



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza



Trabajo Fin de

Autor/es

Director/es

Facultad de Veterinaria

ÍNDICE

1. RESUMEN.....	1
2. ABSTRACT.....	1
3. INTRODUCCIÓN.....	2
3.1. Concepto de enzima y su importancia en la alimentación	2
3.1.1. Concepto de enzima y mecanismo de actuación	2
3.1.2. Estructura.....	4
3.1.3. Importancia en la industria alimentaria	5
3.2. Historia: uso de enzimas en la obtención de alimentos desde la antigüedad	6
3.3. Fuentes de obtención de enzimas	7
3.4. Clasificación de enzimas según sus funciones.....	9
3.5. Desarrollo de las enzimas más importantes para la obtención de productos lácteos ...	11
3.5.1. Lactasa.....	12
3.5.2. Lipasa.....	13
3.5.3. Proteasa: tripsina, pepsina y renina.....	15
4. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	17
5. METODOLOGÍA.....	18
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	20
6.1. Métodos de obtención de enzimas en la industria láctea.....	20
6.2. Inmovilización de enzimas	26
6.2.1. Métodos de inmovilización de enzimas	27
6.2.2. Efectos de la inmovilización	28
6.2.3. Aplicaciones de las enzimas inmovilizadas	28
6.3. Aplicaciones más relevantes del uso de enzimas para la industria láctea.....	29
6.3.1. Importancia del uso de enzimas en la elaboración de queso	29
6.3.2. Importancia del uso de enzimas en la elaboración de productos sin lactosa.	32
7. CONCLUSIONES	34
8. CONCLUSIONS.....	34
This work also concludes the importance of the use of certain enzymes in many processes in the dairy industry, such as:.....	34
9. VALORACIÓN PERSONAL.....	35
10. BIBLIOGRAFÍA	35

1. RESUMEN

Las enzimas son proteínas que catalizan o aceleran las reacciones bioquímicas que ocurren de manera natural en todos los organismos vivos. Las puede fabricar el propio organismo a partir de proteínas o se pueden adquirir a través de los alimentos. Se han utilizado desde hace siglos para la elaboración de productos y bebidas como queso, vino y pan. Sin embargo, en la actualidad la industria alimentaria, a partir del conocimiento de los procesos bioquímicos y moleculares básicos, así como de la aplicación de técnicas de ingeniería de procesos, ha sabido sacar un gran partido a las enzimas tanto para optimizar sus procesos de producción, como para desarrollar nuevos productos. Este trabajo ofrece una recopilación sobre la información más relevante acerca del uso de enzimas en los alimentos. La primera parte del trabajo se centra en el uso de enzimas en la industria alimentaria en general, explicando una serie de conceptos como su mecanismo de acción, su estructura, sus fuentes de obtención o su importancia en la industria alimentaria, entre otros. La segunda parte del trabajo es más específica, ya que se centra en el uso de enzimas en la industria láctea, explicando los métodos de obtención e inmovilización, así como las aplicaciones más relevantes en esta industria. Para la realización de este trabajo de revisión bibliográfica se han consultado las bases de datos *ScienceDirect* y *Web Of Science*, principalmente.

2. ABSTRACT

Enzymes are proteins that catalyze or accelerate the biochemical reactions that occur naturally in all living organisms. They can be created by organism from proteins or can be obtained through food. They have been used for centuries to produce products and drinks such as cheese, wine and bread. However, at present, the food industry, based on knowledge of basic biochemical and molecular processes, as well as the application of process engineering techniques, has been able to take full advantage of the enzymes usage both to optimize their production processes and to develop new products. This work offers a compilation of the most relevant information about the use of enzymes in food. The first part of the work focuses on the use of enzymes in the food industry in general, explaining some concepts such as its mechanism of action, its structure, its sources of obtaining or its importance in the food industry, among others. The second part of the work is more specific because it focuses on the use of enzymes in the dairy industry, explaining the methods of obtaining and immobilization, as well as the most relevant applications in this industry.

The main databases used for the realization of this literature review work, have been *ScienceDirect* and *Web Of Science*.

3. INTRODUCCIÓN

3.1. Concepto de enzima y su importancia en la alimentación

3.1.1. Concepto de enzima y mecanismo de actuación

Una enzima es una sustancia de naturaleza proteica especializada en catalizar, de forma selectiva y específica, las reacciones químicas que tienen lugar en los tejidos vivos (Cremosi, 2002). Forman parte de las células de todos los seres vivos y son esenciales para que éstas sean metabólicamente activas. Según Voet, Voet y Pratt (2003), gracias a las enzimas, las reacciones químicas que ocurren dentro de la célula son compatibles con la vida, ya que, si no aumentarían notablemente la velocidad, éstas reacciones serían demasiado lentas y el organismo correspondiente no sería viable.

Son catalizadores muy eficaces porque son capaces de aumentar la velocidad de las reacciones químicas, mucho más que cualquier catalizador artificial. Además, son altamente específicas, ya que cada tipo de enzima cataliza un tipo de reacción química, es decir, cada tipo de enzima induce a la transformación de una sola sustancia, cuando ésta se encuentra en presencia de otros sustratos.

Siempre que sea termodinámicamente posible, en estas reacciones, las enzimas actúan sobre unas moléculas que se llaman sustratos, los cuales se convierten en varias moléculas que se denominan productos. Esto tiene lugar, tal y como se muestra en la Figura 1, porque una determinada fracción de la población de moléculas R, en un instante dado, posee energía suficiente como para alcanzar un estado activo llamado estado de transición, en el que es muy fácil que se rompan o se formen uno o más enlaces químicos para formar los productos P. La velocidad de una reacción química es proporcional al número de moléculas por unidad de tiempo con energía suficiente para alcanzar el estado de transición. Este estado de transición posee una energía superior a la de los reactivos y a la de los productos constituyendo entre ellos una barrera energética, denominada energía de activación, que debe superarse para que la reacción tenga lugar. Según Lehninger (2006), se denomina energía libre de activación a la diferencia entre la energía de los reactivos y la del estado de transición.

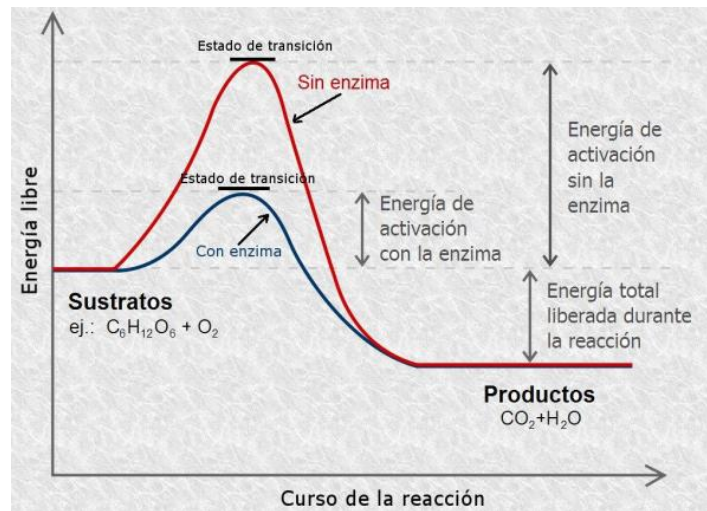


Figura 1. Energía libre de activación y efecto de los catalizadores. Obtenida en:

<http://www.bionova.org.es/biocast/tema14.htm>

La velocidad de las reacciones enzimáticas depende de la concentración de la enzima, de la concentración del sustrato, de la temperatura, del pH y del medio, como variables de operación más importantes. El efecto catalítico de las enzimas, al igual que el de cualquier otro catalizador, se traduce en una disminución de la energía de activación de la reacción. Esto es debido a que, en presencia de los catalizadores, los reactivos alcanzan un estado de transición de menor energía de activación que en el caso de una reacción no catalizada. En definitiva, el mecanismo de reacción en presencia de la enzima es distinto al de la no catalizada. Cuando se forman los productos se regenera el catalizador libre. Por tanto, un catalizador es una sustancia que, sin consumirse en el proceso, aumenta la velocidad de una reacción química rebajando la barrera de energía de activación. Sin embargo, los parámetros termodinámicos de la reacción, calor de reacción y constante de equilibrio, no se ven alterados por la presencia del catalizador.

La enzima y el sustrato se combinan de modo transitorio para formar un complejo enzima-sustrato (Figura 2), que alcanza el estado de transición con mayor probabilidad que en la reacción no catalizada. Una vez alcanzado dicho estado, el complejo enzima-sustrato se descompone para dar lugar a los productos y la enzima libre según se refleja en la siguiente ecuación:



La enzima, una vez liberada, puede combinarse con una nueva molécula de sustrato para formar un nuevo complejo enzima-sustrato cerrándose así el ciclo catalítico de la enzima. De este modo, una sola molécula de enzima puede transformar en producto, en sucesivos ciclos catalíticos, a un elevado número de moléculas de sustrato, lo que contribuiría a explicar la gran eficacia catalítica que exhiben estas biomoléculas.

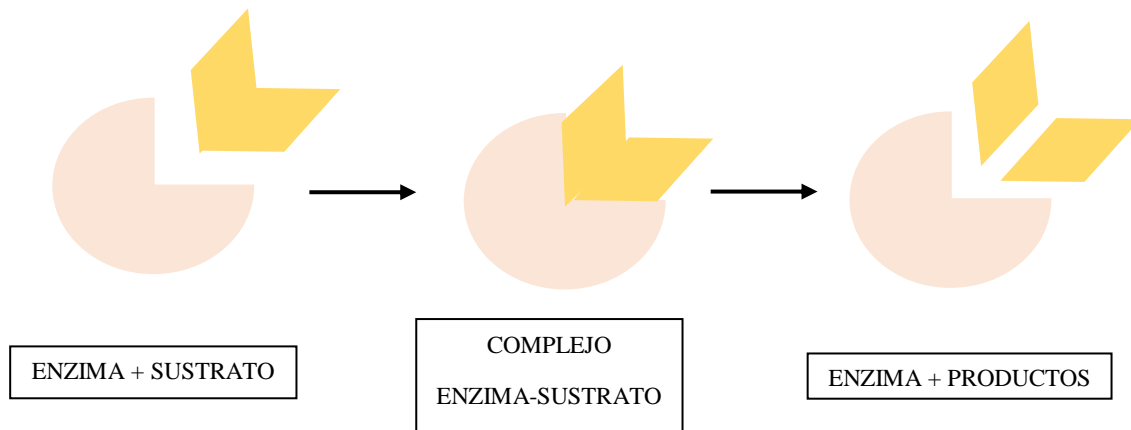


Figura 2. Complejo enzima-sustrato

3.1.2. Estructura

Las enzimas presentan todos los rasgos estructurales y propiedades químicas de las proteínas. En efecto, se ha podido comprobar que las enzimas pierden su actividad catalítica cuando sufren desnaturalización por efecto de los mismos agentes que afectan a las demás proteínas.

Las enzimas son proteínas globulares formadas por una o más cadenas polipeptídicas plegadas. La conformación tridimensional nativa intacta de la proteína enzimática resulta indispensable para que ésta desempeñe su función. Además, las enzimas, al igual que otras muchas clases de proteínas, presentan un centro activo a través del cual interactúan con los sustratos, mediante un acoplamiento espacial (las superficies moleculares de ambos tienen formas complementarias) y químico (grupos funcionales complementarios de la enzima y el sustrato establecen diferentes tipos de interacciones débiles entre sí).

3.1.3. Importancia en la industria alimentaria

Las enzimas tienen un papel fundamental en la industria alimentaria debido a que catalizan muchas reacciones que se llevan a cabo en los alimentos o en procesos alimentarios, tanto que el 30% de las enzimas que se producen industrialmente se utilizan en el área de alimentos y bebidas (Quirasco y López-Munguía, 2013).

Son una importante herramienta en el procesamiento, conservación y desarrollo de alimentos debido a la diversidad, especificidad y capacidad catalítica que poseen. Asimismo, tienen un papel relevante en la manufactura de materias primas de la industria alimentaria. La tecnología enzimática forma una parte esencial de la biotecnología de alimentos, como se constata en su aplicación en las industrias de panificación, productos lácteos, cárnicos y en la producción de edulcorantes, entre otras (Peña y Quirasco, 2014).

De formas más específica, se podría decir que la importancia de las enzimas en la industria alimentaria radica en las siguientes propiedades:

- Mejoran las propiedades sensoriales de los alimentos (color, aroma, textura...)
- Tienen un papel importante en la conservación de las características químicas y sensoriales durante el proceso y almacenamiento de los alimentos.
- Mejoran y aumentan la calidad de un producto en cuanto a su valor nutritivo, debido principalmente a que las vitaminas forman parte de la estructura de las enzimas.
- Hacen posible la obtención de productos determinados que sin el uso de enzimas serían imposibles de obtener debido, principalmente, a la velocidad de reacción (un ejemplo es la aceleración de la maduración del queso en la industria láctea).
- Son indicadores de calidad en cuanto a la eficacia de los tratamientos térmicos a los que se someten determinados productos.
- Permiten el desarrollo de nuevos productos (un ejemplo es el desarrollo de nuevas variedades de queso con características peculiares de sabor y textura).

3.2.Historia: uso de enzimas en la obtención de alimentos desde la antigüedad

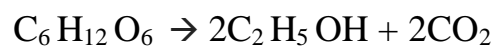
El uso de enzimas en alimentos procede de tiempos muy antiguos, desde siglos antes de que se supiera que se trataba de proteínas con actividad catalítica (Peña y Quirasco, 2014).

Las primeras aplicaciones se remontan al año 6.000 a. C., con la elaboración de alimentos como cerveza, pan, queso y vino, mientras que la primera oxidación microbiana intencionada se produjo en la elaboración de vinagre, en el año 2.000 a. C (Vasic-Racki, 2006).

Ya en el siglo XVIII, mucho antes de conocer el fenómeno de la catálisis, comenzaron a descubrirse agentes biológicos con capacidad catalítica (enzimas). Un ejemplo de ello fue cuando René Réaumur (1683- 1757) y Lázaro Spallanzani (1729-1799) establecieron la actividad digestiva del jugo gástrico o de la saliva, en las que eran protagonistas las enzimas (Aragón, 2009). Fue en este mismo siglo cuando Antoine-Laurent de Lavoisier (1743-1794) esclareció mediante sus estudios el proceso de fermentación alcohólica que tanto había preocupado a los investigadores desde la antigüedad (Babor e Ibarz, 1965). El estudio de la fermentación alcohólica fue sin duda el que más contribuyó al conocimiento de las enzimas y al desarrollo de la bioquímica moderna (Aragón, 2009).

A comienzos del siglo XIX, el Instituto Nacional de las Ciencias y las Artes de Francia convocó un premio que tenía como finalidad averiguar las características que distinguen las sustancias que actúan como fermentos de las que sufren la fermentación (Fruton, 1972), es decir, descifrar el problema central de la enzimología, que radicaba en conocer la diferencia entre lo que hoy conocemos como enzima y sustrato (Friedmann, 1981). Pero este problema no fue solventado hasta años más tarde.

Gay-Lussac (1778-1850) estableció la reacción del proceso de fermentación, según la cual una molécula de glucosa es dividida dando lugar a dos moléculas de dióxido de carbono y dos de etanol:



Esta reacción fue propuesta tras observar que al abrir botellas que contenían zumo de uvas, se iniciaba la fermentación en contacto con el aire. De manera que el fermento se formaba por acción del oxígeno disuelto en el líquido (Schlenk, 1997).

Conforme avanzaba el siglo XIX se producían más descubrimientos, concretamente en el año 1837, en el que Charles Cagniard-Latour (1777-1859), Theodor Schwann (1810-1882) y Friedrich T. Kützing (1807-1893) demostraron que el proceso de fermentación se llevaba a cabo mediante unos organismos vivos llamados levaduras. Schwann le mostró a Gay-Lussac que se equivocaba ya que la putrefacción que aparece tras pasar aire al medio fermentable ya hervido podía evitarse si el aire se calentaba a alta temperatura, lo que le llevo a concluir que la levadura era el agente responsable de la fermentación, que no se producía si se inactivaban las levaduras por efecto del calor (Aragón, 2009).

Pero el hallazgo de estos tres científicos no fue reconocido hasta que Pasteur lo corroboró mediante sus estudios, en los que demostró que efectivamente la fermentación era correlativa con el desarrollo y multiplicación de la levadura, la que consideraba como una “célula viva” exclusivamente cuando era fermentada. Esto marcó el comienzo de la microbiología moderna (Florkin, 1972).

Pero el descubrimiento más trascendental para la historia de la bioquímica no tiene lugar hasta 1897, cuando Eduard Buchner (1860-1917) descubre de forma accidental que un extracto de levadura es capaz de llevar a cabo la fermentación alcohólica, acabando así con la postura de Pasteur en cuanto a la necesidad de poseer una célula viva para que tenga lugar la fermentación. El químico supuso que la fermentación era resultado de la actividad de un complejo enzimático, que él llamó “zimasa”. Este descubrimiento es considerado como el nacimiento de la enzimología y con ello, el de la bioquímica moderna (Aragón, 2009).

3.3.Fuentes de obtención de enzimas

Dependiendo de las fuentes de producción de enzimas para uso industrial, podemos clasificar las enzimas como:

Enzimas microbianas: Se extraen principalmente de bacterias, hongos y levaduras que se desarrollan en la industria farmacéutica.

El 90% de las enzimas producidas en los procesos industriales son originadas por la fermentación de microorganismos (Lee, 2000).

Las células microbianas son consideradas la fuente más común de enzimas para uso industrial. La mayoría de las enzimas microbianas se producen a partir de aproximadamente 25 organismos, incluyendo una docena de hongos, pero se ha calculado que sólo el 2% de los

microorganismos existentes en el mundo han sido estudiados como fuente de enzimas (Bello, 2009).

Debido a la gran variedad de actividades catalíticas de las enzimas microbianas, son más útiles que las obtenidas de las plantas o animales. Además, pueden obtenerse en grandes cantidades de forma regular, de calidad uniforme y de forma barata. Asimismo, las enzimas microbianas son habitualmente más estables, y su proceso de producción es más fácil y seguro (Bello, 2009). Otra ventaja del uso de enzimas microbianas es que se puede incrementar el rendimiento de las células mediante la manipulación genética y ambiental. Esto puede llevarse a cabo fácilmente debido su corto periodo de regeneración y a sus simples exigencias nutritivas (Bello, 2009).

Un ejemplo de este tipo de enzimas es la peptidoglucano hidrolasa, producida por bacterias lácticas como *Pediococcus* y *Enterococcus*, aislada de productos cárnicos y quesos. En las investigaciones realizadas por García-Cano et al. (2014) se confirmó que estas enzimas poseen un efecto de bioconservación en alimentos, debido a su efecto inhibitorio contra bacterias patógenas como *Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes*.

Enzimas vegetales: Una fuente histórica de enzimas alimentarias son las proteasas vegetales obtenidas principalmente de las secreciones de papaya (papaína), higuera (ficina) y piña (bromelina). El uso de hojas de papaya para ablandar la carne dura es conocido desde antaño, y hoy en día la papaína es la enzima proteolítica más utilizada (Reed, 1966).

Ganguli y Bhalerao (1965) afirmaron que, debido a la relativa escasez de una enzima tan importante como es la renina, se han buscado enzimas sustitutivas a ésta, llegando a la creación de un “cuajo vegetal” mediante las enzimas de *Ficus carica* (higuera) y de *Streblus asper* (arbusto áspero siamés). Éstas producen cuajos muy similares a los producidos por la enzima original.

Enzimas animales: La industria cárnica es la fuente principal de enzimas derivadas del páncreas, estómago e hígado de animales, tales como la tripsina, lipasa y cuajo (quimosina y renina), que son producidas ultra puras en cantidades industriales. (Lee, 2000).

Las esterasas pregástricas son un ejemplo de enzimas sustitutivas del cuajo. Estas enzimas pueden extraerse de las glándulas extirpadas de vacas, corderos o cabras, que se encuentran en la base de la lengua. Debido a la semejanza en cuanto a pH y temperatura óptimos, se pueden considerar el reemplazamiento de la pasta de cuajo por un extracto de estas glándulas (Reed, 1966).

Estas enzimas son utilizadas en la fabricación de quesos italianos y de chocolate con leche debido a su aportación de sabores lácteos pronunciados, muy beneficiosos para estos productos (Schneider, 1961).

Ingeniería genética: quimosina recombinante

Las enzimas recombinantes surgen debido a la demanda creciente de enzimas con características catalíticas y de producción más adecuada para los requerimientos industriales. Estas enzimas se llaman así porque se obtienen de otro organismo diferente al que lo produce originalmente, a través de la ingeniería genética, que consiste en la transferencia de material genético del organismo original al nuevo o recombinante. Una de las aplicaciones más importantes es la producción de quimosina bovina en un organismo diferente al ternero. Esto surge debido a la gran demanda de esta enzima por parte de la industria quesera, y a que su obtención a partir de tejido animal es insuficiente. Para llevarlo a cabo se introduce el gen que codifica para la quimosina en una bacteria, de tal forma que actualmente se puede obtener una mayor cantidad de dicha enzima en menor tiempo, con la certeza de que la especificidad es la misma y que su consumo es seguro, según afirma Mohanty et al. (1999).

3.4. Clasificación de enzimas según sus funciones

En la siguiente tabla se presentan los ejemplos más representativos de las enzimas y su papel en la industria alimentaria y, específicamente, en la industria láctea.

Tabla 1. Las enzimas y sus funciones en la industria alimentaria y láctea.

TIPO DE ENZIMA Y FUNCIÓN	EJEMPLOS	FUNCIÓN EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA	IMPORTANCIA EN LA INDUSTRIA LÁCTEA
Oxidoreductasas: catalizan reacciones en las que un sustrato pierde un átomo de hidrógeno, gana un átomo de oxígeno o pierde un electrón	Glucosa oxidasa	Obtención de masa panaria más firme	
	Lacasa	Clarificación de jugos y blanqueamiento del pan	
	Lipoxigenasa	Refuerzo de la masa panaria y blanqueamiento del pan	
Transferasas: catalizan la transferencia de un grupo activo (obtenido de la ruptura de ciertas moléculas) de un sustrato a otro	Ciclodextrina	Estabiliza aromas y elimina sabores no deseados	
	Glucosiltransferasa	Síntesis de polímeros de glucosa	
	Fructosiltransferasa	Síntesis de los oligómeros de glucosa	
	Transglutaminasa	Modificación de las propiedades viscoelásticas, procesamiento de la masa panaria y procesamiento de la carne	Mejora las propiedades físicas y funcionales del suero lácteo y las propiedades reológicas del yogur de leche de cabra

Hidrolasas: catalizan las reacciones de hidrólisis con la obtención de monómeros a partir de polímeros	Amilasa	Licuefacción de almidón y sacarificación. Aumenta la vida útil y mejora la calidad. Suavidad y volumen de pan, asegurando una fermentación uniforme de la levadura. Tratamiento de zumos y cerveza baja en calorías.	
	Galactosidasa	Reducción de la viscosidad en altramuces y leguminosas de grano utilizadas en la alimentación animal y mejora de la digestibilidad	
	Glucanasa	Reducción de la viscosidad en la cebada y la avena utilizadas en la alimentación animal y mejora de la digestibilidad	Mejora la digestibilidad de los lácteos
	Glucoamilasa	Sacarificación	Mejora la digestibilidad de los lácteos
	Invertasa	Hidrólisis de sacarosa y producción de jarabe de azúcar invertido	Se utiliza en la preparación de lactasa comercial y afecta a los derivados lácteos en cuanto a su dulzor
	Lactasa		Hidrólisis de lactosa y suero de leche
	Lipasa	Emulsificación in situ para el acondicionamiento de la masa, soporte para la digestión de lípidos en animales jóvenes y síntesis de moléculas aromáticas	Produce el sabor característico de los quesos
	Proteasa	Hidrólisis de proteínas, mejora de la digestibilidad y ablandador de carne	Coagulación de la leche, formulación de alimentos para lactantes poco alergénicos y mejora el sabor de la leche y del queso
	Pectinasa	Maximiza el rendimiento en la producción de jugos y ayuda en el proceso de fabricación de vino	
	Peptidasa	Hidrólisis de proteínas (soja, gluten) para sabores salados	Maduración de quesos
	Fosfolipasa	Emulsificación in situ para el acondicionamiento de la masa panaria	
	Fitasa	Liberación de fosfato del fitato y mejora de la disponibilidad mineral en alimentos	
	Pululanasa	Sacarificación	
Xilanasas	Reducción de la viscosidad, y mejora el acondicionamiento y digestibilidad de la masa panaria		

Liasas: catalizan reacciones de ruptura o soldadura de sustratos	Acetolactato descarboxilasa	Maduración de la cerveza	
Isomerasas: catalizan la interconversión de isómeros, es decir, actúan sobre determinadas moléculas obteniendo sus isómeros de función o posición	Xilosa	Isomerización de glucosa a fructosa	

3.5.Desarrollo de las enzimas más importantes para la obtención de productos lácteos

La Industria láctea se encarga principalmente de la producción de leche de consumo directo, productos obtenidos a partir de la grasa de la leche (nata y mantequilla), leches fermentadas (yogur) y quesos (madurados y no madurados).

En la siguiente figura se muestra la producción de distintos productos lácteos, expresada en toneladas/año, en los países del Arco Mediterráneo.

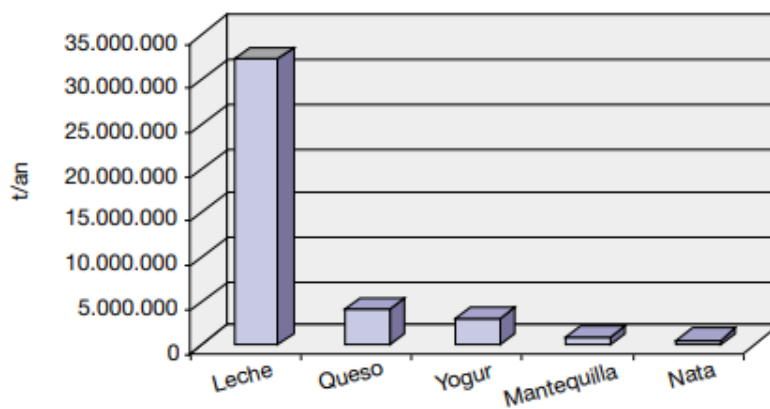


Figura 3. Producción de productos lácteos en los países del Arco Mediterráneo.

Obtenida en: www.cprac.org/docs/lac_es

España tiene 33.105 empresas agroalimentarias lo que supone el 14% de la industria española y el subsector lácteo cuenta con 1.511 empresas, es decir, el 5% de todas las empresas agroalimentarias (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, 2002).

Como ya se ha descrito anteriormente, las enzimas son imprescindibles en la industria alimentaria, pero especialmente, en la industria láctea juegan un papel fundamental, ya que, además de mejorar y acelerar los procesos, nos permiten desarrollar nuevos productos lácteos al modificar sus características.

Una de las funciones de las enzimas lácteas es la de transformar sustancias para dar productos atractivos desde el punto de vista gustativo o visual, o para aumentar su conservación (Bello, 2009).

En este apartado se van a estudiar las principales enzimas utilizadas en la obtención de diferentes productos lácteos, como son la lactasa, lipasa, tripsina, pepsina y renina.

3.5.1. Lactasa

La lactosa, también conocida como el azúcar de la leche, es un disacárido que al hidrolizarse produce un mol de glucosa y uno de galactosa. Esta hidrólisis se debe a una enzima llamada β -galactosidasa o, más comúnmente, lactasa (Reed, 1966).

Esta enzima puede encontrarse en las plantas (almendras, melocotones, albaricoques y manzanas), aunque no se suelen utilizar como fuente de lactasa. También se encuentra en muchos microorganismos, que son considerados la mejor fuente de obtención de lactasa para el uso comercial, como es el caso de *E. coli*, *A. niger* y algunas de las levaduras que fermentan la lactosa. Por último, la lactosa puede encontrarse también en los intestinos de animales que amamantan a sus crías, donde se han realizado diferentes estudios para observar la relación existente entre la alimentación con lactosa durante la lactancia y la concentración de lactasa en el tracto intestinal. Doell y Kretschmer mediante sus estudios realizados en 1962 observaron que ésta aumenta durante las últimas etapas del desarrollo del feto y disminuye después del nacimiento.

El estudio de lactasa tiene gran importancia ya que permite la conversión de un azúcar relativamente insoluble con un bajo grado de dulzor en una mezcla más dulce de monosacáridos (glucosa y galactosa) que no cristaliza (Reed, 1966).

Debido a esta conversión, la lactasa se utiliza para obtener alimentos sin este azúcar, imprescindibles para las personas con intolerancia a la lactosa. Este trastorno tiene una incidencia entre el 50 y 70% de la población adulta a nivel mundial en distintos grados. Se trata de un trastorno causado por la carencia o baja producción de lactasa, por lo cual, el organismo no produce la enzima necesaria para digerir la lactosa de los

productos lácteos y como consecuencia se padecen diversos malestares estomacales al ingerirla (Bello, 2009).

Para el uso en la industria láctea, se han obtenido preparaciones de enzimas productoras de levaduras y hongos de lactasa. Las levaduras que se encuentran normalmente en los lácteos (*S. fragilis* y *C. pseudotropicalis*) son fermentadores de lactosa eficientes, es decir, poseen un sistema enzimático capaz de hidrolizar la lactosa (Reed, 1966).

La adición de distintos compuestos puede dar lugar a la activación o inhibición de las enzimas. Por ejemplo, algunos metales como el cobre y el hierro la inhiben, mientras que la adición de compuestos reductores como la cisteína, el sulfuro de sodio, el sulfito de sodio o el metabisulfito de potasio la activan y son capaces de superar el efecto inhibitorio de los metales (Stimpson y Stamberg, 1956).

También es interesante destacar que la lactosa de la leche desnatada o del suero de leche se hidroliza más fácilmente que la de la leche entera, así como la lactosa de los productos pasterizados se hidrolizan más fácilmente que la de los productos no pasterizados (Reed, 1966).

3.5.2. Lipasa

Las lipasas son enzimas encargadas de hidrolizar la grasa que contiene la leche, creando compuestos que generan aroma y sabor, como el ácido butírico, que, además, puede ser convertido en aldehídos y cetonas, que también aportan aromas en los quesos (Reed, 1966).

La grasa se encuentra en la leche en forma de pequeñas esferas de 4 μm de diámetro y los glóbulos se encuentran estabilizados por diferentes compuestos que los rodean, como fosfolípidos, proteínas y glicéridos. Cabe destacar que normalmente la tasa de hidrólisis es más lenta cuanto mayor es el tamaño de los glóbulos grasos, como se puede comprobar en los estudios realizados por Chandan y Shahani (1963b, 1964).

Las lipasas son enzimas ubicuas, ya que se encuentran en animales, plantas, hongos y bacterias, sin embargo, las que se producen industrialmente provienen de microorganismos, principalmente de hongos (Reed, 1966).

Se caracterizan por tener la capacidad de operar en la interfaz entre una fase acuosa y una no acuosa, ya que su estructura presenta una especie de “tapa” que cubre al sitio activo (que es el lugar donde se lleva a cabo la hidrólisis). Cuando la enzima se

encuentra en la interfaz, la tapa se abre, dejando expuesto el sitio activo (Derewenda, et al., 1992). Por todo esto, las lipasas cumplen una función biológica: catalizar la hidrólisis de lípidos (triacilglicerolos, grasas, aceites).

La reacción de estas enzimas produce la lipólisis enzimática (imprescindible en el desarrollo del aroma característico de muchos quesos), que puede observarse en la siguiente figura, en la que un triglicérido (a) (molécula que tiene unidos 3 ácidos grasos al glicerol mediante un enlace éster) es hidrolizado por la lipasa, generando así ácidos grasos libres (b) y glicerol (c).

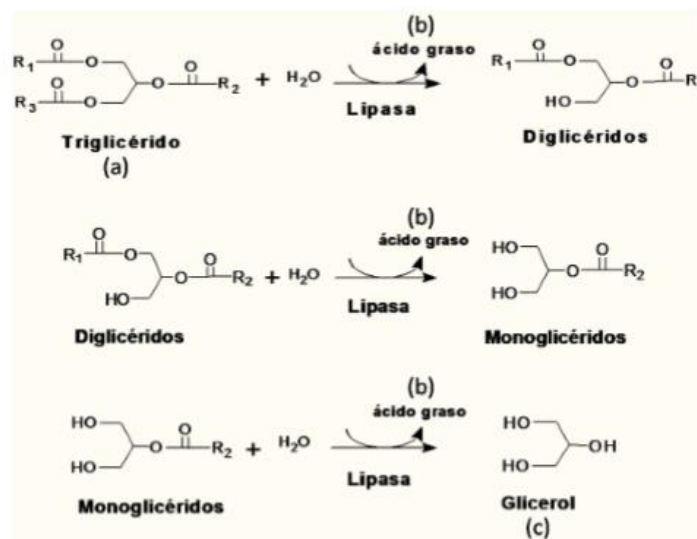


Figura 4. Reacción catalizada por lipasas. (Derewenda, et al., 1992)

En la actualidad, existe una gran producción de lipasas a escala industrial, que se utilizan principalmente en reacciones de hidrólisis para el desarrollo de sabor y aroma en productos lácteos y en el procesado de otros alimentos (Peña y Quirasco, 2014).

La lipasa de la leche es inhibida por metales pesados (cobalto, cobre y níquel), por el oxígeno y por reactivos de sulfhidrilo (Chandan y Shahani, 1963a, b). La lipasa también es muy sensible a pequeñas concentraciones de algunos antibióticos, como la penicilina (Shahani y Chandan, 1962).

3.5.3. Proteasa: tripsina, pepsina y renina

Las proteasas son enzimas encargadas de la hidrólisis de proteínas, que tiene como consecuencia la generación de péptidos, que además de cumplir con su función nutricional, como cualquier otra proteína, son capaces de ejercer efectos biológicos benéficos específicos, por lo que se les denominan péptidos bioactivos o biopéptidos (Kumar y Bhalla, 2005; Costa, Rocha y María, 2007; Dziuba, Dziuba y Iwaniak, 2009).

Los biopéptidos pueden impactar positivamente en la salud del consumidor por medio del sistema inmune, gastrointestinal, nervioso, cardiovascular y al estado nutricional (Dziuba y Darewicz, 2007; Jauhianen y Korpela, 2007; Hajirostamloo, 2010; Ruíz-Giménez et al., 2012).

Hasta la fecha se han aislado una gran variedad de biopéptidos de la leche y de productos lácteos tales como: suero (Ijas et al., 2004, Wang et al., 2010), leches fermentadas con bacterias ácido lácticas (BAL) (Ferreira y Eca, 2007), yogurt (Donkor et al., 2007) y quesos tales como cheddar (Haileselassie, Lee y Gibbs, 1999) y manchego (Gómez-Ruíz, Ramos y Recio, 2004).

Las tres enzimas proteasas relacionadas con la industria de los productos lácteos son la tripsina, pepsina y renina:

a. Tripsina

La tripsina es una endopeptidasa que se forma en el tracto intestinal de muchos animales a partir de un precursor inactivo. Posee una especificidad bastante estrecha para ciertos enlaces peptídicos y es inhibida por los inhibidores proteicos naturales. Todas estas características, junto con su importancia como una de las principales enzimas digestivas y su disponibilidad inmediata, hacen de la tripsina una enzima de gran interés (Reed, 1966).

La tripsina se forma como un precursor inactivo, el tripsinógeno, que se excreta por la glándula pancreática y se activa en el tracto intestinal por ácidos o proteasas. Por lo que la tripsina desempeña un papel fundamental en la activación de enzimas pancreáticas y al catalizar su propia formación a partir del tripsinógeno, el proceso puede ser denominado autocatalítico (Reed, 1966).

Cabe destacar que este mecanismo de activación no siempre funciona así, ya que posee un inhibidor de la proteína en el páncreas que si se combina lentamente con la tripsina puede formar un complejo inactivo que evita el funcionamiento del mecanismo de activación (Reed, 1966).

En presencia de calcio, la reacción autocatalítica avanza rápidamente, pero en su ausencia, se forma una cantidad considerable de proteína inactiva a partir del tripsinógeno (Reed, 1966).

b. Pepsina

La pepsina se forma a partir de su precursor, el pepsinógeno, que se encuentra en la mucosa del estómago de los animales. Como en el caso anterior, el pepsinógeno se convierte en pepsina mediante un ácido o mediante autocatálisis. La activación se produce con la formación de cinco péptidos además de la pepsina. Uno de ellos se encuentra unido a la pepsina cuando los valores de pH son superiores a 5, actuando como inhibidor, por lo que la activación es autocatalítica solo a valores de pH menores a 5 (Reed, 1966).

La pepsina se usa en la precipitación de cuajadas de caseína y, en menor proporción, en el proceso de elaboración de la cerveza y en la formulación de tónicos y chicles (Reed, 1966).

Por último, cabe destacar que, la pepsina, a diferencia de la tripsina y quimiotripsina, no hidroliza ésteres o amidas de los α -aminoácidos (Bovey y Yanari, 1960). La enzima muestra una gran especificidad para los enlaces peptídicos, favoreciendo los de los aminoácidos aromáticos adyacentes.

c. Renina

La renina es una enzima que se obtiene del jugo del cuarto estómago del becerro. Es importante diferenciar esta enzima con los extractos de cuajo que se producen a partir de estómagos de terneros, corderos y cabras. Esta enzima se obtiene, como en los casos anteriores, a partir de su precursor inactivo, la prorrenina. Se usa principalmente para la fabricación de queso.

La renina participa activamente en el mecanismo de coagulación de la leche, convirtiendo la caseína en para-caseína, que precipita en presencia de iones de calcio. Esta precipitación forma lo que conocemos como cuajada, y el líquido restante es conocido como suero. En la producción de leche evaporada se elimina el calcio o se añade citrato o fosfato, lo que disminuye o elimina la tendencia a la coagulación (Reed, 1966).

4. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Las enzimas son proteínas que actúan como catalizadores en las reacciones químicas que tienen lugar en los tejidos vivos. Gracias a que aumentan notablemente la velocidad de las reacciones, éstas pueden ser posibles.

En la industria alimentaria, las enzimas están involucradas en múltiples aspectos de la producción de alimentos. Así, éstas se pueden agregar en alguna de las etapas de un proceso, o bien pueden ser elaboradas por los microorganismos presentes en la etapa de fermentación.

La utilización de enzimas en la industria alimentaria, tanto para la obtención de materias primas, como para la elaboración de productos, es prácticamente imprescindible hoy en día. Por ello, su estudio es muy relevante en el área de la Tecnología de los Alimentos. En particular, en la industria láctea, las enzimas son imprescindibles para la elaboración de la mayor parte de los derivados de la leche que se consumen de forma habitual.

En este trabajo se pretende clasificar las enzimas según sus funciones específicas (oxidoreductasas, transferasas, hidrolasas, liasas, isomerasas y ligasas) y analizar su papel en la obtención de los distintos productos lácteos que hay en el mercado (queso, yogurt, leche sin lactosa, etc).

El objetivo de este trabajo es realizar una revisión bibliográfica sobre los aspectos más importantes de las enzimas en la industria alimentaria, señalando la importancia que han tenido a lo largo de la historia en el desarrollo de la industria láctea. Se comenzará por describir generalidades de las enzimas: qué son, cómo actúan, cómo evolucionó su descubrimiento a lo largo de los años, sus fuentes de obtención, etc. Posteriormente, se realizará una revisión de los métodos de obtención de enzimas y seguidamente, un análisis y clasificación de las aplicaciones más relevantes para la industria alimentaria, haciendo énfasis en nuevos procesos y en los principales productos obtenidos.

5. METODOLOGÍA

Para realizar un trabajo de revisión bibliográfica es fundamental realizar una búsqueda detallada del tema objeto de estudio. Dado que actualmente existe mucha información y el tema escogido es tan amplio, se han seguido una serie de pautas recomendadas en el curso “*Guía de herramientas y pautas para un buen TFG: Ciencia y Tecnología de los Alimentos 2018-2019*” (Biblioteca de la Universidad de Zaragoza, 2018), documento aportado por la Biblioteca de la Facultad de Veterinaria.

Para el desarrollo de este Trabajo de Fin de Grado se han utilizado publicaciones científicas de diferentes bases de datos como las que se nombran a continuación:

Alcorze: según la Biblioteca de la Universidad de Zaragoza (2018) es una herramienta de búsqueda unificada que permite acceder a la mayoría de los recursos de información disponibles en la colección de la BUZ, tanto de fuentes internas (catálogo de la biblioteca, repositorio institucional Zaguán) como externas (bases de datos). También localiza publicaciones en acceso abierto.

Google Académico: es un buscador especializado en el mundo de la investigación científica que permite localizar artículos de carácter académico procedentes de diversas fuentes (Biblioteca de la Universidad de Zaragoza, 2018).

ScienceDirect: es un portal sobre ciencia y tecnología de la empresa Elsevier que permite la búsqueda y recuperación de artículos de las revistas y libros de la propia editorial (Biblioteca de la Universidad de Zaragoza, 2018).

Web of Science: según FECYT (2019), es una plataforma que recoge las referencias de las principales publicaciones científicas de cualquier disciplina desde 1945, esenciales para el apoyo a la investigación y para el reconocimiento de los esfuerzos y avances realizados por la comunidad científica y tecnológica.

Además de utilizar las bases de datos mencionadas anteriormente, se obtuvieron varios artículos de revistas científicas como “*Revista Digital Universitaria (RDU)*”, “*Revista Científica*”, “*Journal of Dairy Science*”, “*Journal of Food Science and Technology*”, “*International Dairy Journal*”, etc.

Como se mencionó anteriormente, la búsqueda bibliográfica fue realizada siguiendo una serie de pautas que dio lugar a la siguiente estructura (Biblioteca de la Universidad de Zaragoza, 2018):

- Búsqueda inicial: se utilizó para descubrir cuándo y cuánto se había escrito sobre el tema, además de para obtener una idea global. También permitió descartar otros temas que no guardaban tanta relación. Para ello, en primer lugar, se realizó una búsqueda general en Internet para obtener información de los aspectos más básicos. Una vez hecho esto, se profundizó más sobre el tema realizando búsquedas bibliográficas en diferentes bases de datos como *ScienceDirect* y *Web of Science*. También se utilizaron a menudo los buscadores *Alcorze* y *Google Académico*, que permitieron obtener artículos de calidad académica.

Las palabras clave más utilizadas fueron “Enzymes”, “Dairy Industry”, “Food Processing”, “Enzyme Engineering”, “Biochemistry”, “Lactase”, “Renin”, “Immobilized Enzymes”, combinándolas tanto en inglés como en español.

En la siguiente figura se muestra el número de artículos publicados a lo largo de los años en la base de datos *ScienceDirect*, utilizando las palabras claves: “*Enzyme*” “*Dairy*” y “*industry*”. Como se puede observar, existe un aumento progresivo a lo largo de los años, percibiéndose un crecimiento exponencial desde 2012 hasta ahora.



Figura 5. Artículos publicados por año en ScienceDirect.

Gracias a la selección de estos primeros artículos se pudo elaborar un índice con diferentes apartados sobre los que se debía tratar en el Trabajo de Fin de Grado.

- **Búsqueda sistemática:** una vez planificada la estrategia de búsqueda, se establecieron descriptores o palabras clave y el campo y el periodo de búsqueda. Gracias a esto, se seleccionaron artículos de forma más ordenada, a la vez que se organizaron en diferentes carpetas en función del tema tratado.
- **Búsqueda interna:** en ella, se utilizaron las citas y bibliografía de los artículos encontrados para realizar una última búsqueda y selección.

Una vez terminada la búsqueda, se realizó un esquema y un resumen de cada uno de los artículos que contenían la información más relevante relacionada con este trabajo, para poder manejar más fácilmente toda la bibliografía consultada.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Métodos de obtención de enzimas en la industria láctea

- **Extracción:** es un método para la obtención de enzimas que se producen en tejidos de plantas, tejidos animales o dentro de las células microbianas. Es muy importante que estas enzimas se obtengan mediante una solución acuosa.

En primer lugar, se debe producir una molienda, que dependiendo del tipo de tejido del que queramos obtener la enzima, se realizará de una forma u otra:

- En tejidos secos se muele hasta conseguir un tamaño de partícula fino
- En tejidos húmedos se produce una molienda u homogenización hasta que se desintegra
- En células microbianas se produce una molienda mediante métodos abrasivos, ultrasonidos o lisis hasta producir la desintegración completa de ésta.

El siguiente paso consiste en una extracción de enzimas utilizando agua o soluciones tampón apropiadas.

Seguidamente se procede a la filtración o ultrafiltración para eliminar los desechos insolubles.

En el caso de la obtención de enzimas extracelulares microbianas, se deben filtrar junto con los componentes insolubles para así, hacer posible la obtención de las enzimas que se encuentran en los medios de cultivo. Para facilitar la filtración se utilizan tierras de diatomeas o soluciones enzimáticas crudas (Reed, 1966).

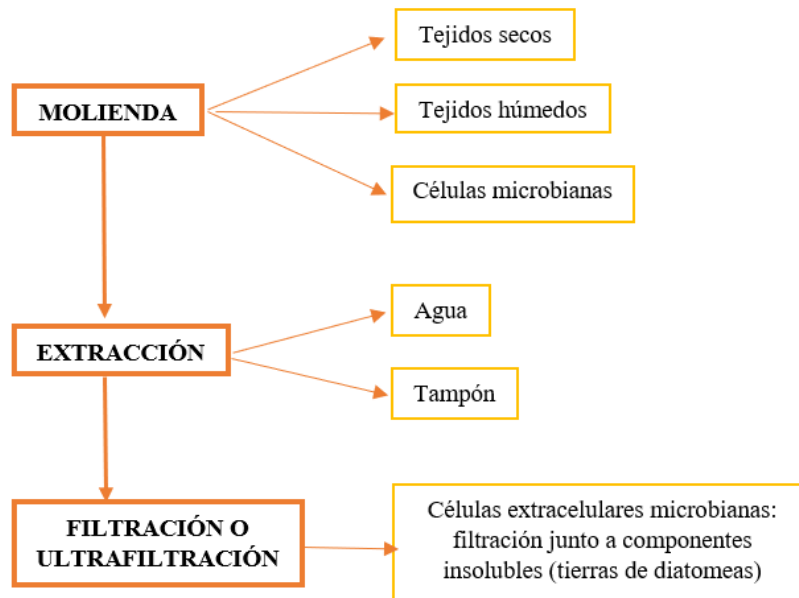


Figura 6. Diagrama de flujo de la extracción de enzimas.

- **Concentración y purificación:** el método de concentración de enzimas se consigue mediante una evaporación a vacío con temperaturas relativamente bajas. De esta forma se obtienen enzimas no purificadas, es decir, no contienen únicamente la enzima deseada, sino que se encuentra acompañada de otras enzimas y de materiales orgánicos e inorgánicos, principalmente proteínas, carbohidratos y cenizas.

Para conseguir una mayor concentración y una separación de las impurezas solubles más gruesas, la enzima debe someterse a una precipitación (Reed, 1966).

Esta precipitación puede ser obtenida mediante la adición de sales, por el cambio de pH o potencial iónico, o por la adición de solventes (orgánicos, inertes o polímeros) (Harris y Angal, 1995).

- **Precipitación por punto isoelectrico:** consiste en ajustar el pH de la solución a uno igual al punto isoelectrico de la enzima que se quiera obtener, aunque sin llegar a valores extremos de pH que pueden causar la desnaturalización. El punto

isoelectrico es el pH al que una enzima, en este caso, tiene carga neta cero, es decir, cuando la solubilidad de la sustancia es casi nula. Este método es posible gracias a que la superficie de las proteínas se encuentra cargada, es decir, cubierta por grupos que se encuentran cargados tanto positiva como negativamente. Esto tiene que ver con el punto isoelectrico, ya que se dice que la proteína se encuentra por encima del punto isoelectrico cuando su superficie está cargada negativamente, y al revés, cuando está cargada positivamente se dice que se encuentra por debajo del punto isoelectrico (Harrison et al., 2003). En cualquier caso, si las moléculas se encuentran con la misma carga que la superficie son repelidas. Para que la repulsión no ocurra, se debe alcanzar el punto isoelectrico y así, las cargas positivas y negativas de la superficie se neutralizan unas con otras, dando lugar a un precipitado que se forma debido a la atracción entre las moléculas de proteína (Harris y Angal, 1995).

Se pueden utilizar ácidos para acercar el pH de la solución al punto isoelectrico y provocar la precipitación. En la industria alimentaria se suelen emplear ácidos minerales como el fosfórico, clorhídrico y sulfúrico, que presentan la ventaja de ser económicos (Harrison et al., 2003).

- Precipitación por salado o “salting-out”: este método depende de la naturaleza hidrofóbica de la superficie de la proteína. Los grupos hidrofóbicos predominan en el interior de ésta, pero algunos se localizan en diferentes regiones de la superficie; el agua es puesta en contacto con la superficie, haciendo que estas regiones no queden expuestas; cuando la sal es agregada, el agua solvata los iones de la sal, y mientras la concentración de sal se incrementa, el agua es evacuada de los alrededores de la proteína, exponiendo las regiones hidrofóbicas. Dichas regiones en las proteínas pueden interactuar mutuamente o con las de otras moléculas, provocando una aglomeración. De esta forma las proteínas con regiones hidrofóbicas más abundantes formarán agregados y se precipitarán más rápidamente que aquellas con pocas regiones (Harris y Angal, 1995).

La precipitación por salado se considera un método seguro para la obtención de enzimas, ya que presenta una ventaja y es que las sales utilizadas estabilizan las proteínas contra la desnaturalización, además de que evitan en la medida de lo posible la proteólisis y la contaminación bacteriana (Harris y Angal, 1995).

La sal más utilizada en el salting-out es el sulfato de amonio $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$ debido principalmente a su alta solubilidad. Otra ventaja de utilizar esta sal es que los precipitados que se forman son muy estables durante años, por lo que suele emplearse en enzimas comerciales.

La única desventaja que posee el sulfato de amonio es que no puede ser utilizada por encima de un pH de 8, debido al efecto tampón del amoniaco. Por lo que en los casos en los que se necesite realizar una precipitación por encima de este valor de pH, se utilizará citrato de sodio como alternativa (Harrison et al., 2003).

Debido a que en estos dos métodos de concentración de enzimas se usan distintos compuestos para provocar la precipitación, pueden ser utilizados uno tras otro para la misma enzima, consiguiendo así maximizar la extracción.

Es importante que la precipitación se realice a temperaturas bajas durante un tiempo corto para evitar la desnaturalización y la pérdida de la actividad enzimática. Además, para conseguir un precipitado con buenas características físicas, se utilizan azúcares, almidón y tierras de diatomeas (Reed, 1966).

Seguidamente, para la recuperación de los precipitados se lleva a cabo una filtración o centrifugación, o un lavado o resuspensión en un tampón adecuado (Harris y Angal, 1995).

Por último, se realiza un secado en secadores atmosféricos o de vacío.

En el caso de querer conseguir enzimas con alto nivel de pureza, deben ser sometidas a unos tratamientos de purificación, como la precipitación fraccionada, adsorción y elución diferencial, cromatografía, electroforesis, diálisis, cristalización y centrifugación. Cada enzima requiere su propia secuencia de pasos específicos para una purificación exitosa, que solo puede establecerse empíricamente. En muchos casos se puede obtener pureza enzimática, y con frecuencia las enzimas se pueden obtener en forma cristalina, pero esto no es una garantía de pureza absoluta (Reed, 1966).

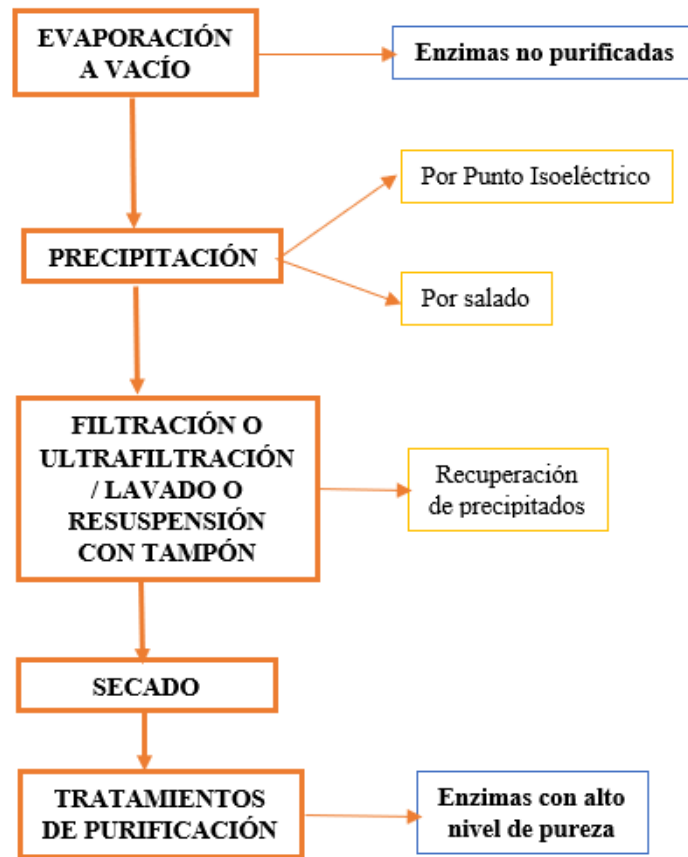


Figura 7. Diagrama de flujo de la concentración y purificación de enzimas.

Uno de los métodos más empleados para la purificación de enzimas es el de ultrafiltración, que consiste en pasar una solución a través de una membrana semipermeable mediante una fuerza transmembranal (Harris y Angal, 1995). Los poros de estas membranas tienen un diámetro entre 1 y 20 nm (Harris y Angal, 1995), que son lo suficientemente pequeños como para ser selectivos a los tamaños y formas de las moléculas disueltas y separar de esta manera el retenido del permeado.

Esta técnica de separación mediante membranas de ultrafiltración se utiliza en la obtención y purificación de moléculas solubles en agua y con alto valor añadido, puesto que presenta una serie de ventajas, ya que evita la desnaturalización térmica al no utilizar altas temperaturas y evita también el empleo de agentes químicos (Jaouen et al., 1999). Esta técnica es muy utilizada en la industria láctea para la concentración de enzimas (Weatherley, 1994).

- **Estabilización, normalización y formulación:** no es un método de extracción como tal, sino una forma de conservar los productos enzimáticos comerciales una vez han sido extraídos.

Estos productos se venden como productos líquidos o sólidos, ya sea como concentrados o, más comúnmente, diluidos en soluciones estándar.

En el caso de que los productos sean líquidos, pueden requerir la presencia de estabilizadores para evitar el crecimiento microbiano o la pérdida de la actividad enzimática durante su almacenamiento. Los estabilizantes utilizados incluyen benzoato de sodio, ésteres de ácido parahidroxibenzoico, glicerol, propilenglicol, sorbitol y cloruro de sodio (Reed, 1966).

En cambio, a los productos sólidos se les añaden diluyentes como almidón, lactosa, dextrosa, sacarosa, harina, sales, gelatina y caseína (Reed, 1966).

También se utilizan otros compuestos en la formulación de productos enzimáticos tanto sólidos como líquidos para mantener las condiciones favorables de pH, actividad enzimática y estabilidad, como, por ejemplo, tampones y otras sales como citratos, fosfatos y sulfato de calcio (Reed, 1966).

Por último, cabe destacar que en los casos en que se practica la filtración del producto alimenticio después del tratamiento enzimático, los diluyentes pueden incluir tierra de diatomeas (Reed, 1966).

Una vez explicados los métodos generales de obtención de enzimas (todos ellos aplicables a la industria láctea), a continuación, se describe de forma detallada un ejemplo de extracción enzimática en la industria láctea:

Montiel et al. (2005) realizaron una investigación sobre la optimización de extracción de lactasa, que es una enzima exclusivamente intracelular en *Kluyveromyces marxianus* ATCC 8554.

Para su liberación existen diversos métodos de extracción, dependiendo de su localización dentro de la célula, intenciones de uso y estabilidad (Becerra, Rodríguez y Cerdán, 2001). Uno de los métodos más utilizados para la extracción de lactasa a partir de levaduras es el uso de solventes orgánicos como el tolueno, cloroformo y alcohol isoamílico (Becerra, Rodríguez y Cerdán, 2001). La selección del solvente debe considerar el hecho de que el

agente extractor es debe ser capaz de penetrar la pared celular y alcanzar la membrana citoplasmática (Fenton, 1982). Entre los solventes orgánicos, el tolueno es el agente más usado ya que disuelve considerablemente el material celular sin ruptura de la pared (Becerra, Rodríguez y Cerdán, 2001; Fenton, 1982; Jordao, Brandi y López, 2001).

En este experimento se consiguió reducir el tiempo requerido para la extracción de la lactasa de *K. marxianus* ATCC 8554 permeabilizadas con tolueno. Esto fue posible gracias a una adecuada combinación de los parámetros: pH, temperatura y tiempo, bajo una adecuada concentración de sales tampón (Montiel et al., 2005).

6.2. Inmovilización de enzimas

La inmovilización de enzimas se define como el proceso en el que se localiza a la enzima en una región definida en el espacio, para dar lugar a formas insolubles que retienen su actividad catalítica y pueden ser reutilizadas repetidamente (Wingard, 1972). Actualmente esta definición se ha ampliado a aquel proceso por el cual se restringen completa o parcialmente, los grados de libertad de movimiento de enzimas por su unión a un soporte (Taylor, 1991).

Antes de descubrir este proceso de inmovilización, el empleo de enzimas no se encontraba generalizado en los procesos químicos industriales debido a que la mayoría de las enzimas no eran estables en las condiciones de trabajo y, además, al ser solubles en agua, su separación de los sustratos y productos era difícil, por lo que no se podían reutilizar (Arroyo, 1998).

Con la inmovilización de enzimas se ha conseguido superar estos inconvenientes, permitiendo que el proceso biotecnológico sea económicamente rentable (Arroyo, 1998).

El empleo de enzimas inmovilizadas presenta una serie de ventajas (Hartmeier, 1985) como el aumento de la estabilidad de la enzima, su reutilización que disminuye los costes del proceso y la posibilidad de diseñar un reactor enzimático de fácil manejo y control.

También cabe destacar que este proceso biotecnológico presenta una serie de inconvenientes (Martinek y Mozhaev, 1987), como por ejemplo la alteración que sufre la conformación de la enzima respecto a su estado nativo, la gran heterogeneidad del sistema enzima-soporte donde pueden existir distintas fracciones de proteínas inmovilizadas con un diferente número de uniones al soporte, la pérdida de actividad de la enzima ocasionada durante la inmovilización y el coste elevado del biocatalizador.

6.2.1. Métodos de inmovilización de enzimas

Los métodos de inmovilización consiguen retener una o varias enzimas en un sistema sólido, conservando parcialmente sus propiedades biológicas y permitiendo el transporte de los sustratos y de los productos entre la fase móvil y el material activo. Para seleccionar un método de inmovilización se deben conocer los cambios en las propiedades físicas y químicas que pueden producirse durante la inmovilización de la enzima y las posibles modificaciones del soporte o interacciones enzima-soporte que pueden ocurrir (Mammarella, 2001).

Respecto del método de inmovilización, resulta muy difícil a priori, definir la conveniencia de uno u otro en una aplicación específica. Por lo tanto, para cada aplicación se debe encontrar un procedimiento de inmovilización sencillo y barato con el que se obtenga un producto que conserve la actividad y que tenga elevada estabilidad operacional (Wiseman, 1991).

La importancia del estudio de inmovilización de enzimas lácteas reside en la imposibilidad de usarlas de manera discontinua, como es el caso de la lactasa, en la que la hidrólisis discontinua solo sería viable comercialmente hablando cuando las lactasas se añadan a los contenedores de leche durante el envasado, de forma que la lactosa se hidrolizase durante el transporte y almacenamiento de la leche (Mammarella, 2001).

La enzima β -Galactosidasa obtenida de distintas fuentes, ha sido inmovilizada con relativo éxito en una gran variedad de soportes a escala de laboratorio: en soportes inorgánicos, colágeno, agarosa, así como en geles de poliacrilamida y fibras de acetato de celulosa (Okos, Grulke y Syverson, 1978; Hannibal-Friedrich, Chun y Sernetz, 1980; Bernal y Pavel, 1985; Siso, 1993; Wang y Ruckenstein, 1993; Carrara y Rubiolo, 1994). Células microbianas productoras de β -Galactosidasa se han inmovilizado en geles de poliacrilamida. El soporte a utilizar, el método de inmovilización escogido y la aplicación que se le dé a la preparación influyen en la elección de la fuente enzimática (Roberts, 1977). En general, los métodos de inmovilización se pueden clasificar en dos grandes categorías: la retención física y la unión química (Kennedy y Cabral, 1983).

6.2.2. Efectos de la inmovilización

A menudo, la inmovilización altera significativamente el comportamiento de las enzimas. Se producen cambios ventajosos en su estabilidad, ya que generalmente se observa un incremento de ésta debido a diferentes razones como:

- La existencia de uniones enzima-soporte que provocan que la estructura terciaria de la enzima adquiera una mayor rigidez y se haga más resistente a la desactivación térmica o química.
- La protección frente a proteasas en el medio.
- Se evita la agregación intermolecular al mantener a las moléculas de enzima retenidas en una determinada región del espacio.
- La existencia de la alteración del microentorno debida a la interacción enzima-soporte.

6.2.3. Aplicaciones de las enzimas inmovilizadas

Las aplicaciones más importantes de las enzimas inmovilizadas se pueden clasificar en: aplicaciones analíticas (biosensores), médicas e industriales (en la industria química, farmacéutica, alimentaria y de tratamiento de residuos) (Arroyo, 1998).

La inmovilización de enzimas utilizadas en la industria alimentaria permite que puedan ser reutilizadas repetidamente en operaciones continuas o discontinuas, aunque cabe destacar, que existen limitaciones en su empleo relacionadas con los requisitos económicos y sanitarios inherentes al procesado de alimentos (Roland, 1980). A continuación, se resumen algunas de las aplicaciones conocidas de las enzimas inmovilizadas en la industria láctea:

- En la hidrólisis de proteínas: las enzimas proteolíticas se emplean en la modificación del contenido proteico de los alimentos. En el caso de la industria láctea se emplean para la disminución de contenido de lactoglobulina en la leche y en la industria quesera (Vuilleumard et al., 1988).
- En la hidrólisis de hidratos de carbono: en la industria láctea se utiliza para la eliminación de lactosa de los derivados lácteos, como se mencionó anteriormente.

La eliminación de este azúcar se puede conseguir tratando la leche con β -galactosidasa de levaduras inmovilizada en fibras de acetato de celulosa (Honda et al., 1993) y es de gran importancia en la preparación de productos lácteos dietéticos. Su eliminación también es interesante en la preparación de helados, ya que la lactosa tiende a cristalizar a temperaturas bajas.

- En la mejora de las características organolépticas de ciertos alimentos (Katchalski-Katzir, 1993): en la industria láctea se emplean ciertas lipasas y proteasas encapsuladas para la maduración de quesos (Magee, Olson y Linslay, 1981).
- En la obtención de edulcorantes y aditivos alimentarios (Katchalski-Katzir, 1993).

6.3. Aplicaciones más relevantes del uso de enzimas para la industria láctea

6.3.1. Importancia del uso de enzimas en la elaboración de queso

Las enzimas tienen muchas aplicaciones en la tecnología láctea, una de las más desarrolladas se encuentra en el proceso de elaboración del queso, concretamente en las etapas de coagulación y maduración, ya que mediante la adición de enzimas a la leche o cuajada se pueden obtener nuevos productos (ingredientes alimentarios como los “sabores o aromas a queso curado”, nuevas variedades de queso...) y acelerar la maduración de los quesos (Núñez Gutiérrez, et al., 1995).

A continuación, se muestra el diagrama de flujo del proceso de elaboración del queso (Figura 8), y se describen las etapas en las que las enzimas juegan un papel fundamental.



Figura 8. Diagrama de flujo del proceso de elaboración del queso (en azul oscuro las etapas en las que intervienen el uso de enzimas)

- **Pasteurización:** es un tratamiento térmico que tiene como principal objetivo destruir las bacterias patógenas. Además, permite inhibir ciertas enzimas como las lipasas, que pueden traer problemas de rancidez en los quesos. Algunos quesos madurados deben su sabor y aroma a la acción lipolítica de las enzimas, razón por lo cual se consiguen comercialmente preparaciones de lipasas para su uso en la elaboración de esos quesos cuando se ha pasteurizado la leche. Cabe destacar que algunas enzimas microbianas resisten las temperaturas de pasteurización, así como también los esporas bacterianas, lo cual señala la necesidad de trabajar con leches de buena calidad (Early, 2000).
- **Coagulación:** es el proceso mediante el cual la leche comienza su transformación en queso, puede ser ácida o enzimática. La coagulación enzimática se produce cuando se añade cuajo a la leche, que tiene la capacidad de romper la molécula de kappa-caseína entre los aminoácidos 105-106 (fenilalanina-metionina), lo cual inestabiliza las micelas de caseína, dando lugar a la formación de un “gel” o coágulo que conocemos con el nombre de cuajada.
Como se describió en apartados anteriores, existen dificultades para el abastecimiento de cuajo, por lo que se han desarrollado otros coagulantes, tanto de origen animal (pepsinas bovinas y porcinas), como de origen microbiano (proteasas fúngicas) o vegetal (flores de *Cynara cardunculus*) (Anam, 2012).
- **Maduración:** es un periodo que puede durar desde días hasta varios meses e incluso años, en el cual los quesos permanecen almacenados bajo ciertas condiciones de temperatura y humedad según el tipo de queso que se quiera conseguir, con el fin de permitir el desarrollo de productos provenientes del metabolismo de la grasa, proteínas y azúcares por la acción de las enzimas que le confieren al queso el sabor y aroma característico. La maduración puede ser superficial o en el interior de los quesos (Amiot, 1991).
 - En la superficial, la flora microbiana se desarrolla en la superficie y las enzimas secretados migran hacia el interior de los quesos provocando los cambios bioquímicos deseados.
 - La maduración en el interior se da principalmente por flora anaeróbica. En los quesos azules (Roquefort, Danablu, etc.) el *Penicillium* crece desde el interior, por lo cual, estos quesos son perforados con agujas especiales de manera que pueda entrar oxígeno al interior y permitir el crecimiento del moho.

La degradación de los componentes orgánicos se produce por la acción conjunta de las enzimas y la flora microbiana.

- Las enzimas naturales de la leche (lipasas y proteasas) tienen una participación reducida en la maduración, su acción es lenta ya que las condiciones como pH ácido y temperatura baja no le favorecen. Además, son poco termorresistentes, y por lo tanto se inactivan durante la pasteurización de la leche. Sin embargo, se puede demostrar que participan en la maduración ya que el grado de maduración en quesos elaborados con leche cruda es mayor que en los elaborados con leche pasteurizada.

- Las **lipasas** hidrolizan la grasa de la leche generando compuestos de aroma y sabor como el ácido butírico, los cuales, a su vez, pueden ser transformados químicamente a otras moléculas llamadas aldehídos y cetonas que también aportan aromas característicos de los quesos.
- Las **proteasas** son endopeptidasas que cortan las cadenas proteicas en el centro y no en los extremos liberando péptidos (no aminoácidos), por lo que un exceso produce sabor amargo por el gran número de estos componentes. Los péptidos son degradados posteriormente por las enzimas microbianas a aminoácidos.

Las proteasas producen un cambio de textura en el producto, haciéndolo más suave. En algunos quesos fuertes, como el roquefort, es posible percibir un aroma a amoníaco, el que se produce por una posterior descomposición de los aminoácidos que se obtuvieron por la hidrólisis de las proteínas (Marilley y Casey, 2004).

- La flora microbiana desempeña el papel más importante debido a las enzimas que secretan durante este proceso. Secretan dos tipos de enzimas:
 - Enzimas **extracelulares**: se difunden al medio ejerciendo su actividad hidrolítica. Actúan más fácilmente en los quesos blandos ya que por su contenido de humedad permiten una mayor difusión.
 - Enzimas **intracelulares**: se liberan después de la muerte celular microbiana, por lo que son más importantes en quesos de maduración prolongada.

6.3.2. Importancia del uso de enzimas en la elaboración de productos sin lactosa.

Otra aplicación relevante del uso de enzimas en la elaboración de productos lácteos es el uso de una enzima hidrolasa denominada lactasa, que transforma la lactosa en glucosa y galactosa, dos azúcares perfectamente asimilables, que evitan los problemas relacionados con la intolerancia a la lactosa. Existen varios procesos industriales que permiten la producción de leche deslactosada utilizando la enzima lactasa.

La lactasa neutra (procedente de levadura *Kluyveromyces L.*) es una enzima que ejerce su actividad de forma óptima en el pH natural de la leche y hasta una temperatura máxima de 45°C. Cuanto mayor es la temperatura y la dosis de enzima por litro, más rápidamente se desdobra la lactosa. Sin embargo, por razones de higiene y conservación de la leche, se prefiere trabajar a baja temperatura o temperatura ambiente, según el sistema empleado. Se utilizan principalmente dos tipos de tratamientos de la leche para eliminar la lactosa que contiene (Biocon, 2019).

- **Tratamientos batch, antes de la esterilización por UHT:** Se basan en la adición de la enzima a un tanque de leche pasteurizada, se mantiene una temperatura baja, entre 8 y 10°C a la dosis de enzima y durante el tiempo necesario para lograr el grado de hidrólisis deseado (% del total de lactosa hidrolizada). En la Figura 9 se muestra el grado de hidrólisis obtenido a 8°C según el tiempo empleado y la dosis de enzima comercial (Biolactasa NL Super) en mililitros por litro de leche a tratar (Biocon, 2019).

<i>Biolactasa NL Super</i>	<i>Tiempo (a 8°C)</i>		
	24 h	36 h	48h
<i>Dosis (ml / l)</i>	% Hidrólisis		
0,8	100	100	100
0,6	96	100	100
0,4	90	96	100

Figura 9. Porcentaje de Hidrólisis de Lactosa con diferentes dosis y a diferentes tiempos. Obtenida en: <https://biocon.es/wp-content/uploads/2017/01/Leche-deslactosada.pdf>

- **Tratamientos post-UHT por inyección de enzima estéril en línea:** consiste en la adición de la enzima mediante una inyección sobre la leche tras su esterilización por UHT. Una vez la enzima se halla en el envase, comienza su acción sobre la lactosa de la leche y al tener lugar el proceso a temperatura ambiente, la dosis a emplear es considerablemente inferior (Biocon, 2019).

Debido a que la leche deslactosada contiene glucosa y galactosa, es más propensa a que se produzca la reacción de Maillard, ya que estos dos monosacáridos reaccionan con las proteínas de la leche produciendo compuestos que presentan coloraciones indeseables. Para minimizar este pardeamiento se reduce la temperatura y se aumenta el tiempo. Los sistemas de dosificación aséptica en línea significan un avance en la calidad de la leche deslactosada ya que la hidrólisis de la lactosa se produce después del proceso térmico UHT, es decir, la concentración de monosacáridos en el momento del UHT es mínima y con ello se produce una menor coloración en la leche durante su almacenaje. Normalmente, la leche deslactosada producida mediante este sistema duplica la vida del producto de 3 a 6 meses (Biocon, 2019).

7. CONCLUSIONES

En este trabajo se ha realizado una recopilación exhaustiva de información acerca del uso de enzimas en la industria láctea. El análisis de los diferentes estudios realizados sobre este tema muestra que la industria alimentaria ha llevado a cabo un importante trabajo de investigación, tanto básica como aplicada, sobre el uso de enzimas dada su importancia en el sector de la alimentación. De hecho, como se muestra en la Figura 5, se ha producido un incremento exponencial en la publicación de artículos científicos relacionados con las enzimas en la industria láctea en los últimos años. Esto significa que el uso de enzimas en esta industria está en auge, debido principalmente al interés por la creación de alimentos con nuevas características y a la posibilidad de optimizar los procesos de elaboración.

Con este trabajo también se concluye la importancia que tiene el uso de determinadas enzimas en muchos procesos de la industria láctea, como, por ejemplo:

- En el proceso de elaboración de queso se consiguen unas propiedades organolépticas características (aroma y textura) gracias a la acción de lipasas y proteasas, principalmente.
- Los productos sin lactosa, obtenidos por la acción de lactasa, causaron una gran revolución en la industria alimentaria, permitiendo el consumo de lácteos a personas intolerantes a este disacárido.

8. CONCLUSIONS

In this work, an exhaustive compilation of information about the use of enzymes in the dairy industry has been carried out. The analysis of the different studies carried out on this topic shows that the food industry has developed an important research work, both basic and applied, on the use of enzymes given its importance in the food sector. In fact, as shown in Figure 5, there has been an exponential increase in the publication of scientific articles related to enzymes in the dairy industry in recent years. This means that the enzymes usage in this industry is booming, mainly due to the interest in the creation of foods with new characteristics and the possibility of optimizing the manufacturing processes.

This work also concludes the importance of the use of certain enzymes in many processes in the dairy industry, such as:

- During cheese production, characteristic organoleptic properties (aroma and texture) are obtained thanks to the action of lipases and proteases, mainly.
- Lactose free products, obtained by the lactase action, caused a great revolution in the food industry, allowing the dairy intake to people intolerant to this disaccharide.

9. VALORACIÓN PERSONAL

La realización de este Trabajo Fin de Grado de revisión bibliográfica me ha permitido desarrollar una serie de destrezas que considero imprescindibles para la finalización de mis estudios.

En primer lugar, he desarrollado una serie de habilidades relacionadas con la gestión, como aprender a realizar búsquedas en bases de datos; seleccionar artículos científicos, organizar la información elegida y realizar una síntesis significativa; hacer una lectura crítica de la información, tanto en español como en inglés, mejorando mi comprensión lectora del idioma, y por último, adquirir capacidades como la responsabilidad al enfrentarme a un trabajo de envergadura, la autonomía al tomar mis propias decisiones seleccionando los temas a tratar y la planificación para encontrar el tiempo necesario que exige este trabajo.

En segundo lugar, he adquirido una serie de conocimientos relacionados con los temas que he tratado en el trabajo, que me resultan imprescindibles para el grado de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, ya que considero que es muy importante el estudio de las enzimas en el procesado de alimentos y debería profundizarse más.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Amiot, J. (1991). *Ciencia y Tecnología de la Leche. Principios y aplicaciones*. Zaragoza: Acribia S. A.
- Anam (2012). El Blog de Mumumío: Coagulación láctica vs. Coagulación enzimática. Disponible en: <http://blog.mumumio.com/post/2012/09/26/coagulacion-lactica-vs-coagulacion-enzimatica/> [Consultado: 12-11-2019].
- Aragón, JJ. 2009. “Un recorrido por el nacimiento de la enzimología y los orígenes de la bioquímica actual”. *Encuentros Multidisciplinares*, pp. 3-8.
- Babor, J.A. e Ibarz, J. (1965). *Química General Moderna*. Barcelona: Marín.
- Becerra, M. Rodríguez, E. y Cerdán, M. (2001). “Extraction of intracellular proteins from *Kluyveromyces lactis*”. *Food technology and biotechnology*, 39(2), pp.135-139.
- Bello, A. (2009). *Producción de enzimas en la industria láctea (lactasa y renina)*. Trabajo Fin de Grado. Universidad de Zipaquira.
- Bernal, V. y Pavel, P. (1985). “Lactose hydrolysis by *Kluyveromyces lactis* β -D-galactosidase in skim milk, whey, permeate and model system”. *Journal of Food Science and Technology*, 18(1), pp.97-99. DOI: 10.1016/S0315-5463(85)71728-2
- Biblioteca de la Universidad de Zaragoza (2018). Guía de herramientas y pautas para un buen TFG: Ciencia y Tecnología de los alimentos 2018-19. Disponible en: <https://moodle2.unizar.es/add/course/view.php?id=26154> [Consultado 30-10-2019].
- Biocon (2019). Producción y control de leche deslactosada. Disponible en: <https://biocon.es/wp-content/uploads/2017/01/Leche-deslactosada.pdf> [Consultado: 15-11-2019].

- Bovey, F. A., y Yanari, S. S. (1960). *Pepsin*. In *The Enzymes*. (2^a ed.) En: Boyer, P.D., Lardy, H. y Myrback, Y. Nueva York: Academic Press.
- Carrara, C. y Rubiolo, A. (1994). "Immobilization of β -galactosidase on chitosan". *Biotechnology Progress*, 10(2): 220-224. DOI: 10.1021/bp00026a012
- Chandan, R. C, y Shahani, K. M. (1963). "Purification and characterization of milk lipase. II. Characterization of the purified enzyme". *Journal of Dairy Science*, 46(6), pp.503-509. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(63)89085-2
- Costa, E.L., Rocha, J.A., Maria, F. (2007). "Effect of heat and enzymatic treatment on the antihypertensive activity of whey protein hydrolysates". *International Dairy Journal*, 17(6), pp.632-640. DOI: 10.1016/j.idairyj.2006.09.003
- Cremosi, P. (2002). *L'uso degli enzimi nella pulitura di oprer policrome*. Padova: Ed. Il prato.
- Derewenda, Z. S., Derewenda, U., Dodson, G. G. (1992). "The crystal and molecular structure of the *Rhizomucor miehei* triacylglyceride lipase at 1.9 Å resolution". *Journal of molecular biology*, 227(3), pp. 818-839. DOI: 10.1016/0022-2836(92)90225-9
- Doell, R. G., y Kretschmer, N. (1962). "The small intestine during development. I. Distribution and activity of beta galactosidase". *Biochimica et Biophysica Acta*, 62(13), pp.353-362. DOI: 10.1016/0006-3002(62)90097-5
- Donkor, O.N., Nilmini, S.L.I., Stolic, P., Vasiljevic, T. y Shah, N.P. (2007). "Survival and activity of selected probiotic organisms in set-type yoghurt during cold storage". *International Dairy Journal*, 17(6), pp.657-665. DOI: 10.1016/j.idairyj.2006.08.006
- Dziuba, M., Dziuba, B. y Iwaniak, A. (2009). "Milk proteins as precursors of bioactive peptides". *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, 8(1), pp.71-90. DOI: 10.17306/J.AFS.2014.1.1
- Dziuba, M. y Darewicz, M. (2007). "Food Proteins as Precursors of Bioactive Peptides- Classification Into Families". *Food Science and Technology International* 13(6), pp.393-404. DOI: 10.1177/1082013208085933
- Early, R. (2000). *Tecnología de los Productos Lácteos*. Zaragoza: Acribia S.A.
- FECYT (2019). Web of Science. Disponible en: <https://www.fecyt.es/es/recurso/web-science> [Consultado: 30-10-2019].
- Fenton, D. (1982). "Solvent treatment for β -D galactosidase release from Yeast cells". *Enzyme and Microbial Technology*, 4(4), pp.229-232. DOI: 10.1016/0141-0229(82)90036-9
- Ferreira I, Eca R (2007). "Development and Validation of an HPLC/UV Method for Quantification of Bioactive Peptides in Fermented Milks". *Journal of Liquid Chromatography Related Technologies*, 30(14), pp.2139-2147. DOI:10.1080/10826070701435145
- Florkin, M. (1972). *A history of Biochemistry*. Amsterdam: Elsevier.
- Friedmann, H.C. (1981). "Benchmark Papers in Biochemistry". *Trends in Biochemical Sciences*, 1(3), pp. 117-118. DOI: 10.1016/0968-0004(82)90166-9
- Fruton, J.S. (1972). *Molecules and Life: Historical Essays on the Interplay of Chemistry and Biology*. Nueva York: John Wiley and Sons.
- Ganguli, N.C. y Bhalerao, V.R. (1965). "Differential Action of Animal, Vegetable, and Microbial Rennets on Caseins as Revealed by Casein Agar Plate Assay Method". *Journal of Dairy Science*, 48(4), pp. 197-200. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(65)88249-2
- García-Cano I., Serrano-Maldonado C. E., Olvera-García M., Delgado-Arciniega E., Peña-Montes C., Mendoza-Hernández G., Quirasco M. (2014). "Antibacterial activity produced by *Enterococcus spp.* isolated from an artisanal Mexican dairy product, Cotija cheese". *LWT – Food Science and Technology*, 59(1), pp. 26-34. DOI: 10.1016/j.lwt.2014.04.059

- Gomez-Ruiz, J.A., Ramos, M. y Recio, I. (2004). "Angiotensin converting enzyme-inhibitory activity of peptides isolated from Manchego cheese. Stability under simulated gastrointestinal digestion". *International Dairy Journal*, 14(12), pp.075-1080. DOI: 10.1016/j.idairyj.2004.04.007
- Haileselassie, S.S., Lee, B.H. y Gibbs, B.F. (1999). "Purification and Identification of Potentially Bioactive Peptides from Enzyme-Modified Cheese". *Journal of Dairy Science*, 82(8), pp.1612-1617. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(99)75389-0
- Hajirostamloo, B. (2010). "Bioactive Component in Milk and Dairy Product". *International Journal of Agricultural and Biosystems Engineering*, 4(12), pp.870-873. DOI: 10.4081/ijas.2009.315
- Hannibal-Friedrich, O., Chun, M. y Sernetz, M. (1980). "Immobilization of β -galactosidase, albumin, and γ -globulin on epoxy-activated acrylic beads". *Biotechnology and Bioengineering*, 22(1), pp.157-175. DOI: 10.1002/bit.260220112
- Harris, E.L.V. y Angal, S. (1995). *Protein purification methods. A practical approach*. (6^a ed.) New York: Oxford University Press.
- Harrison, R., Todd, P., Rudge, S. y Petrides, D. (2003). *Bioseparations Science and Engineering*. Nueva York: Oxford University Press.
- Hartmeier, W. (1985). "Immobilized biocatalysts: from simple to complex systems". *Trends in Biotechnology*, 3(6), pp.149-153. DOI: 10.1016/0167-7799(85)90104-0
- Honda, Y., Kako, M., Abiko, K. y Sogo, Y. (1993). "Industrial Application of immobilized enzymes". *Molecular Catalysis*. pp.209-234.
- Ijas, H., Collin, M., Finckenberg, P., Pihlanto-Leppala, A., Korhonen, H., Korpela, R., Vapaatalo, H. y Nurminen, M.A. (2004). "Antihypertensive opioid-like milk peptide a-lactorphin: lack of effect on behavioural tests in mice". *International Dairy Journal*, 14(3), pp.201-205. DOI: 10.1016/j.idairyj.2003.08.002
- Jaouen, P., Bertrand, L., Rossignol, N., Royer, R. y Quéméneur, F. (1999). "Clarification and concentration with membrane technology of a phycocyanin solution extracted from *Spirulina platensis*". *Biotechnology Techniques*, 13(12), pp.877-881. DOI: 10.1023/A:1008980424219
- Jauhiainen, T. y Korpela, R. (2007). "Milk Peptides and Blood Pressure". *Journal of Nutrition*, 137(3), pp.825S-829S. DOI: 10.1093/jn/137.3.825S
- Jordao, R., Brandi, I. y López, F. (2001). "Stabilization of the activity of β -galactosidase in Permeabilized Immobilized cells for Hydrolysis of Lactose in Milk". *Journal of Food Biochemistry*, 25(3), pp.257-267. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1745-4514.2001.tb00738.x>
- Katchalski-Katzir, E. (1993). "Immobilized enzymes: learning from past successes and failures". *Trends in Biotechnology*. 11(11): 471-478. DOI: 10.1016/0167-7799(93)90080-S
- Kennedy, J.F. y Cabral, J.M.S. (1983). *Solid Phase Biochemistry*. En: Schouten, W.H. (ed.). New York: Wiley Publisher.
- Kumar, D., Bhalla, T.C. (2005). "Microbial proteases in peptide synthesis: approaches and applications". *Applied Microbiology and Biotechnology*, 68(6), pp.726-736. DOI: 10.1007/s00253-005-0094-7
- Lee, B.H. (2000). *Fundamentos de Biotecnología de los alimentos*. (1^a ed.) Zaragoza: Acribia, S.A.
- Lehninger, A., Nelson, D., Cox, M. (2006). *Principios de Bioquímica*. (4^a Ed.) Barcelona: Omega, p. 194.

- Magee, E.L., Olson, N.F. y Linslay, R.C. (1981). "Microencapsulation of cheese ripening systems: production of diacetyl and acetoin in cheese by encapsulated bacterial cell free extract". *Journal of Dairy Science*. 64(4), pp.616-621. DOI:10.3168/jds.S0022-0302(81)82620-3
- Mammarella, J.E. (2001). *Estudio del sistema de inmovilización de enzimas para la hidrólisis de lactosa*. Tesis para la Obtención del Grado Académico de Doctor. Universidad Nacional del Litoral.
- Marilley, L. y Casey, M.G. (2004). "Flavours of cheese products: metabolic pathways, analytical tools and identification of producing strains", *International Journal of Food Microbiology*, 90(2), pp.139-59. DOI: 10.1016/s0168-1605(03)00304-0
- Martinek, K. y Mozhaev, V.V. (1987). "Immobilization of enzymes: an approach to fundamental studies in biochemistry". *Advances in Enzymology*, 57, pp.179-249. DOI:10.1002/9780470123034.ch3
- Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (2002). Prevención de la contaminación en la Industria Láctea. Disponible en: www.cprac.org/docs/lac_es [Consultado: 23-10-2019]
- Mohanty, A. K., Mukhopadhyay, U. K., Grover, S., Batish, V. K. (1999). "Bovine chymosin: Production by rDNA technology and application in cheese manufacture". *Biotechnology Advances*, 17(2-3), pp. 205-217. DOI: 10.1016/S0734-9750(99)00010-5
- Montiel, X. (2005). "Optimización del proceso de extracción de la lactasa de *kluveromyces marxianus* atcc 8554, para su aplicabilidad en la industria láctea." *Revista Científica*, 16(5), pp.476-482. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=959/95915512> [Consultado: 28-10-2019].
- Núñez Gutiérrez, M., Medina Fernández-Regatillo, M., Gaya Sicilia, P., Guillén Scapardini, A.M., Picón Gálvez, A.M., Fernández Alvarez, J.J. y Fernández Mohedano, A. (1995). *Enzimas para la industria láctea: producción y aplicaciones en maduración acelerada y en obtención de nuevas variedades de quesos*. Proyecto de Investigación. Centro de Investigación y Tecnología.
- Okos, M., Grulke, A. y Syverson, A. (1978). "Hydrolysis of lactose in acid whey using β -galactosidase adsorbed to a phenol formaldehyde resin". *Journal of Food Science*, 43(2), pp.566-571. DOI: 10.1111/j.1365-2621.1978.tb02356.x
- Peña, C. y Quirasco, M. (2014). "¿Enzimas en los alimentos? Bioquímica de lo comestible". *Revista digital universitaria*, 15 (12), pp. 2. Disponible en: <http://www.revista.unam.mx/vol.15/num12/art94/> [Consultado: 12-09-2019].
- Portón Andión, A. (2019). Curso de Biología. Disponible en: <http://www.bionova.org.es/biocast/tema14.htm> [Consultado: 03-11-2019].
- Quirasco, M., López-Munguía, A. (2013). *Química de los Alimentos*. (4ª Ed.) México: Pearson Educación. pp. 275 - 339.
- Reed, G. (1966). *Enzymes in food processing*. (3ª Ed.) Milwaukee, Wiscconsin: Elsevier.
- Roberts, D. (1977). *Enzyme kinetics*. Cambridge, Reino Unido: Cambridge University Press.
- Roland, J.F. (1980). *Requirements unique to the food and beverage industry*. En: Immobilized enzymes for food processing, Pitcher, W.H. et al. (eds.). Boca Raton, Florida: CRC Press.
- Ruiz-Giménez, P., Salom, J.B., Marcos, J.F., Vallés, S., Martínez-Maqueda, D.F., Recio, I., Torregrosa, G., Alborch, E. y Manzanares, P. (2012). "Antihypertensive effect of a bovine lactoferrin pepsin hydrolysate: Identification of novel active peptides". *Food Chemistry*, 131(1), pp.266-273. DOI:10.1016/j.foodchem.2011.08.076

- Schlenk, F. (1997). "Early research on fermentation. A history of missed opportunities". En: Cornish-Bowden, A. (Eds.). *New Beer in an Old Bottle. Eduard Buchner and the Growth of Biochemical Knowledge*. Valencia: (Universitat de València), pp. 43-50.
- Schneider, J. (1961). "Effect of rennet on the viscosity of ice cream mix, firmness and meltdown of the finished product and the possibility of obviating the use of stabilizers". *Zpravy Vyzkumneho Ustavu Mlekarenskeho* 9 (2), pp.7-13.
- Shahani, K. M., Chandan, R. C. (1962). "Sensitivity of milk lipase to antibiotics". *Journal of Dairy Science*, 45(10), 1178-1183. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(62)89592-7
- Siso, M. (1993). "Covalent immobilization of b-galactosidase on corn grits. A system for lactose hydrolysis without diffusional resistances". *Process Biochemistry*, 29(1), pp.7-12. DOI: 10.1016/0032-9592(94)80053-7
- Stimpson, E. G., y Stamberg, O. E. (1956). "Conversion of lactose to glucose, galactose and other sugars in the presence of lactase activators". *Official Gazette-United States Patent office*, 707(1), pp.227.
- Taylor, R.F. (1991). *Protein Immobilization: fundamentals and applications*. Nueva York: Marcel Dekker.
- Vasic-Racki, D. (2006). "History of industrial biotransformations-dreams and realities". En: A. Liese, K. Seelbach, y C. Wandrey (Eds.). Winheim, Alemania: Wiley-VCH, pp. 1-35. DOI: 10.1002/9783527608188.ch1
- Voet, D., Voet, J., Pratt, C. (2013). *Fundamentals of Biochemistry. Life at the Molecular Level*. (4ª Ed.) New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., pp. 440, 493.
- Vuilleumard, J.C. Goulet, J. Amiot, J. y Vijayalakshmi, M.A. (1988). "Continuous production of small peptides from milk proteins by extracellular proteases of free and immobilized *Serratia marcescens* cells". *Enzyme and Microbial Technology*. 10(1), pp.2-8. DOI: 10.1016/0141-0229(88)90090-7
- Wang, L., Mao, X., Cheng, X., Xiong, X. y Ren, F. (2010). "Effect of enzyme type and hydrolysis conditions on the in vitro angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity and ash content of hydrolysed whey protein isolate". *International Journal of Food Science and Technology*, 45(4), pp.807-812. DOI: 10.1111/j.1365-2621.2010.02210.x
- Wang, X. y Ruckenstein, E. (1993). "Preparation of porous polyurethane particles and their use in enzyme immobilization". *Biotechnology Progress*, 9(6), pp.661-665. DOI:10.1021/bp00024a015
- Weatherley, L. R. (1994). *Engineering Processes for Bioseparations*. Oxford: Butterworth-Heinemann.
- Wingard, L.B. (1972). *Enzyme Engineering*. Nueva York: Interscience Publishers.
- Wiseman, A. (1991). *Manual de biotecnología de los enzimas*. Zaragoza: Acribia S.A.