

Biotecnología Alimentaria: PRODUCCIÓN DE ENZIMAS ALIMENTARIAS

Máster Universitario en Ingeniería Química
Prof. María Martín Conde

Enzimas

Las **enzimas** son moléculas de proteínas que tienen la capacidad de facilitar y **acelerar las reacciones químicas** que tienen lugar en los tejidos vivos, disminuyendo el nivel de la "energía de activación" propia de la reacción.

- **No reaccionan químicamente ni alteran el equilibrio de la reacción.**
- **Aumentan la velocidad de la reacción (catalizadores).**
- **Suelen ser activas en determinadas condiciones de temperatura y pH.**

Enzimas Alimentarias

- Se han utilizado **desde hace siglos** para obtener productos como queso, vino y pan y, en la **actualidad**, se utilizan en la industria alimentaria con un **fin tecnológico**.
- **Alrededor de un 65%** de las enzimas que se producen industrialmente están relacionadas con la **industria alimentaria**.

Enzima alimentaria: producto obtenido a partir de plantas, animales o microorganismos, incluidos los obtenidos mediante un proceso de fermentación por microorganismos.

Legislación de Enzimas Alimentarias

- **Todas las enzimas que se usan en la Unión Europea deben ser evaluadas y autorizadas.** Para ello deben demostrar que son **seguras** en las cantidades utilizadas, que son **necesarias** en los alimentos en los que se autorizan y que **no llevan a engaño** al consumidor.
- El presente Reglamento únicamente debe aplicarse a las enzimas utilizadas con **finés tecnológicos en la fabricación, la transformación, la preparación, el tratamiento, el envase, el transporte o el almacenamiento de los alimentos.**

Tipos de Enzimas Microbianas

Enzimas microbianas extracelulares

- **Enzimas que se producen en una célula y su función la realizan en otra célula.**
- Costos por lote de sustrato relativamente bajo.
- No recuperables

Enzimas microbianas intracelulares

- **Enzimas que se utilizan en las mismas células que se elaboran.**
- Costos de producción mayores (aislamiento y purificación).
- Recuperables

Enzimas Extracelulares

PROTEASAS:

- 50 % mercado enzimas microbianas.
- Rompen los enlaces peptídicos de las proteínas.
- Manufactura del queso (cuajo producido por “*Mucor miehie*”).
- Modificación de la masa de pan y galletas “*Aspergillus oryzae*”.

AMILASAS:

- Enzimas que **degradan el almidón**.
- Para la obtención de azúcares fermentescibles.
- Producidas por: “*Aspergillus oryzae*”, “*Bacillus amyloliquefaciens*” y “*Bacillus hicheriformis*” (α -amilasas). “*Aspergillus niger*” (gluco-amilasas).

Enzimas Extracelulares

PECTINASAS:

- **Degradación de cadenas de pectina.**
- En la industria del vino se utilizan para aclarar mostos.
- Producidas por "*Aspergillus niger*".

CELULASAS:

- Realiza la **hidrólisis de la celulosa en moléculas de glucosa libre.**
- Utilizadas en cervecería y en la producción de alcohol.
- Producidas por "*Trichoderma reesei*".

LIPASAS:

- Catalizan la **hidrólisis de triglicéridos a glicerol y ácidos grasos libres.**
- Contribuye a realzar el sabor y/o perfume que tiene un alimento.
- Producidas por "*Aspergillus niger*", "*Rhizomucor miehei*" y "*Rhizopus delemar*".

Enzimas Intracelulares

GLUCOSA ISOMERASA:

- Convierte la **glucosa en fructosa**.
- Forma parte de las rutas metabólicas de la glucólisis, glucogénesis, ruta de las pentosas fosfato, metabolismo de almidón y sacarosa
- Obtención de jarabes de maíz ricos en fructosa.
- Producidas por “*Bacillus cogulans*”, “*Streptococcus robinosus*”.

Cinética Enzimática

Las enzimas **no pueden alterar ni modificar el equilibrio** de las reacciones químicas

La cantidad final de producto formado en una reacción será siempre la misma, se encuentre presente o no la enzima

La diferencia radica en el tiempo empleado en llegar a esa cantidad.

**En presencia de enzimas tardará segundos
y en ausencia en algunos casos extremos puede llevar siglos**

Cinética enzimática

(velocidad de reacción catalizada por enzimas)

Ecuación de Michalis-Menten:

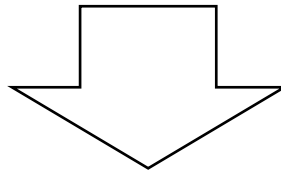
$$V_0 = V_{m\acute{a}x} \times \frac{[S]}{[S] + K_M}$$

V_0 : velocidad de formación del producto
 $[S]$: concentración de sustrato

$V_{m\acute{a}x}$: velocidad máxima
 K_M : constante de Michalis-Menten

Proceso de Producción de Enzimas

La producción comercial de una enzima debe estar precedida de la **existencia de demanda**, de un **diseño técnico** satisfactorio del proceso, y de una **evaluación económica positiva**.



Se obtienen por fermentación en condiciones controladas de cepas de alto rendimiento en cultivos en superficie o sumergidos

Proceso de Producción de Enzimas



Fermentación

CULTIVO EN SUPERFICIE

- Cultivo se realiza sobre la **superficie de un medio sólido** (salvado de trigo) con alto contenido en nutrientes.
- El sustrato se vuelca en forma de capa fina en salas de incubación o en tambores horizontales rotatorios.
- Siembra de los hongos con esporas.
- Cámara a temperatura constante y circulación de aire humidificado.
- La solución concentrada en enzimas se precipita.

- **Menor coste**
- **Alta manipulación**
- **Alto riesgo de contaminación**

Fermentación

CULTIVO SUMERGIDO

- Cultivo consiste en el crecimiento del microorganismo en **vasos de reacción** que contienen un medio de fermentación rico en nutrientes y una elevada concentración de oxígeno.
- En un tanque con agitación mecánica, con capacidad de 10.000 a 100.000 L, opera de forma intermitente (inestabilidad de las cepas).
- Dependiendo de la enzima suele durar entre 30 y 150 h.
- Parámetros a controlar: Influencia del medio de cultivo, tamaño y edad del inóculo, pH, aireación y agitación.

- **Mayor coste**
- **Menor riesgo de contaminación**
- **Mayores rendimientos**

Industria de las Enzimas

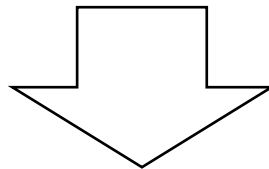
Procesos catalizados por enzimas en la industria:

- Presentan una gran actividad catalítica.
- Muestran una gran especificidad de sustrato.
- Son muy activos a temperatura ambiente y presión atmosférica.

Pero ...

**La mayoría de las enzimas no son estables
en las condiciones de trabajo.**

**Al ser solubles en agua, su separación de los sustratos y productos es difícil,
y no se pueden reutilizar.**



PROCESO DE INMOVILIZACIÓN DE ENZIMAS

Inmovilización de Enzimas

- La **inmovilización de enzimas** es un proceso en el que se confina o localiza a la enzima en una región definida del espacio, para dar lugar a formas insolubles que retienen su actividad catalítica y que pueden ser reutilizadas repetidamente.

La inmovilización de las enzimas permite que el proceso biotecnológico sea económicamente rentable.

Métodos Físicos

Retención física

```
graph TD; A[Retención física] --> B[Inclusión en membranas]; A --> C[Atrapamiento o encapsulación];
```

Inclusión en membranas

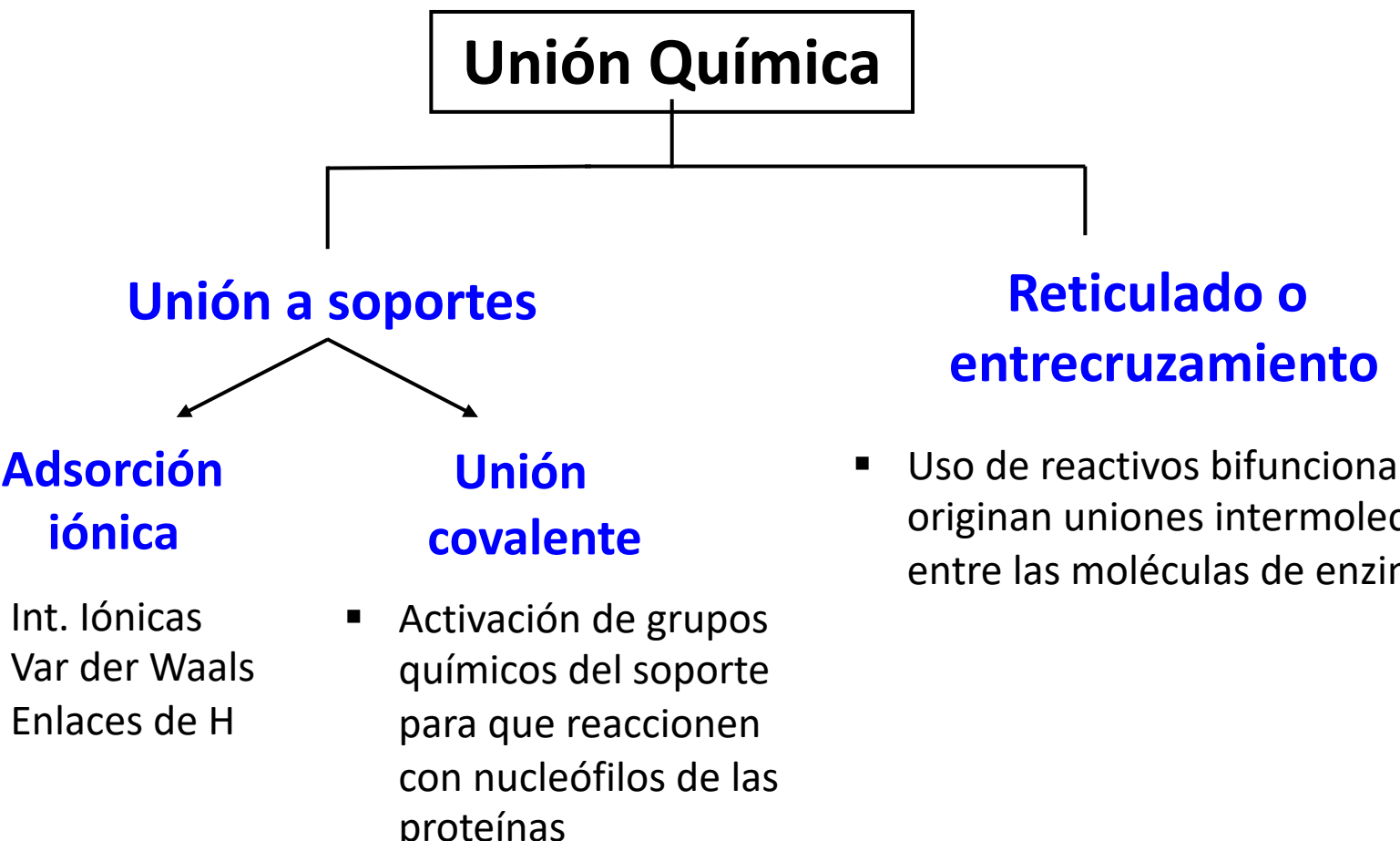
- Adsorción de la enzima sobre la membrana que formará el reactor

Atrapamiento o encapsulación

- Retención física de la enzima dentro de una matriz sólida porosa (polímero)
- Enzima rodeada membrana semipermeable

Métodos Químicos

Unión Química



```
graph TD; A[Unión Química] --> B[Unión a soportes]; A --> C[Reticulado o entrecruzamiento]; B --> D[Adsorción iónica]; B --> E[Unión covalente]; D --> D1[Int. Iónicas]; D --> D2[Van der Waals]; D --> D3[Enlaces de H]; E --> E1[Activación de grupos químicos del soporte para que reaccionen con nucleófilos de las proteínas]; C --> C1[Uso de reactivos bifuncionales que originan uniones intermoleculares entre las moléculas de enzima];
```

Unión a soportes

Adsorción iónica

- Int. Iónicas
- Van der Waals
- Enlaces de H

Unión covalente

- Activación de grupos químicos del soporte para que reaccionen con nucleófilos de las proteínas

Reticulado o entrecruzamiento

- Uso de reactivos bifuncionales que originan uniones intermoleculares entre las moléculas de enzima

Tipos de Soportes

INORGÁNICAS

- **Naturales:** arcillas, piedra pómez, sílice, ...
- **Materiales manufacturados:** óxidos de metales, alúmina, cerámicas, ...

ORGÁNICOS

- **Polímeros naturales:** celulosa, almidón, colágeno, queratina, ...
- **Polímeros sintéticos:** poliestireno, poliacrilatos, poliamidas, ...

Comparación de los Métodos de Inmovilización

MÉTODO	Inclusión en membranas	Atrapamiento	Reticulado	Adsorción química	Unión covalente
Preparación	Intermedia	Difícil	Intermedia	Sencilla	Difícil
Fuerza de unión	Débil	Media	Débil-Media	Media	Fuerte
Actividad enzimática	Media-Alta	Baja	Baja	Media	Alta
Regeneración soporte	Posible	Imposible	Imposible	Posible	Difícil
Coste proceso	Medio-Alto	Medio	Medio	Bajo	Alto
Estabilidad	Media	Alta	Alta	Baja	Alta
Validez	General	General	Limitada	General	Limitada
Resistencia microbiana	Sí	Sí	Sí	No	No