



Enzyme Development Corporation
(212) 736-1580

21 Penn Plaza, New York, NY 10001

E-mail: info@EnzymeDevelopment.com

Enzimas Tradicionales para la Industria Panificadora Proteasas

Presentado en el American Institute of Baking (AIB) de Manhattan, Kansas, el 7 de mayo de 2001 por Peter Moodie, Director de ventas y mercadotecnia de *Enzyme Development Corporation*

El tema que abordaré el día de hoy son las proteasas. Explicaré qué son y qué es lo que hacen, cómo se prueban, se comparan y se usan en diversas aplicaciones.

Primero que nada necesitamos definir qué es una proteasa. Al igual que muchas otras enzimas usadas en la industria alimentaria, las proteasas toman un polímero largo y lo descomponen en unidades más pequeñas. En este caso, las proteasas hidrolizan proteínas y sus productos de descomposición son los péptidos y los aminoácidos. Una proteasa puede ser funcional sobre una proteína en particular sólo si la proteína se encuentra en una forma específica, por ejemplo: una proteasa puede hidrolizar albúmina de huevo en huevo crudo pero ser inactiva sobre albúmina desnaturalizada en un huevo cocido. Lo mismo sucede en los productos cárnicos, de soya y de gluten. La forma física de la proteína es la que determina si la proteasa será funcional. En comparación es como intentar cortar una bola de estambre con un cortaúñas: a menos que la bola de estambre esté completamente desenrollada, se vuelve casi imposible hacer un corte significativo a lo largo de ella, sin embargo, si se desenreda el estambre, el cortaúñas cortará fácilmente en cualquier parte.

Existen dos tipos básicos de acción enzimática sobre las proteínas: la endo y la exo. La acción endo es definida como un corte al azar del polímero en cualquier sitio de la cadena. Esta acción contribuye en gran parte a la relajación de la masa, a la prevención de la disminución del volumen y a un mayor rendimiento del proceso.

La producción de productos de panificación son realmente la razón para el uso de proteasas. Es posible elaborar cualquier producto de panificación sin usarlas, ya que todo lo que se requiere es mezclar y mezclar, sin embargo las proteasas son ingredientes que se utilizan en pequeñas cantidades y baratas que pueden tener un impacto significativo en las ganancias. Por ejemplo: considere que usted tiene una panadería optimizada para usar dos batidoras de masa terminada que pueden procesar una carga cada diez minutos, es decir, seis cargas por hora. Si se usan durante 18 horas tendrá 108 cargas al día. Pero la

harina no es idéntica siempre. En este caso pensemos que una o dos de las cargas son muy pesadas. El tiempo de mezclado tendría que aumentarse para compensar la diferencia en la harina. Ahora sólo podría hacer una carga de masa cada 12 minutos en lugar de una cada 10. En lugar de 108, ahora sólo produciría 90 cargas en las mismas 18 horas, lo que representaría casi un 20% de pérdida en la productividad. Es decir, para hacer la misma cantidad de pan tendría que pagar a sus empleados 3.6 horas extra y sus hornos tendrían que encenderse 3.6 horas más, lo cual sería una consecuencia bastante cara. Sin embargo, el problema se resolvería fácilmente con la adición de unas cuantas tabletas o paquetes de proteasa a cada carga de masa. El gasto adicional de unos cuantos dólares por hora en proteasa se justifica cuando se compara con la alternativa de las pérdidas en la producción.

El otro tipo de acción asociada con estas enzimas es la acción Exo. Ésta se define como el corte específico en un grupo terminal del polímero. En el caso de las proteínas cortas, en un aminoácido, en un dipéptido o en un tripéptido. La aplicación más común es “desamargar” el producto hidrolizado de una proteína, tal como la leucina. Pero los aminoácidos libres también contribuyen a la reacción de oscurecimiento y al sabor del pan.

En la siguiente sección hablaré sobre las fuentes de las proteasas y cómo se analizan generalmente.

Las proteasas más utilizadas en la historia han sido las derivadas de plantas y animales. Las proteasas animales son la pancreatina, la tripsina y la quimotripsina que raramente son usadas en la industria panificadora, tanto debido a su costo como a la presencia de actividades secundarias. La pancreatina, por ejemplo, contiene proteasa, lipasa y amilasa. La lipasa puede causar cambios significativos de sabor debido a que produce ácidos grasos libres y sabores rancios o jabonosos. Incluso si un productor de pan les encontrase un uso existiría un problema: estas enzimas se derivan de fuentes bovinas y porcinas, por lo tanto no podrían ser certificadas como *kosher*. Aún más: cualquier producto terminado en el cual se use pancreatina nunca podrá ser *kosher*. Por otra parte, si usted tiene una industria *kosher*, las labores de limpieza se volverán muy intensas.

Las proteasas vegetales son la papaína, la bromelina y la ficina. De las tres, la bromelina es la de mayor uso en la industria panificadora. Desde hace 30 años ha estado disponible y ha tendido a reemplazar a la papaína en esta industria debido a que tiene los mismos efectos pero es más rápida. Con base en su actividad por unidad de enzima, la bromelina es comúnmente un poco más cara que la papaína pero la diferencia es insignificante comparada con el aumento en la velocidad de la reacción. La ficina no ha sido usada debido a su alto costo y su disponibilidad intermitente. Otra ventaja de las proteasas vegetales es que no poseen actividades secundarias tales como la de amilasa. Sin embargo esta ventaja tiende a desaparecer con el desarrollo de las técnicas de edición genética que han permitido la síntesis de proteasas microbianas que están esencialmente libres de otras actividades.

Cuando se compran proteasas vegetales se puede notar que las actividades son frecuentemente mencionadas como MCU, CDU, BTU, TU, y GDU. Los parámetros de análisis son definidos en la presentación y los sustratos típicos usados son el NFDm, la hemoglobina y la caseína.

Las fuentes más comunes de proteasas fúngicas son el *Aspergillus oryzae* y el *Aspergillus niger* y estos también tienen una larga historia de uso. Como dato interesante, podemos decir que estas proteasas fueron de uso comercial desde antes de 1958 y son parte de la solicitud hecha en 1972 para incluir a las enzimas en la lista de productos GRAS. Existen patentes sobre estas proteasas que datan ya de los años treinta, cuarenta y cincuenta.

Como clase, estas enzimas son típicamente usadas en aplicaciones de pH neutro y ácido. Comparadas con otras proteasas, éstas son de acción relativamente lenta en el gluten y han tenido actividades secundarias significativas tales como la de la amilasa o la de la pentosanasa. En el caso de tres proteasas provenientes de cepas distintas del *A. oryzae*, se analizaron en su actividad de amilasa ajustándolas para tener la misma actividad HUT por gramo; de ellas la enzima número 1 tuvo la mayor actividad y la número 3 estuvo por debajo del límite de detección. El método HU(T) es el más común para el análisis de proteasas fúngicas utilizadas en la industria panificadora y el sustrato que se usa es la hemoglobina. Lo común es encontrar tabletas o paquetes con una actividad definida como de tantas unidades HUT por tableta. Por ejemplo: una tableta puede contener 50,000 unidades HUT y una o dos tabletas puede ser la dosis sugerida. Como punto de referencia, la materia prima usada para producir esa tableta fue de 500,000 + HUT/g. En este caso la tableta es el mejor método para dosificarla, pues si el panadero no dispusiera de ellas tendría que pesar de 0.1 a 0.2 gramos de enzima concentrada.

Otras fuentes comunes de proteasas microbianas son el *Bacillus subtilis* y el *B. licheniformis* que se usan en aplicaciones neutras y ligeramente alcalinas. Son más rápidas que las proteasas fúngicas, pero un poco más fáciles de controlar que la bromelina o la L-cisteína. Pueden o no tener cantidades significativas de amilasa y la actividad de pentosanasa es muy rara. Históricamente los métodos de análisis más comunes son el Anson, el de Unidad Delft (DU), –hay que tener cuidado de no confundirse, porque ésta es también la notación para el método de degradación de almidón, la Unidad Dextrinizante–, la Unidad Northrup y la proteasa neutra, también conocida como el método PC. Los sustratos usados son la hemoglobina y la caseína.

El problema más grande para el panadero es la dificultad para comparar el desempeño de las proteasas sobre el gluten debido a que ninguno de esos métodos mide la actividad sobre este sustrato. Es decir, ninguno es representativo de las condiciones reales de amasado. La mejor forma de compararlas es en la panadería o en el laboratorio usando algún tipo de dispositivo para medir la cantidad de energía usada para que la masa alcance su desarrollo óptimo. Un ejemplo podría ser un farinógrafo en el laboratorio o un mixotrón conectado directamente a la batidora. Para el panadero debe existir una solución práctica en la planta y debe ser fácil de usar por todo el personal. En una planta de producción la mejor solución es tener un mixotrón conectado a la batidora para tener evidencia visual del desarrollo de la masa. Gracias al mixotrón es posible determinar el

punto máximo de desarrollo de la masa en una grafica y saber exactamente cuándo está lista.

Un método diferente basado en la química húmeda se desarrolló en Holanda por TNO y fue presentado en la convención AACC hace cinco o seis años. La innovación consistía en usar el gluten como sustrato. En aquel momento los detalles que se dieron a conocer fueron un tanto limitados porque estaban (y parecen estar aún) en proceso de vender la técnica para comparar diferentes proteasas, por lo que no identificaron las proteasas fúngicas específicas evaluadas. Sólo afirmaron que todas provenían de diferentes organismos productores. Tomando los datos generados por ellos y asumiendo una relación lineal entre las diversas relaciones, les presenté nueve proteasas igualadas en su actividad con base en la hemoglobina. Cada una de ellas ha sido establecida como poseedora de un factor de 100. TNO nos reportó las velocidades de reacción de glutenina, gliadina y caseína de cada una de estas nueve proteasas fúngicas.

La glutenina puede ser clasificada como una mezcla heterogénea de proteínas. Tiene un peso molecular de 100,000 a varios millones. Es una proteína de cadenas múltiples con puentes disulfuro interconectados. Tiene una adhesividad moderada y una gran elasticidad. Como puede apreciarse (diapositiva 16), las proteasas 8 y 9 tienen las velocidades de reacción más altas, en tanto que la proteasa 5 no muestra actividad apreciable.

La gliadina es considerada como una mezcla heterogénea de prolaminas con un peso molecular que van desde 25 a 60,000. Es una cadena sencilla de proteínas que contiene puentes disulfuro intermoleculares. Tiene una gran adhesividad y una baja elasticidad. En este caso las proteasas 8 y 9 tienen baja actividad, mientras que la proteasa 1 tiene una actividad alta. De nuevo la número 5 no muestra actividad aparente.

Finalmente TNO probó las mismas nueve proteasas en caseína, la proteína de la leche. Es interesante notar que la proteasa número 5 sólo parece funcionar en la hemoglobina y nada más. Las proteasas número 1 y número 6 tuvieron las actividades más altas. Basándose en este trabajo, una mezcla de número 1 y número 8 o número 9 sería una mezcla efectiva para hidrolizar gluten.

La decisión acerca de cuál enzima usar en la elaboración de un producto horneado dependerá de la velocidad y la habilidad para controlar la velocidad de reacción. Muchas veces la opción se hace con base en la práctica y la experiencia. Pueden existir muchas otras enzimas que funcionen igual de bien o mejor, pero hacer cambios puede ser costoso tanto en mano de obra como en materia prima. Además no es de esperarse que haya grandes ahorros. Las proteasas son una clase de enzimas que tienden a ser baratas en relación con otras enzimas.

A medida que avance en esta presentación hablaré brevemente de diversas aplicaciones, tales como panes, galletas saladas, galletas dulces, tortillas, pizzas y otros productos.

En los panes, el sistema tradicional de masa fermentada o “masa de esponja” (*sponge dough*) puede dar mejores resultados cuando se le añade la proteasa a la “esponja”. Una dosis típica es de 50,000 HUT. Si la filosofía de la panadería es la de obtener una “esponja” simple, entonces la dosis para reducir el tiempo de mezclado de la masa puede ser de 250,000 HUT. En una masa sencilla las proteasas generalmente se usan para mejorar las propiedades de manejo y, más que para reducir el tiempo de mezclado, para producir una masa de mejores características. En el caso de las masas rápidas, mejoran la retención de gas. En sistemas continuos y masas extruidas, las proteasas facilitan el manejo haciendo que la masa se rompa menos en las máquinas. La dosis dependerá de la cantidad de tiempo y de si es un sistema con o sin harina. Hasta donde sé, el pan de mezclado continuo es el único pan en cuyo método de producción se usa bromelina. Los otros métodos usan proteasas fúngicas.

En cuanto a las galletas saladas, se producen de dos tipos: las galletas de soda fermentada y las que se hacen con levadura química. Las galletas de soda generalmente usan una proteasa bacteriana neutra o ligeramente alcalina. Este tipo de galletas tiene un tiempo de fermentación de 10 a 20 horas. Después de este tiempo, la “esponja” se saca y se añade el harina al mismo tiempo que el resto de los ingredientes. Típicamente se añade la proteasa en esta etapa. La dosis adecuada está en un rango de 200 a 400 unidades Northrup por peso o 150,000 PC. Así la proteasa tiene suficiente tiempo para curarse en la harina mientras la masa reposa hasta por cuatro horas antes de ser procesada. La proteasa permite entonces un trabajo más fácil de la masa para formar láminas delgadas sin que se encoja o se arrugue en la banda del horno. Por su parte, las galletas con levadura química se hacen generalmente con masas rápidas por lo que, si se usa una proteasa, debe ser agresiva con el gluten. En este caso la bromelina en dosis de 100 a 200 BTU por peso es comúnmente el producto preferido. Con base en una actividad igual, la bromelina es mucho más agresiva que la papaína. Aunque las galletas pueden hacerse con proteasas, hasta donde sé su uso no es muy común. Las enzimas pueden usarse si se tiene que trabajar forzosamente con harinas de trigo duros y generalmente usa harina de trigo blando. En este caso se han usado proteasas bacterianas, bromelina y papaína. Al respecto hay un artículo interesante que fue publicado en 1989 por Gaines y Finney en *Cereal Chemistry*, Vol. 66, No. 2. En él se evaluaron un buen número de diferentes proteasas y se encontró que la papaína producía una masa más extensible.

Una proteasa puede ser usada para producir tortillas o pizzas. El producto más adecuado es generalmente la bromelina, sin embargo, debido a los cortos tiempos del proceso, es más común usar L-cisteína o metabisulfito de sodio.

La producción de masa de maíz es una nueva oportunidad para el uso de proteasas. El método tradicional de producción consiste en añadir de 2 a 3% de cal (KOH) al maíz y dejarlo cocer en agua caliente de 12 a 24 horas. El propósito de este paso es suavizar el maíz y permitir una separación fácil de la cáscara externa. Luego el maíz es drenado, enjuagado y molido. Entonces la masa puede usarse para hacer tortillas o frituras de maíz. EDC ha hecho diversas pruebas que indican que los tiempos de proceso podrían reducirse de 3 a 4 horas. Por ejemplo: en lugar de añadir una cantidad fija de cal, el pH se ajustó a un rango de 9–10. La enzima se añadió en ese momento y la temperatura se mantuvo a un

máximo de 160° F. Resultó que el maíz estuvo listo para ser molido en 3 horas menos de lo normal. También fue interesante notar que el maíz resultó blanco en lugar de amarillo. Para obtener el color amarillo tuvo que añadirse más cal.

Existen otras tecnologías que pueden usarse para obtener resultados similares al uso de proteasas como, por ejemplo, la L-cisteína, la glutatona de levadura inactiva y el metabisulfito de sodio. Estos métodos tienden a usarse cuando se necesita una descomposición muy rápida pero la reacción se detiene. Desafortunadamente, cuando se añade una proteasa ésta continuará funcionando hasta que el sustrato, gluten en este caso, se agote. Si los hornos disminuyen la temperatura por periodos largos de tiempo, una masa tratada con enzimas puede resultar un fracaso, sin embargo los otros compuestos pueden producir una masa que sea recuperable.

En el área de aplicaciones futuras, quizá haya una mayor investigación acerca de cuál es “el sabor del pan”. ¿Pueden las proteasas o las levaduras modificar su sabor? Sabemos que las proteasas son usadas como potenciadores de sabor en otras industrias. El ejemplo mejor conocido es el queso modificado con enzimas, en el cual proteasas selectivas y lipasas pueden acelerar la producción de sabor. El queso *Cheddar*, por ejemplo, puede tomar hasta un año para añejarse. Bajo condiciones adecuadas, las enzimas pueden lograr este proceso de añejamiento en uno o dos meses o tal vez menos. Las proteasas juegan una parte importante en el desarrollo del sabor. Generalmente son las actividades de aminopeptidasa y carboxipeptidasa los factores más importantes. Sin embargo, la relación puede variar dramáticamente entre diversas preparaciones enzimáticas. Por ejemplo:

Enzima	Concentración de Proteasa	Proteasa 400	Proteasa 100	Exo-Proteasa
GTG-asa	3	30	100	N/A
LAP-asa	5	30	100	100

En resumen, las proteasas siguen siendo una herramienta importante y de bajo costo para mejorar la producción y la calidad del producto.

© Utilizado por *Enzyme Development Corporation* con permiso del *American Institute of Baking*.



Enzyme Development Corporation

(212) 736-1580 21 Penn Plaza, New York, NY 10001

E-mail: info@EnzymeDevelopment.com

Enzimas Tradicionales para Hornear - Proteasas Presentada en the American Institute of Baking

7 de mayo 2001

Peter Moodie, Enzyme Development Corporation

Definición

Hidroliza/degrada proteínas y sus productos de descomposición en compuestos más simples tales como péptidos y aminoácidos.

Acción Endo

- Interna y completamente al azar
- Contribuye a la relajación de la masa
- Previene el “encogimiento”
- Acelera el proceso de horneado
- Mayor volumen/Retención de gas

Valor de la Acción Endo

- 2 batidoras,
- 1 masa cada 10 minutos, 18 horas
108 masas en 18 horas de trabajo

Nueva Harina, Mayor Proteína

- Añade 2 minutos por masa
90 masas en 18 horas
- *Necesita 3.6 horas más para producir 108 masas*

Acción Exo

- Específica para el grupo terminal
- Produce aminoácidos libres
- Contribuye a las reacciones de oscurecimiento
- Puede reducir los péptidos amargos y mejorar el sabor

Fuentes animales

- Pancreatina
- Contiene amilasa, proteasa y lipasa

- Raramente usada
- Cara
- No es kosher
- Problemas con sus actividades secundarias

Fuentes vegetales

- Papaína, bromelina, ficina
Larga historia de uso
Velocidad de reacción rápida
Valores óptimos de pH y temperatura amplios
No tiene actividad adicional de amilasa o pentosanasa
- Harina de cebada malteada
Amilasa, actividad secundaria de proteasa

Métodos comunes de análisis de proteasas vegetales

- Unidad de coagulación de leche MCU/mg
NFDM: pH 6.0, 40° C, 3 a 4 minutos
- Unidad de Digestión de Caseína CDU/mg
Caseína: pH 7, 37° C, 1 minuto
- Unidad de Tirosina TU/mg
Caseína: pH 6.0, 40° C, 60 minutos
- Unidad de Bromelina Tirosina BTU/g
Hemoglobina: pH 5.0, 30° C 30 min.; 23 C 30 min.
- Unidad de Digestión de Gelatina GDU/g
Gelatina: pH 4.5, 45° C, 20 minutos

Fuentes Microbiana y Fúngica

- *Aspergillus oryzae /Aspergillus niger*
 Aplicaciones con pH de neutro a ácido
 Acción relativamente lenta
 Puede tener una actividad de amilasa secundaria
 Puede tener una actividad secundaria de pentosanasa significativa

Comparación de HUT vs. SKB

- Proteasa 1,
 100,000 HUT/g, 5,000 SKB/g
- Proteasa 2,
 100,000 HUT/g, 400 SKB/g
- Proteasa 3,
 100,000 HUT/g, >10 SKB/g

Comparación de HUT vs. LAP

- Todas a 100,000 HUT, *A. oryzae*
 Proteasa 1 < 50 LAP/g
 Proteasa 2 ~125 LAP/g
 Proteasa 3 > 300 LAP/g

HU(T)

- Método de análisis de proteasas fúngicas más común
- Sustrato: hemoglobina
- 30 minutos, pH 4.7, 40° C

Fuentes Microbiana y Bacteriana

- *Bacillus subtilis, licheniformis*
 - Aplicaciones de pH neutro o alcalino
 - Más rápida que las fúngicas
 - Más lenta que la bromelina o L-cisteína
 - Pueden tener amilasa
 - Es poco probable que tengan pentosanasas

Métodos de análisis comunes para proteasa bacteriana

- Anson, A/g
 - Hemoglobina: pH 7.5, 25° C, 10 min.
- Delft DU/g
 - Caseína: pH 8.5, 40° C, 40 min.
- Northrup NU/g
 - Caseína: pH 7.4, 40° C, 35 min.
- Proteasa neutra PC/g
 - Caseína: pH 7.0, 37° C, 60 min.

Problema del Método de Análisis para el Horneado

- Ninguno usa gluten o harina
- Ninguno refleja las condiciones reales de la masa

Solución Práctica

- Debe ser fácil de usar en la planta de producción
- Debe ser fácil de usar por todo el personal
- Un mixitrón en cada batidora para optimizar el tiempo y los niveles de uso de proteasa

Acción de la Proteasa en el Gluten

- Del reporte de TNO
Modificación enzimática del gluten de trigo
Weegels, Jager, Voorpostel, Harte, Hamer
Presentación en la AACC
Modificada para reflejar 100 unidades en hemoglobina

Reacción de Proteasa en Hemoglobina

Reacción de Proteasa en Glutenina

Reacción de Proteasa en Gliadina

Reacción de Proteasa en Caseína

Velocidades Relativas de Reacción Relativas

- Regla Empírica
Las proteasas fúngicas más lentas
La velocidad moderada de las proteasas bacterianas
La más rápida bromelina
La bromelina no es tan rápida como la L-cisteína

Uso General en Horneado

- Panes
- Galletas saladas
- Galletas
- Tortillas/ pizzas
- Otros ingredientes

Panes

- Masa fermentada o “de esponja”
- Masa sencilla
- Masa rápida
- Mezcla continua

Galletas Saladas

- Levantadas con levadura
- Levantadas químicamente

Galletas

- Las proteasas pueden mejorar el extendido de la masa

Tortillas y Pizzas

- Uso limitado en tortillas de harina
Tiempo de proceso corto
- Previene el encogimiento en la masa de pizza
Compete con el bisulfato y la L-cisteína

Producción de Masa de Maíz

- Posible uso de proteasa alcalina
Reduce el tiempo de remojo
Reduce la cantidad de cal
Más fácil de producir; masa blanca en vez de amarilla
Patentada por la Universidad de Nebraska

Otras Tecnologías

- L-cisteína
- Glutamina
- Metabisulfito de sodio

Aplicaciones Futuras

- ¿Cuál es el sabor del pan?
¿Pueden las proteasas aumentarlo o modificarlo?

Actividad de Peptidasa en Preparaciones Comerciales

- Concentrado de proteasa
GTG-asa 3, LAP-asa 5
- Proteasa 400
GTG-asa 30, LAP-asa 30
- Proteasa 100
GTG-asa 100, LAP-asa 100
- Exo-Proteasa
GTG-asa NA, LAP-asa 100