

# **UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA “ANTONIO NARRO”**



**DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL**

**PRODUCCIÓN, EXTRACCIÓN, PURIFICACIÓN, USOS Y APLICACIONES DE  
LA ENZIMA AMILASA EN LA INDUSTRIA DE LOS ALIMENTOS**

**Por:  
MARTHA LILIA MELENDEZ ESTRADA**

## **MONOGRAFIA**

**Presentada como Requisito Parcial para  
Obtener el Título de:**

**INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS**

**Buenavista, Saltillo, Coahuila, México  
Marzo de 2004**

# **UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA “ANTONIO NARRO”**



**DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN Y ALIMENTOS  
DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL**

**PRODUCCIÓN, EXTRACCIÓN, PURIFICACIÓN, USOS Y APLICACIONES DE  
LA ENZIMA AMILASA EN LA INDUSTRIA DE LOS ALIMENTOS**

**Por:  
MARTHA LILIA MELENDEZ ESTRADA**

## **MONOGRAFIA**

**Presentada como Requisito Parcial para  
Obtener el Título de:**

**INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS**

**Buenavista, Saltillo, Coahuila, México  
Marzo de 2004**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO**

**DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN Y ALIMENTOS  
DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL**

**PRODUCCIÓN, EXTRACCIÓN, PURIFICACIÓN, USOS Y APLICACIONES DE  
LA ENZIMA AMILASA EN LA INDUSTRIA DE LOS ALIMENTOS**

## **MONOGRAFIA**

**Presentada por:  
MARTHA LILIA MELENDEZ ESTRADA**

**Que Somete a Consideración del H. Jurado Examinador como Requisito  
Parcial para Obtener el Título de:**

**INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS**

---

**M. C. Antonio Francisco Aguilera Carbó  
Asesor principal**

---

**Dr. Ramón García Castillo  
Vocal**

---

**Lic. Laura Olivia Fuentes Lara**

---

**M.C. Heliodoro de la Garza Toledo  
Suplente**

---

**Dr. Ramón García Castillo  
Coordinador de la División de Ciencia Animal**

**Buenavista, Saltillo, Coahuila, México  
Marzo de 2004**

## ÍNDICE GENERAL

Agradecimientos.....	viii
Dedicatorias.....	ix
Índice de figuras.....	x
Índice de cuadros.....	x
Resumen.....	xii
Abreviaturas y símbolos.....	xi
CAPITULO 1	
INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Objetivos.....	2
1.2 Justificación. ....	3
CAPITULO 2	
2.1. Generalidades.....	4
2.2. Clasificación.....	7
2.3. Nomenclatura.....	8
CAPITULO 3	
REVISIÓN DE LITERATURA.....	9
3.1. Antecedentes.....	9
3.1.1. Características del enzima $\alpha$ -amilasa.....	9
3.1.2. Mecanismo de acción de $\alpha$ -amilasa.....	11
3.1.2.1. Fuentes naturales de amilasas.....	11
3.1.3. Tipos de amilasas.....	12
3.1.3.1. Origen fúngico.....	12
3.1.3.2. Origen bacteriano.....	12
3.1.3.3. Origen vegetal.....	13
3.1.3.4. Glucoamilasas.....	13
3.1.4. Inhibidores de amilasas.....	13
3.2. Mecanismo de la reacción.....	14
3.2.1. Tipos de mecanismos de la reacción.....	15

3.2.1.1. Ión oxicarbonio.....	15
3.2.1.2. Desplazamiento.....	15
CAPITULO 4	
4.1. Almidón.....	17
4.1.1. Composición del almidón.....	18
4.1.2. Amilosa.....	19
4.1.3. Amilopectina.....	19
4.1.4. Grano de almidón.....	20
4.1.5. Gelatinización.....	20
4.1.6. Retrogradación.....	21
4.1.7. Estructura de amilosa.....	22
4.1.8. Estructura de amilopectina.....	23
4.1.9. Estructura de los gránulos de almidón.....	23
CAPITULO 5	
5.1. Enzimas microbianas.....	25
5.1.1. Usos industriales.....	25
5.1.1.1. Inmovilización de enzimas.....	26
5.2. Preparaciones enzimáticas comerciales.....	26
5.3. Soportes utilizados en producción de enzimas fúngicas.....	28
5.4. Microorganismos productores de amilasa.....	29
5.5. Enzimas técnicos.....	32
5.6. Ventajas de enzimas técnicos.....	32
5.7. Reportes de producción de enzima amilasa.....	33
5.8. Mercado mundial de enzimas.....	34
CAPITULO 6	
6.1. Fermentaciones.....	36
6.1.1. Ventajas de las fermentaciones.....	36
6.1.2. Factores que controlan el crecimiento microbiano en las fermentaciones...37	
6.2. Efectos de la fermentación sobre los alimentos.....	37
6.3. Fermentaciones alimentarias.....	38
6.3.1. Fermentaciones lácticas.....	39

6.3. Fermentaciones no alcohólicas.....	40
6.3.1. Fermentación alcohólica.....	40
6.3.2. Fermentación cárnica.....	41
6.3.3. Fermentaciones locales especiales.....	41
6.4. Materias primas empleadas en las fermentaciones industriales.....	43
6.4.1. Fuentes de carbono.....	43
6.4.1.1. Las melazas.....	43
6.4.1.2. Extracto de malta.....	43
6.4.1.3. Aceites vegetales.....	44
6.5. Fuentes de nitrógeno.....	44
6.5.1. Líquido de maceración del maíz.....	44
6.5.2. Extractos de levadura.....	44
6.5.3. Peptonas.....	45
6.6. Factores físico-químicos que afectan el rendimiento en las fermentaciones...	45
6.6.1. Oxígeno.....	45
6.6.2. Temperatura.....	46
6.6.3. PH.....	46
CAPITULO 7	
7.1. Tipos de cultivo.....	48
7.1.1. Discontinuo.....	48
7.1.2. Alimentado.....	48
7.1.2.1. Continuo.....	49
7.1.2.2 Cultivos en inmersión.....	49
7.2. Variables implicadas.....	50
7.3. Aplicaciones.....	51
7.4. Extracción y Purificación de enzimas.....	53
7.4.1. Extracción.....	53
7.4.2. Purificación.....	55
7.4.2.1. Purificación por diálisis.....	55

CAPITULO 8	
CONCLUSIONES.....	57
CAPITULO 9	
LITERATURA CITADA.....	58

# AGRADECIMIENTOS

A **Dios** por darme salud durante todos los días de mi vida y por permitirme cumplir una de mis metas.

A mi **Alma Terra Mater** por haberme formado como ingeniero.

Al **M. C. Antonio Francisco Aguilera Carbó** por su paciencia y el apoyo brindado para la realización de este trabajo.

Al **Lic. Laura Olivia Fuentes Lara** por su valiosa cooperación para la presentación de este trabajo.

Al **M. C Ramón García Castillo** por su valiosa cooperación para la realización de este trabajo.

Al **M.C Heliodoro de la Garza Toledo** por su valiosa cooperación para la presentación de este trabajo

A **mis maestros** que durante mi estancia en la universidad contribuyeron a mi formación.

A **mis compañeros** de clases por todos los momentos compartidos.



## DEDICATORIAS

A **mi madre** por su amor incondicional y su valioso apoyo durante todos los días de mi vida. Te quiero mucho

A mis hermanos

**Edgar**

**J. Inés**

**Juan Carlos**

**Octavio**

**Héctor**

A **miguel** por tu amor y apoyo incondicional.

A **mis sobrinos**. Los quiero mucho.

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Estructura de amilosa.....	22
Figura 2: Estructura de amilopectina.....	23
Figura 3: Granos de almidón en arroz, <i>Oryza sativa</i> .....	23
Figura 4: Granos de almidón en maíz, <i>Zea mays</i> .....	24
Figura 5: <i>Aspergillus niger</i> .....	30
Figura 6: <i>Bacillus subtilis</i> .....	31
Figura 7: <i>Aspergillus oryzae</i> .....	31
Figura 8: <i>Bacillus polimyxa</i> .....	31
Figura 9: <i>Aspergillus sojae</i> .....	31
Figura 10: <i>Bacillus circulans</i> .....	31
Figura 11: <i>Rhizopus</i> .....	31
Figura 12: Esquema de la fermentación láctica.....	42
Figura 13: Esquema de la fermentación alcohólica.....	42
Figura 14: Sistema fermentador.....	50
Figura 15: Tanques fermentadores de 2, 20 y 50 litros.....	52
Figura 16: Tanque fermentador.....	52
Figura 17: Tanque fermentador.....	52
Figura 18: Fermentador tipo industrial.....	53

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1: Microorganismos productores de amilasas.....	29
Cuadro 2: Reportes de producción de enzima amilasa.....	33

## ABREVIACIONES Y SÍMBOLOS

E C 3.2.1.1: Número asignado a la enzima alfa amilasa según la Comisión de Enzimas de la Unión Internacional de Bioquímica.

E C 3.2.1.2: Numero asignado a la enzima beta amilasa según la Comisión de Enzimas de la Unión Internacional de Bioquímica

U.S.F.D.A: United Status Food and Drug Administration.

T.F.P.B: Temperatura Final de la Pérdida de Birrefringencia.

U. Dun: Cantidad de enzima que causa una reducción del 1% en la intensidad del color de la reacción final, a 40° C en un minuto.

## RESUMEN

La enzima  $\alpha$ -amilasa, es una glicosidasa que cataliza la hidrólisis del almidón por medio del rompimiento de enlaces  $\alpha$ -1,4 para producir dextrinas y maltosa. La enzima contiene  $\text{Ca}^{2+}$  por mol de proteína, que resulta esencial para su estabilización, su peso molecular es de 50.000 daltons y su pH oscila entre 5. Se encuentra presente en cereales con alto contenido en almidón, frutas y tubérculos, pero la fuente más importante es por vía microbiana ya que el producto obtenido es más estable y se produce en cantidades masivas por medio de la fermentación continua o en medio sólido.

Los microorganismos empleados en la fermentación involucran bacterias del género *Bacillus*, hongos filamentosos del género *Aspergillus* y algunas levaduras como *Saccharomyces cerevisiae*.

Los sustratos que normalmente se usan para su producción son sustratos sólidos como, salvado de trigo, salvado de maíz, harina de cacahuate, harina de soja y pieles de algunas frutas.

La actividad de la enzima puede ser inhibida por sustancias propias de algunos vegetales que utilizan como protección contra los depredadores.

A nivel mundial han tomado gran importancia para el mercado extranjero y el mercado mexicano, dado que las enzimas poseen características específicas que permiten llevar un mejor control de temperatura u otras condiciones como pH para evitar efectos secundarios en las mismas, por tanto benefician tanto a sectores industriales como a los consumidores.

## **CAPITULO 1**

### **INTRODUCCIÓN**

La presente investigación es una recopilación de bibliografía referente al tema de la producción, extracción, purificación y principales usos y aplicaciones de la enzima *alfa amilasa*, en el capítulo de revisión bibliográfica o antecedentes se hace mención general de las enzimas pero en especial sobre la enzima amilasa, su mecanismo de acción y aspectos importantes de la misma. También se hace referencia a su principal sustrato, el almidón, su composición química y a los dos tipos de moléculas que se derivan, la amilosa y amilopectina.

En cuanto a la producción de la enzima  $\alpha$ -amilasa aborda las principales fuentes como son origen animal, vegetal y microbiano este último se trata más a detalle debido a que es la principal fuente industrial de obtención de alfa amilasa.

La extracción de la enzima se lleva a cabo mediante la precipitación de la proteína por medio de solventes y sales, posteriormente se purifica por diferentes métodos cromatográficos o por diálisis.

El proceso de fermentación se lleva a cabo en lotes, por cultivo continuo, sumergido, alimentado, las materias primas empleadas en la fermentación son principalmente sustratos sólidos como harina de soja, cacahuete, pieles de

algunas frutas ya que estos elementos son ricos en carbohidratos de los cuales el microorganismo deriva su energía para llevar a cabo su metabolismo.

En el ámbito industrial es de gran importancia para el mercado extranjero y el mercado mexicano ya que sus usos generan grandes ganancias para los productores y ofrecen grandes alternativas a los consumidores.

## **OBJETIVO**

Recopilar, Analizar y sistematizar información literaria sobre la producción, extracción, purificación, usos y aplicaciones de la enzima amilasa en la industria de los alimentos.

## **1.1. JUSTIFICACIÓN**

Desde hace miles de años el hombre a utilizado métodos biológicos para producir y conservar sus alimentos, para obtener productos que han contribuido a mejorar su salud (por ejemplo antibióticos y vitaminas) o mejorar las características de los alimentos como el color, olor, sabor, etc.

Actualmente se emplean procedimientos biotecnológicos para la producción, transformación y preservación de alimentos o para la producción de materias primas, aditiva y coadyuvante empleadas en la industria alimentaria. Así mismo las técnicas biotecnológicas están cada vez involucradas en aspectos analíticos y de control de calidad. Las enzimas son producidas por células vivas y su función principal es la de efectuar diferentes reacciones biológicas propias de cada especie.

En el ámbito mundial han tomado gran importancia para los mercados extranjeros y el mercado mexicano, en el ámbito industrial son de gran importancia ya que se producen en cantidades masivas por medio de la fermentación de microorganismos que son viables para producir diferentes enzimas para todo tipo de industria.

La tecnología actual permite extraerlas de su fuente de origen y utilizarlas en sus diferentes aplicaciones industriales para la producción de alimentos. Por

otra parte, las enzimas naturales propias de los alimentos puede tener una acción tanto favorable como dañina en el producto terminado.

En la actualidad se conocen la existencia de mas de 2000 enzimas, de las cuales más de 150 han sido aisladas, purificadas y algunas cristalizadas entre ellas encontramos a la amilasa fúngica que se produce por fermentación de una cepa de hongo *Aspergillus niger*, y es la más utilizada en la fabricación de pan, como una alternativa a la harina de malta. Ello es debido al hecho, entre otros, de que la alfa-amilasa fúngica tiene una mayor tolerancia a la sobre dosificación que la de origen de cereal, lo que se basa en su desactivación durante la primera fase de la cocción 60-65°C, por lo que no existe el riesgo de que se produzca un exceso de dextrinas lo cual producirá migas pegajosas.



## **CAPITULO 2**

### **2.1 Generalidades**

Las enzimas son proteínas solubles que intervienen en todas las reacciones del metabolismo permitiendo que éstas se produzcan. Actúan en secuencia organizada en reacciones de degradación de nutrientes y en la síntesis de macromoléculas a partir de precursores sencillos. Se definen como biocatalizadores autógenos, ya que son propios de cada organismo que sintetiza los suyos según sean sus necesidades para actuar específicamente en una clase de reacción. Montes. , (1998.

Tienen gran importancia en diversas áreas que permiten reducir los costos de producción, mejora en la calidad de productos, desarrollo de procesos más eficientes, y generación de ganancias y mayores rendimientos en procesos industriales. Magaña. , (1993.

En el área de alimentos se ha utilizado el cuajo (renina) en la elaboración de quesos, es una de las enzimas más antigua, esta formada por la mezcla de dos enzimas, quimosina y pepsina; que se obtiene del cuajar de terneras jóvenes. Estas enzimas rompen la caseína de la leche y producen la coagulación.

En el procesamiento de jugos de frutas el producto obtenido generalmente es viscoso debido a la pectina disuelta y turbio por los fragmentos de pared celular en suspensión, cuando se agregan péctinasas, la viscosidad disminuye y las

partículas pueden eliminarse fácilmente centrifugando el líquido o filtrándolo. Camperi (1996).

Las amilasas son glicosidasas que catalizan la hidrólisis de almidón mediante el rompimiento de los enlaces  $\alpha$ - 1,4, de las moléculas de amilosa y amilopectina. Para que la enzima lleve a cabo su acción es necesario la presencia de  $\text{Ca}^2$ . La  $\beta$ -amilasa, en cambio, no precisa metales. La enzima se encuentra presente en cereales con alto contenido de almidón como (*trigo, arroz, cebada, mijo, centeno*). En frutas (*plátano*), tubérculos (*papa*). Dentro de las enzimas de origen animal se encuentra la amilasa salival y pancreática de bovino. Sin embargo, la fuente más importante es por vía microbiana, debido a que las enzimas generadas son más estables, se producen en grandes cantidades y en forma constante. Lecka y Lonsane (1997).

Los principales microorganismos productores son hongos filamentosos como el *Aspergillus* y bacterias del genero *bacillus*. Tienen aplicación en variadas industrias. Su importancia se ha destacado ampliamente por su uso en la preparación de jarabes a partir de almidón, en la industria textil, del papel, de los adhesivos, de la panificación, de los detergentes. Ortega (1998).

El uso de amilasas en detergentes mejora el rendimiento y evita que la suciedad se adhiera al almidón, ya que aumenta el poder limpiador del producto.

En medicina genera conocimientos a diagnóstico mayor de los casos de enfermedades por tanto mejora la salud en la población. Stauffer (1994).

Mediante el uso de una enzima o el acoplamiento de dos o más de ellas es posible cuantificar más de 30 sustancias en el control de calidad de alimentos como ácido ascórbico, ácido láctico, ácido cítrico, almidón, colesterol, lactosa, lecitina y glucosa.

## **2.2 Clasificación**

Muchas enzimas han sido designadas añadiendo el sufijo “asa” al nombre del sustrato, es decir, a la molécula sobre la cual la enzima ejerce su acción catalítica. Esta nomenclatura ha ocasionado que muchas enzimas hayan recibido nombres que químicamente son poco informativos como por ejemplo la quimiosina, renina.

Se han propuesto o utilizado varios sistemas de clasificación enzimática. La mayoría de las enzimas pueden clasificarse en forma general respecto a los sustratos. Por ejemplo: las carbohidrasas actúan sobre los carbohidratos; las proteasas sobre las proteínas; las lipasas sobre los lípidos, etc. Sin embargo, la mayoría de las enzimas presentes en los alimentos o utilizadas para propósitos tecnológicos pertenecen a la clase de las oxidoreductasas, como es la peroxidasa o catalasa y las hidrolasas como la amilasa, proteasa o fosfatasa. Toporek. , (1984).

## **2.3 Nomenclatura**

La Comisión de enzimas de la Unión Internacional de Bioquímica desarrolló un método de identificación cada una con cuatro dígitos.

En primer término, se hicieron seis grupos que incluyen a todas las enzimas;

***Oxidoreductasas:*** Catalizan reacciones de oxidación o reducción

***Transferasas:*** Catalizan la transferencia de variedades químicas específicas

***Hidrolasas:*** Hidrolizan los sustratos con una absorción concomitante de moléculas de agua

***Liasas:*** Eliminan o adicionan variedades químicas específicas a sus sustratos

***Isomerasas:*** Catalizan la isomerización

***Ligasas:*** Catalizan la síntesis o enlace de unidades de sustrato. Badui, (1981).

El primer dígito de la nomenclatura indica a que grupo pertenece. El segundo dígito de la nomenclatura corresponde a la subclase de la enzima, al tipo de enlace que hidroliza. El tercer dígito es una subdivisión y ofrece más información con respecto al sustrato que utiliza la enzima. El cuarto dígito indica específicamente la acción de la enzima en cuestión.

## **CAPITULO 3**

### **REVISION DE LITERATURA**

#### **3.1. Antecedentes**

Las amilasas son glicosidasas que catalizan la hidrólisis de polímeros de unidades de glucosa, unida a través de enlaces  $\alpha$ - 1,4, mediante la transferencia de un resto glucósido (donador) a H<sub>2</sub>O (receptor). La  $\alpha$ -amilasa (1,4- $\alpha$ -D- glucano glucan hidrolasa (EC 3.2.1.1) se encuentra en todos los organismos vivos en tanto que la  $\beta$ -amilasa (1,4- $\alpha$ -D- glucano maltohidrolasa, (EC 3.2.1.2) se halla presente en las semillas de los vegetales superiores, en los *boniatos*, la *avena*, *el maíz*, y *el sorgo*. La  $\alpha$ -amilasa comercialmente empleada suele proceder de *Bacillus licheniformes* o *Aspergillus oryzae*. Wong. , (1989).

##### **3.1.1. Características del enzima $\alpha$ -amilasa**

Ambas amilasas tienen pesos moleculares en torno a 50.000 Daltons, excepto la  $\beta$ -amilasa del boniato que es un tetrámero de 197.000 daltons. La  $\alpha$ -amilasa contiene un Ca<sup>2+</sup> por mol de proteína, que resulta esencial para la estabilización del enzima. La  $\beta$ -amilasa, en cambio, no precisa metales. El pH óptimo de la  $\alpha$ -amilasa varía según su origen (6-7) la de los *mamíferos*, (4-8), (5-8) la de *A.oryzae*, (5-8), (5-6), la de *B. subtilis*). El pH óptimo de la  $\beta$ -amilasa oscila entre 5 (*trigo*, *malta* y *boniato*) y 6 (la de *soja*). (Robinsón., 1991).

La  $\alpha$ -amilasa escinde los polímeros  $\alpha$ -1,4 de glucosa en posiciones internas (endoataque), para dar fragmentos de oligosacáridos con el hidroxilo del C1 en configuración  $\beta$ -amilasa es una exoglicosidasa que separa sucesivas unidades maltosilo a partir del extremo no reductor del polímero para dar maltosa en configuración  $\beta$ .

Aunque las  $\alpha$ -amilasas fúngicas de *Aspergillus oryzae* son termolábiles, han sido descritas como maltogénicas. El jarabe producido por la acción de las  $\alpha$ -amilasas fúngicas contiene maltosa (50%), maltotriosa (30%) y glucosa (5%). Las  $\alpha$ -amilasas fúngicas comerciales se han utilizado como mejorantes del pan y se han añadido a la masa puesto que aumentan la retención de gas y volumen de la miga, (Couvain, 1987).

Las  $\alpha$ -amilasas se inactivan en alimentos ácidos y frecuentemente se presentan en forma de isoenzimas diferentes como la isoenzima de la  $\alpha$ -amilasa porcina parece contener dos partes estructurales similares, ambas con un peso molecular de 25,000, unidas mediante un puente disulfuro y activas enzimáticamente.

Las enzimas porcinos y de *Aspergillus oryzae* son glicoproteínas (Robyt, 1984).

El ataque secuencial de la  $\beta$ -amilasa sobre el almidón se detiene en los puntos de ramificación del polímero. Sin embargo, el punto de ramificación  $\alpha$ -1,6 convierte el enlace  $\alpha$ -1,4 vecino en resistente al ataque de las amilasas.

### **3.1.2. Mecanismo de acción de la $\alpha$ -amilasa**

El almidón, principal componente de las harinas de los cereales está constituido por un 75% de amilopectina y un 25% de amilosa. Sobre éstas actúa la alfa amilasa rompiendo al azar, a excepción de los terminales, los enlaces alfa 1,4 glicosídicos produciendo maltosa y sobre todo dextrinas. Sobre estas últimas actúa la beta amilasa que hidroliza los enlaces 1-4 glicosídicos terminales de manera secuencial liberando así la maltosa. La maltosa es posteriormente fermentada por la levadura dando lugar a la producción de gas CO<sub>2</sub> del que depende de forma directa al volumen de la masa. ( Blanco. , 1997).

La harina de los cereales contiene suficiente cantidad de  $\beta$  – amilasa. Sin embargo, la cantidad de alfa amilasa es muy variable dependiendo de variaciones e influencias climatológicas en cada cosecha (Blanco, 1997).

#### **3.1.2.1 Fuentes naturales de amilasas**

La enzima se encuentra presente en cereales con alto contenido de almidón como (trigo, arroz, cebada, mijo, centeno). En frutas (plátano), tubérculos (papa). Dentro de las enzimas de origen animal se encuentra la amilasa salival y pancreática de bovino. Sin embargo, la fuente más importante es por vía microbiana, debido a que las enzimas generadas son más estables, se producen en grandes cantidades y en forma constante. Dentro de los microorganismos productores, se encuentran levaduras como *Saccharomyces cerevisiae*, bacterias del genero *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus polimixa*, *Bacillus*

*cereus* y principalmente hongos filamentosos de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*, siendo los del genero *Aspergillus*, especie *níger* el mas ampliamente utilizado como modelo, ya que no es patógeno, es un productor conocido de una gran variedad de enzimas y es considerado como GRAS (generalmente reconocido como seguro). Lekha y Lonsane. , 1997).

### **3.1.3. Tipos de amilasas**

#### **3.1.3.1. Origen fúngico**

Se producen por medio de fermentación de una cepa del hongo *Aspergillus níger*, y es la más utilizada en la fabricación del pan, como alternativa a la harina de malta, esto es debido a que la alfa-amilasa fungal tiene una mayor tolerancia a la sobre dosificación que la de origen vegetal lo que provoca su desactivación durante la primera fase de cocción, por lo que no existe el riesgo de que se produzca un exceso de dextrinas, lo cual provocará que las migas queden pegajosas.

#### **3.1.3.2. Origen bacteriano**

Se produce a partir de la bacteria *Bacillus subtilis*, y es muy resistente al calor por lo que a temperaturas de 70 a 90°C alcanza su máxima velocidad de reacción. El efecto secundario típico de la amilasa bacteriana es una disminución de la viscosidad del engrudo del almidón.



### **3.1.3.3. Origen vegetal**

Para su elaboración se lleva a cabo la germinación del trigo para que se movilicen las alfa-amilasas naturales del grano. Hasta la década pasada los mejorantes completos de panificación se formulaban con este tipo de amilasas.

Estas amilasas se inactivan a 75°C, por lo que en una harina con elevada actividad enzimática o en el caso de una sobre dosificación, es mayor la estabilidad al calor y puede ocasionar los mismos problemas que las harinas procedentes de trigo germinado.

### **3.1.3.4. Glucoamilasas**

Se obtiene de hongos, *Aspergillus rhizopus*, y actúa sobre las dextrinas produciendo glucosa, lo que se traduce en una aceleración de la fermentación.

### **3.1.4. Inhibidores de amilasas**

Además de los inhibidores de proteinasas, las plantas contienen también inhibidores de las amilasas de naturaleza proteica, encontrados en los cereales, legumbres y patatas, aunque en general estos inhibidores sólo actúan sobre la  $\alpha$ -amilasa de los insectos y los animales superiores. Moléculas no proteicas pequeñas inhiben la  $\beta$ -amilasas y las glucoamilasas Whitaker. , (1983).

A partir de un actinomiceto se han obtenido dos inhibidores proteicos de la  $\alpha$ -amilasa que retienen el 80% de la actividad inhibidora tras un tratamiento térmico a 100°C durante 10 minutos Goto et al., 1983).

A partir de varias especies de *Streptomyces* se han aislado un gran número de inhibidores de la  $\alpha$ -amilasa que son oligosacáridos pequeños que contienen un átomo de nitrógeno por mol Takeshi et al., 1983).

Como algunos de los inhibidores de proteínas se digieren por la pepsina, se ha intentado utilizar *faseolamina*, inhibidor  $\alpha$ -amilasa de *Phaseolus vulgaris* para inhibir la digestión del almidón por los mamíferos. Sin embargo, con tales bloqueadores del almidón se han observado diversos efectos laterales indeseables, como flatulencia intestinal y náuseas, por lo que desde 1982 se prohíbe la venta de dichos productos por la United States Food and Drug Administración (UFSDA).

Los inhibidores no proteicos de las amilasas son generalmente derivados de oligosacáridos o monosacáridos cortos e inusuales y por tanto actúan probablemente asociados al centro activo de la enzima. Las amilostaticas, aisladas de un filtrado de cultivo de *Streptomyces diastaticus* Fukuhara et al., 1982) contiene diferente actividad inhibitoria frente a las diversas amilasas.

### **3.2. Mecanismo de la reacción**

La hidrólisis enzimática tiene lugar mediante ruptura del enlace C anomérico-O. Un grupo imidazol actúa como un ácido general para protonar el oxígeno glicosídico y un grupo anión carboxílico lo hace como una base general, grupo estabilizador, o nucleófilo. Wong., (1989).

### **3.2.1. Tipos de mecanismo de la reacción**

- Formación de un ion oxicarbonio intermedio, seguida de hidratación.
- Reacción de desplazamiento con formación a través de un intermediario covalente enzima-sustrato.

#### **3.2.1.1. Ión oxicarbonio**

Para justificar la configuración específica de los productos de la reacción catalizada por las amilasas, una distorsión del anillo del sustrato, inducido por la enzima, para dar un intermedio en semisilla.

La distorsión a una configuración en semisilla libera la deformación esférica que se da en C1, y mejora la accesibilidad del carbono anomérico desde una posición frontal favorece la formación de un ión oxicarbonio intermedio.

Por consiguiente, en el mecanismo ión oxicarbonio, la molécula de agua, queda retenida si el enzima la dirige a un ataque frontal; un ataque por detrás produce la inversión.

#### **3.2.1.2. Desplazamiento**

La retención de la configuración en la hidrólisis catalizada por la  $\alpha$ -amilasa sugiere la posibilidad de una reacción de desplazamiento doble. La protón acción concertada del oxígeno glicosídico por el grupo imidazol y el ataque nucleofílico del anión carboxilato en posición C1, escinden el enlace glicosídico, dando lugar a la formación de un intermediario covalente glicosilo-enzima con una configuración

invertida. Un segundo desplazamiento por una catálisis básica general, con ayuda de imidazol, disocia el intermediario enzima-glicosilo ligado covalentemente, para dar un producto de configuración. Wong., (1989).

## **CAPITULO 4**

### **4.1. Almidón**

Es la sustancia de reserva alimenticia predominante en las plantas, y proporciona el 70-80% de las calorías consumidas por los humanos de todo el mundo. Tanto el almidón como los productos de la hidrólisis del almidón constituyen la mayor parte de los carbohidratos digeribles de la dieta habitual. Del mismo modo, la cantidad de almidón utilizado en la preparación de productos alimenticios, sin contar el que se encuentra presente en las harinas usadas para hacer pan y otros productos de panadería. Badui 1986.

El almidón se diferencia de todos los demás carbohidratos en que en la naturaleza se presenta como complejas partículas discretas (gránulos). Los gránulos de almidón son relativamente densos e insolubles, se hidratan muy mal en agua fría. Pueden ser dispersados en agua, dando lugar a la formación de suspensiones de baja viscosidad que pueden ser fácilmente mezcladas.

Los almidones comerciales se obtienen de las semillas de cereales, particularmente de maíz, maíz céreo, maíz rico en amilosa, trigo, varios tipos de arroz, y de algunas raíces y tubérculos, particularmente de patata, y tapioca. Tanto los almidones como los almidones modificados tienen un número enorme de posibles aplicaciones en los alimentos, que incluyen las siguientes: adhesivo, ligante, enturbiantes, formador de películas, estabilizante de espumas, agente

antienvjecimiento de pan, gelificante, glaseante, humectante, estabilizante, texturizante y espesante. Beckman. , (1953.

#### **4.1.1. Composición del almidón**

El almidón está compuesto fundamentalmente por glucosa. Aunque puede contener una serie de constituyentes en cantidades mínimas, estos aparecen a niveles tan bajos, que es discutible si son oligoconstituyentes del almidón o contaminantes no eliminados completamente en el proceso de extracción. Desrosier. , (1989.

Químicamente es una mezcla de dos polisacáridos muy similares, la amilosa y la amilopectina; contienen regiones cristalinas y no cristalinas en capas alternadas. Puesto que la cristalinidad es producida por el ordenamiento de las cadenas de amilopectina, los gránulos de almidón céreo, tienen parecido grado de cristalinidad que los almidones normales. La disposición radial y ordenada de las moléculas de almidón en un gránulo resulta evidente al observar la cruz de polarización (cruz blanca sobre un fondo negro) en un microscopio de polarización cuando se colocan los polarizadores a 90° entre sí.

Los almidones de los cereales contienen pequeñas cantidades de grasas. Los lípidos asociados al almidón son, generalmente, lípidos polares, que necesitan disolventes polares tales como metanol-agua, para su extracción. Generalmente el nivel de lípidos en el almidón cereal, está entre 0.5 y 1%. Los almidones no cereales, no contienen esencialmente lípidos. , Badui, 1981.

#### **4.1.2. Amilosa**

Es el producto de la condensación de D-glucopiranosas por medio de enlaces glucosídicos  $\alpha(1,4)$ , que establece largas cadenas lineales con 200-2500 unidades y pesos moleculares hasta de un millón; es decir, la amilosa es una  $\alpha$ -D-(1,4)-glucana cuya unidad repetitiva es la  $\alpha$ -maltosa. Tiene la facilidad de adquirir una conformación tridimensional helicoidal, en la que cada vuelta de hélice consta de seis moléculas de glucosa. El interior de la hélice contiene sólo átomos de hidrógeno, y es por tanto lipofílico, mientras que los grupos hidroxilo están situados en el exterior de la hélice. La mayoría de los almidones contienen alrededor del 25% de amilosa. Los dos almidones de maíz comúnmente conocidos como ricos en amilosa que existen comercialmente poseen contenidos aparentes de masa alrededor del 52% y del 70-75%. Rogers. , (1988).

#### **4.1.3. Amilopectina**

Se diferencia de la amilosa ya que contiene ramificaciones que le dan una forma molecular a la de un árbol; las ramas están unidas al tronco central (semejante a la amilosa) por enlaces  $\alpha$ -D-(1,6), localizadas cada 15-25 unidades lineales de glucosa. Su peso molecular es muy alto ya que algunas fracciones llegan a alcanzar hasta 200 millones de daltons. La amilopectina constituye alrededor del 75% de los almidones más comunes. Algunos almidones están constituidos exclusivamente por amilopectina y son conocidos como céreos. La amilopectina de patata es la única que posee en su molécula grupos éster fosfato,

unidos mas frecuentemente en una posición O-6, mientras que el tercio restante lo hace en posición O-3. Rusell. , (1983).

#### **4.1.4. Grano de almidón**

El tamaño y la forma de los granos de almidón de las células del endospermo, varía de un cereal a otro; en el trigo, centeno, cebada, maíz, sorgo y mijo, los granos son sencillos, mientras que los de arroz son compuestos. La avena tiene granos sencillos y compuestos predominando estos últimos.

La mayor parte de los granos de almidón de las células del endospermo prismático y central del trigo tiene dos tamaños: grande, 15-30  $\mu\text{m}$  de diámetro, y pequeño, 1-10  $\mu\text{m}$ , mientras que los de las células del endospermo sub-aleurona, son principalmente de tamaño intermedio 6-15  $\mu\text{m}$  de diámetro. En las células del endospermo sub-aleurona hay relativamente más proteína y los granos de almidón están menos apretados que en el resto del endospermo. Robinson. , (1991)

#### **4.1.5. Gelatinización**

Los gránulos de almidón son insolubles en agua fría, pero pueden embeber agua de manera reversible; es decir, pueden hincharse ligeramente con el agua y volver luego al tamaño original al secarse. Sin embargo cuando se calientan en agua, los gránulos de almidón sufren el proceso denominado gelatinización, que es la disrupción de la ordenación de las moléculas en los gránulos. Durante la gelatinización se produce la lixiviación de la amilosa, la



gelatinización total se produce normalmente dentro de un intervalo más o menos amplio de temperatura, siendo los gránulos más grandes los que primero gelatinizan. Belitz. , (1992.

Los diversos estados de gelatinización pueden ser determinados utilizando un microscopio de polarización. Estos estados son: la temperatura de iniciación (primera observación de la pérdida de birefringencia), la temperatura media, la temperatura final de la pérdida de birefringencia (TFPB, es la temperatura a la cual el último gránulo en el campo de observación pierde su birefringencia), y el intervalo de temperatura de gelatinización.

Al final de este fenómeno se genera una pasta en la que existen cadenas de amilosa de bajo peso molecular altamente hidratadas que rodean a los agregados, también hidratados, de los restos de los gránulos. Rogers, y col, 1988.

#### **4.1.6. Retrogradación**

Se define como la insolubilización y la precipitación espontánea, principalmente de las moléculas de amilosa, debido a que sus cadenas lineales se orientan paralelamente y accionan entre sí por puentes de hidrógeno a través de sus múltiples hidroxilos; se puede efectuar por diversas rutas que dependen de la concentración y de la temperatura del sistema. Si se calienta una solución concentrada de amilosa y se enfría rápidamente hasta alcanzar la temperatura ambiente se forma un gel rígido y reversible, pero si las soluciones son diluidas, se vuelven opacas y precipitan cuando se dejan reposar y enfriar lentamente.

La retrogradación esta directamente relacionada con el envejecimiento del pan, las fracciones de amilosa o las secciones lineales de amilopectina que retrogradan, forman zonas con una organización cristalina muy rígida, que requiere de una alta energía para que se rompan y el almidón gelatinice. Badui., 1996.

#### 4.1.7. Estructura de amilosa

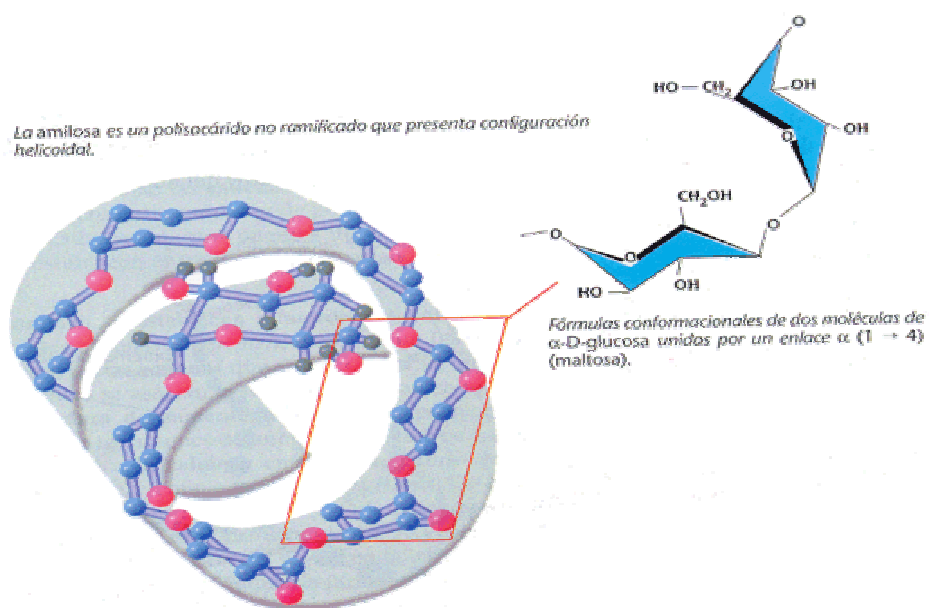


Fig. 1: Estructura de amilosa.

#### 4.1.8. Estructura de amilopectina

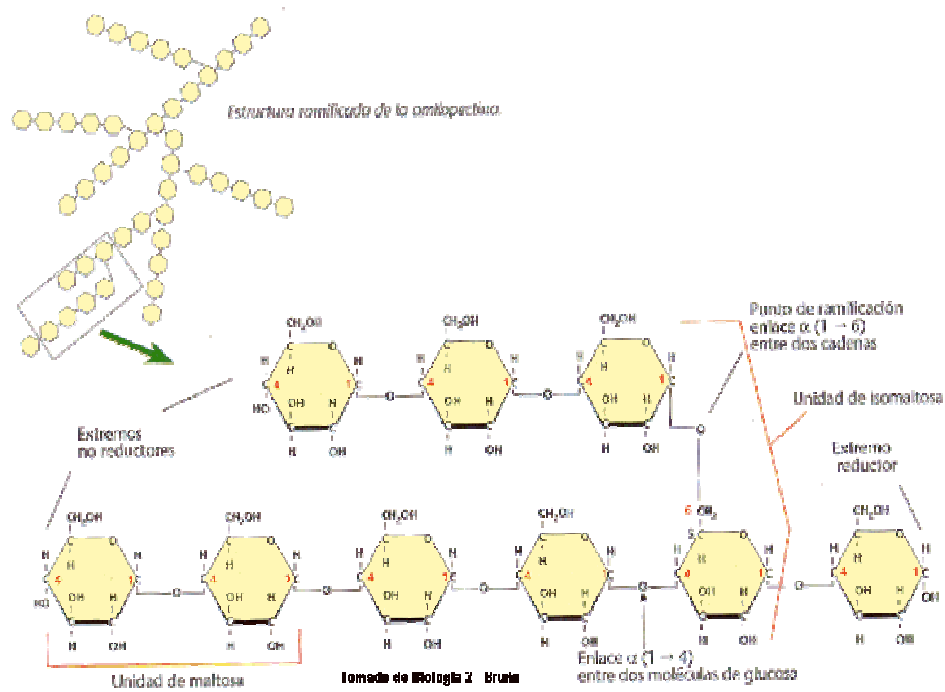


Fig. .2: Estructura de amilopectina

Fuente: A. L. Lehninger. 1997. Analysis of the native structure of starch granules with x- ray microfocus diffraction. Waigh. Macromolecules 30: 3813-3820.

#### **4.1.9. Estructura de los gránulos de almidón**

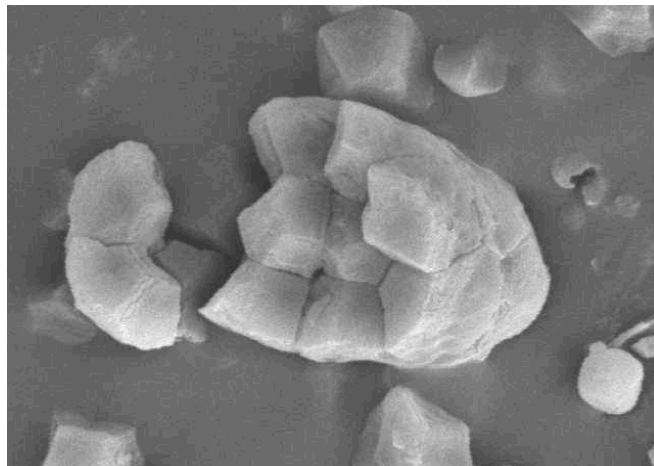


Fig. 3: Granos de almidón en arroz, *Oryza sativa*

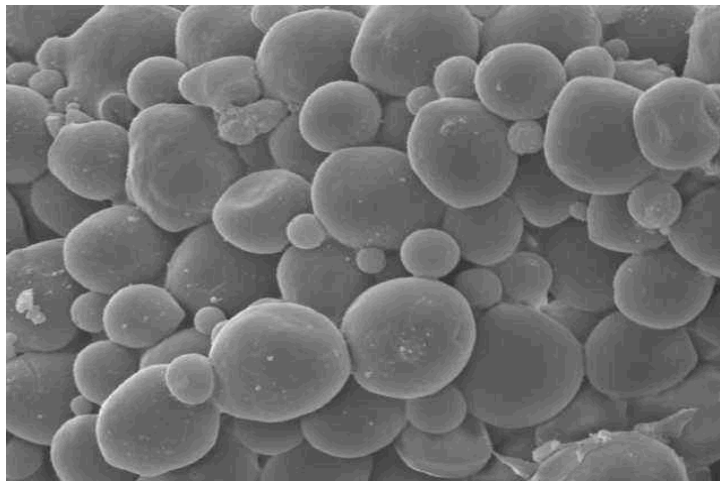


Fig. 4: Granos de almidón en maíz, *Zea mays*

Fuente: Berg, L. R. 1997. Introductory Botany, Plants, People and the Environment. Saunders College Publishing.

## **CAPITULO 5**

## **5.1. Enzimas microbianas**

La fabricación industrial de enzimas de microorganismos exige que se cumplan con los requisitos.

- Los microorganismos deben ser capaces de crecer en sustratos de bajo coste.
- La producción del enzima debe tener lugar a un ritmo elevado, constante y en poco tiempo.
- Los métodos para la recuperación del enzima deben ser sencillos y baratos.
- La preparación enzimática obtenida debe mantenerse estable. Fellows. , (1994).

### **5.1.1. Usos industriales**

Las amilasas se utilizan tanto en la industria panadera como en la de los jarabes de maíz. La fermentación por la levadura cesa en la masa canaria, cuando el azúcar de la misma se ha agotado. El azúcar de la masa tiene tres procedencias: el originalmente presente en la harina, el añadido y el producto de la degradación de almidón por las amilasas. La harina de trigo cultivado en América del Norte es pobre en  $\alpha$ -amilasa. Si se le agregan enzimas se produce una constante y gradual liberación de maltosa que permite que la fermentación prosiga.

También se utiliza en la elaboración de vino y cervezas para la clarificación de los turbios de almidón. La  $\alpha$ -amilasa desempeña, junto con las glucoamilasas y la isomerasa, un papel esencial en la producción de jarabes de maíz. Wong. , (1989).

#### **5.1.1.1. Inmovilización de enzimas**

Otra importante aplicación de las enzimas es la inmovilización, es una técnica que consiste en retener la enzima en un soporte por diversos mecanismos como: Atraparla en matriz de un polímero, de un gel o de un micro cápsula. Adhlerirla a un soporte sólido ya sea por mecanismos de absorción de intercambio iónico, enlace covalente, entre el soporte activado y un grupo funcional de la enzima. En cualquier caso se pretende recuperar la enzima para emplearla nuevamente o en procesos continuos.

### **5.2. Preparaciones enzimáticas comerciales**

Entre los preparados se encuentran Enzimix 5000 que es un preparado en polvo en base a enzima, alfa-amilasa y almidón de maíz, elaborado con una concentración estandarizada de 5000 SKB por gramo. Este preparado facilita y corrige la diferencia diastásica en la harina, protegiéndola de las variaciones naturales de la alfa-amilasa del trigo, provoca un aumento en el volumen del pan, mejorando notoriamente el color y crocancia de la corteza, con esto se obtienen panes con textura de miga de porosidad fina.

Veron M4 que es un producto en base a alfa-amilasa fúngica para el tratamiento de la harina. Polvo color beige claro y olor aromático. Posee una actividad enzimática de > 1728 AZ por gramo. Este es un tratamiento que se le da directamente a la harina en la fabricación de productos de panificación para que se faciliten la fermentación e incrementar el volumen al hornear para obtener poros finos y uniformes en la miga. Camperi, Hours, Audaz, Miranda, Coscone, Navarro. , 1996.

Las preparaciones comerciales de amilasas fúngicas que contienen pequeñas proporciones de glucoamilasa, sacarifican más profundamente el almidón que la amilasa en si y dan lugar a cantidades sustanciales de maltosa que apenas contienen glucosa por esto se utilizan para los siguientes procesos.

- Para eliminar turbulencia producida por los almidones y reducir la viscosidad de los zumos de fruta.
- Para transformar el almidón de cacao en dextrina reduciendo así su viscosidad y mejorando los jarabes de chocolate.
- Para la fabricación de jarabes de glucosa
- Para reducir la viscosidad de la masa de panadería y acelerar la fermentación de la misma por las levaduras Delrue. , (1987)

### **5.3. Soportes utilizados en la producción de enzimas fúngicas**

Los sustratos que normalmente se han utilizado para la producción de enzimas fúngicas son sustratos sólidos, salvado de maíz, pieles de algunas frutas, preparados a base de soja, harina de trigo, harina de cacahuate, residuos de remolacha, plátano, maíz, yuca, bagazo de caña, pulpa de café, cáscara cítrica, salvado de trigo, arroz y soya. Pandey. , 1992.



#### 5.4. Microorganismos productores de amilasa

Microorganismo	Enzima	Aplicación
<i>Bacillus licheniformis</i> <i>B. subtilis</i> , <i>B. amyloliquefaciens</i>	$\alpha$ -amilasa	Licuefacción del almidón para obtener hidrolizados con ED-8-12.  Hidrólisis de almidón residual de almidón en jugo de caña. Aditivo de cervecería.
<i>A. oryzae</i> , <i>A. Sojae</i> , <i>A. effusus</i>	$\alpha$ -amilasa	Obtención de hidrolizados de almidón con alto contenido de maltosa.
<i>Malta, bacillus polymyxa circulans</i> , <i>B. Cereus</i> .	$\beta$ -amilasa	Obtención de hidrolizados de almidón con alto contenido de maltosa.
<i>A. Níger</i> , <i>A. oryzae</i> , <i>Rhizopus delemar</i>	Amiloglucosidasa	Obtención de glucosa a partir de hidrolizados de almidón con amilasa, aditivo en la elaboración de cerveza ligera.

Cuadro 1: Microorganismos productores de amilasas

Fuente: López, Munguía, Quintero R. (1999). Biotecnología Alimentaria.

*Aspergillus niger*

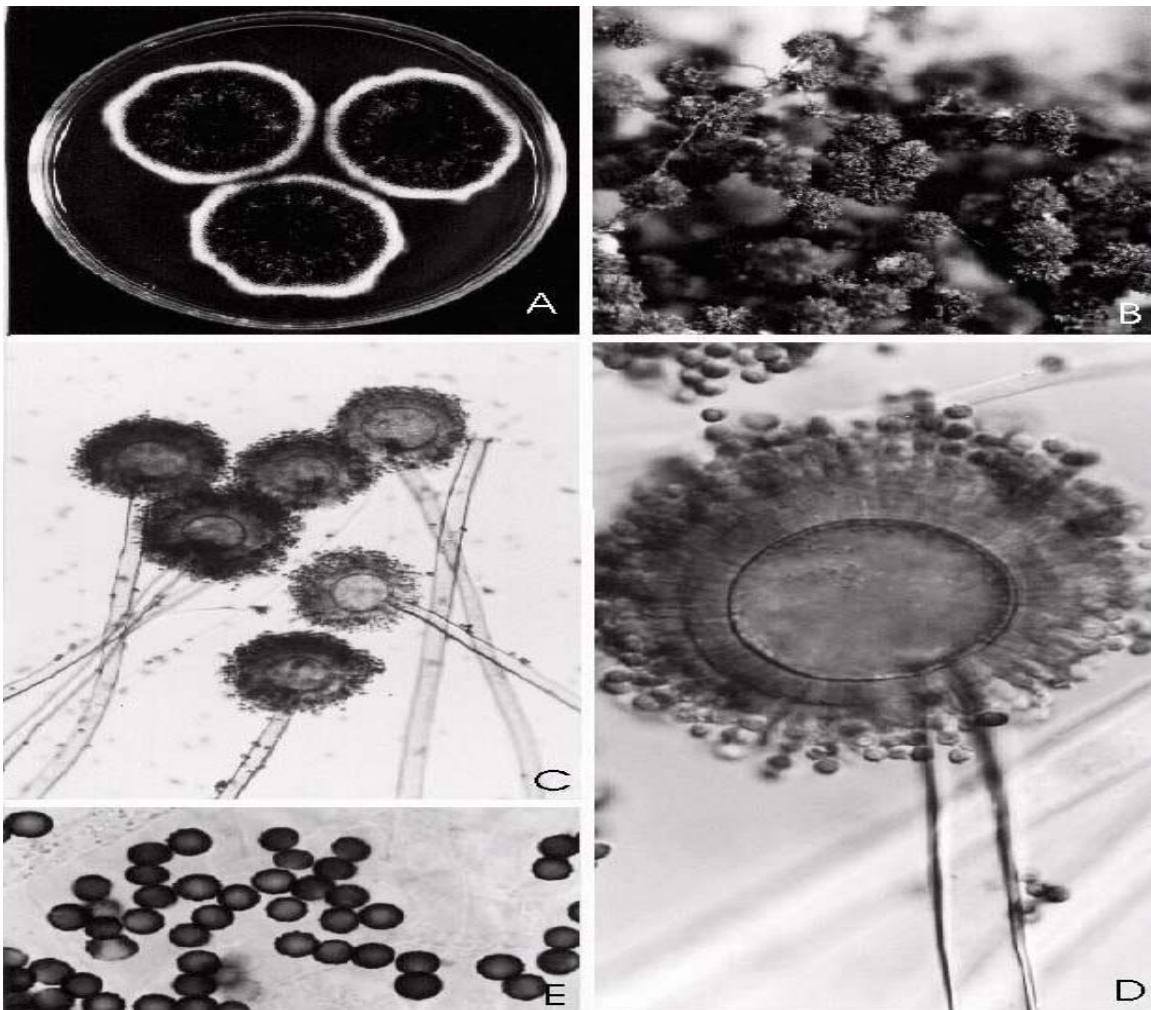


Fig. 5 : *Aspergillus niger*

Fuente : Hoog G. S and Guarro J. (1995. Atlas of Clinical Fungi ;  
Centraalbureau voor Schimmecultures, Baar and Deltt, the Netherlands.

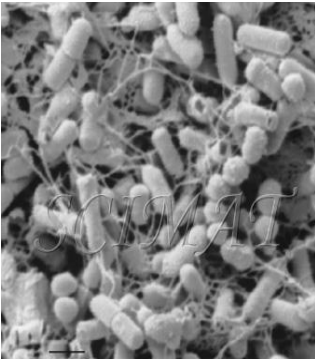


Fig. 6: *Bacillus subtilis*

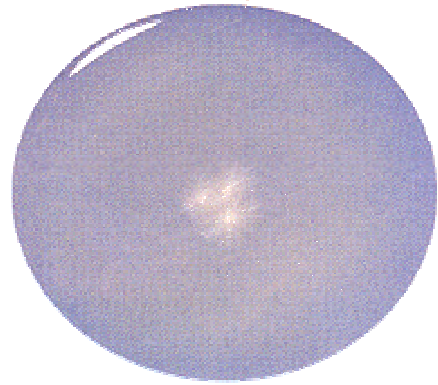


Fig. 7: *Aspergillus oryzae*



Fig. 8: *Bacillus polymyxa*



Fig. 9: *Aspergillus sojae*



*Bacillus*  
*Circulans*

Fig.10: *Bacillus*

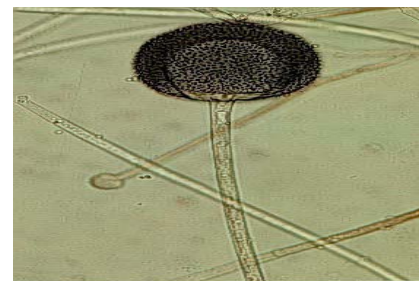


Fig. 11: *Rhizopus*

Fuente: Kwon – Chung, K. J. And Bennett, (1992). Medical Mycology. Lea and Febiger, Philadelphia and London *Bacillus subtilis*.

### **5.5. Enzimas técnicos**

Los enzimas aislados y purificados se denominan “enzimas técnicos”. Se adicionan a los alimentos en soluciones concentradas o en polvos para provocar el desarrollo de reacciones específicas, en condiciones suaves de pH y temperatura.

Los enzimas técnicos se obtienen, bien por cultivo superficial sobre sustratos sólidos como salvado de maíz, pieles de algunas frutas y harina de trigo o en cultivos sumergidos utilizando sustratos líquidos. Fellow. , 1994.

### **5.6. Ventajas de los enzimas técnicos**

- a) Producen modificaciones muy específicas en los alimentos
- b) La pérdida de valor nutritivo que provocan es mínima ya que se utilizan a temperaturas poco elevadas.
- c) Consumo energético muy inferior al que requerirían las reacciones químicas equivalentes.
- e) Permiten la elaboración de productos nuevos.

### **5.7. Reportes de producción de enzima amilasa**

Gpo. Investigación	Fuente	Tipo amilasa	Unidades producidas	Cu adr o 2: Re port es de pro duc ció n de enz ima ami las a
Taipei Taiwán Yang y Wang	Patata dulce Harina cacahuete	$\alpha$ -amilasa	2.642.7 U/ml	
Brasilia Rita salinas, Maria Yoldjian	Soya	$\alpha$ -amilasa $\beta$ -amilasa	55.7U/ml	
Argentina D.D Mariani	Amaranto	$\alpha$ -amilasa	2750 U. Dun/ml 2806 U. Dun/ml	
Brasil Ely Nahas	Almidón	$\alpha$ -amilasa	56.7U/ml	
Ludhiana India G.S Kocher y Kathyal	Papa	$\alpha$ -amilasa	174U/ml	<b>5.8.</b>

### Mercado mundial de enzimas

A comienzos de 1970 la tecnología enzimática comenzaba a entrar en periodo de desarrollo industrial, dirigido a la producción de aminoácidos y azúcares a partir de glucosa isomerasa. En aquel momento, los mercados Europeos y Americanos se encontraban dominados por la comercialización de las

enzimas proteolíticas utilizadas en la industria de los detergentes, pero existían grandes expectativas sobre el mercado de enzimas aplicadas a la industria alimentaría, al cual se le auguraba un crecimiento importante. Dunnill. 1980.

En 1981 el mercado mundial del azúcar se valoró en 200 millones de dólares y en 1985 la oficina de Valores Tecnológicos de USA lo cifraba en 250 millones. La interpretación más clara es que el mercado para las enzimas utilizadas en la industria ha crecido espectacularmente a lo largo de los años 1970, y que este crecimiento ha sido paralelo al desarrollo de un gran número de aplicaciones a la industria alimentaría. Se puede esperar en el futuro que el mercado experimente un aumento cuando las enzimas comiencen a utilizarse en procesos de producción de la industria química. Lewis. , 1985.

En época más reciente se ha visto que puede utilizarse diversos tejidos vegetales y homogenizados tisulares, obtenidos de distintas fuentes, como alternativas a las células microbianas y a las enzimas purificadas.

La producción industrial de enzimas es un negocio que ha comienzos del siglo XXI mueve en torno a 1.600 millones de dólares al año, de los cuales el 70% se debe a productos del genero Bacillus. Kristiansen. , (1985). En 1998 alcanzó ventas por mil 600 millones de dólares, la industria alimentaria y biomédica dependen totalmente de su uso. En la actualidad, las industrias biomédica, alimentaria y química se han convertido en sectores totalmente dependientes del uso de enzimas producidas por microorganismos.

El mercado mundial ha crecido enormemente en la última década, alcanzando en el año 1998 ventas por mil 600 millones de dólares, tan solo para las enzimas involucradas en la industria alimentaria y de la transformación del almidón.

Aplicación en la Medicina, especialmente la mejora de los anticuerpos utilizados para fines diagnósticos y terapéuticos. Un mercado de más de 5.000 millones de euros anuales.

La mitad del mercado de enzimas lo ocupa Dinamarca y Holanda, con las compañías Novo y Gis Brocade. Otras compañías de importancia son Miles Laboratories (ahora Solvay), Pfizer, Rohm and Haas, Amano. En Japón se encuentra la mayor producción de enzimas en medio sólido.

Novo Industries estableció una planta en Brasil y actualmente en México la compañía ENMEX produce las principales enzimas con tecnología de Miles Laboratories y Pfizer y producen amilasas y proteasas. Sánchez. , 1987.

## **CAPITULO 6**

### **6.1. Fermentaciones**

La Fermentación es la transformación de una sustancia orgánica (generalmente un carbohidrato) en otra utilizable, producida mediante un proceso metabólico por microorganismos o por enzimas que provocan reacciones de oxidación-reducción, de las cuales el organismo productor deriva la energía suficiente para su metabolismo. Las fermentaciones pueden ser anaeróbicas, si se

producen fuera del contacto con el aire, o aeróbicas, que sólo tienen lugar en presencia de oxígeno. Potter, et. al.1995.

### **6.1.1. Ventajas de las fermentaciones**

- La utilización de pH's y temperaturas que no alteran y con frecuencia mejoran, el valor nutritivo y las características organolépticas de los alimentos,
- La obtención de alimentos con aroma y texturas que no pueden ser obtenidos por otros procedimientos.
- Bajo consumo energético por las especiales condiciones de su proceso de elaboración.
- Gastos de instalación y de funcionamiento relativamente bajos.
- Tecnología relativamente sencilla. Fellows. , ( 1994)

### **6.1.2. Factores que controlan el crecimiento microbiano en las fermentaciones microbianas.**

- Disponibilidad de carbono y nitrógeno, así como de nutrientes específicos para el crecimiento de algunos microorganismos
- pH del sustrato
- Temperatura de incubación
- Contenido en agua
- Potencial de oxido-reducción
- Fase de crecimiento del microorganismo



- Presencia de otros microorganismos competidores Jay. , (1978).

## **6.2. Efecto de la fermentación sobre los alimentos**

Las condiciones suaves en las que la fermentación de los alimentos suele tener lugar, apenas provoca cambios en su valor nutritivo. Las complejas transformaciones que experimentan las proteínas y los carbohidratos reblandecen la textura de los productos fermentados, los cambios en el bouquet son también muy complejos algunos cambios que experimentan los productos fermentados son:

1. Disminución del dulzor e incremento de la acidez por la transformación de los azúcares en ácidos orgánicos, durante la fermentación.
2. Incremento del contenido en sal de algunos alimentos (pepinillos, salsa de soja, pescado y productos derivados.
3. Reducción del amargor de algunos alimentos por la acción de enzimas específicos. Carr. , 1985.

Las fermentaciones más comunes en la industria de alimentos es la del azúcar, con formación de alcohol etílico, en la elaboración de vino, cerveza, sidra; la del alcohol, con formación de ácido acético, en la elaboración del vinagre; y la fermentación láctica, en la elaboración de quesos y yogures. Actualmente en la industria fermentativa se utilizan tanques de fermentación en los

que ésta se realiza en condiciones controladas de temperatura y presión y que permiten regular constantemente la entrada y salida de productos. Vogel. , 1983.

### **6.3. Fermentaciones alimentarias**

Los cambios provocados por los microorganismos en los carbohidratos de un sustrato determinado, (alimento) se pueden utilizar para clasificar las fermentaciones por sus productos finales:

- Fermentaciones para obtener ácidos orgánicos
- Fermentaciones alcohólicas (metanol) y anhídrido carbónico

Los microorganismos que se utilizan en las fermentaciones se pueden clasificar en:

- Homofermentativos.- Originan un solo producto
- Heterofermentativos.- Originan productos diversos

Las principales fermentaciones alimentarias son la Láctica y Alcohólica, en el caso de las Homolácticas y Alcohólica se originan en su fase inicial en el ciclo de Embden Mayerhoff-Parnas, en el caso de las Heterolácticas sigue el ciclo de las hexosas-monofosfato. Buchner. , 1897.

### **6.3.1. Fermentaciones lácticas**

La secuencia de acción de las bacterias lácticas es regulada por su tolerancia al pH, en el caso de la leche cuando la concentración de ácido láctico llega a .7 - 1.0 % se inhibe el crecimiento de *Streptococcus lactis* y aparecen especies que toleran mejor bajos pH's tales como *Bacillus casei* ( 1.5 a 2.0 % de ácido Láctico) y *Lactobacillus bulgaricus*, 2.5 a 3.0 % ácido Láctico. En la fermentación de vegetales los *Lactobacillus* tienen mayor poder acidificante que los estreptococos. Este tipo de fermentación, utiliza como sustrato la lactosa, que se transforma en ácido láctico. Ward. , 1989.

Dentro del grupo de bacterias lácticas se encuentran:

- *Pediococos* (homolácticos)
- *Streptococos* (homolácticos)
- *Leuconostoc* (heterolácticos)
- *Lactobacillus*, depende de cada cepa y pueden ser homolácticos o heterolácticos. Cheftel. , (1977)

En las fermentaciones de productos poco ácidos como la carne y la leche para acelerar las fermentaciones se utilizan cultivos puros (estárter), iniciadores y así incrementar el número de microorganismos que actuarán sobre el sustrato para reducir el tiempo de fermentación, además de inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos y bacterias causantes de alteraciones.

En otro tipo de fermentaciones la flora natural del producto es suficiente para promover un rápido descenso del pH que evite el crecimiento de microorganismos no deseados. Desrosier. , 1976.

### **6.3.2. Fermentaciones no alcohólicas**

- Panadería (fermentación por levaduras de panadería)
- Vegetales fermentados (encurtidos en general)
- Ensilado (fermentación de forraje)

#### **6.3.2.1. Fermentación alcohólica**

- Vino (fermentación alcohólica y maloláctica)
- Cerveza
- Sidra
- Destilados
- Vinagre (transformación de alcohol en ácido acético por fermentación con Acetobacter)

#### **6.3.2.2. Fermentación cárnica**

- Embutidos crudos curados (salame, chorizo español, etc.)
- Jamón Serrano (producto curado)
- Productos de pescado fermentado fermentación en filetes de pescado ahumado.

#### **6.3.2.3. Fermentaciones locales especiales**

- Salsa de soya
- Miso
- Tofu
- Otros productos

## Fermentación láctica

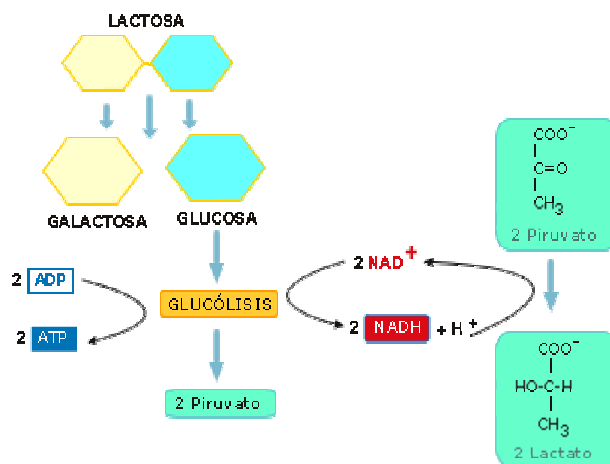


Fig. 12: Esquema de la fermentación láctica

## Fermentación alcohólica

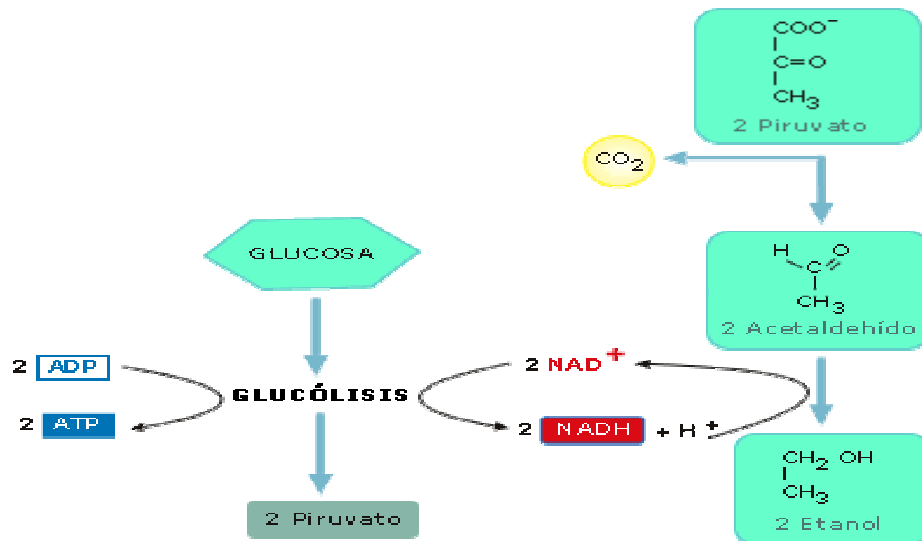


Fig. 13: Esquema de la fermentación alcohólica

Fuente: G. Beltrán, M.G, Torrija, , Novo, Ferrer N, Poblett M. (2002. Analysis of Yeast population during alcoholic. Fermentation six years follows up study, systematic and applied Microbiology, 25: 287 – 293.

### **6.4. Materias primas empleadas en las fermentaciones industriales**

#### **6.4.1. Fuentes de carbono**

Los carbohidratos son tradicionalmente las fuentes de carbono utilizadas en la industria de la fermentación. Por razones económicas la glucosa o la sacarosa pura rara vez son utilizadas como única fuente de carbono, excepto en los procesos que exigen un control exacto de la fermentación. Garibay, 1999.

##### **6.4.1.1. Las melazas**

Un subproducto de la producción de azúcar es una de las fuentes más baratas de carbohidratos. Además de una gran cantidad de azúcar, las melazas

contienen sustancias nitrogenadas, vitaminas y elementos traza. Sin embargo, la composición de las melazas varía dependiendo de la materia prima utilizada para la producción de azúcar (caña o remolacha) y la calidad de las melazas depende de la localidad, condiciones climáticas y procesos de producción.

#### **6.4.1.2. Extracto de malta**

Un extracto acuoso de la cebada malteada (cebada germinada que produce enzimas que hidrolizan el almidón), es un sustrato excelente para muchos *hongos filamentosos*, *levaduras* y *actinomicetos*. El extracto seco de malta contiene aproximadamente de 90 – 92% de carbohidratos y está compuesto de hexosas (glucosa, fructosa), disacáridos (maltosa, sacarosa), trisacáridos, maltotriosa y dextrinas, polímeros de glucosa 1,4 con ramificaciones 1,6. Las sustancias nitrogenadas presentes en el extracto de malta incluyen proteínas, péptidos, aminoácidos, purinas, pirimidinas y vitaminas. Los medios de cultivo que contienen extracto de malta deben ser esterilizados cuidadosamente. Cuando existe sobrecalentamiento se produce la reacción de Maillard debido al bajo pH y a la alta proporción de azúcares reductores.

#### **6.4.1.3. Aceites vegetales**

Como el aceite de soja, el aceite de algodón y el aceite de palma son utilizados principalmente como sustratos, siendo añadidos al medio en el que los carbohidratos proporcionan la principal fuente de energía.

### **6.5. Fuentes de Nitrógeno**

### **6.5.1. Líquido de maceración del maíz**

Fuente de nitrógeno que es metabolizada eficientemente y se forma durante la producción de almidón a partir de maíz. Este líquido contiene numerosos aminoácidos como alanina, arginina, ácido glutámico, isoleucina, treonina y cisteína.

### **6.5.2. Extractos de levadura**

Son excelentes sustratos para muchos microorganismos. Son producidos a partir de la levadura de panadería mediante autólisis 50-55°C mediante plasmólisis en presencia de altas concentraciones de NaCl. El extracto de levadura contiene aminoácidos, péptidos, vitaminas solubles en agua y carbohidratos. La composición del extracto varía de un lote a otro, parcialmente debido a que los sustratos utilizados para el cultivo de las levaduras afectan a la calidad del extracto de levadura obtenido.

### **6.5.3. Peptonas**

Hidrolizados de proteína pueden ser utilizados por muchos microorganismos pero son relativamente caras para la aplicación industrial. Las fuentes de peptonas incluyen la carne, caseína, gelatina, queratina, semillas de cacahuate, harina de soja, semillas de algodón y semillas de girasol. La composición de las peptonas varía dependiendo de su origen. El producto final está también influenciado por el tipo de hidrólisis (ácida o enzimática) especialmente con relación a su contenido en triptófano.



## **6.6. Factores físico-químicos que afectan el rendimiento de las fermentaciones**

### **6.6.1. Oxígeno**

Uno de los factores más críticos en la operación de la fermentación a gran escala es el suministro de un intercambio de gases adecuado. El oxígeno es el sustrato gaseoso más importante para el metabolismo microbiano y el anhídrido carbónico es el producto metabólico más importante.

El oxígeno no es un gas muy soluble ya que una solución saturada de oxígeno contiene aproximadamente 9 mg/lit de este gas en agua. Debido a los ingredientes del cultivo, el contenido máximo de oxígeno realmente es más bajo de lo que debería ser en agua pura. El suministro se logra pulverizando aire en el fermentador durante el proceso. López. , 1987.

### **6.6.2. Temperatura**

La temperatura es otro de los parámetros esenciales para el éxito de una fermentación.

Los microorganismos que crecen a una temperatura inferior a la óptima tienen retardado su crecimiento y por lo tanto reducida la producción celular, es decir su productividad, por otro lado, si la temperatura es alta, pero no letal, se puede inducir una respuesta de estrés al choque térmico con la consiguiente producción de proteasas celulares que ocasionen una disminución en el rendimiento de los productos proteicos.

### **6.6.3. pH**

La mayor parte de los microorganismos crecen óptimamente entre pH de 5.5 y 8.5. Pero durante el crecimiento en un fermentador, los metabolitos celulares son liberados al medio, lo que puede originar un cambio de pH del medio de cultivo. Por lo tanto, se debe controlar el pH del medio de cultivo y añadir un ácido o una base cuando se necesite para mantener constante el pH.

La adición del ácido o base debe ser mezclada rápidamente de tal manera que el pH del medio de cultivo sea el mismo en todo el fermentador.

## **CAPITULO 7**

### **7.1. Tipos de cultivo**

#### **7.1.1. Discontinuo**

Una fermentación discontinua (en batch) puede ser considerada como un “sistema cerrado”. Al inicio de la operación se añade la solución esterilizada de nutrientes y se inocula con el microorganismo, permitiendo que se lleve a cabo la incubación en condiciones óptimas de fermentación. A lo largo de toda la fermentación no se añade nada. Excepto oxígeno (en forma de aire), un agente antiespumante y ácidos o bases para controlar el pH. La composición del medio de cultivo, la concentración de la biomasa y la concentración de metabolitos cambia generalmente como resultado del metabolismo de las células

observándose las cuatro fases típicas de crecimiento: fase de latencia, fase logarítmica, fase estacionaria y fase de muerte. Ramírez, 1990.

### **7.1.2. Alimentado**

Se utiliza en la producción de sustancias como la penicilina. En los procesos alimentados, los sustratos se añaden escalonadamente a medida que progresa la fermentación. La formación de muchos metabolitos secundarios está sometida a represión catabólica (efecto glucosa) Por esta razón, en el método alimentado los elementos críticos de la solución de nutrientes se añaden en pequeñas concentraciones a principio de la fermentación y continúan añadiéndose a pequeñas dosis durante la fase de producción. Armiger, Humphrey. , 1979.

#### **7.1.2.1. Continuo**

En la fermentación continua se establece un sistema abierto. La solución nutritiva estéril se añade continuamente al biorreactor y una cantidad equivalente de solución utilizada de los nutrientes con los microorganismos, se saca simultáneamente del sistema. Quintero, 1990.

#### **7.1.2.2. Cultivos en inmersión**

Estos tipos de cultivo requieren un gasto menor, están menos expuestos a la contaminación y son más fácilmente automatizables. El sustrato utilizado debe contener una fuente energética, de Carbono y de Nitrógeno que permita la

proliferación celular. Además puede requerir de nutrientes específicos para el crecimiento y determinado tipo de minerales para la producción de enzima. El sustrato como son melazas, hidrolizados de almidón, aguas de maceración del maíz, es barato, abundante y de calidad uniforme.

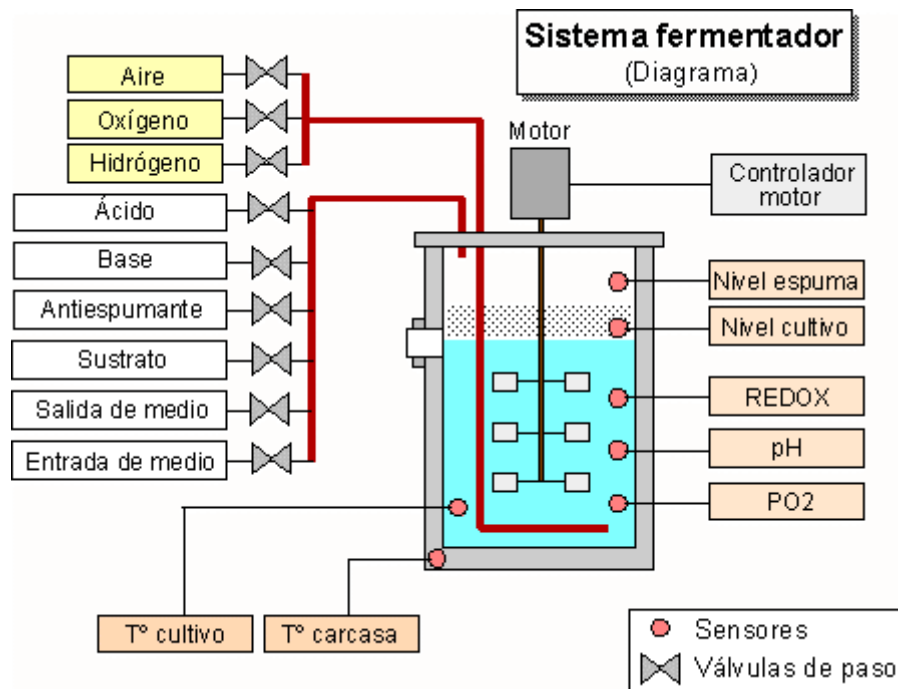


Fig. 14: Sistema fermentador.

Fuente: Atkinson B and Ferda, M. M. Stockton Press. (1983). Biochemical Engineering and Biotechnology Handbook.

## **7.2. Variables implicadas**

Los microorganismos crecerán a una velocidad característica que depende tanto de la composición del medio de cultivo como de la temperatura, pH, oxígeno suministrado y condiciones de la mezcla. Por este motivo, durante el proceso de producción se controlan mediante los oportunos sensores las siguientes variables:

- pH
- temperatura
- presión parcial de oxígeno
- producción de espumas
- nivel.

## **7.3. Aplicaciones**

Los productos y procesos desarrollados en la planta de biotecnología agroalimentaria pueden aplicarse a los siguientes sectores.

- Industria agroalimentaria: industrias panaderas y de bollería, industrias lácteas (quesos, yogures), bodegas (vinos, sidras, cavas), encurtidos, elaborados cárnicos, etc.
- Salud y nutrición (microorganismos probióticos)
- Industria farmacéutica y veterinaria (medicamentos microbianos)
- Industria fitosanitaria

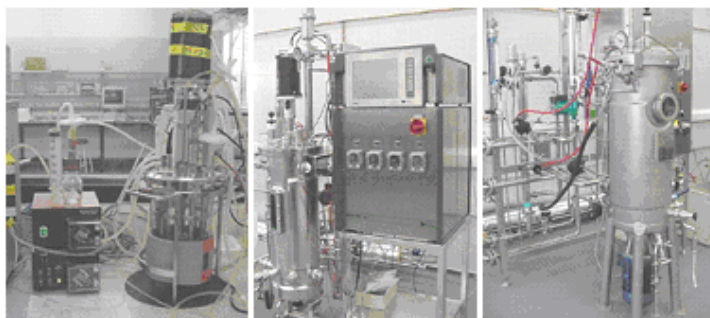


Fig. 15 Tanques fermentadores de 2, 20 y 50 litros.



Fig. 16: Tanque fermentador

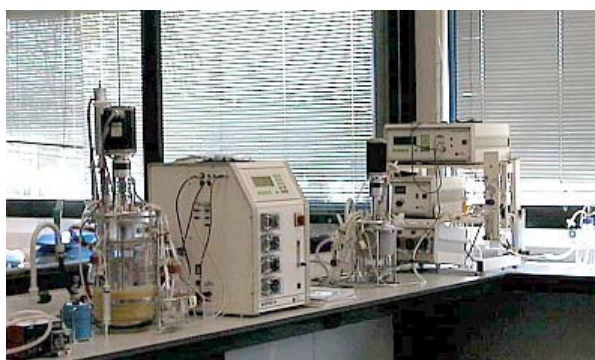


Fig. 17: Tanque fermentador

Fuente: Demain A. and E. Julian, Davis. ASM Press. (1983). Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology.

Fig.  
18:



Fermentador tipo industrial

## 7.4. Extracción y purificación de enzimas

### 7.4.1. Extracción

Para llevar a cabo la extracción tanto intracelular como la extracelular se separa el extracto crudo, se solubiliza en agua y las enzimas se precipitan por la adición de solventes orgánicos, como etanol o acetona, o con sales como sulfato de amonio y sulfato de sodio.

La cromatografía y la cromatografía de electroforesis separan los diversos componentes de la mezcla usando un solvente que se mueve con un medio inmóvil tal como papel de la cromatografía, los componentes se mueven a lo largo del medio y pueden entonces ser aislados individualmente.

La electroforesis alcanza un efecto similar cuando una corriente eléctrica se pasa con un medio apropiado y produce extremos positivos y negativos. Los diversos componentes se mueven con el medio dependiendo de su tamaño y carga. Badui. , (1988)

Los sistemas bifásicos acuosos (ATPS) ofrecen un buen mecanismo para separar las enzimas por la naturaleza de su coste y buen funcionamiento basados en la partición entre dos fases líquidas en varios pasos de la extracción.

Se puede llevar a cabo la recuperación de proteína de las materias de base crudas por la extracción en sistemas bifásicos acuosos y espuma detergente, respectivamente. Las tecnologías de la separación han sido adaptadas a las proteínas individuales del juego utilizando diversas formas de interacciones moleculares y de cambios ambientales de una manera muy simple.

Otra técnica que puede ser utilizada para la extracción de la enzima es la que emplea bióxido de carbono supercrítico en tecnología de la enzima y puede ser utilizado para la purificación de enzimas crudas por medio de la extracción fluida supercrítica (SFE) Usando la contaminación supercrítica del bióxido de carbono de los productos y el ambiente con los solventes tóxicos puede ser evitado y se facilita el producto, solvente, separación. , Oliveira y col., 2002.



## 7.4.2. Purificación

Las células madre primero son interrumpidas por comprobación o por métodos químicos, como el moler o por la adición de álcalis. El resto de la célula es quitada por medio de filtración o por centrifugación. De este modo las enzimas se precipitan de la solución usando sulfato del amonio, que es barato y de toxicidad baja. La purificación adicional puede implicar una variedad de técnicas de la separación tales como cromatografía, filtración y la electroforesis. Hay un tipo de cromatografía de afinidad, llamada *pseudobioespecífica*, en la que, para purificar proteínas, se inmovilizan en la matriz colorante o iones, sustancias que, debido a su estructura, simulan algún compuesto natural al que la proteína se une, pues tiene afinidad por él. Aunque se trata de un procedimiento de menor selectividad, es también mucho más barato.

### 7.4.2.1 Purificación por diálisis

Para llevar a cabo este tipo de purificación a la muestra que contiene el extracto enzimático se introduce en una bolsa o tubo de membrana semipermeable y se cierran los extremos, con el fin de separar las moléculas pequeñas de las grandes en solución, basándose en diferentes velocidades de difusión a través de una membrana. La bolsa que contiene la solución, se sumerge en agua destilada y se mantiene en agitación constante durante veinticuatro horas, durante este tiempo la membrana permite que las moléculas pequeñas se

difundan al agua del exterior, dejando en el interior de la bolsa, las moléculas más grandes. , Bender. , (1990).

## **CAPITULO 8**

### **CONCLUSIONES.**

Las enzimas presentan muchísimas aplicaciones. Con los procedimientos modernos de fabricación de alimentos, benefician tanto a los sectores industriales como a los consumidores. Sus características específicas permiten a los industriales ejercer un control más estricto. Con un menor consumo de energía y unas condiciones de tratamiento más ligeras, su eficacia favorece el entorno. Pueden utilizarse para tratar los desechos biológicos resultantes de la fabricación de alimentos, puesto que las propias enzimas son biodegradables.

Por otra parte las enzimas son catalizadores de origen biológico que cumplen muchos requisitos para impulsar nuevas industrias químicas. La ingeniería genética y la biotecnología permiten el desarrollo cada vez mayor del uso de las enzimas debido a la serie de ventajas que presentan ya sea de índole económico y tecnológico.

Se puede manipular genéticamente, la biosíntesis de enzimas para optimizar los procesos, pero se debe tener en cuenta, las respectivas normas ya

que la producción de enzimas a gran escala requiere de un proceso de purificación y se debe cumplir con lo establecido.

### **LITERATURA CITADA**

1. Armiger, W. B., and A.E. Humphrey. 1979. Computer applications in fermentation technology. In: Peppler and D. Perlman (eds), Microbial technology 2a Edn. Vol. 2. Academic Press, New York, Pp. 375-401.
2. Badui D. S. 1981. Química de los Alimentos, Editorial Alhambra Mexicana S.A. de C.V., Pp. 205-208, 94-104, 284-319.
3. Badui D. S. 1996. Química de los Alimentos, Editorial Alhambra Mexicana S.A. de C.V., Pp. 205-208, 94-104, 284-319.
4. Bauer F.G. 1986. The use of enzymes in food processing. Food Eur., October-November, 21-24.
5. Bauer. A. And B. Kuster. 2003. Affinity purification, mass spectrometry, powerful tools for the characterization of protein complexes. Eur. J. Biochem. Vol. 270. Pp. 570- 578.
6. Bernard A. and F. Mavituna. 1983. Properties of Microorganism, Production, Process Economics, Measurements and Instrumentation. M Stockton Press. Biochemical Engineering and Biotechnology Handbook.

7. Bender, E. 1990. Nutrición y tecnología de los alimentos. Editorial Acribia, Zaragoza España. Pág. 117- 120.
8. Beltrán G, M.G Torrija, M. Novo, N. Ferrer N, M. Poblet, J. M, Guillamon, N. Roses, A. Mas. 2002. Analysis of yeast population during alcoholic fermentation a six years follow- up study, *Systematic and applied Microbiology*, 25: Pp. 287 – 293.
9. Belitz, H. D. And W. Grosch. 1997. Química de los Alimentos 4ª Edición. Editorial Acribia, Zaragoza España.
10. Bhella, R.S. 1987. Biotechnology. Appl. Biochem. Control of alpha- amylase gene expression in *Aspergillus awamori*. 9, 287-93-
11. Berg, L. R. 1997. Introductory Botany, Plants, People and the Environment. Saunders College Publishing.
12. Beckman C. O. 1953. Hydrolysis of Starch. Ann. N.Y Acad. Sci, 57
13. Bhargaran, N. V 1983. Bioquímica. Nueva editorial interamericana. Pág. 86-107.
14. Bio Factsheet. 1999. The Economic Importance of Enzymes, No. 47.
15. Blanco, A. L, J. Juste, S. Garcés, M. Pérez, R. Marcos (1995). Evaluation of impairment in patients with occupational asthma caused by amylase. *Alergy*, 50-172.

16. Blanco C., J. G. Alonso Gil, L. B. Zavala, B. Vallverdu, A. Palacios, R. Juste, M. García, F. Pérez J. Asma por la insensibilización del alfa-amilasa. Rev. Esp. Alergol. Inmunol. Clin. 1997; 12:288-292.
17. Braverman, J.B.S. 1980. Introducción a la Bioquímica de los Alimentos. Editorial Omega. Barcelona, España.
18. Buchner, E. 1897. Alcoholic Fermentation without Yeast Cells. Preliminary. Communication. Berichte des Deutschen Chemischen Yesellschaft. 30. Pp. 117. (As traslate and excepted in Mikulas Teich, A Documentary History of Biochemistry, 1770- 1940. (Rutherford, N. J; Farleigh Dickson University Press, (1992).
19. Camperi, S.A; R. M. Auday, R. A. Hours, M. M. Miranda, A. Navarro del Cañizo y O. Coscone. 1996. Revista Ciencia Hoy 6, 33.
20. Carr, J. G. 1985. Tea, coffee and cocoa, In: B. J. B Wood (ed.) Microbiology of fermented foods, vol. 2, Elsevier. Applied Science, pp. 133- 154.
21. Chefftel J. C y D. Lorient, 1989. Proteínas Alimentarias. Bioquímica, Propiedades Funcionales, Editorial Acribia, S.A., Zaragoza España.
22. Coultate, T.P. 1998. Manual de química y Bioquímica de los alimentos 3a edición. Editorial Acribia, Zaragoza España.
23. Demain, A. and J. E. Davies.1999. ASM Press. Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology.

24. Desrosier, N. 1989. Elementos de Tecnología de Alimentos, 6ª Edición. Editorial Continental.
25. Devlin, T. M. 1992. Biochemistry, 3a Edición. Editorial Wiley pp. 135-138.
26. Delrue, R. M 1987). A review of glucose and fructose syrups. In: A Turner (ed), Food Technology International Europe, Sterling, London, Pp. 171- 174.
27. Esking, N. A., M. Henderson, R. J Townsend, 1990. Biochemistry of Food. London Academia pp. 239.
28. European Journal of Biochemistry. 1986. Vol. 158, 491-495, Copyright © by Federation of European Biochemical Societies.
29. Fellows, P. 1994. Tecnología del procesado de los alimentos. Editorial Acribia, Zaragoza España. Pp. 159-180.
30. Fukuhara, K., Murai, H. And Murcio, S. 1982. Isolation and Structure activity relationship of some amylostatis, (F-1 b) fraction. Produced by *Streptomyces diastaticus* Subb. Spp. Amylostaticus no. 9140; Agric. Biol. Chem., 46, 1941-5.
31. A. García, R. Quintero, M. López M. 1999. Biotecnología Alimentaria, Editorial Limusa, 2ª Reimpresión, Pág. 105-121.

32. P. Gaseosa y J. Hube. 1990. Tecnología de las Enzimas, Editorial Acribia. S.A. Segunda Edición, Zaragoza España, Pp. 3.
33. Goto A., Matsui, Y., Ohyama, K., Arai, M. And N. Muraos. 1983. Purification and characterization of an  $\alpha$ - amylase inhibitor (Halm) Produced by *Streptomyces griseosporus* YM – 25 Agric. Biol. Chem, 47, 83-8.
34. Guebel. V. Daniel. 2000. *Optimization of the citric acid production by Aspergillus niger through a metabolic flux balance* model. Journal of Biotechnology. Universidad Católica de Valparaíso, Chile.
35. Harper, H. A. 1980. Manual de Química Fisiológica. Editorial Manual Moderno, Pág. 93-110.
36. Hoog, G.S and J. Guarro, J. 1995. Atlas of Clinical Fungi. Centralbureau Voor Schimmelcultures, Baarn and Deltt, the Netherlands.
37. Illanes, A. 1994. Biotecnología de Enzimas, Serie de Biología, Monografía no. 35. Secretaria General de la Organización de Desarrollo Científico y Tecnológico. Ediciones de Valparaíso. Universidad Católica de Valparaíso. Chile
38. J. E. Bailey and D. F. Ollis. 1986. Fermentation Industry. Mc. Graw. Hill. Biochemical Engineering Fundamentals.
39. Jay, J. M. 1978. Modern Food Microbiology. D. van Nostrand, New York.

40. J. Ortega, L. H Morales, M. Montes, 1993. Producción Industrial de Enzimas. I. M. P, Biotech. Tech. 7, 775.
41. Kira, R, Enciclopedia de Tecnología Química, 1962. Tomo VI, Primera Edición, Editorial Uteha, España. , Pp. 1006.
42. Kwon-Chung, K.J. and J.E Bennett. 1992. Medical Mycology. Lea and Febiger, Philadelphia and London *Bacillus subtilis*.
43. Lehninger, A. L. 1976. Curso Breve de Bioquímica, Ediciones Omega, Barcelona España Pág. 34-37.
44. Lehninger, A. L. 1995. Bioquímica, Las bases moleculares de la estructura y función celular 2a edición. Ediciones Omega. Barcelona, España. Pp. 189.
45. Lehninger, A. L. 1997. Analysis of the native structure of starch granules with x-ray microfocus diffraction. Waigt. Macromolecules 30:3813-3820.
46. Lekha, P, and Lonsane, B. 1997. Production and Application of tannin acyl hidrolase: State of the art. Adv. Appl. Microbiol 44: 215-260.
47. López A. R, Q. 1987. Tecnología enzimática. Aplicaciones en alimentos y medicina. Universidad Nacional Autónoma de México. Coordinación de Investigación Científica. Programa Universitario de Alimentos. UNAM, México, DF
48. Montes H.C., Magaña I.P. 2002. Enzimas con Aplicación Industrial. Avance y Perspectivas. Vol. 21, Pp. 279-282.



49. Mertz, E. 1978. Bioquímica. Editorial Publicaciones Cultural, Pág. 93-110.
50. Nahas, E; M. Waldemarin. 2002. Control of amylase production and growth characteristic of *Aspergillus Ochraceus*. Revista latinoamericana de Microbiología Vol. 44, No. 1 pp. 5-10.
51. Ortega. Magaña I. 1998. Avance y perspectivas Vol. 2. Departamento de biotecnología y Bioingeniería del CINVESTAV.
52. Owen P. J. Wiley. 1992. Fermentation Biotechnology.
53. Pandey, A. 1992 . Recent Process Developments in solid state fermentation. Process Biochemistry 24: 109-117.
54. Quintero R. R. 1990. Ingeniería, Bioquímica, Teoría y Aplicaciones, Editorial Alhambra Mexicana.
- 55.. Robinsón S. David. 1991. Bioquímica y Valor Nutritivo de los Alimentos, Editorial Acribia, Zaragoza España.
56. Robyt, J.F. 1984. Enzymes in the hydrolysis and synthesis in starch; Chemistry and Technology 2a. edn. (eds. Whistler, R.L Be Miller, J.N. and Paschall, E.F). Academic. Press. London.
57. A. Rogers. 19888. Influencia de las Enzimas en la Conservación del pan. Departamento de Tecnología de Alimentos. Madrid, España.

58. Salinas, A. Yoldjian A. M. 2001. *Comportamiento de la glicina,  $\beta$ -conglucina y  $\alpha$ -amilasa en semillas de soja deterioradas y no deterioradas*. Pesq. Agropec. Bras. Brasilia. Vol. 37, no. 8 Pág. 1175-1181.
59. Sikander Ali, I kram- ul, haq. 2001. *Novel Technique for microbial production of 3,4- Dihydroxi Phenyl L. alanine by mutants strain of Aspergillus oryzae*. Journal of Biotechnology. Vol. 5, No. 2. Universidad Católica de Valparaíso. Chile.
60. Stauffer C. 1994. Utilización de las enzimas en productos de panadería. Boletín Técnico Ed. Gur Ranhotra.; 16: 1-11.
61. Terebiznik, M.R.,V. Zylberman, M. P Buera. 1998. Stabilizing crude and Ultrafiltrated  $\alpha$ -amilasa and  $\alpha$ - glucosidasa from *Aspergillus oryzae* by trehalosa. Biotechnol. Tech. 12 . Pp. 683- 687.
62. Toporek, M. 1984. Bioquímica, 3a Edición, Nueva Editorial Interamericana, SA de C.V. Pp. 254.
63. Thakeshi, T, Yojiro, K. and U. Seinosake. 1983. Amylase inhibitors produced by *Streptomyces sp.* No. 280. Agric. Biol.. Chem., 47, 671-9.
64. Viikari L., M. Ranua, A. Kantelinem, M. Linko, J. Sunquist. 1987. Proc. Of the 3n Int. Conf. Biotechnology in Pulp and Paper Industry ( Estocolmo) Pp. 67.
65. Ward, P.O. 1989. Biotecnología de la Fermentación. Principios, Procesos, Productos. Editorial Acribia. Zaragoza, España.

66. Wong. W. S. Dominic.1989. Química de los Alimentos, Mecanismos y Teoría. Editorial Acribia.
67. Whitaker, J.R. 1983. *Protease and amylase inhibitors in biological materials, in xenobiotic in foods and feeds* (eds). Finley, J.W and Schawass D.E. ACS Symposia 234. American Chemical Society Washington DC.
68. Yokoyama, S., Ogawa, and A. Obayashi, A. 1988. Enzyme Microbiology Technol. 10: 52-55.
69. Yodato P. B., F. Forchiassin, M. B. Segovia del Huergo. *Producción de amilasas por Aurebasidium pullulanasa en medio liquido y sólido*. Revista Argentina de Microbiología, Vol. 29-1997.

