

Aspectos relevantes del uso de enzimas en la industria de los alimentos

Sandra del Moral, Laura P. Ramírez-Coutiño, María de Jesús García-Gómez

Instituto de Biotecnología
Universidad del Papaloapan
Tuxtepec, Oax.; México
[smoral, lpramirez, mjgarcia]@unpa.edu.mx

Abstract— Enzymes are a key tool in food industry. Their relevance falls not only on the profits associated with their use or production, but also in improvement of manufacturing process and sensory properties of foods. Therefore, new application areas are arising as biosensors design and active food packaging, where the oxidizing-reducing enzymes are involved in quality assurance and shelf life of products. Given their demand, more fast and sensitive strategies as DNA recombinant, metagenomic and protein engineering, are needed to find enzymes with best properties. Investment in this field, could boost the economy of emergent countries.

Keyword— *enzymes, foods, biosensors, active food packing, regulation.*

Resumen—Las enzimas son una herramienta clave en la industria alimentaria. Su importancia no solo radica en las ganancias que se obtienen de su uso o producción, sino que mejoran los procesos de fabricación y las propiedades sensoriales de los alimentos. Dando lugar a nuevas áreas de aplicación, como diseño de biosensores y envases activos en donde enzimas de tipo oxido-reductasas garantizan la calidad y vida de anaquel de los productos. Dada la demanda, se han requerido de estrategias más rápidas y sensibles, como el uso de la tecnología del ácido desoxirribonucleico recombinante, metagenómica e ingeniería de proteínas para encontrar enzimas con mejores propiedades. La inversión en este campo podría detonar la economía de países emergentes.

Palabras claves— *enzimas, alimentos, biosensores, empaques bioactivos, regulación.*

I. INTRODUCCIÓN

Las enzimas son ubicuas en todos los seres vivos porque son moléculas esenciales para su funcionamiento. Una de las características más sobresalientes de las enzimas es su elevada especificidad por lo que tienen una amplia aplicación en diversos sectores industriales.

El uso de las enzimas para la producción de alimentos data del año 2000 A.C., en productos fermentados como cerveza, vino, pan y queso, aunque fue hasta finales del siglo XIX que se acuñó el término enzima. En los años 80's del siglo XX se incorporaron por primera vez a nivel industrial preparaciones enzimáticas comerciales para incrementar el contenido nutritivo y la digestibilidad de alimento para ganado. En la década de los 90's se produjeron y aprobó el uso de enzimas recombinantes para queso (EUA) y pan (Reino Unido).

Actualmente, las enzimas se consideran como aditivos en la industria de los alimentos que pueden modificar la apariencia, textura, valor nutricional, generar aromas y sabores, además de disminuir el tiempo de proceso. Su utilización se ha extendido a otras aplicaciones relacionadas con la industria alimentaria como el desarrollo de envases activos y biosensores.

El objetivo de esta revisión es dar a conocer de manera general el impacto económico y las fuentes de obtención; así como las principales aplicaciones, las innovaciones y la regulación de las enzimas en la industria alimentaria.

II. IMPACTO ECONÓMICO

La producción de enzimas a nivel mundial (fig. 1) está a cargo de 18 compañías distribuidas en Europa, Asia y América, dominando casi el 75% de las ventas globales Novo Nordisk (Dinamarca) y DuPont (USA) con sus filiales Danisco-Genencor (USA). Con una participación menor pero importante se encuentran las compañías alemanas BASF y Henkel, la holandesa DSM, así como las japonesas Amano y Ajinomoto. En el 2013 se calculó que el mercado global de las enzimas era alrededor de 4.5 billones de dólares y se espera para el 2020 un incremento a un ritmo del 8.3%, alcanzando valores mayores a 7.5 billones de dólares [1], [2]. En América Latina existen empresas productoras de enzimas, sin embargo muchas de ellas son subsidiarias de empresas transnacionales [3]. En México, Enmex, figura dentro de las principales compañías productoras de enzimas a nivel mundial [4].

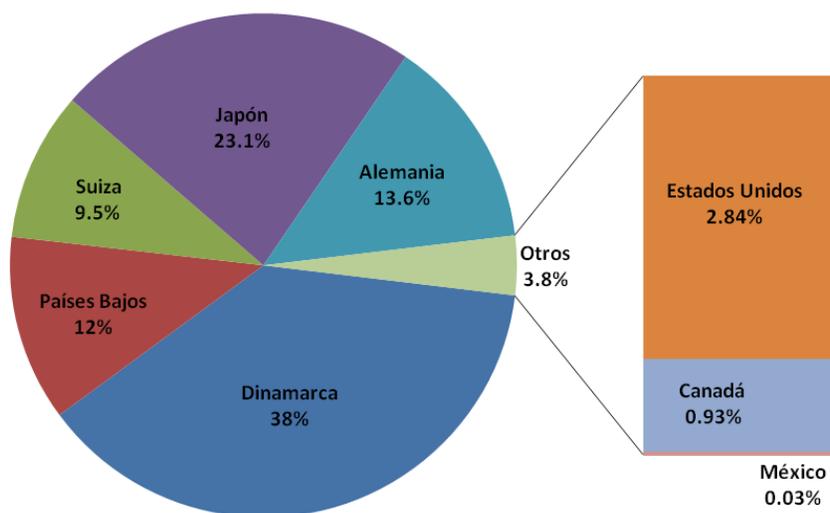


Fig. 1. Principales países productores de enzimas

La venta mundial de enzimas se ha incrementado de manera constante desde hace varios años (fig. 2) en función de las necesidades específicas de cada continente o región [5]. La distribución del mercado está repartido en diversos sectores, entre los que se encuentran productos de limpieza (37 %), alimentos y bebidas (31 %), bioenergéticos (17 %), alimentos para ganado (15 %). Las regiones en las que se comercializan las enzimas son Norteamérica (35 %), Europa (36%), Asia (19%) y Latinoamérica (10%) [6]. En Europa y Norteamérica se consumen enzimas para el sector de bicomcombustibles y de detergentes; mientras que en América Latina y China, en el sector alimentario [4]. En China e India, se producen enzimas para autoconsumo y se estima que en pocos años se sumen a los principales productores mundiales. Por esta razón, empresarios, en conjunto con los gobiernos de países con economías emergentes, incluyendo México, deberían implementar estrategias para satisfacer al menos la autodemanda de enzimas, en varios sectores productivos.

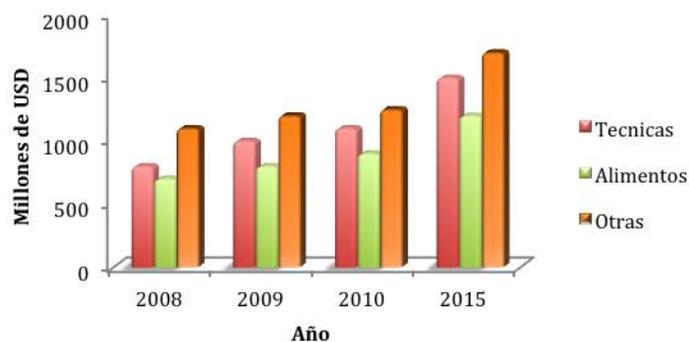


Fig. 2. Ganancias en el mercado enzimático del 2008-2015 (BCC Research)

III. OBTENCION DE ENZIMAS

Las enzimas pueden obtenerse a partir de tejidos animales, tejidos vegetales o mediante procesos de fermentación utilizando microorganismos seleccionados. El uso de enzimas a nivel industrial se ve limitado por la disponibilidad-costo, es por ello que los microorganismos como fuente de enzimas versus plantas y animales ofrecen importantes ventajas como: espacios de producción reducidos, no son estacionales, poseen un rápido crecimiento sobre medios de cultivo económicos, la mayoría de las enzimas son secretadas al medio de cultivo lo que facilita su recuperación. Además, las enzimas microbianas son más estables y su producción es más conveniente y segura [7]. Por esta razón, 50% de las enzimas son producidas por hongos y levaduras, 35% por bacterias, y 15% por plantas y animales [8]. La mayoría de las enzimas hidrolíticas extracelulares, utilizadas en alimentos, son producidas por organismos pertenecientes a los géneros *Bacillus* y *Aspergillus* [9], [10], [11].

Por otro lado, la tecnología del ADN recombinante mediante diversas técnicas ha permitido la expresión de enzimas vegetales, animales y microbianas en microorganismos huéspedes de alta producción como *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus niger* entre otros [11], resolviendo la disponibilidad y la obtención de enzimas mejoradas con características diversas [11], [12].

A. Obtención de enzimas a partir de fuentes no-cultivables: metagenómica.

La mayor parte de las enzimas con aplicación industrial en alimentos proviene de fuentes microbianas cultivables, sin embargo se estima que solo se conoce entre el 0.001-15% de la microbiota de una muestra [13], [14]. Para explicar ese fenómeno se ha argumentado que se desconocen los requerimientos nutricionales y las condiciones fisicoquímicas necesarias para el desarrollo de gran número de grupos microbianos [15]. Como alternativa a este problema ha surgido la metagenómica, con la que se accede al material genómico representativo de una comunidad microbiológica sin necesidad de cultivar a los microorganismos [16].

El uso de la metagenómica como herramienta novedosa en la búsqueda de nuevas enzimas está ampliamente reportado [17], [18], [19], [20], [21], [22]. De hecho, en estudios metagenómicos pioneros realizados en el Mar de los Sargazos se identificaron 1.2 millones de genes que codifican para enzimas con diversas categorías funcionales [23]. Se han encontrado genes, no reportados, que codifican para esterases, celulasas, ciclodextrinasas, lipasas, amilasa, glucosidasas, entre otras, de ambientes muy diversos (heces fecales porcinas, suelos, heces fecales humanas, etc.) con parámetros de operación novedosos [24], [25], [26]. Hoy en día, se han comenzado a explorar ambientes extremos: zonas geotérmicas, ambientes hipersalinos y zonas polares con el fin de encontrar enzimas con actividades a la

temperatura y el pH de estos sitios [27]. Incluso análisis metagenómicos del intestino humano han revelado una gran diversidad de enzimas, sobre todo aquellas relacionadas con la hidrólisis de carbohidratos [28], [29].

Aunque actualmente no se han empezado a utilizar de manera industrial enzimas aisladas de metagenomas en alimentos, es posible que su inserción se haga a corto plazo. Mientras tanto, la metagenómica brinda la oportunidad de aislar nuevas enzimas con mejores propiedades catalíticas de cualquier fuente ambiental, que serán de gran valor en la industria.

IV. APLICACIONES

En la industria de los alimentos se utilizan más de 59 enzimas diferentes de acuerdo a la Asociación de Manufactureros y Formuladores de productos enzimáticos (AMFEP, por sus siglas en inglés) [30], se prevé que esta cantidad se incremente en función del aislamiento de nuevas enzimas. A continuación se describen el uso y aplicación de las enzimas en los sectores más importantes de la industria de los alimentos y en la tabla I se adiciona información de otras enzimas que se emplean en este sector.

A. Industria del almidón y del azúcar

A partir del almidón se pueden obtener jarabes de diferente composición y propiedades físicas. Los jarabes se utilizan en una variedad de alimentos tales como gaseosas, dulces, productos horneados, helados, salsas, alimentos para bebés, frutas enlatadas, conservas, etc. [31]. Para la producción de jarabes de glucosa y maltosa hay tres etapas básicas en la conversión enzimática del almidón que son gelatinización, licuefacción y sacarificación. En la primera etapa, se utiliza α -amilasa (E.C. 3.2.1.1) termoestable debido a que la temperatura de la reacción se efectúa a 105 °C. En la etapa de sacarificación para la producción de jarabe de glucosa se utilizan glucoamilasas (hidrolizan enlaces α -(1-4) y en menor proporción enlaces α -(1-6)) y pululanasas (E.C. 3.2.1.41) a 60 °C en condiciones ácidas (pH 4.5); mientras que para el jarabe de maltosa se utiliza α -amilasa fúngica a 55 °C en condiciones ácidas (pH 5.5). El jarabe de glucosa puede ser convertido en una mezcla de glucosa y fructosa por la glucosa isomerasa (E.C. 5.3.1.18) [32].

La maltosa puede ser convertida en isomaltooligosacáridos (IMO) utilizando una α -glucosidasa específica (E.C. 3.2.1.3). Para obtener IMO con alto grado pureza se utilizan glucansacarasas (E.C. 2.1.4.5). Las glucansacarasas hidrolizan la sacarosa y transfieren moléculas de glucosa a moléculasceptoras como los IMO, mediante enlaces glucosídicos α -(1-6). Otro método de producción es mediante el uso de la amilasa maltogénica de *Bacillus stearothermophilus* en combinación con la α -glucanotransferasa (E.C.2.4.1.18) de *Thermotoga maritima* que permite obtener hasta un 68% de IMO [33]. Los IMO que están disponibles comercialmente en China y Japón son vendidos como prebióticos [12].

Otro tipo de enzimas relacionadas con la hidrólisis del almidón soluble, que contiene enlaces α -(1-4), son dos tipos de glucanotransferasas: la amilomaltasa (E.C. 2.4.1.25) y las enzimas desramificantes de glicógeno/almidón (α -(1-6)), que son los puntos de ramificación. Los productos de estas enzimas comercialmente disponibles se utilizan como ingredientes en la industria de los alimentos [12].

Por otro lado, las ciclodextrinas, consideradas como fibra dietética no digestible totalmente fermentable, son producidas por licuefacción del almidón y adición de la enzima ciclodextrin glucosiltransferasa (E.C. 2.4.1.19). También derivados del almidón se producen por los gelificantes termoreversibles, que se han utilizado como sustitutos de grasa en productos lácteos, mediante amilomaltasas o 4- α -glucanotransferasas (E.C. 2.4.1.25) [34].

Utilizando glucanotransferasas y almidón de maíz se pueden obtener dextrinas ramificadas que se han adicionado a bebidas para deportistas, algunas investigaciones han demostrado que su uso en este tipo de productos tiene una influencia positiva en el tiempo de vaciamiento gástrico [12], [35], [36].

Estas son algunas de las muchas aplicaciones de las enzimas en este sector, en el que se requieren enzimas termoestables y con alta actividad a temperaturas mayores a 50°C. En ese sentido, las enzimas más usadas provienen de especies como *Bacillus subtilis*, *B. stercorarius*, *B. amyloliquefaciens* [37], [38], [39].

B. Productos Lácteos

La fabricación de productos lácteos en los que participan enzimas es muy amplia e incluye quesos blandos y duros, leches fermentadas (yogurt, leche ácida, kéfir), leche deslactosada, etc.

Para la producción de quesos la principal enzima que se ha utilizado desde hace siglos es la quimosina (E.C.3.4.23.4), que es un enzima proteolítica que se obtiene tradicionalmente del abomaso (cuarto estómago) de terneros jóvenes. Se encuentra, como enzima digestiva, mezclada con pepsina (E.C. 3.4.23.1), siendo la proporción de quimosina y la calidad del cuajo, mayor cuanto más joven es el animal. También se encuentra en otras especies animales, como el cerdo. Los problemas de suministro de cuajo animal y la expansión de la industria del queso a partir de 1940 forzaron la búsqueda de enzimas alternativas al cuajo animal. En la fabricación de quesos industriales se utilizan habitualmente proteinasas obtenidas de microorganismos en lugar del cuajo animal. Una de las más utilizadas es la proteinasa (E.C. 3.4.23.23) de *Rhizomucor miehei*, conocida como mucorpepsina, que es también una aspartil-proteinasa, como la quimosina. La proteinasa de *Rhizomucor miehei* es la más glucosilada de todas las aspartil-proteinasas conocidas. Probablemente, esta es la razón de que sea particularmente termorresistente. También se utiliza en la elaboración de quesos la proteinasa de *Cryphonectria parasitica* (antes conocido como *Endothia parasitica*). A diferencia de la anterior, ésta es muy termolábil, por lo que se destruye en la etapa de calentamiento de quesos como el Emmental. En quesos no calentados, puede dar problemas al fragmentar la β -caseína [40].

Otras enzimas que participan en la producción de quesos son las lipasas (E.C. 3.1.1.3) presentes en la leche, que hidrolizan el componente graso, proporcionando cambios característicos en el sabor del queso durante la maduración. Los atributos deseables producidos durante la maduración, incluyen la ruptura enzimática parcial y gradual de carbohidratos, lípidos y proteínas, como consecuencia de la actividad metabólica de los microorganismos presentes durante este proceso. La adición de enzimas proteolíticas y lipolíticas exógenas permite acelerar el proceso de maduración de algunos quesos, por ejemplo el queso Cheddar cuyo proceso de maduración natural puede durar hasta dos años [31], [41], [42].

Por otro lado, la β -galactosidasa (E.C. 3.2.1.23) llamada también lactasa, hidroliza la lactosa en D-glucosa y D-galactosa; se usa principalmente para la obtención de productos deslactosados para individuos intolerantes al disacárido. La hidrólisis de la lactosa en leche puede realizarse en un fermentador con enzima libre o inmovilizada [41]. Otras aplicaciones de la lactasa incluyen la prevención de la cristalización de la lactosa en helados y postres congelados de leche. Actualmente, las enzimas llamadas “cold active” están teniendo un campo de aplicación importante, ya que al provenir de microorganismos psicrófilos presentan su mayor actividad a temperaturas bajas. Los principales microorganismos productores de β -galactosidasa son *A. oryzae*, *B.circulans*, *K. lactis* [41].

Otras enzimas involucradas en la industria láctea, son aquellas que tienen relación con la preservación del alimento, como la glucosa oxidasa (E.C. 1.1.3.4), catalasa (E.C. 1.11.1.6), dismutasa (la superóxido dismutasa es E.C. 1.15.1.1 y la formaldehído dismutasa es E.C. 1.2.9.4) , lactoperoxidasa (E.C. 1.11.1.7), entre otras, que evitan el crecimiento de microorganismos patógenos sobre el producto [41].

C. Panificación y productos de trigo

El uso de enzimas en este sector industrial se debe principalmente a la deficiencia enzimática en el trigo y en la harina que lleva a la baja disponibilidad de azúcares libres fermentables disponibles para la levadura. El contenido de α -amilasa de la harina depende de las condiciones de crecimiento y de cosecha del trigo. En climas húmedos la tendencia será tener alta actividad de α -amilasa debido a la germinación de los granos, en tanto que en climas secos el nivel de α -amilasa será bajo debido a la escasa germinación. Esto conlleva a grandes diferencias en el contenido de amilasa de diferentes lotes de harina [31]. Una forma de incrementar el contenido de azúcares libres en la masa es añadiendo enzimas exógenas como α -amilasa y β -amilasa (E.C. 3.2.1.2) microbianas, que hidrolizan preferentemente el enlace glucosídico α -(1-4) de la amilosa y la amilopectina, mejorando la calidad del pan. Las amilasas termoresistentes, generalmente producidas por bacterias, pueden permanecer estables después del horneado y continuar hidrolizando el almidón, dando como resultado un pan suave y pegajoso. Por otro lado, las amilasas fúngicas son generalmente termolábiles y son inactivadas durante el horneado [43].

Además de la adición de amilasas, durante la elaboración del pan se pueden agregar proteasas, cuya función es hidrolizar parcialmente el gluten y reducir el tiempo de amasado para la obtención de una masa suave [40].

También la adición de lacasas (E.C. 1.10.3.2) está cobrando mucho interés en la panificación debido a su capacidad para entrecruzar biopolímeros y algunas investigaciones han demostrado que las lacasas aisladas de *Trametes hirsuta* incrementaron la resistencia y disminuyeron la extensibilidad de masas elaboradas a partir de masas de harina y gluten [44]. Otro tipo de enzimas que se ha sugerido pueden incrementar o mantener el volumen de las barras de algunos tipos de panes son las transglutaminasas microbianas (TGasa, E.C. 2.3.2.13) cuando algunos ingredientes fueron sustituidos o reducidos durante el mezclado de la masa.

Por otro lado, la adición de TGasa en productos de trigo como fideos y pasta previene el deterioro de la textura después del cocinado y mejora la fuerza del producto aún cuando sean elaborados utilizando harinas de baja calidad proteica [45].

También se ha reportado el uso de lipooxigenasas (E.C. 1.13.11._) que actúan sobre los ácidos grasos linoleico, linolénico, araquidónico y sus ésteres, mejorando el blanqueamiento de las harinas. Así como endoxilasas (E.C. 3.2.1.8) que sirven para incrementar la retención de gas durante el horneado, el volumen de las barras y la estructura de la miga del pan [46].

D. Industria de grasas y aceites

El uso de enzimas en las industrias de aceites y grasas es muy bajo, aunque se encuentran disponibles enzimas que pueden resolver algunos problemas, por ejemplo minimizar los subproductos indeseables. Las enzimas también se pueden usar para producir aceites y grasas novedosas [47], tal es el caso de las lipasas.

Las lipasas (E.C. 3.1.1.3) son altamente específicas y pueden seleccionar los ácidos grasos de algunas posiciones del triacilglicérido, para incorporar determinados ácidos grasos, sin cambiar los de otras posiciones. De tal manera que es posible modificar por interesterificación el contenido de ácidos grasos, o por transesterificación lograr el rearrreglo de algunos de ellos [9], [48]. Por ejemplo la manteca de cacao, que es el ingrediente principal en la producción de chocolate, cuya disponibilidad y costo fluctúan ampliamente, puede ser sustituida por una grasa obtenida mediante una interesterificación enzimática a partir del aceite de palma, que es más económico y accesible, con propiedades similares a la manteca de cacao [49].

Por otro lado, debido a los efectos benéficos, el uso de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs, por sus siglas en inglés) se ha incrementado como aditivos farmacéuticos, nutracéuticos y en alimentos. Las lipasas microbianas son utilizadas para obtener PUFAs de lípidos de origen animal y vegetal como aceite de atún, arenque y borraja (planta egipcia). También, las lipasas son usadas para obtener grasas de productos cárnicos y marinos [42].

E. Productos cárnicos.

En el procesamiento de la carne, las enzimas con mayor utilidad son las proteasas, cuya función principal es suavizar la carne. El ablandador de carne ideal debería ser una enzima proteolítica específica para la hidrólisis del colágeno y la elastina del tejido conectivo al pH de la carne.

Entre las proteasas más utilizadas en esta industria, se encuentran las de origen vegetal como la bromelina (E.C. 3.4.22.33) y papaína (E.C. 3.4.22.2), y las provenientes de microorganismos como la elastasa (E.C. 3.4.21._) de *Bacillus subtilis* y *Aspergillus oryzae* (E.C. 3.4.21.63). Qihe et al., (2006) evaluaron el comportamiento de la elastasa de *Bacillus* spp EL31410 junto con la papaína, ambas enzimas redujeron la dureza de la carne, aunque la papaína redujo considerablemente la jugosidad de la carne, en cambio la elastasa, que degradó selectivamente la elastina de la estructura microfibrilar (observado por microscopía electrónica), mejoró considerablemente la terneza de la carne.

Otra proteasa investigada es la actinidina (E.C. 3.4.22.14) proveniente del jugo del kiwi, esta proteasa hidroliza las proteínas microfibrilares, dando como resultado nuevos péptidos y la activación de m-calpaina (proteasa de la carne que hidroliza proteínas microfibrilares) [51]. Sin duda, la actinidina es una herramienta útil en el ablandamiento de la carne, sin embargo se ha encontrado que puede causar alergias en adultos y niños [52], [53], por lo que se deberán tomar las precauciones necesarias para comercializar este ablandador.

Actualmente, además de utilizar proteasas para aumentar la terneza de la carne, se están haciendo esfuerzos para producir péptidos bioactivos contra la hipertensión a partir de productos cárnicos reduciendo la alergenicidad de los mismos [54].

Por otro lado, en productos cárnicos procesados también se usan transglutaminasas (TGasas), cuya función es mejorar las características funcionales de las proteínas, proporcionándole al producto mejor textura y sabor. Las TGasas producen enlaces covalentes amida entre un grupo amino primario en una poliamina o lisina (amina donadora) y un grupo α -carboxiamida del residuo glutamilo (amina receptora) de algunas proteínas, dando como resultado la formación de polímeros de alto peso molecular. En el caso de los productos cárnicos, la TGasa cataliza la interconexión de las microfibrillas, mejorando la elasticidad y la cohesividad de la carne. La enzima se aplica a la carne directamente por aspersión o mezclándose con agua. Una vez que se pone en contacto con la proteína empieza la unión y la formación del nuevo gel. Con esta acción se puede estabilizar la preparación sin problema, además de servirla y cortarla sin que ésta se desmonte. De esta forma se pueden preparar una gran variedad de productos cárnicos frescos como albóndigas, escalopas, hamburguesas o procesados como salchichas. Además, las piezas de carne incluyendo la carne molida pueden mantenerse unidas sin la adición de sal y fosfatos, dando como resultado productos cárnicos saludables. En definitiva, esta enzima ayuda en la unión de las proteínas de los alimentos evitando que se rompan durante el procesado o manipulación posterior, su uso deberá vigilarse muy bien para evitar que se apliquen proteínas exógenas del músculo para la elaboración de productos cárnicos [54], [55]. La disponibilidad de esta enzima está limitada a la producción de *Streptovorticillium* sp., por lo que se están realizando esfuerzos para su producción por ADN recombinante en *E. coli* [56].

F. Industria Cervecería

En la fabricación de cerveza se usan principalmente proteasas, amilasas y glucanasas. La acción de todas estas enzimas durante las primeras etapas del proceso, consiste en mejorar la licuefacción del

almidón, regular el contenido de azúcar y nitrógeno, mejorar la extracción, facilitar la filtración y controlar la turbidez. Por ejemplo, la adición de α y β amilasas en el mosto producen dextrinas y maltosas que sirven como sustratos para la fermentación posterior. Por otro lado, las proteasas degradan proteínas formando aminoácidos y péptidos. Durante la fermentación y maduración, la adición de enzimas sirve para controlar la turbidez [31].

Dentro de las glucanasas que se utilizan en la industria cervecera, están las pululanosas (E.C. 3.2.1.41), cuya función es hidrolizar los enlaces α -(1-6) glucosídicos, desramificando la amilopectina o las dextrinas. Estas enzimas se utilizan principalmente en la elaboración de cervezas atenuadas, ligeras y bajas en calorías. La elaboración de cervezas ligeras requiere una maceración prolongada, lo cual puede reducir la capacidad de la sala de cocción, con el uso de pululanosas, se reduce el tiempo de maceración hasta en un 50%, conservando la atenuación deseada [57]. Evidentemente, el resultado es un proceso más rápido sin sacrificar el sabor, con un ahorro de tiempo y energía.

G. Jugos y vinos

Las primeras enzimas empleadas en las industrias de jugos de frutas fueron las enzimas pécticas para la clarificación del jugo de manzana. Actualmente las pectinasas (E.C. 3.2.1.15 y E.C. 3.2.1.67) se usan en el procesamiento de muchas otras frutas, junto con amilasas y celulasas [31], [58].

Durante el procesamiento de los jugos cuando se desintegran los tejidos vegetales, parte de la pectina, que es un componente estructural de las frutas, pasa a la solución, parte se satura con el jugo y parte permanece en las paredes celulares. Las pectinasas se usan para facilitar el prensado, la extracción del jugo y la clarificación o la separación del precipitado floculento [47]. Por otro lado, las lacasas pueden ser utilizadas para mejorar o modificar el color de algunos jugos, mediante la eliminación de compuestos fenólicos responsables del obscurecimiento y turbidez en jugo de frutas translúcidos [44].

En la elaboración industrializada de vinos, principalmente en Estados Unidos, es común la adición de pectinasas durante la elaboración de vino blanco, particularmente durante el triturado para facilitar la extracción del jugo y después durante el prensado para aumentar la clarificación. Además las enzimas pécticas hidrolizan las pectinas presentes en la uvas a azúcares más solubles [40]. Las lacasas pueden participar en la elaboración de vino blanco y rosado como se mencionó en la clarificación de jugos. Entre las nuevas enzimas usadas en la elaboración del vino y bebidas alcohólicas, se encuentran la glucosa oxidasa, para la reducción del contenido de glucosa y por lo tanto de etanol [59].

H. Industria de la tortilla

La tortilla es la base de la alimentación del pueblo mexicano, representando cerca del 70% de la ingesta calórica en las clases de menores ingresos. La vida de anaquel de este producto es corta debido a la retrogradación del almidón. En algunas investigaciones se ha reportado el retraso en el endurecimiento de la tortilla y la extensión de la vida de anaquel cuando la harina de maíz fue mezclada con una amilasa fúngica ($10\mu\text{U g}^{-1}$) [60]. Derivada de estas investigaciones surgió una de las patentes otorgadas a la UNAM. Esto permitiría hacer llegar a lugares más lejanos y a consumidores más exigentes tortillas con una apariencia más fresca. Sin lugar a dudas, la industria de la tortilla, no solo en México, es un nicho de oportunidad, un ejemplo de ello es la empresa DANISCO, quien ofrece un formulado de amilasa G4 e hidrocoloides, que permite mantener la frescura y la flexibilidad de la tortilla incrementando la vida de anaquel.

En la siguiente tabla se presentan otras de las enzimas de mayor importancia que se utilizan en la industria de los alimentos, además se incluyen los mecanismos de acción y las fuentes de obtención.

Tabla I. Otras aplicaciones de enzimas en alimentos.

Enzima	Acción enzimática y aplicación tecnológica	Fuente
α -Acetolactato descarboxilasa	Conversión de acetolactato a acetoína. Reducción del tiempo de maduración del vino	<i>B. subtilis</i>
Amiloglucosidasa	Hidrólisis de dextrina a glucosa. Producción de jarabes fructosados y de cerveza tipo "lite"	<i>A. niger, Rhizopus spp.</i>
Bromelina, ficina y papaína	Hidrólisis de proteínas del tejido conectivo y muscular. Tenderización de la carne	Piña, látex de higo y de papaya inmadura.
Catalasa	Conversión del peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno. Junto con glucosa oxidasa, remueve el oxígeno	<i>A. niger, M. luteus</i>
Celulasa	Hidrólisis de celulosa. Ablandamiento de la fruta en la producción de jugos	<i>A. niger, Trichoderma spp.</i>
Dismutasa lactoperoxidasa	Oxida compuestos en presencia de agua y peróxido de hidrógeno. Combinada con tiocianato oxidado y peróxido de hidrógeno da origen a compuestos antibacterianos	Saliva y leche de mamíferos
β -Glucanasa	Hidrólisis de β -glucanos. Evita la turbidez en la cerveza.	<i>Aspergillus spp., Bacillus subtilis</i>
Glucosa isomerasa	Conversión de glucosa a fructosa. Producción de jarabes fructosados a partir de jarabes de almidón.	<i>A. missouriensis, B. coagulans, S. lividans, S. rubiginosus</i>
Glucosa oxidasa	Oxidación de glucosa a ácido glucónico. Evita el pardeamiento de la clara del huevo.	<i>A. niger, P. chrysogenum</i>
Hemicelulasa y xilanasas	Hidrólisis de hemicelulosa. Mejora la textura del pan	<i>Aspergillus spp., B. subtilis, T. reesei</i>
Lacasa	Reducción del oxígeno a agua con la oxidación de sustrato como diaminas aromáticas y polifenoles. gelatiniza la pectina de la remolacha en la fabricación de azúcar	<i>T. versicolor T. hirsuta</i>
Lipasa y esterasa	Hidrólisis de triacilglicerolos en ácidos grasos y glicerol. Sintetiza ésteres con sabor.	<i>Aspergillus spp., B. subtilis, Rhizopus spp.,</i> garganta de caprino/ovino, abomaso de ternero, páncreas de cerdo
Lipoxigenasa	Oxidación de ácidos grasos insaturados.	Soya
Lisozima	Hidrólisis de la pared celular bacteriana. Bacteriostático.	Huevo blanco
Pectinesterasa	Remoción de grupos metilo de las unidades de galactona en la pectina. Con pectinasa, útil en la despectinización.	<i>Aspergillus spp</i>
Pentosanasa	Hidrólisis de pentosano. Mejora la calidad y textura de la masa de panificación	<i>H. insolens, T. reesei</i>
Pululanasa	Hidrólisis de enlaces $\alpha(1-6)$ del almidón. Mejora la eficiencia de la sacarificación del almidón	<i>Bacillus spp., Klebsiella spp.</i>
Proteasas (Aminopeptidasa y proteinasa, tripsina)	Hidrólisis de proteínas. Producción de hidrolizados para sopas y saborizantes, mejora la textura de la masa de panificación.	<i>Aspergillus spp., R. miehei, C. parasitica, P. citrinum, Rhizopus spp., Bacillus spp., A. awamori, K. lactis,</i> abomaso de ternero, páncreasbovino/porcino
Transglutaminasa	Reacción de transferencia entre grupos carboxiamida y acil. Producción de embutidos, mejora la textura del yogur.	<i>Aspergillus spp., S. mobaraense, Maíz</i>

V. INNOVACIONES EN EL CAMPO ENZIMÁTICO

A. Biosensores

Un biosensor es un dispositivo analítico formado por dos transductores, uno bioquímico y uno físico que tienen contacto y pueden relacionar la concentración de un analito con una señal medible [61]. La señal puede resultar de la reacción catalizada por la enzima, luego el transductor convierte esta señal en una respuesta medible. La señal resultante puede ser amplificada, procesada o almacenada para su posterior análisis [62]. El interés en el uso de biosensores amperométricos a base de enzimas para el control en el procesamiento de los alimentos se ha incrementado desde principios de la década de los noventa del siglo XX. La penetración a la industria de los alimentos ha sido lenta a pesar de la gran cantidad de aplicaciones en el análisis de alimentos [63]. Algunos ejemplos de estas aplicaciones se resumen en la tabla II, todos estos dispositivos, son biosensores amperométricos que emplean sistemas mono o multienzimáticos. La detección de algunos analitos de importancia industrial como glucosa, sacarosa, lactosa, etanol, glicerol y lactato se realiza con dispositivos comerciales de compañías alemanas, norteamericanas, inglesas (Tabla II). En la última década, se ha explorado de manera exitosa el posible uso de biosensores para la determinación de analitos de alimentos frescos y procesados que repercuten directamente en la calidad del producto final [64], [65], [66].

A corto plazo, estas herramientas tendrán que ser más sensibles, rápidas y exactas, lo que puede implicar la búsqueda de enzimas más estables y específicas en una aplicación deseada [63].

Tabla II. Enzimas acopladas en biosensores con aplicación en la industria alimentaria [63-77].

Analito	Enzima	Aplicación
Glucosa	Glucosa oxidasa	Jugo de naranja, tomate y frutas
Fructosa	D-fructosa-5-Deshidrogenasa Invertasa	Jugo de naranja y manzana, miel. Jugo de frutas
Lactosa	β -galactosidasa combinada con D-fructosa-5-deshidrogenasa	Cuantificación de lactosa en leche
Lactulosa	β -galactosidasa combinada con D-fructosa-5-deshidrogenasa	Diferenciación de la leche entre cruda, pasteurizada y ultrapasteurizada
Sacarosa	Invertasa, mutarotasa, glucosa oxidasa	Frutas tropicales (mango, piña y papaya)
Ácido láctico	L-lactato deshidrogenasa, L-lactato oxidasa	Frescura, estabilidad y calidad del almacenamiento en salsa de tomate, frutas, jugos, vino y leche
Ácido Glutámico	Glutamato oxidasa	Cubitos de caldo de carne y pollo, salsa de soya, jugos de frutas y vegetales, leche descremada
Ácido cítrico	Citrato liasa, Oxaloacetato descarboxilasa y piruvato oxidasa	Frutas, jugos y bebidas deportivas
Ácido málico	Malato deshidrogenasa	Frutas, vegetales y vinos
Etanol	Alcohol oxidasa / alcohol deshidrogenasa	Bebidas alcohólicas
Glicerol	Glicerol deshidrogenasa	Bebidas alcohólicas (vino) y proceso de fermentación
Pesticidas	Acetilcolinesterasa	Matrices alimentarias procesadas, alimento para infantes

B. Envases

Las enzimas pueden ser incorporadas en la estructura de un envase como parte de una estrategia durante el desarrollo de envases activos e inteligentes. Para tal efecto, la enzima debe de estar

inmovilizada en la matriz del envase y el sustrato debe de entrar en contacto con ésta para iniciar la reacción.

Aunque una amplia variedad de reacciones enzimáticas con enzimas incorporadas al material del envase han sido concebidas, muy pocas han sido aplicadas. Ejemplos de estas aplicaciones incluyen la remoción de oxígeno utilizando glucosa oxidasa, alcohol oxidasa (E.C. 1.1.3.13) o una mezcla de glucosa oxidasa más catalasa para prevenir el crecimiento de bacterias y levaduras aeróbicas en productos lácteos y panificación, regularmente estas enzimas son colocadas en sacos que se encuentran en los espacios de cabeza del envase [78]. Otras enzimas son incorporadas a los envases activos para catalizar reacciones desde el punto de vista nutricional, para la reducción de la concentración de constituyentes no deseables del alimento y/o la producción de una sustancia benéfica para la salud del consumidor como la reducción del sabor amargo en el jugo de toronja por la adición de naringinasa (E.C. 3.2.1.40) en el envase de plástico [79]; la inserción de colesterol reductasa y β -galactosidasa en las paredes del envase para disminuir el colesterol y la lactosa, respectivamente, en productos lácteos [80]. El uso de este tipo de tecnología, podría permitir la producción de alimentos con valor agregado sin modificar el proceso de fabricación, sin embargo, habrá que considerar que muchos de los métodos de inmovilización podrían tener desventajas desde el punto de vista de inocuidad del producto final, ya que el soporte de la enzima en la matriz del envase tiene que cumplir con características deseables para la inmovilización y para la reacción enzimática en el sistema alimentario. Algunos de los biomateriales considerados como sustancias seguras (SCOGS, por sus siglas en inglés) que han sido estudiados para la inmovilización de enzimas y tienen potencial interés en el diseño de envases activos son carragenina [81], quitosano [82], gelatina [83], ácido poliláctico (PLA, por sus siglas en inglés), ácido poliglicólico (PLG, por sus siglas en inglés) y alginato.

VI. LEGISLACIÓN DE ENZIMAS ALIMENTARIAS

La legislación del uso de enzimas comerciales y sus aplicaciones en la industria de los alimentos depende de cada país. En algunos países se requiere que la inocuidad de la enzima haya sido previamente comprobada antes de agregarla a un producto, mientras que en otros países las instancias de salud o gubernamentales sólo requieren ser notificadas antes de la venta del producto. La Unión Europea, Japón, Australia y otros países reevalúan los procedimientos y la legislación que compete al uso de enzimas, de hecho las enzimas en los países mencionados están sujetas a reglamentaciones adicionales. Sin embargo, en el resto del mundo, las enzimas son consideradas básicamente como aditivos alimentarios y se regulan de tal modo. A continuación se menciona la regulación del uso de enzimas en algunos países de América y se describe en forma breve los procedimientos a seguir para que una enzima se pueda utilizar en la industria alimentaria.

En Estados Unidos de América, las preparaciones enzimáticas son catalogadas por la Administración de Drogas y Alimentos (FDA, por sus siglas en inglés) y el CODEX Alimentarius (entidad dependiente de la OMS y la FAO) como “aditivos”, por tal motivo, la FDA solo acepta el uso de enzimas de fuentes libres de toxinas y organismos GRAS (Generally Recognized as Safe, por sus siglas en inglés) [84], [85]. La aprobación de una enzima por parte de la FDA dependerá de su inocuidad, caracterización enzimática, fuente (alergenicidad, toxicidad, patogenicidad, clasificación taxonómica, etc.), producción recombinante (evolución genética, mutación específica, método de transformación), etc. Posteriormente, se somete a la evaluación GRAS. Con todos estos pasos, finalmente, la FDA determina si la enzima puede ser utilizada como ayudante de proceso o aditivo. Aquellas enzimas que no sean consideradas como GRAS, se sujetan a largas y costosas pruebas para demostrar su inocuidad, lo que puede retrasar la aplicación de un nuevo desarrollo entre 5 y 8 años. Todos esos trámites se realizan con la finalidad de regular el uso de sustancias inocuas para el humano y el ambiente.

Por lo que respecta a otros países como Canadá, las enzimas alimentarias se regulan como aditivos alimentarios. El órgano encargado es el Departamento de Salud de Canadá [86], quien realiza una evaluación previa a la comercialización de las enzimas, además de aprobar su uso en alimentos. Algunos de los datos que solicita el Departamento de Salud de Canadá son: características bioquímicas y moleculares de la fuente, organismo GRAS libre de toxinas y/o antibióticos. En el caso de que el organismo sea genéticamente modificado, el Departamento de Salud revisa la metodología empleada y solicita la secuenciación completa del ADN genómico [86].

En México, las Normas Oficiales Mexicanas (NOM) contemplan el uso de 53 enzimas como aditivos en la industria de los alimentos, establecido en el Reglamento de la Ley General de Salud en materia de control sanitario de actividades, establecimientos, productos y servicios (Diciembre 2004) y detallado con mayor precisión en el Acuerdo por el que se determinan los aditivos y coadyuvantes en alimentos, bebidas y suplementos alimenticios, su uso y disposiciones sanitarias, publicado en el Diario Oficial de la Federación el 17 de julio de 2006 [87]. En este documento, se especifica que las enzimas son consideradas aditivos, que no deben ser notificados en las etiquetas de los alimentos y que su uso se hace conforme a buenas prácticas de fabricación, es decir, que la cantidad de un aditivo que se añade al producto deberá limitarse a la dosis mínima necesaria para obtener el efecto deseado, a condición de que no altere la naturaleza, sustancia o inocuidad del producto. Es importante mencionar que desde la fecha de publicación de este acuerdo, se han recibido solicitudes de la industria para la evaluación de sustancias y su inclusión en el mismo.

VII. CONCLUSIONES

La versatilidad de las enzimas y sus propiedades catalíticas han provocado la consolidación de éstas en el mercado, convirtiéndose en un importante sector económico. Así mismo, la incorporación de enzimas, nuevas o mejoradas, en diversos sectores de la industria de los alimentos tiene un futuro promisorio ya que pueden incluirse para la obtención en una variedad amplia de alimentos procesados en áreas como panificación, jugos, saborizantes, lácteos, cárnicos, etc.; y sus aplicaciones se han extendido en el desarrollo de tecnología para la transformación y/o conservación de productos terminados en envases activos, así como la detección de productos intermedios o finales durante el procesamiento de los alimentos mediante biosensores.

Es claro que la aplicación de las enzimas en la industria de los alimentos seguirá creciendo, ya que los consumidores exigen nuevos y mejores alimentos con características nutricionales y funcionales que repercutan en su salud. Hoy en día la búsqueda y/o ingeniería de enzimas va hacia la obtención de aquellas que no dependan de cofactores, sean estables a condiciones extremas de pH y temperatura, menos susceptibles a inhibidores, entre otras características deseables.

Sin embargo, el uso de enzimas nuevas o mejoradas para la transformación de alimentos puede presentar algunas desventajas o limitaciones. Por ejemplo, muchas de estas enzimas “novedosas” se encuentran aún en etapa experimental y deberá probarse, además de su capacidad como adyuvantes de proceso, su inocuidad; con el debido respaldo de la legislación de cada país.

RECONOCIMIENTOS

Al Proyecto para el Fortalecimiento de Cuerpos Académicos No. PROMEP/103.5/11/6904 por el financiamiento otorgado.

REFERENCIAS

- [1] Company, Novozymes. (2011). The Novozymes Report 2011.

- [2] Grand View Research-Market Research & Consulting. "Enzymes Market Analysis By Product (Carbohydrase, Proteases, Lipases, Polymerases & Nucleases) And Segment Forecasts To 2020. Recuperado el 16 de enero de 2015 en: <http://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/enzymes-industry>
- [3] Izquierdo, J., de la Riva, G.A. (2000). Plant biotechnology and food security in Latin America and Caribbean. *Electron. J. Biotechnol.* 3:1-8
- [4] Li, S., Yang, X., Yang, S., Zhu, M., Wang, X. (2012). Technology prospecting on enzymes: Application, marketing and engineering. *CSBJ.* 2:3
- [5] BCC Research. Recuperado el 16 de enero de 2015 en <http://www.bccresearch.com/>
- [6] Company, Novozymes. (2012). The Novozymes Report 2012.
- [7] Binod, P., Palkhiwala, P., Gaikawai, R., Nampoothiri, K.M., Duggal, A., Dey Kand Pandey, A. (2013). Industrial Enzymes - Present status and future perspectives for India. *J Sci. Ind. Res. India.* 72: 271-286
- [8] Rolle, R.S. (1998). Review: Enzyme applications for agroprocessing in developing countries: an inventory of current and potential applications. *World J. Microbiol.* 14:611-619
- [9] Godfrey, T., Reichelt, J. (1983). Industrial enzymology: The application of enzymes in industry. United Kingdom: MacMillan Publisher Ltd.
- [10] Gacesa, P., Hubble, J. (1990). Tecnología de las enzimas. España: Acribia.
- [11] Olempska-Ber, Z.S., Merker, R.I., Ditto, M.D., DiNovi, M. (2006) Food-processing enzymes from recombinant microorganism-a review. *Regul. Toxicol.Pharm.* 45:144-158
- [12] Whitehurst, R.J., van Oort, M. (edit). (2009). Front Matter, in Enzymes in Food Technology, 2nd edn, Inglaterra: Wiley-Blackwell.
- [13] Lorenz, P., Eck, J. (2005). Metagenomics and industrial applications. *Nat. Rev. Microbiol.* 3:510-516.
- [14] Daniel, R. (2004). The soil metagenome – a rich resource for the discovery of novel natural products. *Curr. Opin. Biotech.* 15:199-204
- [15] Escalante-Lozada, A., Gosset-Lagarda, G., Martínez-Jiménez, A., Bolívar-Zapata, F. (2004). Diversidad microbiana del suelo: métodos de estudio no dependientes del cultivo microbiano e implicaciones biotecnológicas/ Soil bacterial diversity: microbial cultura-independent methods of study and biotechnological implications. *Agrociencia* 38: 583-592
- [16] Handelsman, J., Rondon, M.R., Brady, S.F., Clardy, J., Goodman, R.M. (1998). Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. *Chem. Biol.* 10:R245-249
- [17] Cottrell, M.T., Moore, J.A., Kirchman, D.L. (1999). Chitinases from uncultured marine microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol* 65:2553-2557.
- [18] Ferrer, M., Golyshina, O.V., Chernikova, T.N., Khachane, A.N., Reyes-Duarte, D., Santos, *et al.* (2005). Novel hydrolase diversity retrieved from a metagenome library of bovine rumen microflora. *Environ. Microbiol.* 7:1996-2010.
- [19] Ferrer, M., Martínez-Abarca, F., Golyshin, P.N. (2005). Mining genomes and 'metagenomes' for novel catalysts. *Curr. Opin. Biotechnol.* 16:588-593.
- [20] Henne, A., Schmitz, R.A., Bomeke, M., Gottschalk, G., Daniel, R. (2000). Screening of environmental ADN libraries for the presence of genes conferring lipolytic activity on *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:3113-3116.
- [21] Rondon, M.R., August, P.R., Bettermann, A.D., Brady, S.F., Grossman, T.H., Liles, M.R., *et al.* (2000). Cloning the soil metagenome: a strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:2541-2547
- [22] Voget, S., Leggewie, C., Uesbeck, A., Raasch, C., Jaeger, K.E., Streit, W.R. (2003). Prospecting for novel biocatalysts in a soil metagenome. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:6235-6242.
- [23] Venter, J.C., Remington, K., Heidelberg, J.F., Halpern, A.L., Rusch, D., Eisen, J.A., *et al.* (2004). Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. *Science* 304: 66-74.
- [24] Allen, H.K., Moe, L.A., Rodbumer, J., Gaarder, A., Handelsman, J. (2009). Functional metagenomics reveals diverse β -lactamases in a remote Alaskan soil. *ISME J.* 3:243-251.
- [25] Duan, C.J., Liu, J.L., Wu, X., Tang, J.L., Feng, J.X. (2010). Novel carbohydrate-binding module identified in a ruminal metagenomic endoglucanase. *Appl. Environ. Microbiol.* 76:4867-4870

- [26] Jiang, C., Wu, L.L., Zhao, G.C., Shen, P.H., Jin, K., Hao, Z.Y., et al. (2010). Identification and characterization of a novel fumarase gene by metagenome expression cloning from marine microorganisms. *Microb. Cell Fact.* 9:1-19
- [27] Keller, M., Zengler, K. (2004). Tapping into microbial diversity. *Nat. Rev. Microbiol.* 2: 141-150.
- [28] Tasse, L., Bercovici, J., Pizzut-Serin, S., Robe, P., Tap, J., Klopp, C., et al. (2010). Functional metagenomics to mine the human gut microbiome for dietary fiber catabolic enzymes. *Genome Res.* 20:1605–1612
- [29] Cortes-Lopez N.G., Montor-Antonio, J.J., Olvera-Carranza, C., Pena-Castro, J.M., del Moral, S. (2014). Metagenómica: una ventana de oportunidad a nuevos genes y genomas microbianos. *Revista Iberoamericana de Ciencias*, 1:45-58
- [30] AMFEP, Recuperado el 16 de enero de 2015 en <http://www.amfep.org>
- [31] Carrera, J.E. (2003). Producción y aplicación de enzimas industriales. *Facultad de Ciencias Agropecuarias.* 1:15
- [32] Parker, K., Salas, M., Nwosu, V.C. (2010). High fructose corn syrup: Production, uses and public health concerns. *Biotechnol Mol Biol Rev* 5:71-78
- [33] Vercauteren, R.L.M., Nguyen, V.S. (2004). Process for preparing isomalto-oligosaccharides with elongated chain and low glyceimic index. WO/2004/068966
- [34] Alting, A.C., Van Der Velde, F., Kanning, M.W., Burgering, M., Mulleners, L., Sein, A., et al. (2009). Improved creaminess of low-fat yoghurt: the impact of amyloamylase-treated starch domains. *Food Hydrocolloid*, 23:980-987.
- [35] Takii, H., Ishihara, K., Kometani, T., Okada, S., Fushiki, T. (1999). Enhancement of swimming endurance in mice by highly branched cyclic dextrin. *Biosci Biotechnol Biochem*, 63:2045–2052
- [36] Takii, H., Takii Nagao, Y., Kometani, T., Nishimura, T., Nakae, T., Kuriki, T., et al. (2005). Fluids containing a highly branched cyclic dextrin influence the gastric emptying rate. *Int J Sports Med*, 26:314-319.
- [37] Bano S., Ul Kader S.A., Aman, A., Syed, M.N., Azhar, A. (2011). Purification and characterization of novel α -amylase from *Bacillus subtilis*. *AAPS Pharm Sci Tech.*, 12:255-271
- [38] Monteiro de Souza, P., Oliveira e Magalhães, P. (2010). Application of microbial α -amylase in industry – a review. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41: 850-861.
- [39] Liu, X. D., Xu, Y. (2008). A novel raw starch digesting α -amylase from a newly isolated *Bacillus* sp. YX-1: purification and characterization. *Bioresource Technol*, 99:4315–4320.
- [40] Hutkins, R.W. (2007). Introduction, in *Microbiology and Technology of Fermented Foods*. USA:Blackwell Publishing..
- [41] Neelakantan, S., Mohanty, A.K., Kaushik, J.K. (1999). Production and use of microbial enzymes for dairy processing: A review. *Curr Sci India.*, 77:143–148.
- [42] Sharma, R., Chisti, Y., Banerjee, U.C. (2001). Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotech Advances*, 19:627–662
- [43] Benjamin, S., Smitha R. B., Jisha V. N., Pradeep S., Sajith S., Sreedevi S. et al. (2013). A monograph on amylases from *Bacillus* spp. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 4: 227-241
- [44] Rodríguez-Couto, S., Toca-Herrera, J.L. (2006). Industrial and biotechnological applications of laccases: A review. *Biotechnol Adv*, 24:500-513.
- [45] Motoki, M., Seguro, K. (1998). Transglutaminase and its use for food procesing. *Trends Food Sci Tech.*, 9:204-210.
- [46] Hui, Y.H. (2006). *Bakery Products Science and Technology*. USA: Blackwell Publishing.
- [47] Illanes A. (1994). *Biotecnología de enzimas*. Serie de Monografías Científicas del Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico de la Organización de los Estados Americanos, Ediciones Universitarias de Valparaíso. USA.
- [48] Harlander, S., Labuza, T. (1986). *Biotechnology in Food Processing*. Noyes Publications. USA: Park Ridge.
- [49] Tucker, G.A., Woods, L.F.J. (edit). (1991). *Enzymes in Food Processing*. London: Blackie and Son Ltd.
- [50] Qihe C, Guoqing H, Yingchun J, Hui N. (2006). Effects of elastase from a *Bacillus* strain on the tenderization of beef meat. *Food Chem*, 98:624-629.

- [51] Han, J., Morton, J.D., Bekhit, A.E.D., Sedcole, J.R. (2009). Prerigor infusion with kiwifruit juice improves lamb tenderness. *Meat Sci.* 82:324-330.
- [52] Chen, L., Lucas, J.S., Hourihane, J.O., Lindemann, J., Taylor, S.L., Goodman, R.E. (2006). Evaluation of IgE binding to proteins of hardy (*Actinidia arguta*), gold (*Actinidia chinensis*) and green (*Actinidia deliciosa*) kiwifruits and processed hardy kiwifruit concentrate, using sera of individuals with food allergies to green kiwifruit. *Food Chem Toxicol* 44:1100-1107
- [53] Bublin, M., Radauer, C., Knulst, A., Wagner, S., Scheiner, O., Mackie, A.R., Mills, E.N., Breiteneder, H. (2008). Effects of gastrointestinal digestion and heating on the allergenicity of the kiwi allergens Act d 1, actinidin, and Act d 2, a thaumatin-like protein. *Mol Nutr Food Res* 52:1130-1139.
- [54] Castro Marques, A., Marostica, M.R. Jr, Pastore, G.M. (2010). Some nutritional, technological and environmental advances in the use of enzymes in meat products. *Enzyme Res.*
- [55] Yokohama, K., Nio, N., Kikuchi, Y. (2004). Properties and applications of microbial transglutaminases. *Appl Microbiol Biotechnol*, 64:447-454
- [56] Aguilar-Zárata P., Aguilar-Zárata, M., Carrillo-Inungaray M.L., Portilla-Rivera OM. (2012). Importancia de la producción de transglutaminasa microbiana para su aplicación en alimentos. *Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila Acta Química Mexicana.* 4:1-17
- [57] Company, Novozymes. (2009). The Novozymes Report 2011.
- [58] Demir, N., Acar, J., Sarão, K., Mutlu, M. (2001). The use of commercial pectinase in fruit juice industry. Part 3: Immobilized pectinase for mash treatment *J Food Eng*, 47:275-280
- [59] Malherbe, D.F., du Toit, M., Cordero Otero, R.R., van Rensburg, P., Pretorius, I.S. (2003). Expression of the *Aspergillus niger* glucose oxidase gene in *Saccharomyces cerevisiae* and its potential applications in wine production. *Appl Microbiol Biotechnol.*, 61:502-511.
- [60] Lopez-Munguia, A., Iturbe, A., Lucio, R.M. (2006). Proceso para elaborar tortillas de maíz que conservan mejor sus propiedades organolépticas y reológicas durante su vida de anaquel mediante un tratamiento enzimático. Patente UNAM. Mexico
- [61] Terry, L.A., White, S.F., Tigwell, L.J. (2005). The Application of Biosensors to Fresh Produce and the Wider Food Industry. *J. Agric. Food Chem.* 53:1309-16
- [62] Mulchandani, A., Rogers, K.R. (1998). Methods in biotechnology. Biosensors: Techniques and Protocols; USA: Humana.
- [63] Prodromidis, M.I., Karayannis, M.I. (2002). Enzyme based amperometric biosensors for food analysis. *Electroanal.* 14:241-261.
- [64] Freshness meter from Oriental Electric Co. Ltd. *Chem Sensors* 1992; 8: 18. 2006
- [65] Nagai, R., Yaoita, M., Yoshida, Y., Ikariyama, Y., Yamauchi, S. (1989). Highperformance biosensor for cholesterol. En 9th Chem Sensor Symposium, Aoyama Gakuin University, Japón, 17-20
- [66] Monosik, R., Stredansky, M., Tkac, J., Sturdik, E. (2012). Application of Enzyme Biosensors in Analysis of Food and Beverages. *Food Anal. Methods* 5:40-53.
- [67] YSI Incorporated. Recuperado el 16 de enero de 2015 <http://www.ysi.com>
- [68] Analox Instruments. Recuperado el 16 de enero de 2015 <http://www.analox.com>
- [69] Luong, J.H.T., Bouvrette, P., Male, K.B. (1997). Developments and applications of biosensors in food analysis. *Tibtech.* 15:369-377.
- [70] Kinnear, K.T., Monobouquette, H.G. (1997). An amperometric fructose biosensor based on fructose dehydrogenase immobilized in a membrane mimetic layer on gold. *Anal. Chem.* 69:1771-1775.
- [71] Scheller, F.W., Pfeiffer, D. (1997). Commercial devices based on amperometric biosensors. In: Kress-Rogers E, editor. Handbook of biosensors and electronic noses: medicine, food, and environment. New York, USA.
- [72] Jawaheer, S., White, S.F., Bessant, C., Rughooputh, S.D.D.V., Cullen, D.C. (Mayo, 2002). Determination of fruit status using a disposable multi-analyte biosensor array and principle component analysis. En 7th World Congress on Biosensors. Kyoto, Japón.
- [73] Jawaheer, S., White, S.F., Rughooputh, S.D.D.V., Cullen, D.C. (2003). Development of a common biosensor format for an enzyme based biosensor array to monitor fruit quality. *Biosens. Bioelectron.* 18: 1429-1437.

- [74] Pauliukaite, R., Zhylyak, G., Citterio, D., Spichiger-Keller, U.E. (2006). L-Glutamate biosensor for estimation of the taste of tomato specimens *Anal. Bioanal. Chem*, 386:220-227
- [75] Arif, M., Setford, S.J., Burton, K.S., Tothill, I.E. (2002). L-Malic acid biosensor for field-based evaluation of apple, potato and tomato horticultural produce. *Analyst*, 127: 104-108
- [76] Gulla, K.C., Gouda, M.D., Thakur, M.S., Karanth, N.G. (2002). Reactivation of immobilized acetyl cholinesterase in an amperometric biosensor for organophosphorus pesticide. *Biochim Biophys Acta*, 1597:133-139
- [77] Sculze, H., Scherbaum, E., Anastassiades, M., Vorlova, S., Schmid, R.D., Bachmann, T.T. (2002). Development, validation and application of an acetylcholinesterase biosensor for the direct detection of insecticide residues in infant food. *Biosens Bioelectron*, 17: 1095-1105.
- [78] Suppakul, P., Miltz, J., Sonneveld, J., Bigger, S.W. (2003). Active packaging technologies with an emphasis on antimicrobial packaging and its applications active. *J. Food Sci.* 68:408-420
- [79] Soares, N.F.F., Hotchkiss, J.H. (1998). Naringinase Immobilization in Packaging Films for Reducing Naringin Concentration in Grapefruit Juice. *J. Food Sci.* 63: 61-65
- [80] Brody, A.L., Bundy, J.A. (1995). Enzymes as active packaging agents. IN: Rooney, M. L. (edit.) *Active Food Packaging*. USA: Blackie Academic and Professional.
- [81] van de Velde, F., Lourenco, N.D., Pinheiro, H.M., Bakker, M. (2002). Carrageenan: a food-grade and biocompatible support for immobilisation techniques. *Adv Synth Catal*, 344:815-835.
- [82] Kumar, N.M.V.R. (2000). A review of chitin and chitosan applications. *React. Funct. Polym.*, 46: 1-27
- [83] Nagatomo, H., Matsushita, Y., Sugamoto, K., Matsui, T. (2005). Preparation and properties of gelatin-immobilized beta-glucosidase from *Pyrococcus furiosus*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 69:128-136
- [84] FAO y WHO Food Standards. Recuperado el 16 de enero de 2015 <http://www.codexalimentarius.net>.
- [85] FDA. Recuperado el 16 de enero de 2015 en <http://www.accessdata.fda.gov>
- [86] Health Canada. Recuperado el 16 de enero de 2015 en http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/securit/addit/food_enzymes-eng.php
- [87] Diario oficial de la federación. (México). 16 de julio de 2012. Acuerdo por el que se determinan los aditivos y coadyuvantes en alimentos, bebidas y suplementos alimenticios, su uso y disposiciones sanitarias.