

LAS ENZIMAS EN LOS ALIMENTOS

Su importancia
en la química y la tecnología
de los alimentos



Prof. Dr. Hermann Schmidt-Hebbel
Prof. Irma Pennacchiotti Monti

EDITADO POR FUNDACION CHILE

Prof. Dr. Hermann Schmidt-Hebbel
Prof. Irma Pennacchiotti Monti
Inscripción Propiedad Intelectual N° 55.845
1.000 ejemplares
Septiembre 1982

Impreso en los Talleres de
ALFABETA IMPRESORES
Lira 140, Santiago - Chile

INDICE DE MATERIAS

	Pág.
Introducción	7
I. Bosquejo histórico de la investigación sobre enzimas	9
II. Generalidades sobre enzimas	13
III. Clasificación de las enzimas	27
IV. Métodos generales para la obtención industrial de enzimas	31
V. Enzimas en Tecnología de alimentos	37
VI. Aspectos sanitarios y legales del uso de enzimas en la industria alimentaria	45
VII. Aplicación de preparados enzimáticos en las diferentes industrias alimentarias	49
VIII. Descripción de técnicas de análisis de enzimas en alimentos	65
Determinaciones analíticas de:	
Peroxidasa	66
Catalasa	71
Reductasa	73
Fosfatasa	74
Polifenoloxidasa	76
Pectino-esterasa	78
Enzimas proteolíticas	78
Amilasa	80
Celulasa	81
Invertasa	82

Lactasa	83
Glucosa-oxidasa	84
Lipasa	86
Lipoxidasa	87
Ureasa	88
Unidades para algunas enzimas	89
Referencias bibliográficas	91

INTRODUCCION

Junto a algunos elementos trazas, las enzimas pueden calificarse como biocatalizadores que son capaces de producir efectos máximos al actuar en cantidades mínimas.

En el ámbito de la bioquímica de los alimentos la enzimología es quizás uno de los campos que se ha desarrollado más rápidamente en los últimos años.

Los amplios estudios realizados en esta área han puesto en evidencia la importancia de los procesos enzimáticos en la elaboración y conservación de los alimentos. Fenómenos tan importantes en la tecnología actual, como las reacciones de pardeamiento enzimático (frutas), de rancidez (grasas y aceites), de coloración (vegetales verdes), de textura (salsa de tomate) son ejemplos muy conocidos de la intervención de enzimas.

Estas sustancias catalizadoras de los procesos vitales pueden presentarse extraordinariamente activas durante el período posterior a la cosecha (alimentos vegetales) y los cambios que ellas determinan pueden influir en forma considerable sobre los caracteres organolépticos, textura y presentación del producto terminado.

Así como hay enzimas perjudiciales que deben ser inactivadas en el momento oportuno, hay otras que la tecnología de los alimentos utiliza para una mejor preparación del alimento, como lo son las enzimas de filtración o de clarificación, las enzimas proteolíticas, para ablandar las carnes. la glucosa-oxidasa, que permite eliminar la glucosa de ciertos alimentos, para evitar su pardeamiento posterior.

También ha sido motivo de interesantes estudios la adición de enzimas de acción aromatizante a los alimentos o bebidas que durante su procesamiento han sufrido en su aroma pero han conservado sus precursores, permitiendo, de este modo, restaurar sus componentes aromáticos originales.

Se ha estimado de interés preparar la presente publicación con el fin de entregar en forma concentrada y sistemática antecedentes sobre la acción de las enzimas en los alimentos, la aplicación de las diferentes enzimas en las diversas industrias de alimentos y bebidas y las técnicas para determinar las

principales enzimas en los alimentos, al usarlas para el análisis y control de los alimentos.

Con el objeto de facilitar el uso de la obra en la práctica industrial, se ha estimado conveniente ordenar en la parte tecnológica la aplicación de las enzimas de acuerdo con la respectiva industria en que han de prestar sus servicios.

Por su naturaleza, esta publicación está dirigida a los técnicos y especialistas relacionados con la investigación y la elaboración de alimentos, como igualmente a los profesionales y estudiantes de agronomía, medicina veterinaria, nutrición, bioquímica, química y farmacia e ingeniería en alimentos.

Expresamos nuestros sinceros agradecimientos al *Prof. Dr. Mario Sapag-Hagar* por su valiosa colaboración en la redacción del primer capítulo de esta obra.

LOS AUTORES

I

BOSQUEJO HISTORICO DE LA INVESTIGACION SOBRE ENZIMAS



Desde las ruinas de Troya y las pirámides de Egipto vienen evidencias del uso de *levaduras* como agentes esponjantes para la fabricación del *pan* y, por otra parte, también en Babilonia y Egipto se sabía cómo aplicar la levadura para hacer fermentar la cerveza.

La ilustración que encabeza estas líneas corresponde a un tallado en madera sobre una sepultura egipcia de 2.300 años a.C., precisamente sobre estos dos productos, en cuya elaboración intervienen procesos enzimáticos.

Por otra parte, las palabras en alemán e inglés para pan (*Brot-bread*) y cerveza (*Bier-beer*) derivan, según algunos, etimológicamente, de una misma antigua raíz germánica, que tendría su origen en el proceso de la *fermentación*. Esto coincidiría, además, con el hecho de que hasta fines del siglo pa-

sado el desarrollo de ambas tecnologías corría de cierto modo en forma pareja, no siendo raro el caso que un maestro en panificación entendía también en cervecería y al revés.

En nuestro continente una primera información sobre la aplicación de enzimas en tecnología de alimentos proviene de Hernán Cortés, al señalar que los indios mexicanos ablandaban sus carnes dejándolas envueltas durante la noche en hojas de papaya (ricas en papaína).

Durante siglos la fermentación, la putrefacción y la digestión fueron consideradas como procesos idénticos. La palabra fermento con que se designó en un principio a estas sustancias proviene del término latín "fermentum" = levadura o (según otros) de "fervere" = hervir, debido al desprendimiento gaseoso que acompaña a procesos enzimáticos, como la fermentación alcohólica.

Sin embargo, desde hace algo más de 100 años el término de fermento se ha ido substituyendo, también a nivel internacional, por el de "enzima" (aplicado por Kühne, en 1878), proveniente del griego "en zyme" = en levadura o, según otros, del término griego: "zymos" = zumo. Esta última acepción de la palabra "enzima" confirma la inexactitud de la antigua clasificación que se había hecho entre "fermentos figurados o celulares" y "no figurados, solubles o enzimas". En efecto, fue Eduard Buchner quien comprobó mediante su brillante experiencia (que le valió el Premio Nobel de 1907) que la fermentación alcohólica lograda por el zumo de expresión de la levadura se realizaba por la "zimasa" independientemente de toda célula viva. La portada de este libro ilustra la prensa hidráulica usada por Buchner para exprimir el contenido celular de la levadura. Actualmente se han aislado doce enzimas que se encuentran involucradas en el complejo proceso de la fermentación alcohólica.

Etapas que constituyen verdaderos hitos en la evolución progresiva de la investigación sobre enzimas fueron, sin duda, las siguientes:

- descripción, ya en 1526, de fenómenos relacionados con la fermentación por el famoso yatroquímico *Paracelso*, que se adelantara a su época por sus múltiples y reformadoras ideas científicas;
- observación hecha en 1783 por el naturalista y fisiólogo *L. Spallanzani* de que la carne era digerida por el jugo gástrico de animales;
- descripción por *J. Liebig* y *F. Wöhler*, en 1837, de la emulsina de las almendras (9 b);
- aislamiento, a partir de raíces vegetales de una primera enzima —peroxidasa— capaz de azulear la tintura de guayaco, realizado por *Planche* a comienzos del siglo 19;
- estudio de la invertasa de la miel, hecho por *H. Erlenmeyer*, en 1874;
- elaboración de un primer preparado enzimático aminolítico de origen microbiano, patentado por *Takamine* en Japón, en 1884;
- obtención de una primera enzima en forma cristalina: la ureasa, a partir de la soya, lograda por *Sumner* en 1926;
- mejoramiento de las técnicas de purificación y caracterización de un centenar de enzimas, lo que condujo a una verdadera "ingeniería enzimática" en los 30 años siguientes;
- reconocimiento de la secuencia aminoacídica en una serie de enzimas importantes en la década del 60.
- comprobación de la estructura tridimensional de la lisozima por análisis de rayos X, en 1965;

-- síntesis química completa de una enzima con actividad de ribonucleasa, realizada por *Merrifield*, a fines de la década del 60.

Con este acontecimiento se ha logrado, en cierto modo, la meta final en la evolución histórica de la investigación enzimática.

La importancia *actual* de las enzimas en la tecnología alimentaria queda de manifiesto por el hecho que, según las estadísticas de 1976, del volumen del mercado mundial de las enzimas, las dos terceras partes son consumidas para la elaboración y el control de los alimentos (1).

Por otra parte, según la invitación al Simposio Internacional sobre la utilización de enzimas en Tecnología Alimentaria, que tuvo lugar en Versailles, en mayo de 1982, las biotecnologías enzimáticas están adquiriendo un interés considerable, debido a la especificidad de su acción, la limitación de sus riesgos de polución y la posible economía de energía que a veces involucra su aplicación (2).

El carácter biocatalítico de las enzimas, al cual hace alusión la frase inicial de este libro, se justifica por el hecho de que estos agentes posibilitan, en las condiciones moderadas de su medio ambiente natural, la realización de múltiples reacciones que en el laboratorio o en la industria se logran, a velocidad equivalente, sólo por aplicación de agentes físicos (temperatura, presión) químicos (ácidos, álcalis) más o menos violentos.

II

GENERALIDADES SOBRE ENZIMAS

PROF. DR. MARIO SAPAG-HAGAR
PROF. DR. HERMANN SCHMIDT-HEBBEL

1. LAS ENZIMAS COMO CATALIZADORES BIOLÓGICOS.

1.1. Definiciones y Unidades de actividad (3, 5, 6).

Las enzimas son biocatalizadores complejos de gran especificidad y eficiencia, producidos por las células de organismos vivos, que aumentan la velocidad de las reacciones biológicas a través de vías bien definidas y cuya actividad está sujeta a regulación. Las sustancias sobre las que actúan las enzimas, transformándolas, se denominan *substratos*.

La actividad de las enzimas se expresa generalmente por la velocidad de la reacción catalizada, a través de las siguientes UNIDADES:

UNIDAD INTERNACIONAL DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA: Es la cantidad de enzima que cataliza la transformación de *1 micromol de substrato por minuto*, bajo condiciones bien definidas (condiciones estándar). Esta es la expresión básica de la velocidad de la reacción. Se ha sugerido que la temperatura debe ser, en lo posible, de 30°C y que las otras condiciones, tales como pH y concentraciones de substratos, debieran ser las óptimas para la actividad enzimática.

KATAL (símbolo: kat): Es la cantidad de enzima que cataliza la transformación de *1 mol de substrato por segundo*. Esta unidad ha sido introducida recientemente por la Unión Internacional de Bioquímica $1 \text{ kat} = 6 \times 10^7$ unidades internacionales.

La *Unidad Anson* se ocupa cuando se usa hemoglobina como substrato: 1 Unidad Anson = aquella cantidad de enzima que, bajo las condiciones del test, libera 1 mmol (1 milimol = 10^{-3} mol) de aminoácidos positivos al reactivo de Folin por minuto, calculados como tirosina. La *miliunidad Anson* corresponde a 1 μmol ($= 10^{-6}$ mol) de tirosina.

(El R. de Folin — Ciocalteu para fenoles contiene tungstato y molibdato de sodio, sulfato de litio, HCl, H_3PO_4 y bromo y da color violeta con los aminoácidos fenólicos) (36,76).

ACTIVIDAD ESPECÍFICA: Es el número de unidades de enzima por mg de proteína. Es una medida muy utilizada para expresar la actividad de preparaciones enzimáticas.

ACTIVIDAD MOLECULAR (número de recambio): Es el número de moléculas de sustrato, transformadas, por minuto, por una molécula de enzima. Se calcula dividiendo la velocidad máxima de la enzima por el peso molecular; es una característica de las enzimas individuales y no refleja la pureza de la preparación.

Si la enzima respectiva contiene un grupo prostético, una coenzima o un centro catalítico (véanse éstos más adelante), cuya concentración sea medible, la actividad enzimática puede expresarse también por el número de moléculas de sustrato, transformadas por minuto, por cada centro catalítico (10).

1.2. Estructura de las enzimas.

Son proteínas cuyo peso molecular cubre un amplio rango. Por ej., la ribonucleasa, que hidroliza los ácidos ribonucleicos, tiene un PM de 13.700 daltons y está constituida por una sola cadena polipeptídica de 124 aminoácidos. En cambio, la aldolasa, una enzima implicada en el metabolismo de la glucosa, está constituida por 4 subunidades de 40.000 daltons cada una.

1.3 Cofactores y Coenzimas (4-9).

Existen enzimas cuya función catalítica se debe exclusivamente a su naturaleza proteica, pero hay otras en que sus propiedades catalíticas, aunque relacionadas con su naturaleza proteica, dependen para su actividad óptima de la presencia de una estructura no proteica y termoestable llamada *cofactor*. Los cofactores pueden ser simples iones inorgánicos (Zn^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} , Na^+ , K^+) o sustancias orgánicas más o menos complejas. Cuando los cofactores orgánicos están fuertemente unidos a la proteína enzimática (por enlace covalente) y son específicos para esa enzima, se denominan *grupos prostéticos* (p. ej., el grupo de la hemoglobina). Si los cofactores orgánicos están más débilmente unidos (interacción no covalente) a la proteína y por ello no se asocian a ella permanentemente (generalmente se unen sólo en el curso de la reacción), se denominan *coenzimas*. La mayoría de estas coenzimas derivan de las vitaminas, especialmente las del complejo B. Muchas deshidrogenasas requieren la coenzima nicotinamida-adenina-dinucleótido (NAD^+) o su derivado de fosfato ($NADP^+$), las cuales provienen de la niacina. El ácido pantoténico es un componente esencial de la coenzima A, la cual funciona como un transportador transitorio de grupos acilo en el metabolismo. La biotina es un transportador de CO_2 en las enzimas que catalizan ciertas reacciones de carboxilación y decarboxilación. El ácido tetrahidrofólico, una forma reducida de la vitamina, el ácido fólico, participa en las reacciones de transferencia de grupos de un átomo. La vitamina B12, en su forma de coenzima, funciona en la transferencia de grupos alquilo de ciertas reacciones enzimáticas.

En el lenguaje corriente de la enzimología, el componente proteico se denomina *apoenzima* y el complejo completo de proteína y cofactor se llama

holoenzima. Generalmente la apoenzima es inactiva como catalizador. Algunas enzimas requieren dos o tres cofactores distintos y corrientemente uno de ellos es un ion metálico.

1.4. *Substratos de Enzimas.*

Constituyen las sustancias que son transformadas específicamente por las enzimas.

Se usan para medir la actividad catalítica de las enzimas y, secundariamente, también para determinar el carácter específico de una acción enzimática.

Para que una sustancia sea apropiada como *substrato* de una enzima debe reunir los siguientes requisitos:

- a) Que experimente una *transformación bien definida* por la acción catalítica de la enzima;
- b) Que sea *específica* para la enzima respectiva o el grupo muy restringido de enzimas. Ej.: el almidón para las alfa- y beta-amilasas;
- c) Que según las condiciones del ensayo, previamente fijadas, no sufra una descomposición espontánea o produzca *otras reacciones* no catalizadas por la enzima;
- d) Que la *transformación* del substrato que es catalizada por la enzima, sea fácilmente *medible*. Ejemplos son los siguientes:

- formación estequiométrica de un producto coloreado;
- una modificación definida en la absorción al ultravioleta (ej.: $\text{NAD}^+ \rightarrow \text{NADH}$);
- liberación de un ácido o de un álcali que sean medibles por titulación (ej.: liberación de carboxilos en la pectina por la pectino-esterasa);
- si no se dan estas posibilidades, por acoplamiento con otras reacciones químicas o enzimáticas, llamadas reacciones indicadoras (por ej.: la reacción química (de fosfatasa en leche), del fenol liberado con la dibromoquinon-clorimida para dar indofenol, de color azul).

Otro ejemplo de una segunda reacción enzimática acoplada es la transformación específica de la glucosa por la *glucosa-oxidasa* en D-glucono-delta-lactona y peróxido de hidrógeno. Este último es desdoblado por adición de peroxidasa con liberación de oxígeno, reconocible por un reactivo cromógeno, que actúa como donador de hidrógeno, como la orto-toluidina o la para-anisidina; midiéndose, finalmente, la intensidad de la coloración resultante.

Los *substratos enzimáticos* pueden tener dos orígenes:

- Substratos naturales de las respectivas enzimas, como por ej., el almidón (para amilasas) o el etanol (para la alcohol dehidrogenasa);
- *Derivados* de substratos naturales, obtenidos por síntesis con una estructura química tal que aún son reconocidos y transformados por la respectiva enzima con formación de productos, ya sea coloreados o fácilmente medibles por otro mecanismo. Ejemplos son: 4-nitroanilidas de aminoácidos, para proteasas, y
- nitrofenil-derivados de azúcares, para glucosidasas.

2. PROPIEDADES GENERALES DE LAS ENZIMAS

Ya hemos mencionado que las enzimas, por ser proteínas, tienen pesos moleculares altos. Esto hace difícil su caracterización por métodos físicos o químicos.

2.1. Efecto de la temperatura sobre las enzimas (3,6).

Puesto que la estructura proteica es la que determina la actividad enzimática, cualquier causa que perturbe esta estructura puede llevar a una pérdida de actividad. Aunque el rango general de temperaturas adecuadas para las reacciones enzimáticas es muy estrecho, los cambios ligeros suelen tener una considerable influencia. La *temperatura óptima* para la mayoría de las reacciones enzimáticas está, con pocas excepciones, entre 30°C y 40°C, en que la actividad es máxima. Al aumentar la temperatura, la velocidad de reacción aumenta y, para casi todas las enzimas, un incremento de 10°C duplica e incluso triplica la velocidad de reacción. Por otro lado, sin embargo, ese mismo aumento de temperatura acelera también la inactivación de la enzima por desnaturalización térmica. Para muchas enzimas la región de inactivación térmica extensiva está muy próxima de la temperatura óptima.

Las enzimas muestran, a menudo, una marcada fragilidad térmica. Cuando se calientan a temperaturas superiores a los 50°C la mayoría de las enzimas, pero no todas, se denaturan, y unas pocas muestran desnaturalización cuando se enfrían aproximadamente a 5°C. A temperaturas bajas, aunque la actividad enzimática procede muy lentamente, ella no se detiene del todo, hecho que debe tenerse en cuenta en la industria congeladora de alimentos. A menos que se inactiven previamente las enzimas objetables, la mayoría de los alimentos congelados experimentan un considerable deterioro después de un almacenamiento prolongado, porque a temperaturas tan bajas como -18°C algunas reacciones enzimáticas siguen teniendo lugar. Habitualmente la desnaturalización a alta temperatura es irreversible, debido a que se rompen las fuerzas débiles de enlace al aumentar la vibración térmica de los átomos componentes, fenómeno que daña la estructura tridimensional.

Es importante señalar que una misma enzima, aislada de tejidos diferentes, puede tener diferente capacidad de resistencia a la desnaturalización suave por el calor, hecho que es útil con fines de identificación o de diagnóstico.

Otras aplicaciones de la desnaturalización por el calor son la esterilización de alimentos e instrumentos y la pasteurización de la leche; ambos procesos dependen de la destrucción rápida por calor de las enzimas esenciales de los microorganismos contaminantes.

La mayoría de las enzimas son, pues, muy termolábiles y habitualmente es suficiente aplicar una temperatura de 40 a 80°C por 2 a 5 minutos, a fin de destruir su actividad.

Es este hecho de inactivación completa de las enzimas el que se utiliza ampliamente en la industria alimentaria. En la mayor parte de los casos de preservación de alimentos, es deseable que no haya continuación alguna de actividad enzimática.

Si ello ocurriera se podría producir, por ejemplo, un cambio en el color de la clorifila o de los carotenoides, o producirse el pardeamiento de varios alimentos; podría alterarse el sabor de los hidratos de carbono, o producirse

la rancidez de las grasas. También la persistencia de actividad enzimática podría provocar cambios en el aroma o en el valor nutritivo de las proteínas (o de las vitaminas) y, finalmente, la presencia de enzimas pectinolíticas puede producir un cambio total en la textura de los alimentos.

El tratamiento con calor es, sin duda, un método adecuado para la destrucción de microorganismos que alteran los alimentos (esterilización por calor y pasteurización). De esta manera un procesamiento térmico adecuado puede lograr simultáneamente la preservación microbiológica y la estabilización de los alimentos. A veces la actividad residual de una enzima (no necesariamente objetable) se usa como prueba de la suficiencia de un proceso de tratamiento con calor.

Así, la ausencia de actividad fosfatásica de la leche es un buen indicador de si la leche ha sido pasteurizada adecuadamente, ya que esta enzima se inactiva completamente por la dosis de tratamiento térmico necesaria para destruir agentes patógenos.

Las enzimas difieren ampliamente en su resistencia a la inactivación térmica. Las peroxididas vegetales son particularmente estables (120°C por unos minutos no son suficientes para destruirlas del todo). La velocidad de inactivación térmica depende también del pH, fuerza iónica y del estado físico de la enzima en el material alimentario: si la enzima está igualmente bien distribuida por todo el producto o adsorbida sobre partículas sólidas (como ocurre con las enzimas pectinolíticas y las fenolasas, las cuales están adsorbidas en la pulpa de varios jugos de frutas).

Existen situaciones en la tecnología de alimentos en las que algunas enzimas, a pesar de haber sido inactivadas, se "regeneran" y su actividad se renueva después de cierto tiempo. Este tipo de regeneración enzimática ha sido observada en los casos de peroxididas (leche, verduras); catalasa (verduras); lipasa (productos de la leche) y enzimas pectinolíticas (jugos cítricos). La regeneración sería el resultado de una reorganización, al menos parcial, de la molécula proteica, restableciéndose las estructuras de los sitios activos que habían sido alterados por la desnaturalización.

La reversión de la desnaturalización es un proceso lento, pero durante el almacenamiento prolongado de los alimentos procesados habría tiempo suficiente para la regeneración, detectable, de algunas enzimas. De esta manera, la estabilidad de los alimentos con respecto al daño de éstos por las enzimas es una función tanto de la "profundidad" de la inactivación térmica como del tiempo y condiciones de almacenamiento.

2.2. Efecto de las radiaciones (3).

Las enzimas se afectan también por irradiación con ondas electromagnéticas. La inactivación por luz ultravioleta se debería a la fotólisis de grupos disulfuro y aromáticos de los aminoácidos que constituyen las proteínas. La inactivación de la pepsina se atribuye a la oxidación del grupo fenólico de la tirosina. Estos efectos sobre las enzimas son de escaso rendimiento, por lo que la luz ultravioleta no es de aplicación práctica, desde este punto de vista, en la tecnología alimentaria.

En cambio, la irradiación de los alimentos con radiaciones ionizantes (radiaciones beta, gamma, etc.) es de considerable importancia en el procesamiento de alimentos y ya está en uso en escala comercial. Uno de los mayores problemas en este campo es el hecho de que la destrucción de las enzimas requiere de dosis de radiación mucho más elevadas que para la des-

trucción de los microorganismos. En algunos casos es más práctico utilizar en forma combinada calor e irradiación para inactivar enzimas.

La actividad lipoxidásica puede reducirse al 67% de su valor inicial por irradiación a pH7 con 9×10^4 rad. Existe una pérdida adicional postradiación. Si la enzima se irradia y luego se calienta, el efecto de ambos tratamientos es sinérgico. Si la enzima se calienta primero y luego se irradia, el efecto es meramente aditivo.

2.3. Efecto de la humedad (3,4).

En los alimentos, al igual que en cualquier sistema biológico, el agua es uno de los componentes más importantes.

Por ser un solvente, el agua sirve para poner en contacto a las diversas moléculas que interactúan. Además, la reactividad de muchas sustancias depende de la disociación iónica y de la configuración molecular y, por lo tanto, de la hidratación. El agua es a menudo uno de los reactantes o uno de los productos de la reacción.

Hoy se sabe que la influencia del agua sobre la reactivación del sistema no está relacionada sólo con el contenido real de agua, sino también con el estado de las moléculas de agua.

La disponibilidad de agua es una función tanto del *contenido* como del *estado* y se expresa adecuadamente por el concepto denominado "actividad del agua" (α) que equivale a la relación entre la presión de vapor de agua sobre el sistema (p) y la presión de vapor del agua pura (P_0) a la misma temperatura:

$$\alpha = \frac{P}{P_0}$$

Si los alimentos fueran simples mezclas de agua con sustancias inertes que no interactúan de ninguna manera con las moléculas de agua, la actividad del agua sería siempre 1, cualquiera sea el contenido de agua.

Los alimentos son sistemas en los cuales parte del agua está fuertemente absorbida sobre la superficie de sustancias poliméricas (proteínas, carbohidratos macromoleculares). Esto queda claramente establecido por el hecho que la presión de vapor del agua sobre un alimento con un contenido de humedad bajo o intermedio es considerablemente menor que el que predice la Ley de Raoult. Esto se conoce como "agua ligada". En estos casos, la actividad del agua es inferior al valor que le correspondería por su concentración. Una de las razones para este efecto es el hecho que el "agua libre" está parcialmente atrapada en la estructura porosa del alimento y, por lo tanto, está sujeta a la acción depresora de los capilares sobre la presión de vapor. A niveles más altos del contenido de humedad el sistema se comporta en realidad como una solución acuosa. De hecho la concentración molar de los solutos es habitualmente tan baja que la actividad del agua pronto alcanza valores cercanos a la unidad.

La disponibilidad de agua, medida como actividad del agua, tiene una fuerte influencia sobre la velocidad de las reacciones por enzimas, es decir, la actividad enzimática aumenta al aumentar el contenido de "agua libre" y ello ocurre no sólo en las reacciones hidrolíticas, en las que el agua es uno de los reactantes obvios, sino también en las reacciones no-hidrolíticas.

La velocidad de las reacciones enzimáticas se ve fuertemente influida por la naturaleza y concentración de los solventes.

En la práctica es de gran importancia el efecto de la cantidad de humedad de los alimentos sobre la velocidad de la reacción enzimática. Incluso en los alimentos denominados desecados la acción enzimática procede a una velocidad medible.

A niveles muy bajos de humedad, la actividad enzimática puede ser afectada cualitativamente. Es el caso de la α -amilasa que a una humedad del 20% (o 4% de "agua libre") produce principalmente glucosa y maltosa a partir de almidón. A niveles más elevados de humedad se forman también otros oligosacáridos. Quizás lo que ocurre es que a niveles muy bajos de "agua libre", la rigidez del medio impide la difusión de la enzima o del substrato, limitándose así la hidrólisis a aquellas porciones del substrato que están en contacto inmediato con la enzima.

En los cereales y harinas almacenados es posible detectar, fácilmente, actividad lipolítica y proteolítica. A niveles de humedad superiores a 15% esta actividad es debida, generalmente, a las enzimas de los hongos que crecen en el cereal y que pueden participar también en las reacciones hidrolíticas, desarrollándose amargor o rancidez por la acción enzimática sobre la fracción proteolítica o lipídica durante el almacenamiento.

Los métodos modernos de liofilización de carnes y verduras han introducido problemas similares a estas industrias. La actividad enzimática se determina generalmente en estos casos por métodos autolíticos, ya que la velocidad de la reacción enzimática es baja. Por ejemplo, en el músculo de cerdo liofilizado se usa la desaparición del glicógeno muscular como un índice de actividad enzimática a diferentes niveles de humedad.

2.4. Efecto del pH y del estado iónico (3,6).

La actividad enzimática guarda también relación con el estado iónico de la molécula y, especialmente, de la parte proteica, puesto que las cadenas polipeptídicas contienen grupos que pueden ionizarse (principalmente grupos carboxilos y aminos de los aminoácidos constituyentes) en un grado que depende del pH existente. Como ocurre con las proteínas, las enzimas poseen un punto isoeléctrico al cual su carga libre neta es cero. El pH del punto isoeléctrico, como regla, no es igual al pH al cual se observa actividad máxima. El pH óptimo de las enzimas varía ampliamente; la pepsina, que existe en el medio ácido del estómago, tiene un pH óptimo de alrededor de 1,5, mientras que la arginasa tiene un pH óptimo de 9,7. Sin embargo, la gran mayoría de las enzimas tienen un óptimo entre pH 4 y 8. Algunas enzimas muestran una amplia tolerancia a los cambios del pH, pero otras trabajan bien sólo en un rango estrecho. Cualquier enzima que se someta a valores extremos de pH, se desnaturaliza. Esta sensibilidad de las enzimas a la alteración del pH es una de las razones por la que la regulación del pH del organismo es controlada celosamente y explica por qué las desviaciones de la normalidad pueden implicar graves consecuencias.

Muchas enzimas existen en el organismo a un pH más bien alejado de su valor óptimo. Esto se debe, en parte, a la diferencia del medio ambiente "in vivo" con respecto al "in vitro". Esto recalca también que el control del pH puede representar un importante medio para regular la actividad enzimática.

Las proteínas sufren cambios en su solubilidad, presión osmótica y viscosidad a diferentes valores de pH. Es probable que el cambio en la actividad enzimática, al variar los valores de pH, se deba a los cambios en la

ionización ya sea de la enzima, del sustrato o del complejo enzima-sustrato.

Al determinar la velocidad de reacción de una enzima y para cierta concentración de sustrato, a diferentes valores de pH, se observa que la curva resultante tiene forma de campana. Se le denomina *curva de pH : actividad*. Esta curva no caracteriza, necesariamente, a una enzima, puesto que el pH óptimo puede variar para diferentes sustratos, ni tampoco son similares las curvas de pH:actividad para dos enzimas que hidrolizan el mismo enlace en un sustrato. Por ejemplo, las pectinometilesterasas hidrolizan específicamente los enlaces éster de polimetilgalacturonatos. La pectinometil-esterasa obtenida de un hongo tiene un pH óptimo de 5,0; la de frejoles tiene su óptima actividad a pH cercano a 8,5.

Estas diferencias sobre los pH óptimos de enzimas que actúan sobre sustratos similares es de la mayor importancia en el procesamiento de alimentos. Una enzima tiene que tener buena actividad proteolítica a un pH de 4,5 a fin de ser una enzima a prueba de congelación, o a niveles de pH superiores a 5,5 para ser un buen ablandador de carne. Para la mayoría de las aplicaciones prácticas, el pH del alimento no puede ser ajustado como para adecuarlo al pH óptimo de una enzima determinada. La enzima debe escogerse en base a su actividad al pH natural del alimento. Existen algunas excepciones notables en que es factible y práctico el ajuste del pH. Para la producción de glucosa, la pasta de almidón se ajusta a un pH entre 5 y 7 para la hidrólisis óptima por la alfa-amilasa bacteriana. En cambio, el pH se ajusta entre 4 y 6 para la óptima sacarificación por la amilasa de hongos o de cereales.

La velocidad de inactivación de las enzimas varía para los diferentes valores de pH y, por lo tanto, un alza en la temperatura puede cambiar el pH óptimo. Así, en la industria de cereales el aumento de temperatura hace variar el pH óptimo de la beta-amilasa hacia valores más altos de pH. Puede aplicarse una variación intencional del pH para destruir específicamente una enzima como, por ejemplo, la inactivación diferencial de alfa-amilasa y proteasas en preparaciones enzimáticas de hongos.

Es necesario recalcar, sin embargo, que el término "pH óptimo" no tiene una significación físico-química bien definida. Es mejor, en general, referirse a un rango de pH favorable para una reacción dada. Este rango depende no sólo de la naturaleza de la enzima particular, sino también del sustrato y de la concentración de éste, de la estabilidad de la enzima, de la temperatura y de la extensión del período de reacción.

2.5. Sitio activo y especificidad enzimática (5,8).

Algunas enzimas tienen una especificidad prácticamente absoluta para un determinado sustrato y no atacarán ni siquiera a moléculas muy relacionadas. Por ejemplo, la enzima aspartasa cataliza la adición reversible de amoníaco al doble enlace del ácido fumárico, pero a ningún otro ácido no saturado. La aspartasa también presenta una rígida estereoespecificidad y especificidad geométrica; por eso no desamina D-aspartato ni adiciona amoníaco al maleato, que es el isómero geométrico-cis del fumarato. Otro ejemplo de especificidad absoluta es el de la maltasa verdadera, que sólo desdobla al azúcar maltosa. En el otro extremo están las enzimas que tienen una especificidad relativamente amplia y actúan sobre muchos compuestos que presentan una característica común. Por ejemplo, la fosfatasa de riñón ca-

taliza la hidrólisis de muchos ésteres diferentes del ácido fosfórico, pero a velocidades variables. Otro ejemplo lo constituyen las lipasas, que pueden romper la unión entre el ácido y el alcohol en el lípido, en tanto ésta sea una unión éster (desdoblan igual etilbutirato que un triglicérido).

Del estudio de la especificidad de las enzimas por el sustrato surgió la idea de que existe una relación complementaria tipo llave-cerradura entre la molécula de sustrato y un área específica sobre la superficie de la molécula de la enzima, denominada el *sitio activo* o *sitio catalítico*, al cual se une la molécula del sustrato, mientras experimenta la reacción catalítica.

Dos características estructurales determinan la especificidad de una enzima por su sustrato: a) el sustrato debe poseer el enlace químico específico o unión, que puede ser atacado por la enzima, y b) el sustrato debe tener habitualmente algún otro grupo funcional, un grupo de unión, que se une a la enzima y ubica en posición a la molécula de sustrato de modo que el enlace susceptible se disponga apropiadamente en relación al sitio activo de la enzima.

2.6. Isoenzimas (6,9).

Los isoenzimas constituyen formas moleculares múltiples de una misma enzima que catalizan fundamentalmente la misma reacción, pero difieren en sus propiedades químicas, físicas, estructurales o inmunoquímicas; se originan estas diferencias en su biosíntesis, debido a causas genéticas. Su diferencia radica en la estructura primaria de su proteína, ocurriendo como dímeros o tetrámeros, compuestos ya por subunidades idénticas o no.

Muchas enzimas existen en la misma especie o tejido y aun dentro de la misma célula. A menudo limitadas a un órgano, pueden pertenecer, sin embargo, también a organismos diferentes (enzimas isodinámicas).

Uno de los ejemplos más conocidos de isoenzimas es el de la dehidrogenasa láctica que está presente en los tejidos animales en 5 formas, separables por electroforesis. Estas 5 isoenzimas están constituidas por la combinación de dos clases diferentes de cadenas polipeptídicas, de un peso molecular de 33.500 cada una: las cadenas "M" (de músculo) y "H" (de heart, corazón).

Para identificar y diferenciar isoenzimas se usan métodos cromatográficos (en columna); electroforéticos (en papel o gel); inhibidores químicos (ditio-treitol) o los respectivos antisueros contra isoenzimas. Estos últimos representan anticuerpos inhibidores obtenidos por vía inmunológica (de sueros ovinos o caprinos) que actúan generalmente por precipitación en la solución reactiva, al ser insoluble el complejo enzima-antisuero.

La identificación y diferenciación de isoenzimas tiene aplicación en el diagnóstico de ciertas enfermedades para poder localizarlas en un determinado órgano como, por ejemplo, en el infarto cardíaco, mediante las isoenzimas de la creatin-fosfoquinasa (CPK).

3. MECANISMO DE LA CATALISIS ENZIMATICA (5,8).

3.1. La energía de activación y los efectos de los catalizadores.

Una reacción química tal como $A \rightarrow P$ tiene lugar debido a que un cierto número de las moléculas A, en un momento determinado, poseen más

energía que el resto de la población, suficiente para alcanzar un estado "activado", en el cual puede formarse o romperse un enlace químico, para formar el producto P. Se denomina energía libre de activación a la cantidad de energía en calorías que se requiere para llevar todas las moléculas de un mol de una sustancia, a una temperatura dada, al estado reactivo. Por *estado de transición* se entiende el estado, rico en energía, de las moléculas reaccionantes en el tope o cumbre de la barrera de activación, sobrepasada la cual, se produce la reacción.

La velocidad de una reacción química es proporcional a la concentración de las moléculas en estado de transición. La velocidad de una reacción química puede acelerarse, subiendo la temperatura (la cual aumenta el movimiento térmico y la energía, aumentando así el número de moléculas en este estado de transición) o mediante un catalizador, el cual actúa haciendo bajar la energía de activación. Los catalizadores, como las enzimas, se combinan con los reactivos y producen un estado de transición que tiene menos energía libre que el estado de transición de la reacción no catalizada. Ellos no alteran los equilibrios de reacción. Una vez formados los productos de la reacción, el catalizador libre es nuevamente regenerado.

3.2. El mecanismo de la acción enzimática.

No se conoce bien aún el mecanismo preciso de la catálisis para ninguna enzima. Sin embargo, se sabe que los ácidos y bases (es decir, dadores y aceptores de protones, respectivamente) son catalizadores muy versátiles, que pueden aumentar las velocidades de muchos tipos de reacciones orgánicas, tales como la hidrólisis de ésteres y de compuestos fosforilados, la adición de agua a grupos carbonilos, así como la eliminación de agua de los alcoholes para producir compuestos no saturados. Se puede extrapolar esto a las enzimas, las que contienen grupos dadores de protones ($-\text{NH}_3^+$, carboxilos, sulfhidrilos) así como grupos aceptores de protones ($-\text{NH}_2$ y carboxilatos $-\text{COO}$). También los *grupos nucleofílicos* son catalizadores eficaces. Se trata de grupos funcionales ricos en electrones que pueden donar un par de electrones al núcleo de algún otro átomo. Grupos nucleofílicos típicos son los grupos hidroxilo, sulfhidrilo e imidazol, que se sabe están también presentes en las proteínas. Es así que en diferentes enzimas son ciertos grupos funcionales de los aminoácidos integrantes de su molécula proteica los que participan como centro activo en el proceso catalítico, como sucede con el grupo epsilon-amino de la lisina (base de la determinación de la llamada "lisina aprovechable") (11), el grupo sulfhidrónico de la cisteína, el CH_2OH de la serina y el resto imidazólico de la histidina.

4. REGULACION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA (6,8).

4.1. Mecanismos reguladores.

Existen varios:

a) Variaciones por acción de masas.

Es el mecanismo regulador más primitivo y mediante él la velocidad de la reacción puede variarse, alterando la concentración del substrato, del pro-

ducto (si la reacción es lo suficientemente reversible como para que la concentración del producto afecte significativamente la reacción opuesta) o de cualquiera de los cofactores que intervienen estequiométricamente en la reacción.

b) *Variación de la actividad específica de la enzima por activación o inhibición.*

Se ha hecho evidente que las enzimas están sujetas a la regulación de su capacidad catalítica, ya sea en dirección positiva o negativa, o en ambas, mediante moléculas pequeñas que han sido denominadas *efectores* o *moduladores*. Este tipo de sustancias incluye sustratos, productos, metabolitos posteriores a una vía metabólica, precursores de una ruta metabólica e incluso metabolitos que participan en una vía metabólica aparentemente no relacionada.

En la mayoría de los *sistemas multienzimáticos*, es decir, aquellos en que intervienen secuencialmente varias enzimas y en que el producto de una es el sustrato de la siguiente, la primera enzima de la secuencia funciona como reguladora de la velocidad de todo el sistema y se denomina *enzima reguladora* o *enzima alostérica*. Habitualmente esta enzima es inhibida por el producto final de la secuencia, de tal modo que cuando se produce acumulación del producto final por sobre cierta concentración crítica, éste inhibe a la primera enzima de la secuencia (enzima reguladora), interrumpiendo o cerrando así ese segmento del metabolismo. Este tipo de inhibición se conoce como *inhibición por producto final* o *retroinhibición* (inhibición "feedback"). Las enzimas reguladoras o alostéricas están formadas por dos a más subunidades, las que tienen sitios de unión no sólo para su sustrato normal, sino también para el metabolito regulador, el cual se denomina efector o modulador alostérico. El sitio de unión para el modulador se denomina *sitio alostérico* y es altamente específico para ese metabolito. Cuando el sitio alostérico está desocupado, la enzima funciona con su velocidad catalítica normal; en cambio, si está ocupado por el metabolito regulador, la enzima sufre una modificación en su conformación a una forma menos activa o más activa, dependiendo de si el modulador es inhibidor o estimulador.

La *inhibición de la actividad enzimática* por moléculas específicas y por iones es importante porque sirve como mecanismo de control mayoritario en los sistemas biológicos. También muchos fármacos y agentes tóxicos actúan inhibiendo a las enzimas. Es más, la inhibición enzimática puede suministrar una idea acerca del mecanismo de la acción enzimática.

La inhibición enzimática puede ser *reversible* o *irreversible*. En la inhibición irreversible, el inhibidor queda covalentemente unido a la enzima o ligado tan fuertemente, que su disociación de la enzima es lenta, produciendo una modificación permanente de algún grupo funcional del sitio activo de la enzima. Ejemplos de los inhibidores irreversibles son las sales de metales pesados y el yodoacetato que se fijan en los esenciales grupos sulfhidrílicos de enzimas y, por otra parte, el di-isopropil-fluorofosfato (uno de los potentes gases tóxicos del sistema nervioso) que inhibe a la enzima acetilcolinesterasa, al unirse a una serina fundamental del sitio activo, bloqueándolo.

La inhibición reversible, en cambio, se caracteriza por un rápido equilibrio entre el inhibidor y la enzima. Ejemplos lo constituyen la inhibición *competitiva* y la *no competitiva*.

Los inhibidores competitivos son aquellos cuya acción puede ser revertida aumentando la concentración de sustrato. Habitualmente tienen una estruc-

tura semejante a la del sustrato y compiten con él, por unirse al sitio activo. Un ejemplo es el malonato, que se asemeja al succinato y por ello inhibe a la succinato-deshidrogenasa.

El inhibidor no competitivo no se une al sitio del sustrato, sino a un grupo de la enzima, que es esencial para su función. La inhibición no competitiva no puede ser revertida por el sustrato. Un ejemplo lo constituye la inhibición de algunas enzimas que contienen Fe, por el cianuro, el cual se combina reversiblemente con el átomo de Fe, dando una forma inactiva.

c) *Variación de la concentración de la enzima.*

Hoy se reconoce que uno de los principales mecanismos reguladores se basa en la alteración de la cantidad absoluta de enzima en la célula. La concentración de la enzima es la resultante entre las velocidades que llevan a su síntesis y a su degradación. Se denomina *inducción* al aumento de la concentración de la enzima por aumento en su síntesis y *represión* a su disminución por disminuir la síntesis. La síntesis de proteínas, y por lo tanto de las enzimas, está regulada primordialmente a nivel de la transcripción del DNA, para dar RNA mensajero. La transcripción de un gen o de un grupo coordinado de genes (lo que se llama un *operón*) puede reprimirse al unirse una sustancia represora a un gen operador que forma parte del operón.

Puede des-reprimirse (o sea, producir inducción) por la presencia de ciertos metabolitos reguladores (moléculas inductoras), que puede ser un sustrato de la enzima codificada por el gen reprimido.

Este tipo de mecanismos reguladores que implica alteración en la velocidad de síntesis de una enzima conlleva una apreciable cantidad de tiempo (desde una hora hasta varios días).

4.2 *Importancia de la inducción y represión enzimáticas para mejorar la calidad de los alimentos: Los biorreguladores (12).*

Actualmente es posible mejorar la calidad nutritiva y las características físicas de las cosechas de alimentos mediante el uso de *biorreguladores*, los cuales permiten manipular la expresión genética de las plantas individuales. El uso de biorreguladores en los frutos cítricos des-reprime genes específicos de los frutos, induciendo la producción de cantidades adicionales de componentes que aumentan su color, sabor, aroma y calidad nutricional (provitamina A). Hay varias clases de biorreguladores que inducen la formación de carotenoides (carotenos, licopeno), cuando se aplican en bajas concentraciones a la superficie del fruto cítrico maduro. Entre ellos están los derivados de las chalconas de la trietilamina y de la dietilnonilamina.

Importancia de los biorreguladores.

a) La inducción de la síntesis de carotenoides puede lograrse, en teoría, en cualquier especie que porte los genes que codifican para las enzimas que sintetizan dichos carotenoides (todas las frutas cítricas, damascos, duraznos, tomates, zanahorias). Esta universalidad de efecto sugiere que los biorreguladores actúan a través de una vía común. La des-represión de un gen específico, pues, puede revertir los efectos de aquellas sustancias químicas que se sabe reprimen los genes que codifican la formación de carotenoides en *Ficomices*.

El único proceso ligeramente comparable es el del uso del etileno para promover la maduración de frutas cítricas y tomates; sin embargo, el etileno es un estimulador amplio, que acelera toda la actividad metabólica en la fruta no madura (77). Los biorreguladores, en cambio, estimulan sólo vías metabólicas específicas en frutas completamente maduras.

b) Podría ser posible encontrar otros biorreguladores para aumentar el contenido de un determinado aminoácido en el maíz o aumentar la concentración de proteínas en el arroz, etc.

c) Los biorreguladores pueden aportar una nueva arma para aprender más acerca de los mecanismos que controlan los genes. Su futuro es muy promisorio, como lo demuestran los recientes trabajos de Yokoyama y su grupo en el laboratorio del Depto. de Agricultura en California (12). Ellos han identificado, además de los biorreguladores ya mencionados, otros que aumentan el aroma, como, por ejemplo, uno que induce 3,5 veces el contenido en citral de los limones maduros, un constituyente de la esencia que contribuye en forma importante al aroma del limón.

III

CLASIFICACION DE LAS ENZIMAS

CLASIFICACION GENERAL

Actualmente, más de mil enzimas han sido aisladas y clasificadas de acuerdo con el substrato específico sobre el cual actúan.

Entre las numerosas clasificaciones, algunas se basan en las reacciones que catalizan las enzimas, otras en el substrato sobre el que actúan e incluso muchas enzimas se designan con nombres triviales de origen histórico.

La comisión de Enzimas de la Unión Internacional de Bioquímica introdujo en 1964, para uniformar la nomenclatura, la siguiente clasificación sistemática, en la cual se consideran 6 grupos principales de enzimas de acuerdo al tipo reacción implicada:

1. *Oxidoreductasas:*

Catalizan una amplia variedad de reacciones de óxido-reducción, empleando coenzimas, tales como NAD^+ y NADP^+ , como aceptor de hidrógeno. Este grupo incluye las enzimas denominadas comúnmente como deshidrogenasas, reductasas, oxidasas, oxigenasas, hidroxilasas y catalasas.

2. *Transferasas:*

Catalizan varios tipos de transferencia de grupos de una molécula a otra (transferencia de grupos amino, carboxilo, carbonilo, metilo, glicosilo, acilo, o fosforilo). Ej.: aminotransferasas (transaminasas).

3. *Hidrolasas:*

Catalizan reacciones que implican la ruptura hidrolítica de enlaces químicos, tales como $\text{C}=\text{O}$, $\text{C}-\text{N}$, $\text{C}-\text{C}$. Sus nombres comunes se forman añadiendo el sufijo -asa al nombre de substrato. Ejs.: lipasas, peptidasas, amila-

sa, maltasa, pectinoesterasa, fosfatasa, ureasa. También pertenecen a este grupo la pepsina, tripsina y quimotripsina.

4. *Liasas:*

También catalizan la ruptura de enlaces (C-C, C-S y algunos C-N, excluyendo enlaces peptídicos), pero no por hidrólisis. Ejs.: decarboxilasas, citrato-liasa, deshidratasas y aldolasas.

5. *Isomerasas:*

Transforman sus substratos de una forma isomérica en otra. Ejs.: Epimerasas, racemasas y mutasas.

6. *Ligasas:*

Catalizan la formación de enlace entre C y O, S, N y otros átomos. Generalmente, la energía requerida para la formación de enlace deriva de la hidrólisis del ATP. Las sintetetasas y carboxilasas están en este grupo.

CLASIFICACION DE LAS ENZIMAS DE LOS ALIMENTOS

Braverman (4) distingue dos importantes grupos de enzimas de los alimentos: las *Hidrolasas* y las *Desmolasas o Enzimas Oxidantes* (3, 14).

1. *LAS HIDROLASAS* comprenden las:

1.1. *ESTERASAS*, entre las cuales son de importancia en los alimentos:

- a) *Lipasas*, que hidrolizan los ésteres de ácidos grasos;
- b) *Fosfatasas*, que hidrolizan los ésteres fosfóricos de muchos compuestos orgánicos, como, por ejemplo, glicerofosfatos, almidones fosforilados;
- c) *Clorofilasas*. En la industria alimentaria debe tratarse de retener el color verde de la clorofila, en el caso de los vegetales deshidratados o en conservas. Por ello puede protegerse el color natural (retención de clorofila de hasta 60%) por los siguientes tratamientos:
 - Pretratamiento por inmersión (ej., arvejas), a temperatura ambiente, en solución de bicarbonato de sodio al 2% por espacio de 30 a 40 min.
 - Escaldado en solución de hidróxido de calcio 0,005 M.
 - Procesamiento en salmuera, que lleva adicionada hidróxido de magnesio (0,020-0,025 M.).

El pH en estos casos se eleva a 8 en el primer tiempo y se mantiene durante el escaldado y la esterilización posterior.

- d) *Pectino-esterasa*, enzima importante en la industria de derivados de frutas (véanse éstas).

1.2 *CARBOHIDRASAS*, que se clasifican en:

- a) *Hexosidasas*, entre las que interesan la invertasa y la lactasa, y
- b) *Poliasas*, que comprenden las amilasas, las celulasas y la poligalacturina o pectinasas, que actúa sobre el ácido péctico o poligalacturónico, dando moléculas de ácido galacturónico, carentes de poder gelificante; de importancia en la elaboración de zumos y néctares de frutas.

1.3 *PROTEASAS*, que se clasifican en:

a) *Proteinasas*, endoenzimas que rompen las uniones peptídicas: -CO-NH de las proteínas, algunas de las cuales son muy resistentes al ataque de la enzima proteolítica, en su estado nativo; por el calor u otros agentes se puede abrir la molécula proteica, de modo que entonces las uniones peptídicas pueden ser atacadas por estas enzimas;

b) *Peptidasas*, que rompen las uniones de los péptidos hasta la liberación final de moléculas de aminoácidos;

c) *Catepsinas*, a cuya acción en el músculo proteico se deben los procesos autolíticos en la maduración de la carne. El tejido vivo tiene un pH desfavorable para la acción de estas enzimas, pero a la muerte del animal baja el pH al acumularse ácido láctico por degradación del glicógeno. Al alcanzar un pH 4,5 se hace óptimo para la liberación y acción de la enzima, apareciendo los respectivos cambios en la textura y demás caracteres de la carne, y

d) *Renina, Quimosina o Fermento Lab*, que se encuentra en el cuarto estómago del ternero alimentado sólo con leche materna y que causa la coagulación de la leche (Véase en "Aplicación de enzimas en la Industria Lechera").

2. *DESMOLASAS O ENZIMAS OXIDANTES.*

Entre ellas son de interés en alimentos:

2.1 *Oxidasas*, que comprenden:

a) *Las Oxidasas Férricas:*

Catalasa, responsable de la pérdida de color y olor de vegetales congelados, y

Peroxidasa, que se encuentra en verduras y frutas cítricas. Su estudio es de gran interés en la industria de alimentos por ser una de las enzimas más estables al calor y requerir mayor tiempo de inactivación, con el agravante de que en ciertas condiciones puede regenerar su actividad con el tiempo;

b) A las *Oxidasas Cúpricas* pertenecen la polifenol-oxidasa, tirosinasa, catecolasa, relacionadas con el Pardeamiento Enzimático (véase éste) y la asórbico-oxidasa.

2.2 *Dehidrogenasas.*

Entre éstas se encuentran las enzimas siguientes:

Xantino-oxidasa, que es una flavoproteína con molibdeno y cataliza la oxidación de xantina y aldehídos como el fórmico, actuando como aceptor de H el azul de metileno, al transformarse en su leuco-derivado; en esto se basa su aplicación analítica en el control térmico de la leche y en la detección de leche de vaca en leche humana, pues esta última no contiene esta enzima;

Lipoxidasa, que cataliza la oxidación de ácidos grasos poliinsaturados y secundariamente también al caroteno de frutas y verduras deshidratadas, a través de los peróxidos formados.

IV

METODOS GENERALES PARA LA OBTENCION INDUSTRIAL DE ENZIMAS

1. Durante siglos las enzimas fueron utilizadas, formando parte de células o extractos crudos de materiales vegetales, animales y microbianos. Así sucedió en forma totalmente empírica, sin conocerse su modo de acción, ni el porqué de su actividad catalítica en la industria de la fermentación como en la cerveza, vino, pan y queso. Aún suele emplearse una enzima útil producida por una bacteria, una levadura o un trozo de tejido, sin siquiera extraerla de las células. Por ejemplo, el *Acetobacter aceti* puede servir para oxidar el alcohol y convertirlo en ácido acético sin purificar antes la oxidasa del alcohol. La levadura fermenta el azúcar y lo convierte en alcohol sin que se efectúe la extracción del complejo cimsa; las muchas otras enzimas que contiene la levadura no estorban la reacción, a causa de que tienen otras actividades específicas.

1.1. El desarrollo de fuentes para producir enzimas de uso en la industria alimentaria, de métodos de aislamiento y purificación y el diseño de reactores enzimáticos, que permiten su aplicación en diversos procesos, ha evolucionado en forma considerable y ha dado origen a un área interdisciplinaria conocida hoy día como "ingeniería enzimática", como nuevo enfoque de la biotecnología (13, 15).

Hoy se ha logrado obtener enzimas más puras, que tienen las siguientes ventajas sobre los productos de fermentación:

- acción más específica en su función catalítica;
- actividad predecible y controlable, y
- es posible utilizar concentraciones más elevadas del sustrato.

1.2. Las principales fuentes de enzimas usadas en la industria de alimentos son de diferente origen:

a) *Vegetal*: Lipasas y pectinoesterasa se elaboran a partir de soya, ricino y frutas cítricas; del germen de trigo se extrae la alfa-amilasa. Las proteasas se obtienen de la papaya, del higo, de la piña y la peroxidasa, del rábano picante;

b) *Animal*: La renina, pepsina, tripsina, quimotripsina, catalasa y lipasa pancreática son de origen animal;

c) *Microbiano*: Las enzimas de los hongos: *Aspergillus flavus*, *orycae* y *niger* y del *Bacillus subtilis* han demostrado ser de gran uso en la industria alimentaria.

2. ELABORACION DE ENZIMAS (19).

2.1. Elaboración de enzimas de origen animal o vegetal.

Si se trata de enzimas de origen *animal* la simple trituración de algunos tejidos especializados, como el páncreas o el hígado, permite formar una papilla, la cual se extrae a continuación con un solvente adecuado como agua, acetona fría (-20°C), glicerina o una solución salina. En forma parecida se procede con los tejidos vegetales, previamente sometidos a trituración o disrupción (rotura). También puede partirse de los jugos de expresión de los respectivos tejidos, cuya estructura celular se destruye por autólisis, plasmólisis (18) o por congelación, la cual revienta las paredes celulares.

2.2. Elaboración de enzimas de origen microbiano (16,17).

Actualmente la tendencia industrial es el reemplazo de muchas enzimas provenientes de tejidos por aquellas que resultan de la aplicación de cultivos de *microorganismos seleccionados*, que generan la enzima específica. La producción de enzimas por microorganismos tiene la ventaja de su costo, generalmente menor, y por realizarse en un período relativamente breve: por ejemplo, 1 a 5 días en el caso de una fermentación discontinua por lotes ("batch"). Además, se puede incrementar el rendimiento de una enzima específica por un determinado organismo, recurriendo a modificar sus condiciones ambientales, o bien, a formar por vía genética cepas mutantes, en las cuales la producción de la enzima puede ser varias veces superior que en la cepa original (15,74).

De este modo procesos de selección, adaptación y mutación han mejorado considerablemente la producción de enzimas a partir de microorganismos.

Las enzimas elaboradas industrialmente son por lo general del tipo degradativo y extracelular, es decir, que son excretadas al medio por el microorganismo que las genera; pues entonces no precisan de la ruptura de las células microbianas para su extracción como es necesario en las enzimas intracelulares de biosíntesis.

2.3. La elaboración de enzimas de origen microbiano comprende diferentes etapas:

2.3.1. *Selección de microorganismos*: Se empieza generalmente por un cultivo de enriquecimiento de la cepa seleccionada. Cultivos originales pueden obtenerse de la firma American Type Culture Collection (ATCC), del

Northern Utilization Research Branch o de otro organismo o instituto reconocido.

2.3.2. *Cultivo*: Las materias primas que sean de costo adecuado y que puedan utilizarse como medio de cultivo varían naturalmente según la enzima por elaborar y pueden ser de los siguientes orígenes (10):

- a) Materias azucaradas o amiláceas, como melaza, jarabe de glucosa, almidones y afrechos de trigo, arroz o maíz;
- b) Materias proteicas, como hidrolizados proteicos, harina de pescado, caseína, gelatina y afrechos de extracción de semillas oleaginosas;
- c) Componentes nitrogenados, como sales de amonio, nitratos, urea;
- d) Sustancias favorecedoras del crecimiento microbiano, como extractos y autolizados de levadura, sales minerales con inclusión de elementos trazas y eventualmente vitaminas.

Fuera de la composición del medio constituyen parámetros importantes que deben controlarse en el cultivo, las condiciones óptimas del caso, en cuanto a temperatura, pH, aereación (para suministrar el oxígeno necesario y evitar exceso de calor de reacción), y velocidad de agitación.

En lo que se refiere a los reactores para realizar la fermentación se distingue entre los *cultivos en superficie* de medios líquidos o semisólidos, usándose ya sea sartenes o tambores rotatorios, y *cultivos en profundidad*, actualmente más usados, mediante tanques agitados, de lecho fijo o de lecho fluidizado (partículas suspendidas y agitadas, lo que facilita su mezcla y circulación) (10, 17).

2.3.3. Terminada la incubación del proceso fermentativo se separa la biomasa junto con el resto de las células y los componentes sólidos del medio de cultivo por filtración o centrifugación. El líquido resultante, generalmente aún bastante heterogéneo, puede utilizarse directamente como preparado enzimático; pero, generalmente, se somete a una purificación y/o aislamiento posteriores, que comprenden diferentes fases y que pueden aplicarse igualmente en las enzimas de origen vegetal o animal.

3. PURIFICACION Y AISLAMIENTO DE ENZIMAS.

3.1. Sin perjuicio que un preparado enzimático puede consistir en el mismo extracto o caldo fermentado que sólo se somete a una clarificación y concentración (preparado líquido) o desecación (preparado sólido) se recurre también a métodos de aislamiento y purificación de enzimas en gran escala, lo cual se logra principalmente por los siguientes procesos:

3.2. *Adsorción selectiva* con hidróxidos de hierro o aluminio coloidales, a cierto pH, pues no todas las proteínas son adsorbidas en iguales condiciones. Una vez adsorbida se lava con agua o solución salina y luego se eluye a pH diferente, generalmente alcalino mediante otra solución salina, por ejemplo, de fosfato.

3.3. Por *precipitación*, en que las enzimas son fraccionadas al reducirse su solubilidad hasta el punto en que precipitan. Esto se logra por adición de sales a cierto pH y a elevada concentración iónica o por solventes orgánicos (alcohol, acetona, isopropanol) a baja temperatura. La sal más usada

es el sulfato de amonio por su alta solubilidad, bajo costo, alta atoxicidad para la enzima y por no afectar mayormente la viscosidad de la solución.

3.4. *Diálisis* por gradientes de concentración a través de membranas semipermeables.

3.5. *Ultrafiltración* por aspiración o presión a través de membranas de porosidad fina como tamiz molecular. Presenta una alternativa interesante para separar enzimas, pues no hay cambio de fases, ni altos gradientes de temperatura (15).

3.6. *Electroforesis* sobre soportes de papel, gel de almidón, agar o dextrano.

3.7. *Fraccionamiento cromatográfico* de tipo preparativo, tanto en capa fina, como en columna con intercambiadores iónicos, geles o tamices moleculares.

Combinando estos procedimientos con otros a base de electroforesis de alta tensión, cataforesis y electrodiálisis se logran actualmente separaciones de mezclas complejas de enzimas.

4. El control de todas estas etapas en su forma más rigurosa, es necesario para asegurar el máximo de rendimiento y reproducibilidad, seguridad y calidad de los productos enzimáticos obtenidos.

5. ENZIMAS INMOVILIZADAS (1, 20, 21).

El enorme número de reacciones catalizadas por enzimas y la especificidad de las enzimas individuales significa que éstas son potencialmente de gran valor industrial. Sin embargo, su costo se agudiza al aplicarlas como reactivos en forma soluble, pues se produce su pérdida, una vez utilizadas. Aunque la enzima por regenerarse en el proceso podría usarse muchas veces, su separación a partir de la mezcla de reacción no es económicamente factible. De allí que ha significado un avance importante la posibilidad de *inmovilizar* las enzimas sobre *soportes inertes*, reteniendo así gran parte de su actividad catalítica original. Como las reacciones enzimáticas se desarrollan en medio acuoso, la matriz del soporte debe ser insoluble en agua, pero tan hidrófila que garantice un buen contacto con el medio de la reacción.

Su aplicación se basa en sus interesantes propiedades:

a) Son térmicamente más estables que las enzimas nativas y más resistentes a la autólisis;

b) Al final de una reacción catalizada enzimáticamente, la enzima enlazada puede separarse por simple centrifugación o filtración, sin necesidad de agregar un reactivo de inactivación o precipitación;

c) Una vez recuperada, la enzima enlazada puede volver a usarse las veces que se desea, sin pérdida sustancial de actividad después de un simple lavado con soluciones tampones acuosas y permitiendo realizar así procesos enzimáticos continuos.

Por lo tanto, se usan también para aislar y purificar enzimas, al separarlas de inhibidores específicos.

5.1. Los métodos para la inmovilización de enzimas comprenden las siguientes técnicas (1, 20):

a) Por *adsorción* de la proteína enzimática por la superficie de una matriz de soporte como silicagel, carbón, aluminio, vidrio poroso o poliaminas. La unión es relativamente débil, pudiendo destruirse por cambios en el pH, la temperatura o la concentración iónica; pero puede estabilizarse si la enzima ya adsorbida se somete a un entramado con glutaraldehído (véase bajo d) como lo es un soporte de resina a base de fenol y formaldehído y luego entramada con aldehído glutárico (72).

b) Por *enlace iónico* en que la molécula de la enzima, cargada electrostáticamente es de carácter polianiónico o policatiónico. También aquí la unión es relativamente débil, pues la carga de la proteína enzimática es pequeña en relación a su masa; sin embargo, puede intensificarse al asociarla a una adsorción.

c) Por *enlace covalente* entre la enzima y el soporte insoluble a través de los diferentes grupos funcionales, capaces de reaccionar, de las enzimas, como $-\text{NH}_2$, $-\text{COOH}$, $-\text{SH}$, y $-\text{OH}$. Portadores pueden ser sustancias *inorgánicas*, como silicagel, caolín, apatita, vidrio poroso, aluminio, hierro; *orgánicas*, como celulosa, almidón, dextrano, colágeno, agar y, especialmente, *polímeros* como de la carboximetil-celulosa, succinil-amino-hexil-celulosa, anhídrido maleico entramado, poliamidas, poliuretanos y poliacrilaminas.

Este enlace es bastante estable y puede realizarse a veces en forma directa con el soporte, después de una eventual modificación de grupos funcionales, capaces de reaccionar con la enzima, o bien se intercala todavía entre la enzima y el portador una molécula intermedia ("spacer") para que la enzima mantenga mayor movilidad y con ello una mayor actividad catalítica.

Así, en el caso de la carboximetil-celulosa transformada en su azida para su pre-activación, forma unión covalente por un enlace amida entre el soporte y el grupo epsilon de la lisina contenida en el polipéptido de la enzima o el grupo amino libre de un aminoácido terminal. En el caso del anhídrido maleico entramado, la unión covalente de la enzima se produce por aminólisis del grupo anhídrido sin preactivación.

d) Por *entramado transversal* (cross-linking), una forma especial de enlace covalente en que las moléculas enzimáticas se enlazan entre sí mediante reactivos bi- o polifuncionales, como el dialdehído glutárico, di-isotiocianato o ácido disulfónico. Su inconveniente es el difícil contacto del substrato con la molécula enzimática, situada en el interior del polímero macromolecular resultante.

También suele asociarse una adsorción con un enlace covalente y un entramado.

e) Por *recubrimiento* en que las enzimas mismas no se inmovilizan, sino que se limita su espacio de reacción, recubriéndolas con una membrana polímera, natural o sintética, que sea semipermeable; es decir, permeable para el substrato y el producto de la reacción, pero impermeable para las moléculas enzimáticas. El recubrimiento puede suceder por una envoltura con una matriz, por ejemplo, de TiO_2 , una separación por ultrafiltro o por una inclusión de la enzima en microcápsulas, permeables al substrato, de bajo peso molecular (73).

Factores como diámetro de poro del soporte de adsorción y carga del soporte y del substrato son parámetros que influyen, según el procedimiento elegido, en la cinética de las enzimas inmovilizadas.

5.2. La enzima así inmovilizada presenta las ventajas de un catalizador sólido y es separada fácilmente de la mezcla de reacción. En algunos casos, especialmente cuando la matriz de soporte es de carácter iónico, las propiedades de la enzima inmovilizada pueden ser diferentes de aquellas que presenta la forma soluble. No cabe duda que estas técnicas de inmovilización de enzimas, iniciadas a comienzos de la década del 60, conducirán a exitosos procesos industriales en el campo de la catálisis industrial por enzimas. Una de las posibilidades más prometedoras en esta área es la de crear sistemas multienzimáticos inmovilizados al unir más de un tipo de enzima en la matriz, como glucoamilasa y glucosa-isomerasa para transformar almidón en fructosa. Es interesante hacer notar, al respecto, que en la naturaleza las endoenzimas, es decir aquellas que operan dentro de las células, están habitualmente inmovilizadas por fijación sobre membranas o sobre partículas sólidas en suspensión (20).

La *lactasa* fúngica para desdoblar la lactosa de leche y suero y la *glucosa-isomerasa* para la obtención de fructosa, son buenos ejemplos del empleo actual de enzimas inmovilizadas en tecnología de alimentos.

V

ENZIMAS EN TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

Como es sabido, todo alimento constituye un complejo sistema biológico, cuyas células se encuentran en equilibrio por acción de las enzimas que encierran. En este contexto, los tejidos provenientes de un organismo animal o vegetal, que después de su muerte por matanza, cosecha o preparación llegan a convertirse en alimentos, contienen todo el conjunto de enzimas que necesitan para su metabolismo, tanto anabólico como catabólico y que persisten después de la destrucción de los tejidos.

1. LOCALIZACION DE ALGUNAS ENZIMAS EN LOS ALIMENTOS.

Es importante conocer la distribución que tienen algunas enzimas en los alimentos. Ellas pueden encontrarse repartidas en diversa forma, como sucede, p. ej., en la fosfatasa de la leche adsorbida por sus glóbulos grasos o bien, disueltas en el alimento como es el caso de las lipasas en grasas y aceites. Por otra parte, las encontramos adsorbidas en las partículas sólidas como es el caso de las enzimas pectolíticas y las fenolasas, que se encuentran adsorbidas en la pulpa; cuando se procede a filtrar, el grado de actividad enzimática disminuye notablemente.

En el trigo, las amilasas están ubicadas en el germen, no encontrándose en la capa de aleurona ni en el salvado. Por otra parte, la actividad proteolítica del higo se encuentra en el látex que está sólo en la porción conocida como receptáculo del higo y no en el área de las semillas (22).

Las catepsinas están localizadas en el lisozoma de las células.

2. INHIBICION DE ENZIMAS DE LOS ALIMENTOS.

Las enzimas pueden inactivarse por el calor, aditivos o componentes naturales de los alimentos.

2.1. Inactivación por calor.

La precocción, escaldado o blanching es el método más conocido y empleado por la industria alimentaria para la inactivación de las enzimas, de modo que las reacciones enzimáticas que inducen los cambios indeseables, no ocurren durante las siguientes etapas de los procesos. Este método consiste en exponer durante un tiempo breve, la materia prima cruda a altas temperaturas por corto tiempo — 3 a 10 minutos — como máximo en el caso de las frutas y se realiza aplicando vapor o por ebullición. La aplicación de vapor tiene la ventaja sobre el agua de que reduce la pérdida de las sustancias solubles en ella como las vitaminas y sales hidrosolubles.

2.2. Inhibición por aditivos (no permitidos).

Algunos están prohibidos precisamente por su acción sobre enzimas importantes:

—*Acido fórmico*: por su poder complejante que inhibe enzimas que contienen Fe^{+++} .

—*Acidos monocloro- y monobromoacético*: por su acción tiolopriva en el sentido de bloquear los grupos sulfhidrúlicos de las enzimas.

—*Acido bórico*: inactiva descarboxilasas, fuera de acumularse en la grasa del organismo.

—*Base de amonio cuaternario*: que activan la citocromo-oxidasa y enzimas digestivas.

—*Acido nordihidro-guayarético*: (NDHA-antioxidante), inhibe las catalasas, peroxidasas, alcohol-dehidrogenasa, fuera de tener una acción alergizante.

2.3. Inhibición de enzimas por componentes de alimentos:

—*Factor antitriptico*, que se encuentra en el poroto de soya, clara de huevo (ovomucoide) y zumo de papa cruda.

—*Solanina o solanidina* (aglicón) de la papa, que inhibe la colino-esterasa, lo que tiene relación con el control de la conducción de los impulsos nerviosos (23).

3. ENZIMAS DE ALIMENTOS QUE DESTRUYEN NUTRIENTES.

—*Lipoxidasa*, destruye los carotenos y la vitamina A de frutas y hortalizas, al actuar sobre los dobles enlaces de compuestos insaturados.

—*Tiaminasa*, destruye la tiamina y se la encuentra en mariscos (ostras) y algunos peces crudos.

4. REGENERACION ENZIMATICA.

En la tecnología alimentaria moderna se deben tener presentes los cambios que pueden ocurrir en los procesos tecnológicos. Así, cuando las enzimas se han inactivado, algunas pueden regenerarse, como es el caso de la peroxidasa, de la fosfatasa y otras. El método de High-temperature-Short-time (HT-ST) como lo dice su nombre, es la aplicación de calor (a alta temperatura), pero por corto tiempo; antes se usaban 115°C por tiempo prolongado, hoy se usan 125°C por corto tiempo. Con ello puede suceder que la enzima no se inactive en su totalidad, no sufre el despliegue total de su estructura proteica helicoidal y así recupera parcialmente su estructura nativa después de las 24 horas de elaborado el producto. Con esto regenera su actividad, en parte, lo suficiente como para que durante el almacenaje resulten efectos dañinos en los alimentos conservados, produciendo mal olor y sabor.

Pero la regeneración de la actividad no está limitada a la denaturalización por calor de la enzima-proteína. Algunas, como la alfa-amilasa obtenida del *Bacillus subtilis*, pueden denaturarse por adición de la urea a la solución de enzima. Alrededor del 80% de su actividad original se regenera colocando la solución en tampón de pH 8,5. Si se elimina el resto de urea por diálisis, se regenera sólo el 40% de la actividad. La regeneración ha sido explicada por algunos autores (24, 25, 26, 27) como la capacidad de la enzima de recuperar su estructura terciaria, por recombinación de las uniones H.

5. ACCION UTIL O DETERIORO EJERCIDOS POR LAS ENZIMAS EN LOS ALIMENTOS.

5.1. Las enzimas pueden ejercer, según las circunstancias del caso, una acción deseada o no deseada, desde el punto de vista de la tecnología de alimentos. Según Reed (3, 28), la diferencia entre un efecto beneficioso o desfavorable sobre los alimentos que pueden resultar de estas acciones enzimáticas puede ser, a veces, sutil, dependiendo de la intensidad de la reacción enzimática; así sucede en el pardeamiento y reblandecimiento de frutas, como también en la disminución de su fibra por celulasas durante su maduración.

5.2. Efectos beneficiosos de la acción enzimática.

Entre éstos pueden mencionarse las complejas reacciones enzimáticas que determinan la rigidez cadavérica y la posterior maduración de la *carne* y productos derivados con las respectivas modificaciones de las características de su tejido muscular (57). Por otra parte, la preparación de la *malta* o cebada germinada, primer paso de la elaboración de la cerveza, se basa en la acción de las amilasas y proteasas propias del cereal en germinación. La elaboración de la *masa del pan* por acción de las enzimas del cereal y de la levadura y la maduración de la *crema*, de los *quesos* y de las *frutas*, son otros tantos ejemplos de procesos que serían imposibles sin la valiosa intervención de enzimas.

A la química de los estimulantes de tipo cafeínico se le ha llamado también la química enzimática, ya que en una u otra forma son enzimas las

que intervienen en la elaboración del *té negro* (polifenoloxidasas y otras), la separación previa de las semillas de *café* de sus frutos (enzimas pectinolíticas) y la compleja fermentación previa de las semillas de *cacao* para desarrollar su sabor y aroma agradables (41).

Por otra parte, también en la tecnología de la preparación de diferentes *especies*, como la pimienta negra, la mostaza, el rábano y la vainilla, el desarrollo de sus características de sabor y aroma se debe a útiles reacciones enzimáticas (33); al igual que el aroma de muchas *frutas* se debe a enzimas que lo generan a partir de sus precursores (véase industria de derivados de frutas y hortalizas).

5.3. *Efectos no deseados o deterioros producidos en alimentos por acción enzimática.*

Entre estos efectos deben mencionarse los fenómenos de *pardeamiento* de los alimentos, los cuales se manifiestan por la aparición de manchas oscuras en el tejido animal o vegetal y pueden tener dos causas bien diferentes, distinguiéndose entre el pardeamiento químico o no enzimático y el enzimático.

5.4. *Pardeamiento químico o no enzimático.*

Alimentos ricos en proteínas y azúcares experimentan la llamada "Reacción de Maillard" (32), quien encontró, ya en 1912, que aminoácidos simples reaccionan en caliente con ciertos azúcares para formar compuestos oscuros semejantes a la melanina. Se ha definido esta reacción como "la reacción de los grupos aminoácidos, péptidos o proteínas con los grupos hidroxil-glucosídicos de los azúcares". La reacción es favorecida por la humedad, la temperatura, algunos metales, como hierro y cobre, y el pH.

Entre las diversas reacciones intermedias tenemos la formación de glicosilamina que es incolora, luego una isomerización conocida como reordenamiento de Amadori y posteriormente la llamada degradación de Strecker, con pérdida de una molécula de CO₂ y formación de hidroximetil-furfural.

Este fenómeno es deseable en algunos productos, como cerveza, corteza del pan, café, pero en otros alimentos no es conveniente, ya que involucra aparte del cambio de color, cambios en el sabor, olor y en la disminución del valor nutritivo, ya que están comprometidos algunos aminoácidos esenciales como la lisina (32). Este pardeamiento se puede evitar mediante bajas temperaturas, bajo pH, descomponiendo la mitad de glucosa que puede estar presente, y el método más usado, que es bloquear el grupo -CO mediante el sulfito de sodio (29).

5.5. *Pardeamiento enzimático (36, 37).*

Aunque el resultado final de este fenómeno de pardeamiento conduce también a polímeros oscuros del tipo de la melanina, semejantes a los que se forman en el pardeamiento no enzimático, el mecanismo de la formación es bien diferente.

El cambio de color en frutas, verduras y tubérculos se observa cuando ellos sufren daño mecánico o fisiológico: cuando se mondan, cortan o golpean. Se debe a la presencia en los tejidos vegetales de enzimas del tipo polifenoloxidasas, cuya proteína contiene cobre, que cataliza la oxidación de com-

puestos fenólicos a quinonas. Estas prosiguen su oxidación por el O₂ del aire sobre el tejido en corte reciente, para formar pigmentos oscuros, melanoides, por polimerización.

Los substratos responsables son de tipo orto-fenólico y entre ellos se mencionan: ácido clorogénico-tirosina-catecol-ácido cafeico-ácido gálico-hidroquinonas, antocianos-flavonoides.

Las enzimas responsables son: la tirosinasa, la catecolasa, lacasa, la ascórbico-oxidasa y las polifenol-oxidadas.

Los compuestos de la reacción no son tóxicos, pero la preocupación de los tecnólogos es el aspecto, color y presentación de frutas y verduras, que indudablemente tienen gran importancia comercial y culinaria.

Para que se produzca este pardeamiento es necesario, por lo tanto, la presencia de los tres componentes: enzima, substrato más el oxígeno. Como nada se puede hacer o muy poco con el substrato oxidable, los métodos hoy en uso tienden a inhibir la enzima o a eliminar el oxígeno y algunas veces se combinan ambos métodos.

a) *Inactivación de la enzima mediante calor.* Tiene la ventaja de que no se aplica aditivo alguno, pero presenta el inconveniente de que la aplicación de calor en frutas frescas produce cambios en la textura, dando sabor y aspecto a cocido.

Para evitar estos inconvenientes se regula el tiempo de calentamiento, acortándolo justo al mínimo capaz de inactivar la enzima por un escaldado inmediato. Se puede controlar la inhibición enzimática por la prueba del catecol. La inhibición es lenta a 75°, pero se hace rápida a 85°C.

b) *Inactivación de la enzima mediante inhibidores químicos:*

Anhidrido sulfuroso: Es uno de los más efectivos y económicos inhibidores químicos hoy usados en la industria alimentaria, aunque su olor y sabor desagradables pueden comunicarse al alimento cuando se emplea en grandes cantidades. Su uso no es aconsejable en alimentos ricos en tiamina y vitamina C, pues las destruye. En el caso de la tiamina, el SO₂ es capaz de romper el anillo tiazólico de la vitamina, separando el anillo de pirimidina, con lo que pierde su carácter vitamínico.

La polifenoloxidasa es muy sensible al SO₂, pero la reacción debe realizarse antes que se formen las quinonas por oxidación del substrato, pues éstas oxidan al SO₂, por lo que pierde entonces su propiedad de inhibir la enzima.

Acidos: Bajo un pH 2,5 cesa la actividad enzimática, que es óptima entre 5 y 7. Aunque luego se vuelva al pH original de la fruta, la enzima no se recupera, impidiéndose así el pardeamiento. Entre los ácidos más usados está el málico, que se agrega al prensar la fruta: caso de la manzana, de la cual es uno de sus componentes naturales (30); también se usa, pero en menor proporción, el ácido cítrico.

Acido ascórbico: Este ácido es el más recomendado para evitar o minimizar el pardeamiento enzimático, por su carácter vitamínico inofensivo. El ácido ascórbico por sí mismo no es un inhibidor de la enzima: actúa sobre el substrato, de modo que puede adicionarse después de haberse formado las quinonas; tiene la propiedad de oxidarse a ácido dehidroascórbico, reduciendo la quinona a fenol (35).

Esto lo hace el ácido ascórbico hasta que se haya transformado totalmente en dehidroascórbico que ya no puede reducir las quinonas, de manera que éstas continúan, entonces, su oxidación hasta la formación de melanoides. El ácido dehidroascórbico aún puede ser perjudicial al formar, en la

esterilización posterior, melanoides con los aminoácidos presentes; por eso la adición de ácido ascórbico no es eficaz en cerezas, ciruelas y frutillas. Sin embargo, si se agrega a otras frutas exceso de ácido ascórbico para inactivar totalmente la enzima, se logra prevenir el pardeamiento en forma efectiva y permanente.

Productos especialmente propensos a empardecer por oxidación química, como manzanas, peras, duraznos, damascos, ciruelas y plátanos entre las frutas, y papas, espárragos, zanahorias entre las hortalizas, deben mantenerse, inmediatamente después de *cortadas o peladas*, en agua adicionada de 0,1-0,2% de ácido ascórbico y de 0,2% de ácido cítrico.

Además, para evitar alteraciones de color por oxidación química en las *conservas enlatadas*, es conveniente agregar por cada litro de líquido de relleno 0,5-1 g de ácido ascórbico (y 0,25-0,50 g de ácido cítrico, según lo admita el producto en cuanto al sabor). Para mantener el color de conservas de champiñones y otros hongos es conveniente una adición de 0,15-0,20 g por litro y para el choucroute se agrega a la salmuera 1-2 g/kg de ácido ascórbico, poco antes del envase.

Otros inhibidores químicos: Entre las sales propuestas para controlar el pardeamiento la más usada es NaCl, cuya acción impide la actividad de la polifenol-oxidasa frente al ácido clorogénico. Una sumersión en solución acuosa diluida de NaCl (0,3%) se usa mucho cuando se quiere evitar por corto tiempo el obscurecimiento de frutas peladas, como rodajas de manzanas, antes de ser sometidas al procesamiento; su contenido en ácido ascórbico se mantiene, entonces, constante durante varias horas.

Se aplica el bloqueo de los hidróxilos fenólicos por adición de complejantes con el cobre de la enzima, como el ácido cítrico (0,2%) y boratos (0,2% + 0,01% SO₂). También la cisteína y otros dadores de SH se unen a los fenoles, dando complejos incoloros, previa reducción de las quinonas.

El uso de jugos de piña o de limón para evitar el pardeamiento en preparaciones caseras, se basa en el contenido de compuestos sulfhidrúlicos del primero y en ácidos cítrico y ascórbico del segundo.

c) *Eliminación del oxígeno:* La exclusión o limitación de la influencia del O₂ del aire al trabajar y envasar rápidamente el material y en caso necesario con ayuda del vacío o en atmósfera inerte representan medidas satisfactorias para mantener ciertas frutas al estado lo más natural posible, especialmente en lo que se refiere a textura y sabor. Para frutas destinadas a la congelación, se usa también azúcar y jarabe para cubrir la superficie, retardando así la entrada del oxígeno atmosférico.

5.6. Fuera de estos fenómenos de pardeamiento enzimático existen también otras reacciones enzimáticas que pueden conducir a un deterioro en los alimentos. Durante el procesamiento de productos tanto animales (matanza) como vegetales (frutas, hortalizas, molienda de cereales), la destrucción de los tejidos por acción generalmente mecánica, puede liberar enzimas de sus estructuras tisulares. Las consiguientes transformaciones metabólicas no controladas pueden conducir entonces, a veces, a reacciones enzimáticas que van en desmedro de la calidad del alimento. Es así que la ya mencionada *lipoxidasa* puede dar origen a productos de oxidación de sabor rancio o amargo en derivados de cereales y destruir los carotenos (55). También una excesiva *proteolisis* enzimática puede conducir a un deterioro del tejido, como sucede en la putrefacción de productos cárneos y marinos.

Por otra parte, el reblandecimiento exagerado o la pérdida de consistencia de frutas y hortalizas que han sobrepasado su estado de madurez tienen su origen en una *pectinólisis* no controlada por pectinasas. En el fruto fresco e intacto estas enzimas se encuentran separadas de su sustrato, las pectinas; pero al producirse la ruptura celular en el fruto alterado se genera entonces su reacción de deterioro (28).

VI

ASPECTOS SANITARIOS Y LEGALES DEL USO DE ENZIMAS EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA

1. Las enzimas se consumen en gran cantidad a través de todos los alimentos frescos como frutas, ensaladas frescas, leche, mantequilla, queso, carne, pescado y huevo. Tales enzimas no sólo proceden del reino animal, sino, además, son de origen microbiano, ya que están en los productos obtenidos por fermentación, curado, etc. Estas enzimas son constituyentes naturales de los alimentos, en donde se las encuentra, o bien, se han adicionado a los alimentos, en donde no existen o están en cantidades insuficientes. En este sentido las enzimas se vuelven "ingredientes intencionales de los alimentos o aditivos" (3).

1.1. Mientras la *pureza de las enzimas para fines analíticos* sólo es necesaria llevarla al grado que permita descartar actividades extrañas que puedan interferir en la exactitud del resultado analítico y no a una pureza absoluta, *las enzimas destinadas a la elaboración de alimentos* deben cumplir, según el Comité FAO/OMS, con las exigencias de inocuidad y pureza de los *Aditivos Alimentarios*, como por ej., con respecto a la ausencia de microorganismos patógenos, de metales tóxicos y de restos de reactivos o agentes clarificantes o precipitantes.

1.2. Los polvos secos concentrados de enzima pueden ocasionalmente producir alergias por inhalación, aunque esto es también válido para otros productos en polvo. Las enzimas comerciales no se consumen en su forma activa, pero hay excepciones como la parcial supervivencia de proteasas bacterianas en alimentos horneados o la parcial actividad de la papaína de la cerveza. Pero sabemos que la mayoría de las enzimas se inactivan durante los procesos tecnológicos; las cantidades de enzimas presentes en los alimentos (generalmente en forma inactiva) son pequeñas.

1.3. Se sabe con certeza que las enzimas usadas en tecnología alimentaria no son dañinas de por sí. Sin embargo, se ha estudiado la posibilidad de la

formación de toxinas durante el desarrollo de microorganismos usados en la producción de ellas. Pero la industria puede ponerse a salvo al tomar todas las medidas de seguridad contra la contaminación con agentes patógenos, por los procesos microbiológicos.

1.4. La elaboración de preparados enzimáticos exige tratamientos delicados que no perjudiquen su actividad. Como no pueden aplicarse temperaturas altas durante su preparación no es posible pensar en una esterilización térmica (3).

Por este motivo sería posible la presencia de microorganismos extraños, capaces de multiplicarse a través de ellos mismos o de sus formas de resistencia (esporas) y/o de sus metabolitos no deseados (antibióticos, toxinas). Estas contaminaciones podrían tener, según Frank, los siguientes orígenes (44, 45):

- el propio productor de la enzima o la flora contaminante que aporta;
- substratos nutritivos usados, como la melaza, residuos oleaginosos, afrecho;
- material usado para la adsorción o la dilución, como celulosa, almidón, harina, afrecho;
- infecciones no controladas durante el cultivo masivo de microorganismos.

2. Para evitar posibles peligros, las Comisiones para la "Investigación en Nutrición" y para el "Examen de sustancias extrañas en los alimentos" de la Corporación Alemana para la Investigación (DFG) (47) han recomendado al legislador algunas medidas como:

2.1. El cultivo masivo de microorganismos en la planta industrial debe realizarse de tal manera que no se produzca, por razones ecológicas, una propagación indeseable de los microorganismos en la fábrica y en sus alrededores.

2.2. Por este motivo el personal respectivo debe recibir la instrucción necesaria para el manejo de microorganismos.

2.3. Los fabricantes de enzimas y de metabolitos microbianos (por ej., para la elaboración de jugos de frutas y productos de panadería) deben vigilar cuidadosamente el aire desprendido y las soluciones nutritivas.

2.4. En la preparación de *cultivos para iniciadores* (starter) debe evitarse la intromisión, como impurezas, de microorganismos extraños.

2.5. Los cultivos, enzimas y metabolitos deben estar exentos de *antibióticos* que tengan actuación terapéutica.

2.6. Las enzimas de microorganismos deben provenir de *gérmenes no patógenos* para el hombre y los animales. Debe prestarse especial atención a la ausencia de microorganismos causantes de intoxicaciones alimentarias como *E. coli*, *Salmonella*, *Arizona* y *Staphylococcus aureus*. Deben incluirse ensayos de toxicidad crónica, a largo plazo, y sobre todo la investigación de una posible acción *carcinogénica*, *teratogénica* y *mutagénica*.

2.7. Para ajustar los preparados enzimáticos a una actividad constante o definida de acuerdo con su aplicación, y también para facilitar su estabilidad, se recurre a *aditivos permitidos*. Para este objeto pueden aplicarse *disolventes* como agua potable, glicerina, propilenglicol; *coadyuvantes para comprimidos*

como ácido esteárico y sus sales de calcio y magnesio, sílice coloidal y silicato de calcio (hasta 10 g/kg), glutatión, cisteína y los *preservadores* y *antioxidantes* autorizados para alimentos.

Por otra parte, los preparados enzimáticos no deben contener habitualmente más de 3 mg/kg de arsénico; 10 mg/kg de plomo; 25 mg/kg de zinc y 50 mg/kg en conjunto de cobre y zinc.

En este sentido, la limitación de aflatoxina a 5-10 ppb, respectivamente, a 30 ppb (48) y de actividades antibióticas residuales hasta, por ej., 0,03 U. I. de equivalentes de penicilina/g de enzima (44) parecen constituir medidas adecuadas en protección de la pureza de esta clase de aditivos que constituyen las enzimas. Afortunadamente, según las investigaciones realizadas por Frank y colab. (46), no se han encontrado entre estos residuos, antibióticos aplicados en gran escala en medicina humana y veterinaria, ni gérmenes patógenos como Estafilococos, Salmonellas y Pseudomonas.

2.8. Para la introducción de *nuevas variedades de cultivos de microorganismos* destinados a alimentos debe ser de responsabilidad del fabricante una declaración de su carácter inofensivo en forma similar al examen para la admisión de un nuevo medicamento.

De estas investigaciones y exigencias se deduce la importancia de que se apliquen en la Industria de Alimentos preparados enzimáticos suficientemente garantizados en su pureza.

3. Según la Ley sobre el tráfico de Alimentos, Tabacos, Cosméticos y Productos Similares de la República Federal de Alemania, de 1974, las enzimas, en general, por su calidad de proteínas digestibles, no se consideran como Aditivos, sino como equivalentes a integrantes de alimentos. En Chile rige una situación similar, pues el nuevo Reglamento Sanitario de los Alimentos (71 b) no incluye las enzimas usadas en los alimentos en la lista de los aditivos autorizados, mientras que el Reglamento anterior (71 a) incluía las proteasas: pancreatina, tripsina, pepsina, cuajo, papaína, bromelina y ficina como mejoradores de la fermentación y ablandadores para carne.

En algunos casos, el uso de enzimas de otras fuentes es sancionado por reglamentos especiales dentro de la categoría de Aditivos Alimentarios. Así sucede con el uso de carbohidrasas derivadas del *Rhizopus oryzae*, para producir jarabe de almidón y dextrosa; de catalasas bacterianas de *M. lysodeikticus*, para eliminar agua oxigenada, y de la pareja glucosa-oxidasa y catalasa para la eliminación de glucosa en huevos líquidos (3).

VII

APLICACION DE PREPARADOS ENZIMATICOS EN LAS DIFERENTES INDUSTRIAS ALIMENTARIAS

1. Para comprender los principios y las ventajas de la suplementación de enzimas, es necesario observar estrechamente los factores envueltos: el sustrato, los tipos y acciones de las enzimas y las propiedades que dará este agregado enzimático a los productos finales (3, 52).

Debido a que la estructura espacial de la proteína participante de las enzimas (por ej., helicoidal o globular) es muy sensible frente a las condiciones ambientales (temperatura, aire y agentes químicos), las enzimas son bastante lábiles, debiendo conservarse *secas*, en envases cerrados y a baja temperatura, si se almacenan por mucho tiempo. Sus soluciones deben ser recientes y se preparan en tampones apropiados con adición de adecuados reactivos de protección.

2. ENZIMAS QUE SE APLICAN EN LA INDUSTRIA MOLINERA Y PANADERA

2.1. ALFA Y BETA-AMILASA.

El nombre de *diastasas* corresponde a un sinónimo de las amilasas, aunque se usa principalmente para designar la alfa-amilasa, que se extrae de cereales.

Origen de alfa-amilasa: Fúngico (*Aspergillus oryzae*), bacteriano (*B. stearothermophilus*, *B. subtilis*), de cereales y del páncreas.

Origen de beta-amilasa: cereales, soya y camote.

La enzima alfa-amilasa se encuentra en poca cantidad en el trigo y abunda más en aquel que ha sido parcialmente germinado. La beta-amilasa, por el contrario, se encuentra en gran cantidad en este cereal.

Acciones: Como es sabido, el almidón está formado por la fracción *amilosa* de cadena recta de moléculas de glucosa unidas por enlaces glucosídicos alfa-

1,4; en tanto que la fracción *amilopectina*, además de la cadena recta, presenta ramificaciones con enlaces glucosídicos 1,6.

La *alfa-amilasa* cataliza la hidrólisis de la cadena lineal (amilosa) y la ramificada (*amilopectina*) del almidón, rompiendo enlaces 1,4 interiores (*endo-amilasa*) para formar una mezcla de dextrinas; por ello se la conoce como enzima *dextrinogénica* (mezcla de amilodextrina, eritrodextrina, acrodextrina y maltodextrina) con poca producción de maltosa.

Por su acción, la *alfa-amilasa* provee de fragmentos menores que pueden ser utilizados por la enzima *beta-amilasa*. La enzima *alfa-amilasa* requiere de un activador como, por ej., cloruro de sodio. Es sensible a una acidez elevada y se vuelve inactiva a pH 3,3 o a pH menor a 0°C por 15 min. El pH óptimo de acción está dentro del rango 5-7, siendo de 6,5 para la *alfa-amilasa* bacteriana y pancreática. La enzima es resistente al calor, pues a 70°C conserva un 70% de su actividad. Actúa sobre almidones crudos y gelatinizados.

La *beta-amilasa* se la conoce con el nombre de enzima *sacarogénica*, pues actúa sobre la amilosa, rompiendo unidades 1,4, dando maltosa. Sobre la *amilopectina* actúa en las uniones alfa-1,4 de la cadena recta, y detiene su acción a distancia de 2 unidades de glucosa antes de atacar las uniones alfa-1,6. Se trata de una *exo-amilasa*, ya que actúa sobre el terminal de la molécula; mientras la amilosa es transformada totalmente en maltosa, la cadena ramificada de la *amilopectina* se conserva en un 40-45% sin hidrolizar (38).

La *beta-amilasa* no necesita de activador para actuar, pero es menos estable al calor, inactivándose a 70°C por 15 min. El pH óptimo de la *beta-amilasa* es de 4,5.

Aplicaciones: El uso de la *alfa-amilasa* para mejorar el valor panificador de harinas se basa en el hecho de que un adecuado y mantenido desprendimiento de anhídrido carbónico depende de la cantidad de maltosa y glucosa fermentescibles que estén presentes en la masa, y cuya formación depende, a su vez, de la acción sincronizada de la *alfa-* y la *beta-amilasa*; en mejor forma que por adición de extracto de malta usado también para este objeto. Mientras los cereales germinados contienen ambas enzimas, muchas harinas de trigo son deficientes en *alfa-amilasa*, siendo entonces conveniente su adición.

La *alfa-amilasa* de *origen fúngico* (como es la que se obtiene por crecimiento del micelio del *Aspergillus oryzae* en fermentadores de cultivo sumergido que permiten una agitación y una aereación intensas), aunque puede ser menos potente que la de bacterias o de cereales, se puede obtener con baja actividad de proteasa (desdobladora del gluten) y de maltasa, conservándose así la maltosa, esencial para la fermentación. La presencia de una cantidad suficiente de *alfa-amilasa* durante el esponjamiento y fermentación de la masa, tiene las siguientes ventajas:

- mayor contenido de azúcares fermentescibles en la masa;
- aceleración de la fermentación;
- desprendimiento gaseoso, mayor y uniformemente mantenido;
- aumento del volumen y textura del pan con una miga de porosidad más fina y de *costra* más uniforme y más coloreada.

La *alfa-amilasa* de *origen bacteriano* es más estable al calor que la de hongos y de cereales, de manera que no se inactiva totalmente en el horno panificador. Por este motivo, su adición debe ser bastante cuidadosa para evitar una sobreproducción de dextrina residual y con ello una miga gomosa y pegajosa (38, 40). Por otra parte, una actividad residual de la *alfa-amilasa* bacteriana en el pan tiene la ventaja de suministrarle una mejor conserva-

ción, al restringir durante el almacenamiento del pan la retrogradación de su almidón, causante del envejecimiento. Al sustituir la adición de la amilasa por extracto, jarabe o harina malteados, debe tenerse presente la relativa termo-resistencia de su alfa-amilasa y su considerable actividad proteolítica, cuyas desventajas se han señalado anteriormente.

2.2. PROTEASAS.

Origen: Fúngico (*Aspergillus oryzae*), bacteriano (*Bacillus*, *Streptococcus*) y vegetal (*Carica papaya* L: papaña).

Acción. Desdoblamiento hidrolítico de proteínas y péptidos hasta aminoácidos.

Aplicaciones: Como la adición de amilasa y/o proteasa depende de la harina y otros ingredientes de la masa, la conveniencia de agregar proteasa queda generalmente restringida a harinas de trigo duro, ricas en gluten (como las de Canadá y Rusia), mientras que en harinas pobres o medianamente ricas en gluten puede originar un reblandecimiento exagerado de la masa.

En los casos en que la adición de proteasa es conveniente, se produce una mayor extensibilidad y elasticidad de la masa, acortándose el tiempo de amasijo y facilitando el amasijo mecánico (maquinofilia). El pan resultante adquiere mayor volumen por una mejor retención de gas, mejorando su textura y simetría, como también sus condiciones de conservación y aun de aroma (40); esto último, sobre todo si se asocia a una adición de amilasa.

Como la proteólisis en la masa puede ser inhibida por la sal, conviene agregar ésta sólo durante el amasijo.

En algunos productos de panadería, como barquillos y galletas secas o duras, las masas deben elaborarse con una menor adición de agua; por otra parte, deben ser blandas y plásticas y poco elásticas para que se puedan moldear fácilmente. Por este motivo se prefiere el uso de una harina "floja", es decir, pobre en proteínas totales (no más de 11%) y en gluten húmedo (máx. 22%), pues con contenidos más elevados se necesita más líquido para preparar la masa. Esto tiene el inconveniente de la formación de una miga de poros más gruesos y un excesivo levantamiento del producto, formándose a menudo una superficie áspera, irregular o con ampollas, grietas o fisuras en las galletas.

Si no se dispone de una harina apropiada para estos fines, puede regularse la plasticidad de la masa frenando su desarrollo. Esto se puede conseguir en forma adecuada por medio de una enzima proteolítica como la papaña, que desdobra parte del gluten y permite obtener una masa blanda, *suave y extensible*, y con menor tiempo de horneado. La cantidad por usar depende del contenido de gluten de la harina que se usa; pero, en general, un 0,5%; o, relacionando con 100 kilos de harina, 50-100 ml de Auxillase (un concentrado líquido de Merck) son suficientes.

Como toda enzima, la papaña se destruye con la temperatura del horno de panificación, por lo cual su acción debe tener lugar durante el tiempo de reposo de la masa, de unos 15-20 minutos después de su adición. La dosificación depende, en todo caso, de la humedad, tratamiento mecánico en el amasijo, pH, composición y tiempo de reposo de la masa. Para asegurar una distribución homogénea es conveniente agregar la enzima al agua del amasijo.

Su actividad comprende un margen de pH de 3 hasta 9 y alcanza un óptimo entre 40 y 70°C.

3. ENZIMAS QUE SE APLICAN EN LA INDUSTRIA DE ALIMENTOS AZUCARADOS.

3.1. INVERTASA O SACARASA.

Origen y acción: La hidrólisis de la sacarosa en glucosa y fructosa (azúcar invertido) puede ser realizada por dos enzimas: la betafructosidasa, que actúa sobre el extremo fructosa de la molécula de sacarosa, y la alfa-glucosidasa, que la ataca por el extremo de la glucosa. Actualmente, se entiende generalmente por "invertasa" la beta-fructosidasa, que es producida por levaduras (*Sacaromyces cerevisiae*, *Candida*), mientras que la alfa-glucosidasa constituye preferentemente las invertasas intestinales y de hongos (*Aspergillus oryzae*).

Rango de pH: 4-6.

Aplicaciones: El uso frecuente de la invertasa en alimentos azucarados se basa en la transformación lenta y parcial de la sacarosa en azúcar invertido que tiene mayor poder edulcorante, mayor carácter humectante, mayor solubilidad y, por lo tanto, menor tendencia a cristalizar y endurecer. De esta manera, actúa como un agente de reblandecimiento en alimentos azucarados con tendencia a cristalizar la sacarosa y evaporar agua, lo que afecta su aspecto y consistencia. Además, la fructosa resultante tiene cierto carácter humectante y da sensación de frescura al producto. Productos de confitería, como bombones con relleno, productos de jaleas, fondants, mazapanes y pasteles adquieren entonces una consistencia suave, cremosa y blanda, aún después de un almacenamiento prolongado.

La actividad enzimática de la invertasa depende del pH, siendo su óptimo de 4,5 a 5,0, y de la temperatura que puede variar de 25° a 55°C; no debe agregarse a productos con más de 65°C ni a aquellos con más de 20% de alcohol (bombones con relleno), pues la enzima es inactivada. Como la invertasa produce una hidrólisis, exige la presencia de agua (por lo menos 5% del peso del azúcar). De un preparado líquido de invertasa se agregan normalmente 100-125 ml para 100 kg de masa; dicha cantidad puede aumentarse si no se puede llevar al pH óptimo mediante la adición de ácido cítrico, por razones de sabor.

A veces se agrega la invertasa al producto previamente mezclado con *sorbitol*, que también posee un gran poder higrostático o estabilizador de la humedad, en el sentido de retenerla frente a variaciones en la humedad ambiente. Mientras que el sorbitol reblandece de inmediato y su acción continúa durante el almacenamiento, la invertasa actúa de preferencia en el transcurso del almacenamiento.

Otra aplicación importante de la invertasa está en la elaboración de *azúcar invertido* a partir de sacarosa por vía enzimática, la cual aventaja a la hidrólisis ácida, por ser más fácil de controlar. Además, el jarabe resulta de mayor concentración, presenta mejores caracteres de color y sabor y no contiene indicios de productos secundarios como el furfural. Una vez elaborado el jarabe por inversión enzimática, se calienta a 80°C para inactivar la enzima, teniendo aplicación en diferentes productos azucarados y licores.

Por otra parte, desechos de frutas ricas en sacarosa pueden ser hidrolizados por invertasa en glucosa y fructosa y éstas fermentadas por levaduras para producir etanol y/o proteínas unicelulares (74, 11).

Es interesante que la acción cariogénica del azúcar invertido es bastante inferior a la causada por la sacarosa. La propiedad de no producir caries es aún mucho más manifiesta en el *xilitol*, alcohol pentavalente, de poder edulcorante, semejante al de la sacarosa.

3.2. GLUCOAMILASA O AMILOGLUCOSIDASA.

Origen: Fúngico (*Aspergillus niger*, *Rhizopus*, *Endomyces*).

Acción: Hidroliza los enlaces 1,4 y 1,6 del almidón (tanto amilosa como amilopectina) desde los extremos no reductores de las cadenas con separación de unidades sucesivas de glucosa.

pH óptimo: 4-6.

Aplicación: Se usa para la elaboración enzimática de jarabe de glucosa y de glucosa a partir de almidón (40). En el campo analítico tiene aplicación en la determinación cuantitativa del almidón y alfa-oligo y poliglucósidos en alimentos.

3.3. GLUCOSA-ISOMERASA.

Origen: Bacteriano (*Streptomyces*, *Aerobacter*, *Lactobacillus*).

Acción: Cataliza la isomerización de glucosa en fructosa.

Aplicación: Como se trata de una reacción reversible, la transformación no es cuantitativa, resultando a partir de la glucosa, un azúcar invertido, isomerosa, es decir, mezcla de fructosa y glucosa.

Desdoblado primero el almidón mediante *glucoamilasa* —eventualmente inmovilizada—, se puede transformar la glucosa resultante mediante la *glucosa-isomerasa* para lograr jarabes de alto poder edulcorante a partir de almidón de maíz o de papa (16).

3.4. CELULASAS.

Origen: Fúngico (*Trichoderma reesei* y *T. viride*, *Aspergillus flavus*).

Acción: Se trata de un complejo de por lo menos 3 enzimas, que en conjunto son capaces de desdoblarse la celulosa hasta glucosa.

pH óptimo: 2-7.

Aplicación: Se prevé su uso para la elaboración futura de glucosa y productos azucarados a partir de residuos celulósicos de bajo costo y abundante disponibilidad, como lo son muchos desperdicios de ciudades y desechos industriales. Debido a la presencia de sustancias acompañantes en estos residuos con acción inhibitoria sobre la hidrólisis de la celulosa, como las ligninas, puede ser necesario un pretratamiento de la celulosa (15, 16).

4. ENZIMAS QUE SE APLICAN EN LA INDUSTRIA DE LA CARNE Y DERIVADOS.

4.1. PAPAÍNA.

Se obtiene por purificación del zumo lechoso (látex) coagulado, proveniente de ligeras incisiones longitudinales que se practican en la superficie de los frutos bien desarrollados, pero aún no maduros de la papaya (*Carica papaya*).

4.2. BROMELINA.

Se obtiene por precipitación con acetona del jugo resultante de la presión de los tallos recién brotados de la Bromeliácea, la piña (*Ananas comosus*, sativa).

4.3. FICINA.

Se obtiene del látex coagulado proveniente de cortes o incisiones practicados en los brotes de los tallos de la higuera (*Ficus sp.*).

Se puede purificar la ficina por precipitación con acetona o etanol, redisolución en agua, nueva precipitación con acetona y desecación al vacío; con un rendimiento de unos 11-12 g de polvo a partir de 100 ml de látex (22).

4.4. PROTEASAS MICROBIANAS.

Se obtienen por cultivos de cepas seleccionadas de hongos (*Aspergillus oryzae*) o bacterias (*Bacillus subtilis*).

Acción: Todas estas proteasas hidrolizan gran número de proteínas diferentes a través de polipéptidos hasta aminoácidos; también desdoblan amidas y ésteres de aminoácidos.

pH óptimo: 4-8 (vegetal); 2-10 (fúngico); 6-2 (bacteriano).

Aplicación: Durante el proceso de *maduración* de la carne que sigue al de *rigidez cadavérica*, las transformaciones autolíticas, causadas por sus enzimas proteolíticas (catepsinas) suministran a la carne una textura blanda, jugosa, masticable, de sabor agradable y apta para la cocción y digestión (41). Como esta maduración natural suele ser prolongada (12 días), se puede acelerar artificialmente mediante la adición de proteasas extrañas para así aumentar la ternura de la carne (meat tenderizer). Al atacar por proteólisis las fibras musculares y/o los componentes del tejido conectivo (colágeno, elastina, actomiosina) se logra un relajamiento de los enlaces peptídicos de las proteínas y con ello el ablandamiento de la carne.

Siendo la papaína la enzima más usada para estos fines, existen también preparados a base de mezclas de proteasas de origen tanto vegetal como también fúngico y bacteriano que serían aún más eficaces.

Estos ablandadores de la carne se pueden aplicar por *pulverización*, en la superficie, con preparados enzimáticos secos, como, p. ej., una mezcla de 88% de sal de comer (como sustancia portadora); 4,5% de almidón (para hacerla más espolvoreable); 4,5% de papaína al 1:350, 2% de citrato de sodio cristalizado y 1% de glutamato de sodio, extracto de carne y condimentos. También suelen agregarse polifosfato, glutatión o cisteína y ácido ascórbico como estabilizadores.

La aplicación puede efectuarse también por *inmersión* o por *dispersión* (spray) con soluciones acuosas o hidroalcohólicas de 2 a 5% de la enzima. Después de 30 minutos y hasta un máximo de 3 horas a la temperatura ordinaria debe procederse a la preparación culinaria de la carne, como la cocción y el asado rápido (bisteches, escalopas) para evitar que la superficie se vuelva pegajosa. En el caso de carne destinada a ser *congelada*, se sumergen los trozos en solución de papaína, adicionada eventualmente de ácido láctico y sal de comer, y después de 20 a 30 minutos se congela.

Las proteasas, como la papaína, pueden aplicarse también *premortem* por inyección en la vena yugular hasta 30 minutos antes de la matanza, con el

objeto de aprovechar la distribución homogénea de la enzima por efecto de la circulación sanguínea, aunque suelen producirse hemorragias o edemas en órganos internos del animal vivo. Esto puede evitarse por tratamiento previo de la papaína o ficina con álcali (pH 11-12), lo que las inactiva en forma reversible. A veces se han observado también reacciones defensivas en el organismo del animal vivo que inactivan la enzima inyectada. Este inconveniente no se presentará al hacer la inyección *postmortem*, después de la matanza, en la arteria del animal desangrado, pero aún caliente (10).

También se ha propuesto inyectar *premortem* compuestos azufrados como metionina, cisteína, glutatión o sales inorgánicas azufradas, que serían capaces de aumentar la actividad de las proteasas naturales del tejido muscular de la carne, las cuales desdoblarían entonces las fibras musculares con efecto de tenderización de la carne (72).

En la *carne liofilizada* la aplicación de estas proteasas tiene el efecto de facilitar la rehidratación, al aumentar, por la proteólisis, la capacidad de fijación de agua.

*

4.5. También en los *pescados* tiene lugar, después de la pesca, una cierta maduración natural que influye en su sabor y textura. Como en la proteólisis de esta maduración intervienen, fuera de las enzimas del tejido muscular (catepsinas), también otras de origen gastrointestinal, éstas no podrán actuar si el pescado es eviscerado antes del salado, p. ej., en la preparación de preserves. En estos casos una adición de *proteasas* fúngicas al líquido del curado de los trozos fileteados puede ser útil, como también en la elaboración de condensados solubles de pescado.

Si ya se desea una hidrólisis más intensa, como sucede en la preparación de *hidrolizados proteicos*, de valor condimenticio a base de pescado, cereales, soya o proteínas lácteas, el uso de proteasas vegetales, animales (pepsina) o microbianas presenta ventajas sobre el sistema clásico de hidrólisis en medio ácido bajo presión, pues no produce la destrucción de ciertos aminoácidos como el triptófano, ni su racemización (10).

5. APLICACION DE ENZIMAS EN LA INDUSTRIA LECHERA.

Es en la *quesería* donde la aplicación de enzimas asume el mayor interés en esta industria.

5.1. RENINA, QUIMOSINA O FERMENTO LAB.

Origen: Por maceración de trozos de estómagos de terneros (alimentados sólo con leche) en agua salada se obtiene el llamado cuajo, cuyo principio activo es la enzima y que se expende en forma de un extracto líquido o polvo seco, con sal. Si los terneros reciben fuera de leche también otro forraje, se va formando pepsina, la cual constituye en el animal adulto la proteasa más activa del estómago.

Acción: Determina la coagulación de la leche en presencia de sales de calcio, para la formación de la "cuajada" en la elaboración de quesos. La renina actúa sobre la fracción kappa-caseína de la leche con liberación de varios péptidos.

Al realizar su acción proteolítica, se destruye el efecto de coloide protector de la micela de caseína, causando su floculación. Acidez, tiempo y temperatura en este proceso influyen significativamente en las características posteriores del queso resultante.

pH óptimo: 6-7.

Se ha preparado también renina a partir de estómagos de aves por su inmersión en solución de sal, a pH 4 (72).

5.2. ENZIMAS COAGULANTES DE ORIGEN MICROBIANO.

Debido a la mayor demanda mundial de carne como alimento, no resulta actualmente muy económico matar terneros aún no destetados para obtener el cuajo. Fuera de la *pepsina*, a veces en mezcla con la renina, se están aplicando en quesería, cada vez en mayor escala, enzimas coagulantes de origen microbiano. De aplicación ya industrial son las de la *Endothia parasitica*, *Mucor pusillus* L. y *Mucor miehei*, cuya enzima es la *renilasa*; éstas se caracterizan por tener poca actividad de proteasa. Esto es importante para evitar la formación de péptidos de sabor amargo durante la maduración posterior del queso (16, 41).

5.3. ENZIMAS AUXILIARES DE LA MADURACIÓN DE QUESOS.

Para abreviar el proceso de maduración y mejorar la calidad de los quesos se recurre a la aplicación adicional de *lipasas* de origen vacuno, ovino, caprino o fúngico y de proteasa de *Streptomyces*, por ej., en quesos *Gouda*. En la elaboración de algunos tipos de quesos la adición de lipasa se hace a la leche de partida ya pasteurizada, junto al cuajo, pues la pasteurización la inactiva (es inhibida a 57°C por 30 minutos); por otra parte, la lipasa participa también en el aroma de queso, crema y mantequilla.

Un ejemplo de la acción de un microorganismo en la maduración de quesos es la adición de un cultivo de *Penicillium camemberti* como fuente de una proteasa extracelular, la cual, al hidrolizar lentamente las proteínas del queso Camembert, produce la textura suave y mantecosa que lo caracteriza. En cambio, el *Penicillium roqueforti* es responsable de la formación de vetas de color verde-azulado y de metilcetona, características de los quesos Roquefort, Gorgonzola y Stilton. Proteasas de *Streptomyces* se usan para acortar la maduración del queso Gouda, y de *Aspergillus flavus* para mejorar los caracteres sensoriales del queso Cheddar (10). Para mejorar la textura y aroma del queso Cheddar se suele agregar también un cultivo de *Streptococcus diacetilactis*, pero debe agregarse sólo en pequeña cantidad a la cuajada, para evitar un hinchamiento del queso por desprendimiento de CO₂ (72).

5.4. LACTASA.

Origen: Levaduras (*Saccharomyces lactis*, *S. fragilis*, *Torula cremoris*) y Fúngico (*Aspergillus niger*, *Streptomyces coelicor*, más termorresistente).

Acción: Cataliza la hidrólisis de la lactosa en glucosa y galactosa, desde los extremos de los restos de galactosa; siendo los dos monosacáridos resultantes más dulces y más fácilmente asimilables.

pH óptimo: 4-7.

Aplicaciones: Como la lactosa es de menor solubilidad que los otros azúcares, tiene tendencia a cristalizar en concentrados de leche y de suero

lácteo. Esta cristalización va acompañada de una desestabilización del complejo de caseinato de calcio, lo que conduce fácilmente en el almacenamiento frío de leches condensadas, helados de leche y de crema y concentrados de suero lácteo a floculaciones, con formación de sedimentos granulosos o arenosos. Esto se puede evitar —obteniendo productos suaves al paladar— si se hidroliza por lo menos el 20% y hasta el 50% de la lactosa presente mediante la adición de lactasa. En condensados lácteos que se elaboran con adición de sacarosa conviene agregar ésta sólo después de su tratamiento con lactasa, pues la presencia de sacarosa retarda considerablemente la velocidad de hidrólisis por la lactasa.

Otra aplicación tecnológica de la lactasa es en la elaboración de leches delactosadas, destinadas a la alimentación infantil y de adultos que presentan una intolerancia a la lactosa por déficit de su lactasa intestinal.

6. APLICACION DE ENZIMAS EN LA INDUSTRIA DE DERIVADOS DE FRUTAS Y HORTALIZAS.

6.1. PECTINO-ESTERASA (P.E.) O PECTINO-METIL-ESTERASA.

Origen: Es producida por hongos (*Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum*), levaduras, bacterias y algunos vegetales, como tomates, cebollas y frutas cítricas.

Acción: Produce la hidrólisis de la pectina, formando ácido péctico o poligalacturónico y metanol, al actuar de preferencia sobre los enlaces metílicos, vecinos de grupos carboxílicos libres (15). Como estas enzimas son las causantes de la pérdida de las características de turbidez de algunos jugos y néctares, deben inactivarse por el calor. Así sucede con el jugo de tomate, rico en esta enzima, la cual debe inactivarse antes de exprimir el jugo, por calentamiento del tomate a 80°C por 45 seg. para así conservar el cuerpo o textura del concentrado. Como estabilizadores de turbidez de jugos o néctares de frutos cítricos suele agregarse a la vez pectinasa y una proteasa vegetal (papaína, bromelina), la cual contribuye a aumentar el desdoblamiento del pectato de calcio.

Aplicaciones: En cambio, una adición de preparados a base de pectino-esterasas, muchas veces en mezcla con celulasas y pectinasa (0.05-0.5 g/l) llamados "enzimas filtrantes o clarificantes", al degradar las sustancias pécticas, permite realizar filtraciones rápidas para obtener jugos claros, sin obstruir los poros del filtro y evitando a la vez cambios de los jugos por fenómenos de oxidación en las filtraciones lentas. Este proceso de clarificación se realiza generalmente en diversas fases: a) reducción de la viscosidad, pero sin cambio de opalescencia; b) floculación o decantación y disminución de la opalescencia, y c) eliminación de la pectina y obtención rápida de un filtrado claro.

También se aplica una adición de esta enzima con el objeto de lograr un mayor rendimiento en jugo a partir de algunas frutas que no se pueden prensar con facilidad, quedando retenida una cantidad apreciable de jugo. Así sucede en las *uvas* para obtener el mosto, lo que trae, además, como ventaja, que los *vinos* resultantes adquieren mejor aroma, al haberse degradado las sustancias pécticas; también aumenta la extracción del colorante de la uva.

En cambio, la *antocianasa* de diversos hongos puede disminuir la excesiva intensidad de coloración natural de productos como vinos, mermeladas y jaleas de algunas frutas.

6.2. PECTINASA, POLIGALACTURONIDASA (PG) O PECTINO-DEPOLIMERASA

Origen: Fúngico (*Aspergillus*, *Penicillium chrysogenum*) y bacteriano (*Bacillus*).

Acción: Desdoblamiento hidrolítico de los enlaces glucosídicos de las cadenas de pectina o del ácido péctico a oligourónidos o a ácido galacturónico monómero (con reducción rápida de la viscosidad).

pH óptimo: 3-6 (fúngica) y 5-8 (bacteriana).

Aplicación: Se usa en el procesamiento de frutas y hortalizas para preparar jugos y néctares, formando también parte de las ya mencionadas "enzimas clarificantes", junto a la pectino-esterasa. También se emplea para la maceración de tejidos vegetales con el objeto de obtener aromas (16).

Por otra parte, en la fermentación húmeda de las *semillas de café* la adición ex profeso de preparados de pectinasa proveniente de levadura, permite reducir a aproximadamente la décima parte el tiempo de fermentación previa del café para lograr la separación final de las partículas de pericarpio aún adheridas a las semillas (41).

6.3. ENZIMAS DEL AROMA O FLAVORASAS.

Origen: Se trata de un gran grupo de enzimas individuales o en mezcla que participan en el aroma y sabor (flavor) de alimentos vegetales. La cromatografía gaseosa en combinación con la espectrometría de masa y la resonancia magnética nuclear han permitido dilucidar los complejos procesos de la formación de las sustancias aromáticas, en su mayoría volátiles, de muchas frutas y hortalizas. Se trata de los productos intermedios o finales de procesos metabólicos de biosíntesis a partir de *precursores*, frecuentemente no volátiles y sin olor y sabor.

Acción: En muchos procesos de conservación de frutas y hortalizas, estas enzimas, responsables de aroma y sabor, se destruyen y hay pérdida de estos caracteres naturales del producto. Pero como los procesos térmicos no destruyen generalmente los precursores, cabe la posibilidad de una regeneración y aún a veces intensificación de los aromas propios del alimento por adición posterior de un concentrado enzimático obtenido del vegetal fresco, antes del consumo del producto. Se acelera la formación de aroma si se produce el contacto íntimo de los componentes del tejido con las enzimas, como ser, al desmenuzar o moler el material. Es así que, p. ej., en el ajo y la cebolla, el precursor, la aliina, forma por acción de la enzima: aliinasa, la aliicina, de fuerte sabor picante; ésta se pierde en la desecación, pero al agregar un extracto enzimático de material fresco al precursor se regenera el aroma primitivo (33).

Extractos enzimáticos obtenidos a partir de mostaza y repollo han sido utilizados para mejorar el aroma de berros y otras verduras, mientras que la aplicación de preparados enzimáticos extraños al producto, como celulasas, glucosidasa o alcohol-dehidrogenasa (p. ej., para frambuesas y frejoles), se encuentra aún en estudio.

6.4. También es posible la aplicación de enzimas para la *corrección del sabor* de ciertas frutas y derivados. El caso más conocido es la eliminación

del desagradable sabor amargo de algunos frutos cítricos, especialmente si se procesan con sus semillas, como pomelos, naranjas y limones. Dicho sabor se debe al flavanona-diglucósido, la *narangina*, en la cual el enlace entre los dos glúcidos constituyentes, la L-ramnosa y la D-glucosa, es tan esencial para el sabor que es desdoblable por la enzima, *naranginasa*, de origen vegetal o microbiano (*Aspergillus* o *Coniothyrium diplodiella*). Esta vía enzimática a pH 3,5-5 y unos 60°C es mucho más efectiva que la eliminación de la *narangina* por una hidrólisis ácida o una adsorción por carbón activo (10, 41, 42).

6.5. GLUCOSA-OXIDASA.

Como se describe en Enzimas de acción múltiple (véase pág. 60), los daños que puede causar en derivados de frutas y de hortalizas la presencia de oxígeno se pueden evitar por la adición de esta enzima; acompañada, eso sí, de catalasa para impedir la destrucción de aromas y de pigmentos antociánicos por el peróxido libre que forma la glucosa-oxidasa. Lógicamente, la adición debe hacerse una vez enfriado el producto después de su procesamiento térmico (pasteurización o esterilización). Existen también preparados enzimáticos, recubiertos de una envoltura resistente al calor y la acidez, que actúan sólo después del enfriamiento rápido. En néctares y jugos pulposos es importante que los preparados enzimáticos que se apliquen estén exentos de celulasas y pectinasas (que desdoblan las cadenas glucosídicas del ácido poligalacturónico en la pectina) para evitar el desdoblamiento de los coloides protectores que estabilizan la turbidez.

7. APLICACION DE ENZIMAS EN LA INDUSTRIA CERVECERA.

Aunque la más antigua reglamentación alemana de alimentos, dictada en 1516 por el Archiduque Guillermo IV de Baviera sobre "la pureza de la cerveza", aún vigente en Alemania, no permite más que el uso de malta, hoblón, levadura y agua para su elaboración, las enzimas no son consideradas como aditivos según la actual legislación alemana.

7.1. La preparación de la malta o cebada germinada (la cual constituye junto con el hoblón o lúpulo, la levadura y el agua, las materias primas para la elaboración de esta bebida) tiene por objeto lograr por la germinación la transformación de los componentes proteicos y amiláceos insolubles de la cebada en otros tantos solubles, de desdoblamiento, los cuales pasarán posteriormente al caldo de fermentación. Mientras que esto sucede en la malta verde por la actividad ejercida por las proteasas y amilasas propias del cereal durante la germinación de la malta y la posterior incorporación de agua, resulta conveniente una suplementación enzimática con alfa-amilasa, glucoamilasa y proteasas de origen vegetal o microbiano (véase aplicación de enzimas en molinería y panadería), en caso que la malta se adicione desde un principio (por razones económicas) de cierta proporción de cereal (cebada, maíz o trigo) no germinado.

7.2. Por otra parte, puede aplicarse junto con alfa-amilasa y proteasas, la *Glucanasa*, enzima proveniente del *Bacillus subtilis*, para descomponer glucano, sustancia gomosa de la cebada.

7.3. Otra aplicación importante de proteasas vegetales o microbianas tiene lugar en la cerveza ya terminada, susceptible de experimentar enturbiamientos de origen *no biológico*, que le pueden comunicar un aspecto desagradable. Los factores causantes de estos enturbiamientos son el oxígeno, la luz, el calor, trazas metálicas y, especialmente, la presencia de proteínas de alto peso molecular, provenientes ya sea de la cebada o de la levadura. Estas proteínas coagulan por influencia del oxígeno y también de los taninos y carbohidratos existentes, especialmente después del almacenamiento en frío de la cerveza ya terminada.

Mediante la adición de proteasas, como la papaína, estas proteínas se desdoblán en sus componentes hidrosolubles (péptidos hasta aminoácidos), que ya no causan precipitaciones o enturbiamientos. Para este objeto se pueden mezclar directamente 2-4 ml de Auxillasa líquida (un concentrado normalizado de papaína de Merck) por hectólitro de cerveza, después de su filtración, al trasegarla al estanque de presión y dejándola actuar algunos días, hasta una semana. Como la enzima mantiene su acción después de la pasteurización (62°C por 20 min.) y del llenado de las botellas, la cerveza se estabiliza así durante un largo tiempo, volviéndose menos susceptible a la agitación y al frío y sin ser afectados su sabor, pH y espuma (16, 41).

Para lograr este mismo efecto se suele recurrir también a preparados enzimáticos a base de proteasas de origen fúngico (*Aspergillus*), a veces unidos a un tratamiento sinérgico con tanino (72).

7.4. En cuanto a los enturbiamientos y floculaciones de *origen biológico*, éstos son causados por la presencia de levaduras y otros gérmenes aerobios en la cerveza. En estos casos la adición, antes de la pasteurización, de *glucosa-oxidasa* (véase ésta) asociada a *catalasa* permite eliminar el oxígeno necesario para la actividad de estos microorganismos. De esta manera es posible mejorar el sabor y la estabilidad de la cerveza frente a este fenómeno y también frente a una posible contaminación metálica de las cervezas enlatadas (50).

Para estos fines suele usarse también la mezcla de 5 mg/l de glucosa-oxidasa y 25 mg/l de metabisulfito de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$).

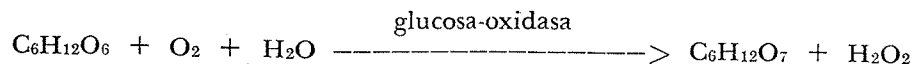
7.5. También puede recurrirse a una adición de *glucoamilasa* (véase ésta) a la cerveza para mejorar su estabilidad y lograr a la vez un desdoblamiento mayor de las dextrinas (10).

8. ENZIMAS DE APLICACION MULTIPLE EN LA INDUSTRIA DE ALIMENTOS.

8.1. GLUCOSA-OXIDASA.

Origen: Fúngico (*Aspergillus niger*, *Penicillium vitale* y *notatum*).

Acciones: Oxidación de glucosa por O_2 a D-glucono-delta-lactona, la cual es hidrolizada por la *lactonasa* (presente en la mayoría de los preparados enzimáticos de glucosa-oxidasa) a ácido glucónico y peróxido de hidrógeno:



Si a la vez está presente o se agrega *catalasa*, los productos finales son ácido glucónico, agua y oxígeno.

pH óptimo: 3-7.

Aplicaciones: En jugos y otros derivados de frutas y verduras, vinos y cervezas, la glucosa-oxidasa (10-30 mg/l) en mezcla con *catalasa* permite *eliminar el oxígeno*, causante de cambios de color, pérdidas de aroma y de vitamina C y de turbideces y floculaciones debidas a microorganismos aerobios.

Por su adición a conservas y bebidas enlatadas se puede reducir también la migración de metales a su contenido, al disminuir fenómenos de *corrosión*. Si el producto no contiene suficiente glucosa es conveniente agregar un 0,1%.

La mezcla de ambas enzimas puede usarse también para la protección superficial contra la oxidación por impregnación del *material de empaque* de quesos, carnes y alimentos deshidratados.

También se puede aplicar la glucosa-oxidasa en mezcla con glucosa y con un tampón para neutralizar el ácido glucónico que se va formando. Al colocar una bolsita impermeable al agua, pero permeable al oxígeno con esta mezcla, dentro del envase del producto, el oxígeno de la atmósfera del envase es rápidamente captado; protegiendo de este modo productos deshidratados con alto contenido de grasa y otros componentes sensibles a la oxidación.

Por otra parte, se usan también estas dos enzimas en la desecación de clara y huevo entero (unos 120 mg/kg) para eliminar los indicios de *glucosa*, que contienen; lo que causa pardeamiento según Maillard, con cambios de color, sabor y olor. A la vez aumenta la estabilidad y el poder espumante por batido de la clara. A menudo conviene agregar peróxido de hidrógeno, necesario para el O₂ de la reacción (a pH7 y 30°C) (50).

En el caso de que la clara de huevo esté acompañada de un poco de yema, tan rica en grasa, puede suceder que ésta impida la formación de espuma, evitando el debido esponjamiento. En este caso la adición de otra enzima, la *lipasa* (proveniente del ricino) desdobra la grasa, permitiendo así una mayor incorporación de aire y formando más espuma.

8.2. CATALASA O HIDRÓGENO-PERÓXIDO-OXIDO-REDUCTASA.

Origen: Fúngico (*Aspergillus niger*), bacteriano (*Micrococcus* sp.) y animal (hígado, eritrocitos de origen vacuno y porcino).

Acción: Cataliza el desdoblamiento de peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno.

pH óptimo: 4-9.

Aplicaciones: Preparados enzimáticos que contienen glucosa-oxidasa junto con *catalasa* se emplean (fuera de los usos recién mencionados) como *anti-oxidantes* de productos líquidos y pastosos, como mantequilla, mayonesa y grasa animal, eventualmente con adición de glucosa (0,5%). Aquí debe evitarse que el lípido tenga exceso de acidez, la cual puede inactivar la *catalasa*. Suelen aplicarse del preparado enzimático 20-25 mg/kg.

En la elaboración de *vinos* la adición de ambas enzimas (más 0,1% de glucosa) impide el crecimiento de microorganismos aerobios y la formación de exceso de acidez volátil. Sin embargo, debe evitarse la inhibición de la *catalasa* por el pH ácido del vino (su inactivación se produce a pH de 3-3,5),

CUADRO RESUMEN DE ALGUNAS APLICACIONES INDUSTRIALES
DE ENZIMAS MICROBIANAS, SEGUN REED (3)

<i>Preparación enzimática a base de:</i>	<i>Tipo de enzima</i>	<i>Usos típicos</i>	<i>Nivel máximo en ppm (sin diluyente)</i>
Bacillus subtilis	Carbohidrasa	Panificación-Molinería, Cereales precocidos (para mejorarlos por modificación de su almidón)	500
		Fermentación de cerveza	100
		Jarabe de chocolate (control de viscosidad)	100
	Proteasa	Cerveza (mantención de transparencia)	10
		Galletas (modificar la masa)	40
		Hidrolizados proteicos	500
		Pescado (curado de filetes y condensados solubles)	1000
Aspergillus oryzae	Carbohidrasa	Jarabes hidrolizados de almidón	250
		Sacarificación de desechos de destilación (producción de alcohol)	1000
		Cerveza (eliminación de almidón)	10
		Jugos de fruta (clarificación)	400
		Jarabe de chocolate (control de viscosidad)	200
	Carbohidrasa y Proteasa	Panificación y galletería (modificación de masa)	50
		Ablandadora de carne	500
Aspergillus niger	Carbohidrasa	Sacarificación de restos de destilería (prod. de alcohol)	
		Concentrado líquido de café (control de viscosidad)	100
	Glucosa-oxidasa y Catalasa	Huevo seco (eliminación de glucosa)	750
		Derivados de frutas y hortalizas, vinos y cervezas (eliminación de oxígeno)	10
	Pectinasa	Jugos de fruta y vinos (producción y clarificación)	200
		Lipasa	Queso (producción de aroma y sabor)

ues entonces quedaría H_2O_2 sin descomponerse, causando cambios desagradables de color y/o sabor.

La catalasa sola tiene también aplicación para eliminar exceso de agua oxigenada de alimentos (por ej., de leche) y para la producción de oxígeno, a partir de agua oxigenada en la preparación de baños de oxígeno (43).

8.3. LIPASAS:

Origen: Animal (pancreática), vegetal (semillas de soya, ricino, algodón y cereales como trigo y maíz) y fúngico (*Aspergillus*, *Rhizopus*, *Mucor*, *Candida*). En la leche hay una lipasa naturalmente activa, adsorbida en los glóbulos grasos y otra lipasa que se activa por tratamiento mecánico (agitación, homogeneización).

Acción: Cataliza la hidrólisis de triglicéridos a diglicéridos, monoglicéridos y ácidos grasos, más glicerina, liberando de preferencia los ácidos grasos de las posiciones 1 y 3 de los glicéridos.

Rangos de pH: 8-9 (animal), 4-5 (vegetal) y 2-9 (fúngica).

Aplicaciones: Se usa en el desdoblamiento de lípidos, en la producción de aroma de quesos (véase Aplicación de enzimas en la industria lechera), crema, mantequilla, margarina y productos de chocolatería. También se usa en el desgrasado de proteína.

9. COSTOS DE ENZIMAS EN TECNOLOGIA DE ALIMENTOS.

No es difícil determinar el costo de las enzimas para aplicaciones específicas, pero deben considerarse los gastos de mano de obra, de energía y de capitales. El costo de las enzimas estará sujeto a cambios, y particularmente el costo de importación, por ej., de la proteinasa vegetal, puede variar mucho de un año a otro. La correlación entre la actividad de una enzima particular y la transacción comercial es a menudo baja; sin embargo, no se ha intentado hasta la fecha indicar el valor de las enzimas en función de peso o de unidades de actividad enzimática. En su lugar Reed (3) ha dado algunas estimaciones de costos aproximados para ciertas enzimas, correspondientes al año 1966.

9.1. JUGO DE MANZANA, OTROS JUGOS DE FRUTAS Y VINO.

El costo para clarificar 100 galones de jugo de fruta o de vino es de alrededor de 10-20 ¢ (¢ = centavos de dólar). Este valor es probablemente menos significativo que los gastos que se producen por los accesorios de filtro, la filtración misma, o que las diferencias del rendimiento en el producto final.

9.2. CERVEZA.

El costo de las enzimas en la fabricación de cerveza tendientes a evitar la congelación de ella es de 2-4 ¢ por barril de cerveza. Ya que la acción de la enzima se realiza durante el tratamiento normal de la cerveza en las cubas de almacenamiento, no hay otros gastos adicionales en su procesamiento.

9.3. QUESO.

En la producción de queso, por ej., de la marca Cheddar, el valor del cuajo líquido es de 20 ¢ por 1.000 galones de leche procesada. El valor de las esterasas pregástricas para la producción de algún sabor pronunciado en algu-

nas variedades de queso italiano (Romano, Provolone) es de 20 ¢ por 1.000 galones de leche para la enzima de ternera y 40 ¢ para la enzima de cabrito. Las enzimas actúan durante la maduración del queso, de modo que no hay gasto adicional por procesamiento o por equipo.

9.4. CARNE.

El valor de las enzimas para ablandar las carnes por inyección de la enzima antes de la muerte, es pequeño, comparado con otros métodos. El valor de la enzima para ablandar 100 libras de carne puede ser del orden de 0,5 a 2 ¢. El uso culinario de polvos ablandadores es más caro, a causa del diluyente, del envase y de su distribución.

9.5. PAN Y HARINA.

Agregar enzima proteolítica a la masa de pan tiene un costo de 2,5 ¢ por cada 100 libras de harina empleada. Esto incluye, también, el gasto del diluyente o el costo de tabletear. Aunque el uso de la enzima reduce notablemente el tiempo de amasijo, hay un real ahorro en la energía requerida en las mezcladoras de masa.

El gasto que significa agregar alfa-amilasa de origen fúngico a la harina es de 0,5 a 10 ¢ por cada 100 libras de harina (para la suplementación en el molino).

9.6. GLUCOSA.

El costo de la enzima para convertir 100 libras de almidón de maíz (del almidón mismo o de harina de maíz) en glucosa es de 40-60 ¢. Este es un porcentaje sustancial del valor que tiene al final la glucosa.

La comparación de costos entre el proceso enzimático y el proceso hidrolítico mediante ácido, debe considerar muchas variables. Entre ellas se pueden mencionar; costo del agente de conversión; ácido versus enzima; valor del equipo (equipo resistente a la corrosión, equipo prensador, tamaño de los equipos); rendimiento de glucosa; período de hidrólisis; valor del líquido madre después de la cristalización de la glucosa.

En las plantas productoras de glucosa, el costo de las enzimas es apreciablemente más bajo, su valor es de 40 ¢ por 100 libras de almidón, si están capacitadas para producir su propia enzima (3).

VIII

DESCRIPCION DE TECNICAS DE ANALISIS DE ENZIMAS EN ALIMENTOS

1. APLICACIONES ANALITICAS DE LAS ENZIMAS.

Los métodos analíticos enzimáticos juegan hoy día un rol muy importante en el análisis de alimentos. Ellos permiten la rápida y segura determinación de numerosos compuestos de los alimentos en el laboratorio, incluyendo problemas analíticos que son extremadamente difíciles, si no imposibles, para ser determinados por métodos convencionales. Los requerimientos básicos para el éxito y seguridad en los ensayos enzimáticos están en los reactivos y condiciones de trabajo.

Desde el punto de vista analítico, la valoración de la actividad enzimática en los alimentos puede aplicarse para diferentes fines:

a) Como indicador del estado higiénico y de conservación de un alimento al determinar la actividad de alguna enzima producida por microorganismos, por ej., la prueba de la reductasa y catalasa en leche y jugos;

b) para controlar tratamientos tecnológicos en alimentos que han sido sometidos a altas o bajas temperaturas, como en el caso de la fosfatasa, peroxidasa y aldehído-reductasa, que se usan para el control de pasteurización y esterilización de leche y de la prueba de la ureasa residual en soya, para demostrar la destrucción total de sus componentes antibiológicos. En el proceso de "blanching, blanqueado o escaldado", el test de peroxidasa es fundamental.

Medidas continuas de actividades enzimáticas durante el tratamiento, el almacenamiento y en los procesos enzimáticos de maduración pueden suministrar importantes informaciones sobre fenómenos biodinámicos que ocurren en los alimentos;

c) para determinar mediante enzimas puras algunos *componentes* de alimentos, a veces difíciles de valorar por métodos exclusivamente químicos.

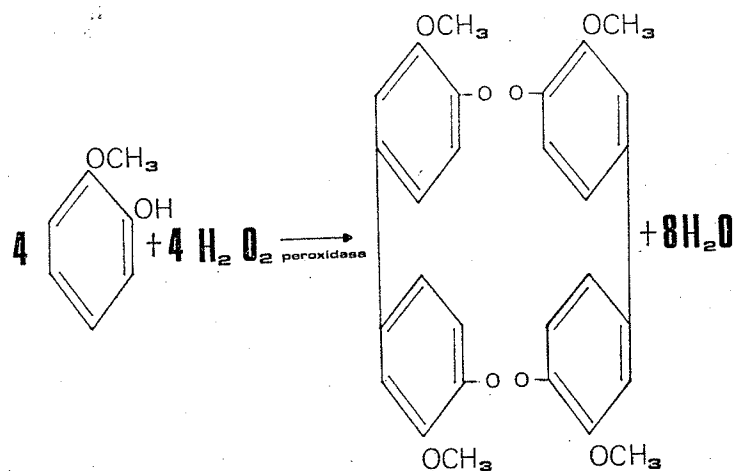
Ejemplos son la determinación de glucosa en la miel por su oxidación específica mediante la glucosa-oxidasa y la determinación de ácidos orgánicos como el láctico y el málico con enzimas específicas: la lactato- y la malato-dehidrogenasa.

También se han elaborado técnicas de análisis enzimáticos para la determinación analítica específica de ácido cítrico, ácido glutámico, ácido pirúvico, ácido glucónico y glucono-delta-lactona, colesterol, sorbitol y diferentes glúcidos en alimentos (58);

d) para determinar la naturaleza y concentración de *sustancias extrañas* en los alimentos, como antisépticos, antibióticos, pesticidas u otros tóxicos.

2. DETERMINACION DE ACTIVIDAD DE PEROXIDASA Y DE SU REGENERACION.

a) La peroxidasa es una enzima que cataliza la oxidación de ciertos compuestos dadores de hidrógeno, como fenoles (guayacol, pirogalol) y aminas aromáticas (o-fenilendiamina) por medio de peróxidos (H_2O_2). El sustrato oxidable más usado es el guayacol, que es oxidado a un complejo coloreado de tetraguayacol en presencia de peroxidasa:



La velocidad de formación del color rojo ladrillo puede ser utilizada como medida de la actividad enzimática por lecturas espectrofotométricas de las absorbancias en relación con el tiempo.

La peroxidasa presenta como grupo prostético un grupo Hem, cuyo átomo central de hierro forma complejos con diferentes compuestos, como los cianuros y la hidroxilamina, inhibiéndose su actividad enzimática.

La actividad enzimática depende del vegetal (los rábanos picantes son especialmente activos), del sustrato oxidable que se emplea como reactivo y del pH y temperatura a que se trabaja.

Como la mayoría de las enzimas, la peroxidasa puede ser inactivada por el calor, siendo una de las que precisa mayor temperatura y más tiempo para su inactivación. Posee, además, la propiedad peculiar de la *regeneración enzimática*. Este fenómeno consiste en que al inactivarla por medio del calor re-

cupera parcialmente su actividad después de un cierto tiempo. Esto ha sido explicado, aduciendo que la fracción proteica de la enzima sufre una desnaturalización sólo parcial, con pérdida de su estructura terciaria, si el calor se aplica un tiempo muy corto, produciéndose luego una reversión de la proteína a su estado normal por recombinación de sus grupos hidrógenos o sulfhidrúlicos.

Este efecto del calor sobre la actividad peroxidásica es muy importante en la industria de alimentos y la regeneración enzimática de la peroxidasa puede causar serios problemas en los caracteres organolépticos. Se ha demostrado en el laboratorio que esta actividad enzimática puede detenerse totalmente, si el calentamiento es suficientemente largo, de manera que sobre 30" la regeneración es muy débil generalmente.

La investigación de la peroxidasa ha sido usada para evaluar la eficiencia del escaldado o blanqueo de verduras y también en el control de pasteurización de la leche. Así, a la temperatura de pasteurización, la lactoperoxidasa se inactiva, pero se regenera; en cambio, si la leche es sobrecalentada (más de 80-85°C) la peroxidasa pierde su actividad en forma definitiva.

b) *Procedimiento*: Colocar 0,1 ml de guayacol líquido junto con 0,2 ml de H₂O₂ al 0,9% y 4,7 ml de agua en un tubo de ensayo (a). Dentro de un tubo del espectrofotómetro colocar 1 ml de jugo de expresión de nabo, filtrado y diluido (1 + 199) y 4 ml de agua (b). Agregar la mezcla de guayacol y agua; oxigenada (a) al tubo del espectrofotómetro y tomar el tiempo con cronómetro. Vaciar rápidamente la mezcla al tubo vacío y luego nuevamente al tubo del espectrofotómetro. Colocar el tubo en el espectrofotómetro, previamente estandarizado con agua a 470 nm. Anotar las lecturas de absorbancia a 470 nm cada 20 segundos hasta obtener 4 ó 5 puntos. Graficar las lecturas de absorbancia contra los tiempos para obtener así la graduación de la reacción.

c) *Renegeración*: Colocar alrededor de 4 ml del jugo diluido (1 + 199) en tres diferentes tubos de ensayo. Colocarlos en un baño hirviente (o calentado al vapor) y sacar el primer tubo después de 30 segundos, el 2º después de 1 minuto y el 3º después de 2 minutos. Enfriarlos rápidamente en un baño de agua y determinar de inmediato la actividad peroxidásica, como se ha descrito anteriormente. Después de 1 hora repetir la determinación de la actividad en los tres tubos calentados.

2.1. DETERMINACIÓN DE PEROXIDASA EN VEGETALES (59, 60, 61, 62).

Fundamento del método:

El método se basa en la oxidación del guayacol (inoloro) a tetraguayacol (rojo ladrillo). El substrato es el guayacol-peróxido de hidrógeno y la reacción es catalizada por la enzima peroxidasa.

Obtención del extracto crudo (de arvejas, porotitos verdes):

Se homogeneiza la muestra (60 a 150 g) en un omni-mixer a velocidad máxima por espacio de 3 minutos, manteniendo la temperatura a 0°C en baño de hielo. El extracto se obtiene en tampón de citrato 0,6 M a pH 4,5 (3 ml por g de tejido) y más o menos 1 g de carbonato de calcio.

La centrifugación se hace en una centrífuga tipo Sorvall a 0°C y a velocidad de 12.000 rpm durante 10 minutos. Algunos autores saturan la mues-

tra con N_2 , usando un tubo de vidrio corriente. Se filtra el extracto a través de algodón, descartando los primeros 10 a 20 ml del filtrado.

Reactivos:

- a) Nitrógeno (de cilindro).
- b) Citrato tampón (pH 4,5) preparado de la siguiente forma:
 - Disolver 126 g de ácido cítrico en más o menos 800 ml de agua dest.
 - Agregar suficiente sol. de NaOH para llevar el pH a 4,5 (solución 7,5 N de NaOH). Enrasar a 1.000 ml; la concentración del citrato es de 0,6 M.
 - Agregar unos ml de tolueno como preservativo, agitar y usarlo diluido con parte igual de agua dest. Guardar en refrigerador para retardar el desarrollo de hongos.
- c) Solución de guayacol 0,5% en alcohol de 50%.
- d) Agua oxigenada al 0,085% ó 0,05 N (diluir a un litro con agua dest., 2,83 ml de agua oxigenada de 30%). Guardar en refrigerador, preferiblemente en frasco obscuro, y renovarla semanal o mensualmente, dependiendo de la frecuencia de su uso.

Procedimiento:

En un tubo de ensayo que contiene 20 ml de agua dest., agregar 2 ml del extracto enzimático. Agregar 1 ml del reactivo de guayacol, dejándolo escurrir por las paredes del tubo, para formar una capa intermedia.

Se agrega 1 ml de la sol. de agua oxigenada al 0,085%, del mismo modo que el reactivo anterior.

Se tapa el tubo, se invierte rápidamente 2 ó 3 veces para mezclar bien y se coloca en la forma más rápida en el tubo del colorímetro Klett-Sumner-son, leyendo a 420 nm. Previamente el aparato debe ajustarse a 0 con agua dest. a la misma longitud de onda. La medición periódica de la intensidad de color desarrollado se hace por triplicado.

La reacción es lineal en el tiempo hasta los 15 min., considerándose el mejor tiempo los 5 minutos.

La actividad de peroxidasa se expresa como unidades KLETT/mg de proteína por 5 minutos de reacción.

Determinación de proteína:

Si se trata de extracto opaco, se recomienda la determinación por el método turbidimétrico (70). Pueden aplicarse también otros métodos de valoración de proteínas.

La enzima más usada para evaluar el grado de escaldado es la peroxidasa. Las principales razones para este uso son las siguientes:

—su presencia en cantidad considerable en prácticamente todos los alimentos que requieren del proceso de escaldado;

—su estabilidad al calor;

—su actividad puede ser fácilmente evaluada también por métodos simples y rápidos, como su extracción semicuantitativa que es una simplificación del método cuantitativo anteriormente señalado, en que se detecta visualmente el color a los 3,5 minutos de reacción. Para ello se miden:

1 ml de sol. de guayacol;

1 ml de sol. de agua oxigenada;

0,1 ml de extracto enzimático, y

21,9 ml de agua.

Se incuba a 25°C y se va observando el desarrollo o no de color rojo, medible a 460 nm (61, 62).

2.2. En forma semejante se procede a la determinación de la *LACTOPE-ROXIDASA* para el control de la pasteurización, sobrecalentamiento o esterilización de leche: a 3 ml de leche se agregan 3 ml de solución de guayacol al 1% en alcohol de 50% y 3 gotas de agua oxigenada. Dentro de 5 minutos se produce color rojo o salmón en leche cruda o pasteurizada a baja temperatura, siendo su límite térmico de 75 a 82°C.

2.3. DETERMINACIÓN DE PEROXIDASA EN ALIMENTOS QUE LA CONTIENEN EN PEQUEÑAS CANTIDADES (por ejemplo, en maíz dulce) (75).

Fundamento:

Este método de valoración de la enzima peroxidasa se basa en medir el color desarrollado al reaccionar la enzima sobre la o-fenilendiamina, en presencia de peróxido de hidrógeno, leyéndose la absorbancia a 430 nm.

Reactivos:

- a) Solución tampón de pH 6,5 (fosfato-citrato).
Se prepara mezclando 14,2 partes de fosfato disódico 0,2 M y 5,8 partes de ácido cítrico 0,1 M.
- b) Orto-fenilendiamina al 1% (en alcohol al 95%; se debe preparar fresca cada 4 horas).
- c) Agua oxigenada al 0,3%.
- d) Solución saturada de bisulfito de sodio.

Procedimiento:

Se pesan aproximadamente 4 g de material fresco y se lleva a 250 ml con tampón fosfato-citrato (a) de pH 6,5 y se somete a homogeneización en mezcladora eléctrica por 3 minutos; 10 ml de este extracto se llevan a 250 ml con el mismo tampón.

Una alícuota de 25 ml de la muestra homogeneizada y diluida se transfiere a una botella centrífuga de 250 ml. Por otra parte, 25 ml de alícuota de cada muestra se usan para preparar los blancos. Debe mezclarse bien antes de tomar las alícuotas, pues parte de la enzima se localiza en las partículas sólidas que tienden a sedimentar. Las muestras se mantienen en baño a t° constante de 25°C por 30 min.

A continuación, a la muestra problema se le agrega 1 ml de solución de o-fenilendiamina al 1% y 1 ml de H₂O₂ al 0,3%, dejándose la mezcla reaccionar por 5 minutos. A este tiempo debe detenerse la reacción agregando 2 ml de la solución saturada de bisulfito de sodio.

A los blancos se les agrega la fenilendiamina, luego el bisulfito y, por último, el agua oxigenada. La enzima es inhibida por el bisulfito de modo que ella está inactivada cuando se agrega el peróxido de hidrógeno.

Cuando se trata de productos ricos en almidón, es aconsejable precipitarlo, agregando para ello 25 ml de alcohol de 95%; se agita mientras se agrega el alcohol para lograr una buena floculación.

Las muestras se centrifugan a 3.000 rpm por 5 minutos. El supernadante se presenta como una solución clara y se transfiere a un tubo del colorí-

metro. Se lee la absorbancia a 430 nm. El colorímetro se lleva a 100% de transmitancia con el correspondiente blanco de cada muestra.

Si se pesan 4 g de material fresco y se obtiene una lectura de 0,5, el resultado se calcula de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\frac{0,5}{\frac{4}{250} \times \frac{10}{250} \times 25} = 31 \text{ U. de absorbancia/g}$$

Cuando se toman cantidades mayores y se hacen diluciones menores, los valores de U/g se pueden calcular de la misma manera.

2.4. DETERMINACIÓN DE PEROXIDASA EN VEGETALES CONGELADOS (68).

Reactivos estables:

a) Solución tampón de fosfato-oxalato 0,1 M, pH 6,0: Disolver 14,2 g de Na_2HPO_4 (o 26,81 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 + 7\text{H}_2\text{O}$) y 12,6 g de $\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4 + 2\text{H}_2\text{O}$ en agua y calentar; enfriar, ajustar el pH a 6,0 con hidróxido de sodio 1 N y diluir a 1 litro.

b) Solución de ácido oxálico 1 M: Disolver 126 g de ácido oxálico en agua y diluir a 1 litro.

c) Solución de cloruro de sodio al 2%: Disolver 20 g de NaCl en agua y diluir a 1 litro. Enfriar a 0°C y mantenerlo a esa temperatura.

Reactivos relativamente inestables:

d) Solución de agua oxigenada 0,1 N: Diluir 0,58 ml de agua oxigenada al 30% a 100 ml con agua. Estandarizarla yodométricamente como sigue: a 25 ml de agua oxigenada 0,1 N agregar 10 ml de ácido sulfúrico 4 N, 6 ml de KI 1 N y 3 gotas de molibdato de amonio 1 N. Titular con solución de tiosulfato de sodio 0,1 N, usando almidón como indicador. Esta solución debe mantenerse en refrigeración cuando no se use. Debe prepararse semanalmente.

e) Solución de indo-fenol 0,001 N: Disolver 200 mg de 2,6-diclorofenol-indofenol o 175 mg de su sal sódica, en agua y diluir a 1 litro. Estandarizarla contra tiosulfato de sodio 0,01 N titulando el yodo liberado con 50 ml del colorante después de adicionar 10 ml de KI 1 N y 10 ml de H_2SO_4 4 N. Mantener en refrigeración y prepararla cada semana.

f) Solución de ácido ascórbico 0,05 M: Disolver 880 mg de 1-ácido ascórbico en tampón (a) 0,1 M y diluir a 100 ml. Prepararla fresca todos los días.

Preparación del extracto enzimático:

Homogeneizar 50 g de material fresco o congelado en una mezcladora a alta velocidad con 200 ml de la solución de cloruro de sodio al 2%, fría. Eliminar las partículas mayores, por filtración, a través de gasa. Usar esta solución dentro de 30 minutos.

Procedimiento:

En un vaso de 400 ml colocar: 75 ml de tampón (a), 50 ml del colorante (e), 5 ml de ácido ascórbico (f) y suficiente cantidad de agua (para alcanzar un

total de 250 ml después de adicionar el extracto en ensayo y agua oxigenada). Calentar a una temperatura de más o menos 25°C o enfriar en caso de bajarla a la misma temperatura.

Colocar el vaso en un agitador magnético y agitar por 30 segundos, a una velocidad tal de impedir la penetración de aire. Agregar a continuación 1-3 ml del extracto enzimático problema (equivalente a 0,2-0,4 g de tejido) y rápidamente agregar 5 ml de H₂O₂. Poner en función el cronómetro inmediatamente después de agregar el agua oxigenada. Continuar mezclando a medida que se agrega el agua oxigenada y hasta que se retire la primera alícuota.

Dentro de los 15-30 segundos después de agregar el agua oxigenada, medir 25 ml de la mezcla reaccionante con una pipeta de flujo rápido de tal manera de poder expulsar el contenido en 5 segundos y hacerlos caer en 5 ml de la solución de ácido oxálico (b) colocados en un Erlenmeyer de 125 ml. Tomar 4-5 muestras consecutivas a 1 minuto de intervalo y vaciar en otros matraces de 125 ml que contiene cada uno 5 ml de ácido oxálico (b).

Registrar el tiempo de reacción que corresponde al tiempo que demore en vaciarse la pipeta. Titular el ácido ascórbico residual con la solución de indo-fenol y calcular la reacción de primer orden. Ajustar la actividad enzimática de modo que la constante sea de la magnitud de 5-20 x 10⁻² y expresar la actividad de peroxidasa K_f como K₁/g de tejido usado.

Los puntos finales deben ser rosados claramente visibles y permanecer por espacio de 1 minuto. Todas las titulaciones deben asemejarse a la primera en su límite. Agregar el indo-fenol en forma rápida al comienzo y posteriormente en forma más lenta.

$$K_f = \frac{1}{t_b - t_a} \log \frac{\text{titulación en blanco} - \text{titulación a } t_a}{\text{titulación en blanco} - \text{titulación a } t_b}$$

g / muestra / 50 ml de mezcla reaccionante

t_a y t_b son tiempos iniciales y finales de dos titulaciones bajo las condiciones estipuladas.

Bajo condiciones óptimas el valor de la titulación inicial es de 35-40 ml de colorante y los valores disminuyen a 20-25 ml en 5 minutos.

Este es el método de cálculo que se aplica en la determinación de catalasa, pero también puede tomarse la recta (slope of plot) del logaritmo de los ml de colorante versus tiempo. Dividir el promedio del valor de K₁ para los diversos intervalos de tiempo (0-1, 1-2, 2-3 minutos) por el peso del tejido vegetal, correspondiendo al vol. de extracto en la mezcla de reacción.

3. DETERMINACION DE CATALASA EN VEGETALES.

Reactivos relativamente estables:

a) Solución fosfato tampón 0,1 M, pH 6,95 ± 0,15: Disolver 15,22 g de K₂HPO₄ + 3H₂O y 4,54 g de KH₂PO₄ en agua y diluir a 1 litro.

b) Acido sulfúrico con molibdato 2N: Agregar 55 ml de H₂SO₄ a más o menos 800 ml de agua, enfriar y agregar 0,1 g de molibdato de amonio finamente molido (NH₄)₆MoO₇ + 24H₂O.

c) Solución de tiosulfato de sodio (más o menos 0,01N) en solución de yoduro de potasio al 10%: Disolver 100 g de KI, 2,50 g de Na₂S₂O₃ + 5H₂O

y más o menos 1 g de carbonato de sodio en 500 ml de agua; diluir a 1 litro (no es necesario estandarizar).

d) Solución de yodo 0,01 N: Disolver 1,27 g de yodo y 2 g de yoduro de potasio en 10 ml de agua y diluir a 1 litro. Se estandariza contra una solución de tiosulfato de sodio. Evitar exponerla a la luz excesiva, aun cuando esté en la bureta.

Reactivos relativamente inestables:

e) Peróxido de hidrógeno 0,1 N: Diluir 0,58 ml de agua oxigenada al 30% a 100 ml con agua fría. Guardar en refrigerador o baño de hielo cuando no esté en uso. Preparar diariamente.

f) Solución de glucosa al 20% en solución tampón: Disolver 20 g de glucosa en 100 ml de fosfato 0,1 M (a). Guardar en refrigerador y prepararla semanalmente.

g) Indicador de almidón: Suspender 1 g de almidón en 100 ml de agua fría, agitar y calentar a ebullición. Preparar cada dos semanas.

Preparación de las muestras (extractos):

Para evitar contaminación con metales pesados, manejar las muestras sólo con espátulas de acero inoxidable.

a) Vegetales congelados o frescos: 50 g del producto se homogeneizan a alta velocidad por 3 minutos con más o menos 1 g de carbonato de calcio y suficiente agua como para completar 200 ml. Eliminar las partículas, filtrando por gasa. Usar el filtrado dentro de 30 minutos.

b) Vegetales secos: Rehidratar 5 g de la muestra y proceder a la extracción como en a).

Determinación:

a) Demostrar presencia o ausencia de catalasa: A 10 ml de extracto (o menos, dependiendo de la actividad) agregar agua hasta un volumen de 43 ml y 5 ml de la solución de glucosa (f). Mezclar y agregar 2 ml de H_2O_2 0,1 N. Inmediatamente después de agregar el agua oxigenada, mezclar rápidamente; de inmediato sacar una alícuota (que va a corresponder al tiempo cero) con una pipeta de succión rápida y vaciar en un Erlenmeyer de 125 ml que contiene 10 ml de H_2SO_4 -molibdato (b). Empezar a contar el tiempo cero desde que se sacó la alícuota de tiempo cero. Sacar 10 ml de la alícuota a los 5 y 10 minutos (La temperatura de la mezcla de reacción debe permanecer a menos de 20°C).

A cada tiempo, dentro de 1 hora, agregar a cada matraz 5 ml de tiosulfato-yoduro (c) y mezclar. Dejar en reposo 3 a 5 minutos; en seguida titular el exceso de tiosulfato con solución de yodo 0,01 N, usando 10 gotas de almidón como indicador.

Correr un blanco de la misma manera, excepto agregar agua en lugar del agua oxigenada y no sacar alícuotas a los 5 y 10 minutos.

La diferencia entre los valores del blanco y los obtenidos en presencia de agua oxigenada corresponde a la solución de yodo, equivalente al agua oxigenada presente en los respectivos tiempos. El valor del tiempo cero deberá ser 0,5 a 2,0 ml de sol. de yodo; diferencias entre el blanco y el tiempo cero serán entre 3,0-4,5 ml de sol. de yodo 0,01 N.

3.1. Determinación de catalasa en solución.

Las condiciones del test son:

1 ml de H_2O_2 0,06 M en tampón de fosfato, 0,05 M de pH 7,0 se mezcla con 2 ml de catalasa o del extracto problema (1,25 $\mu g/ml$) disuelto en tampón de fosfato 0,05 M de pH 7,0 a 25°C y se mide E_{240}/min , haciendo la lectura cada segundo durante los primeros 70 segundos de la reacción. Una unidad de catalasa corresponde a la cantidad de enzima que bajo las condiciones del ensayo transforma 1 μmol de sustrato por minuto.

3.2. Determinación de catalasa en leche.

La determinación de presencia de catalasa junto con la reductasa sirve para conocer el estado de conservación de la leche, pues con el número de gérmenes aumentan también las catalasas y reductasas que ellos producen.

En un catalasímetro apropiado que permite medir el volumen de oxígeno que se desprende, se colocan 10 ml de leche y 5 ml de agua oxigenada (3%). Se lleva durante 2 horas a 37°C y se mide el volumen gaseoso que se desprende, expresando el resultado en ml de $O_2\%$. En el catalasímetro de Roeder se usan 5 ml de leche más 1 ml de agua oxigenada al 1,67% (obtenida por mezcla de 10 ml de H_2O_2 30% con 140 ml de agua), adicionada de dibromotimol, indicador de pH cuyo viraje se reconoce por la coloración que toma la mezcla (reacción alcalina: azul-verdoso; ácida: verde-oliva a amarillo). Aquí el volumen se mide después de 30' a 37°C. La leche normal cruda desprende hasta 30 ml de $O_2\%$, la pasteurizada hasta 6 ml y la leche cocida y esterilizada no presenta desprendimiento. Las leches enfermas, sucias o calostrales desprenden hasta 10 ó 15 veces más que una leche normal.

4. DETERMINACION DE REDUCTASA EN LA LECHE.

En la leche debe hacerse distinción entre la *Reductasa* generada por los microorganismos presentes y cuya actividad aumenta a medida que éstos aumentan, por lo que sirve para controlar el estado higiénico y de conservación de la leche y la *aldehido-reductasa* componente de la leche, cuya actividad se utiliza para controlar el tratamiento térmico (pasteurización, esterilización) a que se ha sometido la leche.

4.1. PRUEBA DE LA REDUCTASA.

En un tubo de ensayo, grande y estéril, se vierten asépticamente 20 ml de leche (dentro de las 4 horas siguientes a la extracción de la muestra), y 1 ml de solución de azul de metileno, obtenida por mezcla de 5 ml de su solución alcohólica saturada con 195 ml de agua. Se tapa el tubo y se calienta 5' a 37°C, luego se invierte varias veces para asegurar la distribución uniforme de la crema y se incuba a 37°-38°C en posición vertical, invirtiendo cada media hora y protegido de la luz solar o eléctrica. Se mide el tiempo desde que se inicia la incubación hasta que por lo menos los 4/5 de la leche se han descolorado. La leche cruda y la pasteurizada deben resistir más de 5½ horas sin descolorarse y la destinada a la pasteurización, por lo menos 3 horas.

Según otra técnica, se colocan en un tubo con tapa atornillada (en las Pruebas de reductasa todo el material usado debe ser estéril) 10 ml de leche y 1 ml de una solución de 1 tableta con 8,8 mg de *tiocianato de azul de metileno* en 200 ml de agua destilada estéril. El tubo, llevado a 36°C, se tapa y se invierte 3 veces. Si después de 30 minutos de incubación a 36°C la mezcla sigue azul, se sigue 1, 2 o más horas hasta que 4/5 del volumen estén descolorados.

4.2. PRUEBA DE LA RESAZURINA.

Representa una modificación de la prueba de la reductasa, en que se substituye el azul de metileno por la resazurina, colorante derivado de la oxazina. En un tubo esterilizado se mezclan 10 ml de la leche con 1 ml de la solución colorante al 0,2 por mil en agua destilada estéril. Después de mantener la mezcla durante 10' a 37°C se compara el color resultante con una escala cuyos colores tienen los siguientes valores comparativos:

Nº I, de color azul; Calificación: muy buena = Reductasa: 5 horas o más.
Nº II, de color azul-violeta; Calific.: buena = Reductasa: 2 a 5 horas.
Nº III, de color rojo-violeta; Calific.: suficiente = Reductasa: 20' a 2 horas.
Nº IV, de color rojo; Calificación: insuficiente = Reductasa hasta 20'.
Nº V, incoloras Calificación: mala = Reductasa: hasta 20'.

También se pueden leer los colores en un Comparador de Lovibond.

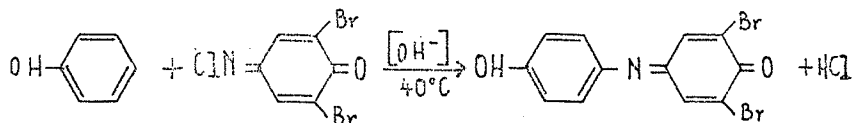
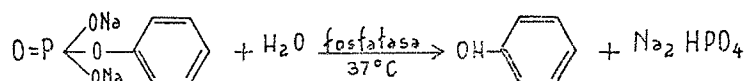
4.3. PRUEBA DE LA ALDEHÍDO-REDUCTASA.

La enzima causante es la xantino-o-aldehído-dehidrogenasa, que cataliza la oxidación de xantina y de diversos aldehídos a ácido úrico y los respectivos ácidos carbónicos; se trata de una flavoproteína con molibdeno. La reacción se basa en que la dehidrogenasa, en presencia de HCHO, descolora el azul de metileno como aceptor de H₂. 10 ml de leche se adicionan de 1 ml del reactivo constituido por una mezcla de 5 ml de solución alcohólica saturada (2%) de azul de metileno (exento de zinc), 5 ml de solución de formalina al 40% y 190 ml de agua destilada. Se agita y se lleva a 55°C, sin agitar más, midiendo el tiempo en que se produce la descoloración. La leche cruda se descolora en menos de 7', la pasteurizada entre 7' y 20' (la stassanizada en más de 12'), y la cocida en más de 30'. Estas cifras pueden ofrecer variaciones, teniendo la interpretación de esta prueba sólo valor en conjunto con las demás. Esta enzima se encuentra sólo en la leche de vaca, de manera que permite reconocer su adición a la leche humana (41).

5. DETERMINACION DE FOSFATASA EN LA LECHE.

a) El método más usado se basa en la hidrólisis del *disodio-fenilfosfato* por acción de la fosfatasa de la leche con liberación de fenol, el cual se reconoce al hacerlo reaccionar con la *dibromoquinon-clorimida*, dando indofenol de color azul:

Reactivos necesarios: Solución tampón de bórax: 28,427 g de bórax crist. (p.an.) se disuelven en 900 ml de agua, se agregan 3,27 g de NaOH y se completa 1 litro con agua (pH 9,6).



Mecanismo de la Reacción de la Fosfatasa.

Reactivo BQC: 40 mg de 2,6-dibromo-quinona-4-clorimida (Merck: para determinar fosfatasa en leche) se disuelven en 10 ml de etanol.

Substrato tampón (de preparación reciente): 0,5 g fenilfosfato sal disódica, dihidrato (Merck: para determinar fosfatasa en leche) se disuelven en 5 ml de agua, se agregan 100 ml del tampón de bórax y se completa 1 litro con agua, debiendo tener un pH de 9,6 (azul a la timolftaleína). [Si se desea comprobar la ausencia de fenol libre, la solución del fenilfosfato en los 5 ml de agua se agita con 0,5 ml de tampón de bórax y luego con 4 gotas de reactivo BQC. Si en 10' resulta color azul, se extrae éste con 2 ml de butanol y se usa el líquido inferior, ahora decolorado, agregando los 100 ml de bórax y completando el litro con agua].

Técnica: 10 ml de substrato tampón se adicionan de 1 ml de leche, bien homogeneizada por inversión repetida, pues los glóbulos grasos adsorben mucha fosfatasa. Se agita y se incuba a 41°C (37-45°C) durante 10' (Scharer indica 38-40°C durante 1 hora); luego se hierve (o se calienta a 80°C durante 5'), se enfría, se agregan 5-10 gotas de reactivo BQC y se deja reposar por lo menos 5'. Debe hacerse simultáneamente una prueba en blanco con leche calentada a 80°C durante 5' para inactivar la fosfatasa. Pruebas en blanco sin leche o sin substrato tampón deben resultar también negativas.

Como la cantidad de fenol liberado es proporcional a la actividad fosfátasa y, por lo tanto, a la intensidad del color azul, se le puede dar también una apreciación cuantitativa (68), midiendo su extinción a 660 nm y haciendo la lectura en una curva de calibración que confronta los mcg de fenol con las extinciones obtenidas. El límite térmico es de 72-73°C, de manera que una leche stassanizada da generalmente resultado negativo. Según Scharer, una leche correctamente pasteurizada no debe desprender más de 15 mcg de fenol por ml.

En la mantequilla se incuba 1 g con 10 ml del substrato y en el queso se trabaja con el macerado de 1 g en 10 ml del substrato, después de ajustar el pH a 9,6.

b) Otra técnica (49) usa como reactivo el *disodio-p-nitrofenilfosfato*, que es hidrolizado por la fosfatasa a p-nitrofenol, de color amarillo. 5 ml de un *substrato tampón* (con 0,15 g de 4-nitrofenilo-fosfato, sal disódica, disuelta en un tampón con 3,5 g de Na₂CO₃ anhidro y 1,5 g de NaHCO₃ por litro de agua) se mezclan con 1 ml de leche y se calienta a 37°C por 30 min. El color resultante se puede comparar con los discos de colores estándares de un comparador de Lovibond, graduados en µg de p-nitrofenol por ml de leche. La leche pasteurizada da 0 o trazas de µg hasta 10 µg, si se incuba 90 min. más.

6. DETERMINACION DE POLIFENOLOXIDASA (peras y manzanas)
(36, 63).

Fundamento:

Se basa el método en medir espectrofotométricamente, a intervalos de 1 minuto, el aumento de absorbancia de una mezcla de la solución enzimática con ácido clorogénico como sustrato. Al graficar la absorbancia contra el tiempo, los resultados se expresan en aumento de absorbancia por minuto y por g de proteína.

Reactivos:

1. Cloruro de potasio 0,3 M.
2. Solución tampón pH 5,2: 23,3 ml de solución de ácido cítrico 0,1 M (19,21 g en 1 litro) más 26,7 ml de sol. de fosfato disódico 0,2 M (53,65 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 + \text{H}_2\text{O}$ ó 71,7 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 + 12\text{H}_2\text{O}$ en 1 litro) más agua destilada c.s.p. 100 ml.
3. Solución de ácido clorogénico $3,33 \times 10^{-3}$ M en solución tampón.
4. Solución de enzima: para extraer la enzima se pesan 70 g de manzana o pera mantenidas, por lo menos dos horas antes en congelador a 0°C ; luego se mordan y trozan. Se homogeneiza en mezcladora eléctrica con KCl 0,3 M a 4°C , que actúa como líquido de extracción. La mezcla se centrifuga por 30 min. a 10.000 rpm en centrífuga refrigerada a 0°C . El sobrenadante se filtra al vacío y luego se enrasa a 200 ml con la sol. KCl.

Procedimiento:

En un matraz de 125 ml se colocan 25 ml de la solución tampón y 10 ml de la solución de ácido clorogénico. Se mezcla suavemente y se mantiene por 10 minutos en un termostato a 30°C . Luego se adicionan 5 ml de la solución enzimática ajustada a 0,1 mg/ml de proteína; se agita suavemente unos segundos y se vuelve a llevar al baño de agua, a 30°C (sin agitación posterior). A intervalos de 1 minuto o 30 segundos se lee el aumento de absorbancia a longitud de onda de 390 nm. Como blanco se usa una mezcla igual a la anterior, pero hervida por 10 minutos, reconstituyendo su volumen original con agua.

Cálculos:

La actividad enzimática se mide al espectrofotómetro en % de transmitancia (% T), el cual se expresa en absorbancia (A), aplicando la siguiente fórmula:

$$A = 2 - \log T$$

Para expresar la actividad enzimática se grafican las absorbancias por minuto y por g de proteína contra el tiempo (cada minuto) y se usa la pendiente inicial de la curva obtenida (porción recta).

6.1. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS.

En un tubo del fotocolorímetro Klett-Summerson se colocan 5 ml de la solución enzimática sobrenadante, se agregan 5 ml de ácido tricloroacético al 6% y se mide la extinción a 515 nm, usando un filtro verde N° 54. Se usa

como blanco una mezcla de 5 ml de agua más 5 ml de ácido tricloroacético al 6%. Los valores obtenidos se pueden comparar con los de una solución tipo de seroalbúmina de concentración igual a 2 mg/ml. El extracto enzimático original puede tener una concentración en proteínas mayor que 0,1 mg por ml; para poder ajustarla después a esta cifra se diluye con cloruro de potasio 0,3 M.

6.2. DETERMINACIÓN DE SUBSTRATOS POLIFENÓLICOS.

En la industria de alimentos se puede presentar el problema de efectuar una adecuada selección de variedades de frutas que presentan en menor grado el fenómeno del pardeamiento enzimático, sea por su menor contenido en substratos fenólicos, sea por su menor actividad enzimática (36).

Los estudios de substratos se pueden efectuar por las siguientes determinaciones:

a) *Pardeamiento actual*, que indica las posibilidades del substrato natural en condiciones óptimas de actividad enzimática. En este caso, se mide la densidad óptica del color pardo que se produce al oxidar el tejido vegetal, en este caso manzanas o peras, con aire, a pH adecuado y con adición de sulfato de cobre, para permitir una actividad óptima de la enzima. Se usa como blanco otra muestra, que en lugar de llevar cobre, contiene tiourea, que al unirse al cobre de la enzima inhibe el pardeamiento. Los resultados se expresan en Unidades por 100 g de fruta, en que 1 Unidad corresponde a una diferencia de 0,1 de densidad óptica.

b) *Pardeamiento potencial*, que mide una disponibilidad total de actividad enzimática, en presencia de exceso de substrato. La determinación se hace en forma semejante a la anterior, con la diferencia que se agregan 20 mg de catecol como substrato fenólico adicional. Los resultados se expresan en las mismas unidades que en el pardeamiento actual.

c) *Determinación directa de ácido clorogénico* y de fenoles totales como substratos; se aplica una reacción colorimétrica que se obtiene haciendo actuar el ácido clorogénico con ácido acético y nitrito de sodio. Los fenoles totales se extraen con alcohol diluido y se miden con un reactivo general de fenoles, según Folin a base de ácido tungstíco o molíbdico (36).

Estudios realizados entre las principales variedades de manzanas chilenas, permiten deducir que la var. Winesap es la más aconsejable para su industrialización, por su bajo pardeamiento actual y potencial. En peras se demostró que la variedad más recomendable es la Winter Bartlett, por su menor actividad enzimática.

Al usar el anhídrido sulfuroso como agente de antipardeamiento (véase éste) hay que asegurarse que el SO_2 haya penetrado hasta el interior de la fruta, sobre todo cuando ésta es posteriormente disgregada o si se trata de frutas que contengan mucho O_2 en sus tejidos, como sería el caso de las manzanas, para evitar que se produzca el pardeamiento interno. Para verificar el grado de penetración del SO_2 al interior de las frutas se usa la llamada prueba del catecol, que consiste en cortar en cruz la fruta o trozo de fruta que se ha sometido a la acción del SO_2 , y luego agregarle en la superficie una solución de pirocatecol al 1%. Si la enzima no ha sido totalmente inactivada se produce la oxidación del catecol y el consiguiente oscurecimiento de la fruta en la porción que tenga enzima activa. Al emplear solución de ácido sulfuroso, la aplicación del test de catecol comprueba que la penetración es casi completa a los 20', a -5°C , mientras que con la sumersión en bisulfito demora cerca de 24 horas, a la misma temperatura.

7. DETERMINACION DE ACTIVIDAD DE PECTINO-ESTERASA (P. E.)

Fundamento:

Como esta enzima hidroliza los grupos metoxilos de la molécula de pectina, se puede medir la liberación de los grupos carboxilos, por titulación potenciométrica con álcali.

Obtención del extracto homogeneizado:

Se pesan 175 g del material (cebolla, naranja, pulpa y cáscara) y se le agrega 5 g de cloruro de sodio, homogeneizando en una juguera eléctrica. El cloruro de sodio sirve para activar la enzima y ayuda a su extracción.

Reactivos:

Solución de pectina al 1% (como sustrato) disuelta en cloruro de sodio 0,2 M.

Solución de hidróxido de sodio 0,01 N.

Procedimiento:

Se miden 2 ml de jugo de limón o 5 ml de zumo de papa (rallada y filtrada).

Si se trata de cebolla se tomarán 1 parte del homogeneizado y 1 parte de agua; en el caso de la naranja se tomarán 1 parte del extracto crudo y 2 partes de agua. Se agita por 4 minutos, dejando en reposo por un momento y posteriormente se toman alícuotas para efectuar la reacción en la forma siguiente:

10 ml de la solución de extracto se agregan a 50 ml de pectina al 1%, colocando la mezcla en baño de agua a 30°C. Se ajusta el pH a 7,5 con NaOH 0,01 N. Cada 5 minutos se ajusta el pH, lo que se hace por un espacio de 30 minutos, anotando en cada intervalo la cantidad acumulativa de álcali gastado. Las curvas se obtienen graficando los ml gastados de álcali versus tiempo.

Conviene trabajar en duplicado y calcular el promedio. El blanco, preparado con la solución enzimática calentada a baño de agua hirviendo por 5 minutos, no debe presentar gasto de hidróxido de sodio, o bien, su valor debe ser restado del consumo total.

Cálculos:

Según la fórmula de Kertesz (56), se multiplica el gasto total de ml de NaOH 0,1 N por el factor 3,1 y se divide por los ml aplicados de la solución de enzima. Este valor representa los mg de grupos metoxilos separados por 1 ml de solución de enzima en 30 minutos, o bien Unidades de pectino-esterasa por ml de solución enzimática.

8. DETERMINACION DE ACTIVIDAD DE ENZIMAS PROTEOLITICAS.

Al presente existen varios métodos para la determinación de proteasas (papaína). Cada uno tiene características ventajosas y desventajosas frente a los

otros y se usan de acuerdo a los requerimientos particulares de la determinación.

Método de Balls y Hoover (66), conocido como el método de coagulación de la leche, es, sin duda, uno de los métodos más expeditos para determinar actividad enzimática de una proteinasa. Se toma como índice de actividad proteolítica, el tiempo necesario para que una cantidad conocida de enzima coagule un determinado volumen de solución de leche. La actividad se expresa en términos de unidades de leche coagulada por g de preparado enzimático. La unidad de leche coagulada se la define como la cantidad en peso de un preparado enzimático necesario para coagular 5 ml de solución de leche estándar por minuto, cuando la temperatura es de 40°C y el pH 6. La principal desventaja de este método radica en el hecho de no medir la proteólisis total, es decir, la hidrólisis de un sustrato de proteína, pero, por el contrario, mide la actividad de la coagulación de la leche. Afortunadamente, sin embargo, la coagulación de la leche parece ser una propiedad característica de los componentes proteolíticos de este grupo de enzimas y puede ser usada con seguridad en la medición proteolítica.

Según algunos autores, las preparaciones es necesario activarlas antes con H₂S o bien con exceso de cianuro.

Método Sørensen, conocido como titulación formólica. Por este método se mide directamente la hidrólisis de una proteína-sustrato realizada por una cantidad conocida de enzima. Cuando las uniones peptídicas se rompen, se liberan grupos -COOH y -NH₂. Para hacer posible la titulación de los grupos carboxilos, los grupos básicos se bloquean con el aldehído fórmico. Los sustratos usuales son la caseína o la gelatina (11).

Método de Anson o Método de la Hemoglobina: Es quizás el método más actualizado para estimar proteólisis. El sustrato que es la hemoglobina denaturalizada, se digiere bajo condiciones estándares. La proteína no digerida se precipita con ácido tricloroacético. La cantidad de proteína no precipitada se valora con reactivo fenólico. La ventaja de la hemoglobina como sustrato sobre la gelatina y caseína, es su reproducibilidad, porque diferentes lotes de hemoglobina son digeridos a la misma velocidad por una proteinasa dada (54). Al aplicarse este método para determinar papainasa se requiere la presencia de un agente reductor, como cianuro, pues de otro modo la hemoglobina inactiva parte o toda la papaína por oxidación.

8.1. DETERMINACIÓN DE RENINA.

Fundamento:

El método se basa en hacer actuar 0,2 ml de una solución de renina (1 : 500) sobre 5 ml de leche descremada, que contiene CaCl₂ 3 M; mezclar e incubar a 37°C, determinándose el tiempo en que demora en aparecer el primer coágulo.

8.2. DETERMINACIÓN DE PAPAÍNA (53).

Fundamento:

El método se basa en medir el aminoácido tirosina que se libera por la acción de la enzima sobre las proteínas, usando el reactivo de Folin.

Reactivos:

- Solución de cianuro de sodio 2,0 M (activador de la enzima).
- Substrato-hemoglobina (Anson): 20 mg/ml de hemoglobina se disuelven en solución tampón de borato 0,1 M, de pH 7,5.
- Acido tricloroacético 0,3 M.
- Solución de NaOH 0,4 N.
- Reactivo del fenol según Folin-Ciocalteu (36,76), dilución: 1 + 2.

Preparación de extracto enzimático:

El producto pesado y molido se extrae con solución tampón de borato 0,1 M de pH 7,5. Luego se centrifuga separándose el sobrenadante que se usará en la determinación.

Procedimiento:

En primer lugar, debe activarse la enzima, para lo cual se toma una alícuota del extracto enzimático problema y se le agrega 0,25 ml de cianuro sódico 2,0 M, manteniéndose la mezcla a 25°C por 3 minutos.

A 5 ml de solución de hemoglobina se le agrega 1 ml del extracto activado y se mantiene a 35,5°C por 10 minutos; para agregar luego 10,0 ml de ácido tricloroacético 0,3 M y centrifugar. Del sobrenadante se toman 5 ml, se agregan 10,0 ml de NaOH 0,5 N y 3 ml del reactivo de Folin (dilución 1 + 2); se lee la absorbancia a 750 nm.

9. DETERMINACION DE ACTIVIDAD DE AMILASA.

La necesidad de determinar la actividad de enzimas amilolíticas en productos como harina, malta y otros, ha hecho desarrollar varios métodos analíticos que miden, ya sea cambios físicos o transformaciones químicas, producidos por las enzimas sobre substratos seleccionados. Entre estos métodos se cuenta el de Lintner, el de la maltosa y el SKB (Sandstedt, Kneen, Blish) (64).

Método de Lintner: Mide principalmente la actividad de la beta-amilasa de malta o de jarabes y se basa en producir maltosa por un infuso de malta, haciendo actuar una solución de enzima en solución tampón, bajo condiciones estándares de tiempo y temperatura. Los grados de Lintner se calculan a partir del poder reductor o contenido de maltosa del almidón convertido, determinado ya sea por el ferricianuro o por la solución de Fehling (41). Los grados de Lintner, multiplicados por el factor 4, dan el equivalente en maltosa.

Método de la Maltosa: Se basa en suspender 10 g de harina en 46 ml de solución tampón de pH 4,5-4,8 e incubár por 1 hora a 30°C. Esto permite que la enzima presente en la harina actúe sobre el almidón y lo convierte en maltosa, la que se determina por el método del ferricianuro. El valor de maltosa se define como los mg de maltosa producidos por 10 g de harina bajo las condiciones ya señaladas.

La maltosa puede también determinarse por el método de Munson y Walker, usando la reacción de Fehling I, II, o bien por titulación yodométrica de Cu no reducido a Cu₂O (41).

Método de Sandstedt, Kneen y Blish (64): Mide la dextrinización de un preparado de alfa-amilasa en términos de tiempo de digestión, requerido pa-

ra producir un cambio de color que refleja la completa dextrinización del almidón. La modificación al método original consiste en medir la dextrinización en presencia de exceso de beta-amilasa para eliminar los efectos variables de beta-amilasa presente en el extracto de malta.

Los resultados se expresan en unidades arbitrarias SKB y representa el número de g de almidón soluble que bajo la acción de exceso de beta-amilasa son dextrinizados por 1 g de malta en 1 hora a 30°C. El punto final se compara con una solución de yodo-dextrina de color rojo pardo.

9.1. DETERMINACIÓN DE ALFA- O DE BETA-AMILASA (COMO TALES) (65).

Fundamento:

Los grupos reductores liberados del almidón se miden por su propiedad de reducir el ácido 3,5-dinitrosalicílico.

Reactivos:

Enzima: Diluir una suspensión cristalina 1 : 500 (o el extracto problema), determinar la concentración proteica mg/ml = $A_{280} \times 0,81$. Para trabajar, diluir 1 microgramo/ml.

Substrato: Solución al 1% de almidón en fosfato de sodio 0,02 M de pH 6,9 con NaCl 0,006 M (para alfa-amilasa) y solución al 1% de almidón en acetato de sodio 0,016 M, de pH 4,8 (para beta-amilasa).

Reactivo de color: 1 g de ácido dinitrosalicílico se disuelve en 20 ml de NaOH2N y 50 ml de agua, se agregan 30 g de sal de Seignette (tartrato de Na y K) y se diluye a 100 ml, protegiéndola del CO₂.

Procedimiento:

0,5 ml de solución de la enzima o del extracto problema se mezclan con 0,5 ml de substrato. Se incluye un blanco con 0,5 ml de agua en reemplazo de la enzima o extracto problema. Se incuba a 25°C por 3 minutos, se agrega 1 ml de reactivo de color, se calienta en agua hirviendo por 5 minutos y luego se enfría. Se agregan 10 ml de agua y se lee a 540 nm. (filtro verde) contra el blanco.

Se establece una curva con maltosa (0,3-3,0 μ moles) para convertir las lecturas colorimétricas a unidades de actividad enzimática, o sea, que libera un micromol de azúcar reductor, calculado como maltosa por minuto y a 25°C bajo las condiciones del ensayo.

10. DETERMINACION DE CELULASA (53).

Fundamento:

Un complejo de enzimas designado como celulasas, hidroliza las uniones beta-glucosídicas 1,4 de la celulosa, liberando glucosa, que es valorable.

Reactivos:

— Substrato: celulosa microcristalina; 5,2 mg de celulosa/ml en solución tampón de pH 4,8.

— Solución tampón de acetato de sodio 0,1 M, de pH 4,8.

- Solución de ácido 3,5-dinitro-salicílico 0,04 M disuelto en NaOH 0,4 N.
- Solución de almidón 100 mg/ml.

Preparación del extracto enzimático problema:

Se pesa una cantidad del producto en estudio, y se homogeneiza con solución tampón de pH 4,8. Se filtra o centrifuga usando el sobrenadante como extracto enzimático.

Procedimiento:

Se toman 24,0 ml de la suspensión de celulosa y se calientan a 30°C. Luego se agrega 1 ml del extracto enzimático, también a 30°C y se mantiene por espacio de 2 horas bajo agitación, a la misma temperatura. Luego se procede a centrifugar y se miden 2 ml del líquido sobrenadante. Se agregan 0,1 ml de la solución de almidón y 2 ml de la solución del ácido 3,5 dinitro-salicílico, manteniendo la mezcla a 100°C por 5 minutos (viraje del amarillo al pardo rojizo).

Después de completar un volumen de 20 ml con agua destilada se mide la absorbancia a 490 nm.

Si no se dispone de ácido 3,5 dinitro-salicílico se puede determinar también la actividad de celulasa de la siguiente manera:

A 200 mg de celulosa microcristalina se agregan 4 ml de solución tampón de acetato 0,05 M, de pH 5,0 y 1 ml de la solución problema. Se incuba bajo agitación por 2 horas a 37°C. Se centrifuga o filtra y se determina la glucosa liberada por los métodos convencionales (65).

Unidad enzimática:

1 Unidad enzimática corresponde a la cantidad de enzima que bajo las condiciones del ensayo, libera 1 microequivalente de grupos reductores por minuto (calculado como glucosa).

II. DETERMINACION DE INVERTASA O SACARASA.

Fundamento:

El método se basa en determinar los mg de azúcar invertido a partir de la reacción que sufre la sacarosa disuelta en tampón acetato y mantenida a 20°C, por adición de una solución de sacarasa o suspensión de levadura a la misma temperatura y posterior determinación del azúcar invertido de acuerdo al método del ácido dinitrosalicílico, el de Munson y Walker o por yodometría (41).

Reactivos:

Colocar 43 ml de acetato de sodio N y 57 ml de ácido acético N en un matraz de 1 litro, enterando volumen con agua bidestilada. Disolver 6,5 g de sacarosa en 96 ml de esta solución tampón, y agregar gotas de tolueno. La solución contendrá 6,5% de sacarosa y el pH será de 4,5. En medio ambiente la solución dura 3 días.

Procedimiento:

5 ml de solución de sacarosa al 6,5% en tampón acetato se dejan incubar a 20°C. Agregar luego 1 ml de solución de sacarasa o de la muestra problema, mantenida también a 20°C, tratando de que se mezclen rápidamente.

Dejar en baño de agua por 5 minutos, luego agregar 5 ml de NaOH 0,1 N. Mezclar y determinar el azúcar invertido en 1 ml por métodos convencionales.

Las unidades de sacarasa se expresan directamente en términos de mg de azúcar formado en 5 minutos, a 20°C y a pH 4,5.

Los mg de azúcar invertido multiplicados por 11 darán las unidades de sacarasa por 1 ml de solución de enzima. Si el valor obtenido es más de 1 o menos de 0,5 mg de azúcar invertido por ml, el análisis debe repetirse, con una dilución mayor o menor de la solución de sacarosa; o aumentando o acortando el tiempo de digestión. La reacción se detiene, agregando al final de los 5 minutos el NaOH.

11.1. DETERMINACIÓN DE INVERTASA EN CERVEZA (PARA EL CONTROL DE SU PASTEURIZACIÓN).

A dos porciones de 20 ml cada una y de las cuales una ha sido hervida se agregan 20 ml de solución de sacarosa al 20%. Después de dejarlas 24 horas a la temperatura ambiente se clarifican con 0,5 ml de subacetato de plomo, se completan con agua a 50 ml, se agitan fuertemente y se filtran. Si las dos muestras presentan una diferencia marcada en su desviación polarimétrica, se trata de cerveza no pasteurizada; en cambio, si la desviación es aproximadamente igual, la cerveza ha sido calentada a más de 58°C, límite térmico de la reacción.

12. DETERMINACION DE LACTASA (beta-galactosidasa) (65).

Fundamento:

La enzima lactasa es capaz de hidrolizar la lactosa, dando glucosa y galactosa.

Reactivos:

- Solución tampón de fosfato de sodio 0,1 M, de pH 7,0.
- Substrato de lactosa al 1,0% en agua.
- Acido perclórico al 4,2%.

Preparación de la muestra:

Una cantidad pesada se trata con solución de fosfato de pH 7,0. Se filtra y se usan alícuotas del sobrenadante.

Procedimiento:

A 4 ml de substrato se agregan 0,9 ml de solución tampón y 0,1 ml del extracto problema en un baño de agua a 37°C a tiempo cero. Después de 15 minutos se detiene la reacción con 1 ml de ácido perclórico. Se valora la glucosa liberada por uno de sus métodos específicos (como ser por la glucosa-

oxidasa) simultáneamente con un estándar de glucosa al 1% en solución tampón.

Unidad enzimática:

1 U es equivalente a 1 micromol de lactosa hidrolizada por minuto a 25°C.

13. DETERMINACION DE GLUCOSA-OXIDASA (53).

Fundamento:

Esta enzima actúa específicamente sobre la glucosa, dando como producto ácido glucónico y agua oxigenada. En presencia de la dupla peroxidasa y o-dianisidina se determina la absorbancia producida por la reacción.

Reactivos:

- Solución tampón de fosfato 0,125 M de pH 7,0.
- Reactivo cromógeno: Clorhidrato de o-dianisidina al 1% en agua.
- Solución de peroxidasa de 60 U/ml: 2 mg/ml en agua destilada.
- Substrato: solución de glucosa 0,1 M disuelta en agua bidestilada, permitiendo llegar al equilibrio de rotación.

Preparación de la muestra:

Una cantidad pesada y bien homogeneizada de la muestra problema se extrae con solución tampón de pH 7,0, se filtra o centrifuga, separando el sobrenadante, que corresponde al extracto enzimático.

Procedimiento:

En primer lugar, se agrega 0,1 ml de solución de o-dianisidina a 12 ml de la solución fosfato de pH 7,0. Se miden 2,48 ml de esta mezcla y se agrega 0,01 ml de la solución de peroxidasa, manteniendo la mezcla final a 25°C. A continuación se agrega 0,1 ml de la solución problema, también a la misma temperatura.

Se mide la absorbancia a 436 nm por 2 a 4 minutos.

Unidad enzimática:

1 U de actividad enzimática de glucosa-oxidasa corresponde a la cantidad de enzima que bajo las condiciones de ensayo, transforma 1 micromol de sustrato por minuto.

14. DETERMINACION ENZIMATICA DE GLUCOSA MEDIANTE GLUCOSA-OXIDASA (glucosa-dehidrogenasa).

Como ejemplo típico de los análisis enzimáticos que se aplican actualmente para la valoración específica de ciertos componentes en productos ali-

menticios, damos a continuación la técnica descrita por Temperli y colab. (67) para determinar la glucosa en mieles y bebidas.

El método se basa en la siguiente reacción enzimática: β -D-Glucosa + NAD \rightarrow D-glucono-lactona + NADH₂, catalizada por la glucosa-dehidrogenasa; por adición simultánea de mutarotasa se aumenta la velocidad de la reacción. Se determina finalmente la cantidad del NADH₂ formado, la cual es proporcional a la concentración de glucosa. La lectura se hace fotométricamente a una longitud de onda de 340 ó 366 nm.

Este método es apropiado para la determinación de glucosa en diversos jugos y néctares de fruta (naranja, durazno, tomate) y de verduras (zanahoria), como también en vinos y mieles. Dada la especificidad de la glucosa-dehidrogenasa frente a la glucosa, no reacciona con la fructosa, ni la sacarosa.

La determinación puede hacerse directamente en el producto diluido. Así los jugos pueden diluirse, por ejemplo, al 1:100; los néctares, al 1:200; los vinos, al 1:20, y la miel, al 1:2.500; tomando después 0,2 ml para el análisis.

Para la realización más rápida y cómoda de esta técnica, los autores mencionados recurren al Juego de Reactivos Merckotest: "Gluc-DH, UV", destinado originalmente al análisis clínico y que contiene todos los reactivos necesarios para la determinación.

Para aplicar el "método de referencia con el Gluc-DH" se disuelve previamente la mezcla de enzimas (contenida en el frasco 4 del Juego de Reactivos) en la solución tampón de fosfato 0,12 mol/l, de pH 7,6 (contenida en el frasco 2) dejando unos 15 minutos con agitación ocasional, hasta disolución completa (si el tampón se ha vuelto turbio, debe filtrarse antes de su uso). Por otra parte, la solución del coenzima NAD 0,22 mol/l se obtiene disolviendo el contenido del frasco 3 por adición de 0,9 ml de agua bidestilada (la solución se conserva por 6 meses al refrigerador).

En el caso del análisis de bebidas y mieles (ya diluidas), las cubetas, de 1 cm de espesor, se llenan según el siguiente esquema:

	<i>Blanco</i>	<i>Análisis</i>
Muestra + agua (vol. final: 1,0 ml)	1,0 ml agua	1,0 ml dilución
Solución de enzima en tampón (Merckotest Gluc-DH)	2,0	2,0
Mezclar y después de 1 minuto leer las extinciones:	EB ₁	EA ₁
Agregar solución NAD (coenzima)	0,02 ml	0,02 ml
Mezclar de inmediato y después de 7 minutos exactos, leer las nuevas extinciones:	EB ₂	EA ₂

La cubeta de referencia contiene agua destilada.

La diferencia de las extinciones (" ΔE "), corregida por los valores del blanco, la cual es proporcional a la cantidad resultante de NADH₂ y también a la concentración de glucosa, se obtiene según la fórmula $\Delta E = (EA_2 - EA_1) - (EB_2 - EB_1)$.

Para calcular la concentración de glucosa, el valor ΔE debe multiplicarse solamente todavía por un factor que depende de la longitud de onda aplicada. Se llega así a la siguiente fórmula final, tomando en cuenta un volumen total de 3,02 ml y un volumen de la muestra diluida de 1,0 ml:
 $\mu\text{g glucosa} = \Delta E_{366 \text{ nm}} \cdot 164,73 \cdot F$ en que "F" es el factor de dilución de la muestra.

(Si la medida se efectúa a 340 nm, se multiplica $E_{340 \text{ nm}}$ por 87,40).

Al realizar análisis en serie, los autores (67) recomiendan trabajar con 3 cubetas, dedicando una a la referencia con agua destilada y midiendo las extinciones de los blancos, debidas a los reactivos: EB_1 y EB_2 sólo una vez para cada serie.

Ensayos hechos con glucosa pura demostraron una curva de calibración, lineal y con buenas pruebas de recuperación, al agregar cantidades conocidas de glucosa a diversos jugos, vino y miel.

En comparación con la determinación de glucosa en diversos jugos de uva por cromatografía líquida de alta presión (HPLC) se obtuvieron valores concordantes, teniendo el método enzimático aun mayor sensibilidad.

15. DETERMINACION DE LIPASA (53).

Fundamento:

Como la enzima es capaz de hidrolizar los triglicéridos a di- y mono-glicéridos y ácidos grasos libres, el método para determinar actividad de lipasa en alimentos se basa en la valoración del ácido acético liberado.

Reactivos:

- Substrato: triacetina 0,31 M, pH 6,2.
- Hidróxido de sodio 0,05 N.

Preparación de la muestra:

Una cantidad de muestra se trata con agua bidestilada a 30°C en una mezcladora eléctrica Waring Blendor, se centrifuga o filtra y el sobrenadante constituye el extracto enzimático.

Procedimiento:

En un matraz Erlenmeyer se colocan 48,0 ml del substrato triacetina y se agrega una alícuota del extracto enzimático; ambos deben estar previamente a 30°C, manteniendo a esta temperatura la mezcla final durante 30 minutos.

El ácido liberado se titula con NaOH 0,05 N, ajustando el pH a 6,2 con ayuda de un potenciómetro.

Unidad enzimática:

Una U corresponde a la cantidad de enzima que bajo las condiciones de ensayo libera 1 micromol de ácido acético/min.

16. DETERMINACION DE LIPOXIDASA (65).

La lipoxidasa cataliza específicamente la oxidación de los grupos metílicos de ácidos grasos insaturados como linoleico, linolénico y araquidónico y sus ésteres, a los respectivos peróxidos. Tanto el método espectrofotométrico desarrollado por Holman y Burr como el método de Bergstrom (55) se basan en medir el aumento de absorción a la luz UV, a 234 nm cuando la lipoxidasa actúa sobre estos ácidos grasos. El aumento del peak se relaciona con la cantidad de peróxido formado, siendo proporcional al tiempo y a la concentración de enzima.

Fundamento:

Se basa en medir la absorbancia que se produce por la oxidación del linoleato, a 234 nm.

Reactivos:

Substrato: Disolver 0,1 ml de ácido linoleico en 60 ml de etanol al 65%. Diluir a 100 ml con agua destilada bajo suave agitación hasta obtener una buena dispersión. Al momento de usar el substrato, éste debe diluirse con 5 vol. de tampón de borato 0,2 M, de pH 9,0.

Preparación de la muestra:

Generalmente el material a ensayar (principalmente poroto de soya y semillas de garbanzos) debe lavarse previamente con éter de petróleo y manteniendo las muestras en botellas cerradas en el refrigerador. Una cantidad de muestra pesada se homogeneiza con solución tampón de borato, de pH 9,0. Luego se centrifuga o filtra, usándose para la determinación el líquido transparente.

Procedimiento:

En una cubeta se colocan 2,0 ml de substrato y se procede a oxigenar durante unos pocos minutos. A continuación, a tiempo 0, se agrega 1 ml de la solución enzimática y a un minuto de intervalo se registra la absorbancia a 234 nm.

Se grafica la absorbancia versus tiempo, debiéndose obtener una línea recta; se calculan los cambios de absorbancia por minuto.

Unidad enzimática:

1 U es el aumento de absorbancia de 0,001 por minuto bajo las condiciones específicas de ensayo a 25°C.

16.1. DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD DE LIPOXIDASA EN HARINA DE SOYA (69).

Fundamento:

El método se basa en determinar la lipoxidasa por adición de un aceite vegetal y en valorar los peróxidos formados por yodometría.

Procedimiento:

100 g de aceite fresco de semillas de algodón se colocan en un matraz de doble pared, entre la cual se hace circular agua para mantener la temperatura a 20°C.

Se agrega exactamente 0,5 g de harina de soya, suspendida en 50 ml de agua destilada. Se agita la mezcla durante 20 minutos con agitador y se centrifuga, agregando previamente un poco de sal para facilitar la separación de las fases de agua y aceite en forma clara. Logrado esto, se pesan 5 g de aceite límpido, se colocan en un vaso y se agregan 50 ml de una mezcla de cloroformo y ácido acético (40 + 60). Luego se agrega 1 ml de solución acuosa saturada de yoduro de potasio, se mezcla bien y se deja en reposo por 5 minutos. Ahora se agregan 100 ml de agua destilada para detener la reacción y se titula el yodo liberado con tiosulfato de sodio 0,1 N, usando almidón como indicador.

A la vez se corre un blanco, usando 0,5 g de harina de soya, calentada a 100°C. Se resta el gasto de la titulación del blanco de aquél de la titulación de la muestra con la enzima activa. El aceite de semilla de algodón da generalmente un blanco de 0,2 a 0,3 ml de tiosulfato 0,1 N, y el valor de la lipoxidasa es generalmente de 4 a 5 ml de tiosulfato 0,1 N.

17. DETERMINACION DE UREASA (53).

Fundamento:

Como la reacción que cataliza esta enzima sobre la urea es la liberación de amoníaco, la determinación se basa en la cuantificación de éste, bajo las condiciones de ensayo.

Reactivos:

- Substrato: solución de urea 0,17 M en agua bidestilada, a 30°C (pH 6,1).
- HCl 0,1 N.

Preparación del extracto problema:

El material a ensayar (poroto de soya) se muele, y se extrae la enzima con agua destilada a temperatura de 30°C. Se filtra o centrifuga, usándose el sobrenadante para la determinación de la actividad enzimática.

Procedimiento:

Se colocan 50 ml del substrato en un matraz Erlenmeyer y a continuación se agrega una alícuota del extracto en estudio, manteniendo la mezcla a 30°C por espacio de 10 minutos.

Se valora el amoníaco liberado con HCl 0,1 N, ajustando el pH a 6,1 con ayuda de un potenciómetro.

Unidad enzimática:

1 U corresponde a la cantidad de enzima que bajo las condiciones de ensayo disocia 1 micromol de urea por minuto.

UNIDADES ESPECIFICAS PARA ALGUNAS ENZIMAS USADAS
EN ALIMENTOS (43, 53).

Alfa-amilasa (bacteriana, pancreática) y *Beta-amilasa*:

1 Unidad = cantidad de enzima que, bajo las condiciones del test, libera un microequivalente de grupos reductores (de los enlaces glucosídicos) por minuto (calculado como maltosa).

Alfa-amilasa (de vegetales):

1 Unidad (SKB) = cantidad de enzima que bajo las condiciones del test desdobla a 30°C 1 g de amilodextrina en 1 hora, de modo que por adición de yodo se obtenga igualdad de coloración con un color estándar.

Amiloglucosidasa y *Celulasa*:

1 Unidad = cantidad de enzima que bajo las condiciones del test libera 1 microequivalente de grupos reductores por minuto (calculado como glucosa).

Celulasa:

1 Unidad = cantidad de enzima que bajo las condiciones del test y a 35°C hace bajar la viscosidad de carboximetil-celulosa de 400 a 300 cp en 1 hora.

Glucosa-oxidasa:

1 Unidad = cantidad de enzima que bajo las condiciones del test cataliza la transformación de 1 μ mol de sustrato por minuto.

1 Unidad = la cantidad de enzima que bajo las condiciones del test a 30°C, a pH 5,9 y con exceso de catalasa produce la captación de 100 mm de O₂ sobre el sustrato de glucosa.

Invertasa:

1 Unidad = cantidad de enzima que bajo las condiciones del test y a 20°C hidroliza el 77% de la sacarosa aplicada.

Catalasa (fúngica, bacteriana, animal):

1 Unidad (Baker) = cantidad de enzima que bajo las condiciones del test y a 25°C desdobla 266 mg de peróxido de hidrógeno por minuto.

Lactasa (fúngica):

1 Unidad = cantidad de enzima que bajo las condiciones del test libera por minuto 1 micromol de o-nitrofenol a partir de o-nitrofenol-beta-D-galactósido.

Lipasa (pancreática, fúngica):

1 Unidad = cantidad de enzima que bajo las condiciones del test libera a partir del sustrato 1 microequivalente (micromol) de ácido por minuto.

Pectinasa (bacteriana):

1 Unidad = cantidad de enzima que bajo las condiciones del test y a 30°C produce en un substrato de pectina de Citrus un aumento de extinción de $\Delta E = 0,01$ por minuto a 235 nm.

Proteasas:

En general, se usa la Unidad Anson (véase pág. 13) con hemoglobina como substrato. Además:

a) *Vegetal* (papaína, bromelina, ficina): 1 Unidad NF (National Formulary) = cantidad de enzima que, bajo las condiciones del test y a 40°C libera 1 μg de tirosina por hora, a partir de un substrato de caseína.

b) *Fúngica*: 1 Unidad HUT = cantidad de enzima que bajo las condiciones del ensayo y a 40°C libera 1 μg de tirosina por ml y minuto a partir de substrato de hemoglobina.

c) *Bacteriana*: 1 Unidad (PC) = cantidad de enzima que bajo las condiciones del test y a 37°C libera 1 μg de tirosina por minuto a partir de caseína.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- (1) W. HARTMEIER: Inmobiliserte Enzyme für die Lebensmitteltechnologie. Lebensmittel-technologische Kolloquien, Lippe in Lemgo (1977).
- (2) Invitación al Simposio Internacional sobre la utilización de enzimas en tecnología alimentaria. Ann. des falsif. et de l'expertise chimique 74, 801, 575 (1981).
- (3) G. REED: Enzymes in food processing. Academic Press, New York (1966).
- (4) a) J. B. S. BRAVERMAN: Introduction to the biochemistry of foods Elsevier (1963).
b) Z. BERK: Braverman's Introduction to the biochemistry of foods. 2nd. edition. Elsevier (1976).
- (5) S. BERNHARD: The Structure and Function of Enzymes. N. A. Benjamin Inc., New York (1968).
- (6) A. L. LEHNINGER: Biochemistry, 2nd. Ed. Worth Publishers, Inc. New York (1975).
- (7) L. STRYER: Bioquímica. Edit. Reverté, S. A. Barcelona (1976).
- (8) D. E. METZLER: Biochemistry, Academic Press, New York (1977).
- (9) a) H. U. BERGMAYER: Methoden der enzymatischen Analyse. Verlag Chemie. Weinheim (1962).
b) H. U. BERGMAYER: Methods of enzymatic analysis. 2nd. edition. Academic Press Inc. New York (1974).
- (10) H. RUTTLOFF et al.: Industrielle Enzyme. Dr. D. Steinkopff. Verlag. Darmstadt (1979).
- (11) H. SCHMIDT-HEBBEL: Avances en Ciencia y Tecnología de alimentos. Alfabeta Impresores. Santiago (1981).
- (12) T. H. MAUGH: Bioregulators: Alteration of gene expression in Citrus fruit. Science 184, 655 (1974).
- (13) H. RUTTLOFF & J. HEMPEL: Zum Einsatz von Enzymen bei der Lebensmittelproduktion. Ernährungsforschung. Akademie Verlag. Berlin 4, 25, 102 (1980)
- (14) AUTCHER, JENSEN, ALTHOUSE: Fundamentos de Bioquímica Agrícola. Ed. Salvat (1954).
- (15) J. A. ASENJO: Ingeniería enzimática, un nuevo enfoque en biotecnología. Rev. Alimentos 3, 1, 37 (1978).
- (16) A. ILLANES, G. SCHAFFELD: Utilización de enzimas en la industria alimentaria. Rev. Alimentos 6, 2, 35 (1981).
- (17) E. J. BECKHORN, M. D. LABBEE, L. A. UNDERKOFER: Production and use of microbial enzymes for food processing. J. Agr. Food Chem. 13, 1 (1965)
- (18) H. SCHMIDT-HEBBEL: Aditivos y Contaminantes en alimentos. Editorial Universitaria (1979).
- (19) SOC. OF CHEMICAL INDUSTRY: Production and application of enzyme preparations in food manufacture. Monograph Nº 11. London (1961).
- (20) S. A. BARKER, C. J. GRAY, A. W. LOMATH: The stabilization of enzymes for industrial use. Biochem. Soc. Trans. 7, 5 (1979).
- (21) E. MERCK: Enzimas enlazadas a polímeros. Darmstadt (1973).
- (22) J. R. WHITAKER: The effect of variety and maturity on the proteolytic content of figs. Food Research 23, 4 (1958).
- (23) H. SCHMIDT-HEBBEL: Intoxicaciones por alimentos. Escuela Salesiana La Graciosa Nacional, Santiago (1969).
- (24) A. JOSLYN, J. B. S. BRAVERMAN: Advances in Food Research 5, 97 (1959).
- (25) R. B. GUYER, J. W. HOLMQUIST: Regeneration in High-Temperature-Short-Time Canned Food Journ. Food Techn. Australia 7, 199 (1955).
- (26) S. SCHWIMMER: Regeneration of heat-inactivated peroxidase. Journ. Biol. Chem. 154, 487 (1944).
- (27) R. B. GUYER, J. W. HOLMQUIST: Food Technology 547 (1954).
- (28) A. ILLANES, G. SCHAFFELD: Actividad enzimática en relación al deterioro y preservación de alimentos. Revista Alimentos 6, 2, 48 (1981).
- (29) H. W. SCHULTZ, A. F. ANGLEMEIR: Symposium Food Proteins and their reactions. AVI. Publ. (1964).
- (30) H. W. SCHULTZ, A. F. ANGLEMEIR: Symposium Food Enzymes AVI Publ. (1960).
- (31) A. DELINCEE, J. BECKER, B. RADOLA: Heat-inactivated peroxidase isoenzymes in green beans. Congress of Food Science and Technology 1, 270 (1970).

- (32) G. P. ELLIS: The Maillard Reaction. *Advances Carbohydrate Chemistry* 14 (1959).
- (33) H. SCHMIDT-HEBBEL: *Las Especies. Su Química y Tecnología*. Editorial Universitaria, Santiago (1980).
- (34) M. A. JOSLYN, J. D. PONTING: Enzyme catalized oxidate browning fruit products. *Advances in Food Research* 3, 1 (1950).
- (35) J. D. PONTING, M. A. JOSLYN: Ascorbic acid oxidation and browning in apple tissue extract. *Arch. Bioch.* 19, 47 (1948).
- (36) M. SCHEEL, C. VERGARA, I. PENNACCHIOTTI, H. SCHMIDT-HEBBEL: Determinación de los principales sustratos del pardeamiento enzimático y estudio de la polifenoloxidasas en manzanas chilenas. *Agroquímica y Tecnología de Alimentos*, Valencia, España (1969).
- (37) L. GUZMÁN, I. PENNACCHIOTTI, H. SCHMIDT-HEBBEL: Estudio del pardeamiento enzimático de peras cultivadas en Chile. *Anal. Facultad de Quím. y Farm. Universidad de Chile* (1969).
- (38) E. J. PYLER: Enzymes in baking. Theory and practice. *Bakers Digest* 43, 1-2, 36-52 (1969).
- (39) A. OSTROVOSKI ET AL.: *Fundamentos de la Tecnología de los Productos Alimenticios*. Traducido del ruso por B. Zapatero. Editorial MIR, Moscú.
- (40) ROHM AND HAAS Co.: *Enzyme topics* 5 (1965).
- (41) H. SCHMIDT-HEBBEL: *Avances en Ciencia y Tecnología de Alimentos*. Alfabetra Impresores, Santiago (1981).
- (42) R. BURKHARDT: Beobachtungen beim Entbittern von Grapefruit. *Mitt. G.D.Ch. Lebensm. Gerichtl. Chem.* 12, 354 (1971).
- (43) G.D.Ch. FACHGRUPPE LEBENS. U. GERICHTL. CHEM.: Standard für Enzympräparate zur Be- u. Verarbeitung von Lebensmitteln. Frankfurt/M. (1975).
- (44) H. K. FRANK: *Deutsche Lebensmittel-Rundschau* 68, 8, 252 (1972).
- (45) H. K. FRANK: *Umschau* 1, 19 (1974).
- (46) G. LOTT, K. H. FRANK: *Deutsche Lebensmittel-Rundschau* 69, 2, 73 (1973).
- (47) *INFORMATIONSBLETT für deut. Wissenschaftler im Ausl.* 8, 12 (1974).
- (48) *WHO FOOD Additives Series Nº 2* Geneva (1972).
- (49) M. E. PINTO y A. HOUBRAKEN: Métodos de análisis químico de leche y productos lácteos. Centro Reg. Capacitación en Lechería de FAO. Santiago (1976).
- (50) J. VOIGT: Anwendungsmöglichkeiten der Glukoseoxidase. *Mitt. Ges. Deut. Chemiker, Fachgr. Lebensm. u. Gerichtl. Chem.* 15, 242 (1961).
- (51) J. SCHORMÜLLER: *Enzymatische Analytik in Lebensmittelchemie u. Technologie* 19, 2, 18 (1965).
- (52) El mercado de las enzimas industriales. *Revista Alimentos* 6, 3, 32 (1981).
- (53) E. MERCK: *Biochemica - Merck*. Darmstadt (1979).
- (54) F. C. ASENJO: The chemistry of papaine. *Bol. Oficial Asoc. Quím. Puerto Rico* (1951).
- (55) S. BERGSTROM: On the oxidation of linoleic acid with lipoxidase. *Arch. Chem. Mineral. Geol.* 21 A, 15 (1946).
- (56) Z. J. KERTESZ: The pectic substances (1951).
- (57) H. SCHMIDT-HEBBEL: Control de calidad de carnes. *Rev. Contacto Latinoamericano*. E. Merck. 3, 11 (1980).
- (58) BOEHRINGER MANNHEIM, BIOCHEMICA: *Methoden der enzymatischen Lebensmittel-analytik* 75/76 & 77/78.
- (59) R. M. ROTH, R. FOSTER, J. VINAGRE, I. PENNACCHIOTTI: Estudio enzimático y tecnológico de arvejas destinadas a la congelación. Tesis tit. Quím. Farm. Universidad de Chile, (1975).
- (60) I. ESPINOSA, J. VINAGRE, I. PENNACCHIOTTI: Estudio enzimático y tecnológico de algunos vegetales, destinados a la congelación. Tesis tit. Quím. Farm. Universidad de Chile (1974).
- (61) M. P. MASURE, H. CAMPBELL: Rapid estimation of peroxidase in vegetable extracts as index of blanching for frozen vegetables. *The fruit products. Journ. American Food Manufacture* 23, 8 (1944).
- (62) H. MORRIS: Application of peroxidase test paper in food processing. *Food Techn.* 12, 6 (1958).

- (63) A. IBIETA, I. CORDERO, V. PARRAGUIRRE, I. PENNACCHIOTTI, H. SCHMIDT-HEBBEL: Estudio de envases plásticos para industrialización de palta chilena. *Rev. Agroquímica y Tecnol. de Alimentos*, Valencia (España), 12, 3, 444 (1972).
- (64) R. M. SANDSTEDT, E. KNEEN, M. BLISH: *J. Cereal Chemistry* 16, 712 (1939).
- (65) WORTHINGTON BIOCHEMICAL CORPORATION: *Worthington Enzyme Manual*. New Jersey (1972).
- (66) BALLS & HOOVER: *Journ. Biolog. Chem.* 121, 137 (1937).
- (67) A. TEMPERLI, H. SCHÄRER, U. KÜNSCH: Un método enzimático para determinación de glucosa en bebidas. *Flüssiges Obst.* 7, 257 (1976).
- (68) AOAC: *Official Methods of Analysis of the Assoc. of Off. Anal. Chemists*. William Horvitz. Editor, XIII Ed. Washington (1980).
- (69) I. PENNACCHIOTTI M.: Apuntes de clases, Prof. Montgomery. Corvallis, Oregon State University (1966).
- (70) E. R. STADTMAN, G. D. T. NOVELLI & F. DIPMAN: *Journ. Biol. Chem.* 365, 191 (1951).
- (71a) SERVICIO NACIONAL DE SALUD: Reglamento Sanitario de los Alimentos. Santiago, Chile (1961) y sus modificaciones (1976).
- (71b) MINISTERIO DE SALUD PÚBLICA: Reglamento Sanitario de los Alimentos. Decreto Nº 60, del 5 de abril de 1982 y publicado en el Diario Oficial del 5 de junio de 1982.
- (72) D. PINTAURO: *Food processing enzymes. Recent developments*. Noyes Data Corporation. New Jersey (1979).
- (73) A. VALENZUELA: La inmovilización de enzimas y sus aplicaciones bioanalíticas. *Revista Alimentos* (en prensa).
- (74) G. PINCHEIRA V.: Desarrollo de la biotecnología de enzimas. *Rev. Creces* 3, 1-2 (1982).
- (75) J. L. VETTER, M. P. STEINBERG y A. I. NELSON: Quantitative determination of peroxidase in sweet corn. *Agricultural and Food Chemistry* 6, 1 (1958).
- (76) THE UNITED STATES PHARMACOPEIA, U.S.P. XVIII (1970), pág. 1026.
- (77) G. PETTERMANN, F.: Maduración artificial de las frutas por el gas etileno. Tesis, Cát. Bromat, Fac. Quím. y Farm. Santiago (1939).