



## ENZIMAS EN PANIFICACION

ING. RAFAEL VILLANUEVA FLORES

*Los sistemas enzimáticos en insumos y en aditivos, utilizados para propósitos específicos en panificación, juegan roles esenciales en todas las etapas del proceso de panificación. La industria dedicada a la manufactura de productos hechos a base de cereales tales como panes y galletas se dirige hacia la producción automática y continua. Este desarrollo se encuentra sostenido por el control de las características y propiedades (funcionalidad) de insumos y masas. Dentro de este contexto las enzimas representan un instrumento importante para el logro de estos objetivos.*

### INTRODUCCION

Las enzimas son catalizadores biológicos consistentes principalmente de proteínas. Se les encuentra en la mayoría de organismos vivos y son indispensables para la vida.

Las enzimas en su naturaleza esencial, contienen los mismos aminoácidos encontrados en las proteínas y su estructura tridimen-

sional es representativa de la conformación, con el mínimo contenido de energía, también característico en las proteínas. Lo que diferencia a las enzimas de otras proteínas, y forma la base de su acción catalítica, es su habilidad para alinear diversos grupos químicos en una conformación geométrica particular. Este complejo, muy preciso, debe mantener intacto la disposición molecular espacial para que la enzima mantenga su actividad.

Las enzimas son elementos vitales para la producción de panes y productos afines; sin enzimas, no existirían productos leudados por levadura. Desde el momento en que la harina, el agua y la levadura son mezclados, un sistema enzimático anfitrión muy bien organizado inicia su función. La efectividad de este sistema depende de muchos factores entre los cuales podemos mencionar pH, temperatura, concentración de enzimas, y otros productos presentes en el sistema.

## NOMENCLATURA Y CLASIFICACION

La palabra enzima deriva del término griego que significa "leudar". Hasta 1897, se consideró que se requerían de células vivas de levadura para fermentar azúcares en alcohol y dióxido de carbono. En ese año, los hermanos Buchner demostraron que extractos de células libres de levadura podrían convertir dextrosa en alcohol y dióxido de carbono exactamente como las células de levadura vivas.

Las reglas para la nomenclatura de enzimas son extensivas y algunas veces difíciles de aplicar. En general, el nombre de una enzima constará de dos partes. La primera consistirá del nombre del sustrato y la segunda de la terminación "asa", lo cual indicará la naturaleza del proceso. Por ejemplo, las enzimas que convierten amilosa y

amilopectina (almidón) en carbohidratos más simples son llamadas amilasas. Las enzimas que causan la descomposición de proteínas son llamadas proteasas.

Sin embargo, a muchas enzimas se les dieron nombres con anterioridad a la adopción de este sistema de nomenclatura y varias de estas antiguas denominaciones aún se mantienen. Algunos ejemplos son tripsina, pepsina y papaína, tres enzimas proteolíticas que convierten moléculas largas de proteínas en péptidos más pequeños.

Las enzimas también son llamadas en base al tipo de reacción que catalizan. Así pues, a la enzima invertasa se le denomina así debido a la inversión de la sucrosa que produce.

Consecuentemente, una nomenclatura de esta naturaleza basada de una parte en nombres sin relación, en nombres basados en sustratos y por otra parte en nombres relacionados con los tipos de reacción, se prestaba a demasiada confusión. Para corregir esta situación, la Unión Internacional de Bioquímica propuso en 1961 un esquema de clasificación de enzimas y nomenclatura que agrupó a las enzimas en seis categorías y grupos de sub clases de acuerdo al tipo de reacción que catalizan. A cada enzima se le asignó un nombre recomendado para uso cotidiano, un nombre sistemático que identifica la reacción

que cataliza y un número de clasificación para una clasificación correcta y sin ambigüedades. Las seis categorías mayores son oxidoreductasas, transferasas, hidrolasas, liasas, isomerasas y ligasas.

## ENZIMAS EN PANIFICACION

La producción de pan involucra cuatro etapas sucesivas:

- 1) Elaboración de la masa a base de harina, agua y algunos aditivos, particularmente sal y levadura, a fin de darle a la masa una consistencia definida.
- 2) Fermentación, pesado, división y moldeado de la masa. Durante este período la temperatura es mantenida a alrededor de 25°C y los objetivos primordiales son la formación de una red de gluten y la producción de dióxido de carbono.
- 3) Horneado de la masa. Durante esta etapa se desarrolla la coloración de la corteza, mientras que la temperatura de la miga puede alcanzar los 100°C, temperatura a la cual las proteínas son desnaturizadas y el almidón parcialmente gelatinizado, fijando la estructura porosa de la miga.
- 4) Enfriado de la masa.

Las modificaciones estructurales de los constituyentes, particularmente

del almidón y proteínas, dependen de las condiciones impuestas por la hidratación, temperatura, tratamiento mecánico, pH, fuerza iónica, propiedades óxido reductoras del medio y actividad enzimática.

Los diversos sistemas enzimáticos presentes en la masa empiezan su función en el instante en que se inicia el mezclado de la masa. Este sistema cumple dos funciones:

- 1) Proveer nutrientes para la fermentación de la levadura.
- 2) Condicionar la masa (tanto la fracción del almidón como la del gluten).

Las enzimas continúan funcionando durante la fermentación y durante el horneado hasta el momento en que la temperatura interna de la masa alcanza la temperatura de inactivación de las enzimas.

Las principales enzimas asociadas en la producción de panes y productos afines son:

- 1) Enzimas que convierten almidón en azúcares, dióxido de carbono y alcohol. Estas enzimas incluyen amilasas, invertasa, maltasa y zimasa.
- 2) Enzimas que afectan reacciones de proteínas. Estas son proteasas.
- 3) Lipooxigenasa, una enzima que descompone grasas.

## AMILASAS

### Substrato de las Amilasas

El almidón se encuentra en las plantas en la forma de gránulos. En los cereales y en otras plantas superiores, los gránulos están formados en organismos elementales (plastids). Estos organismos elementales que forman el almidón son llamados amiloplastos. En los cereales con gránulos de almidón simples (trigo, maíz, sorgo, y mijo) cada organismo elemental (plastid) contiene un gránulo. En el arroz y en la avena, varios gránulos se encuentran en cada amiloplasto. El trigo, centeno y la cebada presentan dos tipos de gránulos de almidón, uno lenticular largo y otro esférico pequeño.

El almidón es básicamente un polímero natural de  $\alpha$ -D-glucosa. Químicamente se distinguen al menos dos tipos de polímeros: amilosa, un polímero esencialmente lineal (consistente en cadenas largas rectas de moléculas de glucosa) y amilopectina, el cual es mayormente ramificado (compuesto de cadenas ramificadas de moléculas de glucosa).

La cantidad de monosacáridos y disacáridos presentes en la harina de trigo es muy pequeña, generalmente no mayor a 0.5%. Esta cantidad no es suficiente para sostener la fermentación requerida a fin de obtener un

pan de buen volumen, y consecuentemente la calidad del pan dependerá de la generación de maltosa por las amilasas. Sin embargo, estas enzimas pueden inducir cambios indeseables cuando su actividad es muy alta o desbalanceada.

La actividad de las amilasas se vuelve importante conforme se gelatiniza el almidón por efecto del calor en el horno. El calor creciente acelera grandemente la acción amiolítica que dextriniza y licua al almidón, resultando en un pan con mejores características como color de la corteza, volumen, calidad de la miga y sabor.

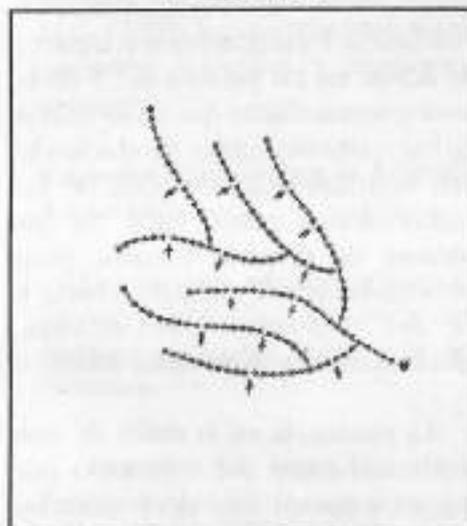
Las amilasas se dividen en dos grupos, alfa amilasa ( $\alpha$ -1,4-glucan glucanohidrolasa, E.C. 3.2.1.2) y beta amilasa ( $\beta$ -1,4-glucan maltohidrolasa, E.C. 3.2.1.2). La acción enzimática de cada uno de estos grupos difiere y ambas deben de estar presentes en la masa para una producción satisfactoria de pan. A parte de ser divididas en estos dos grupos las amilasa también son clasificadas como endo-enzimas (aquellas que atacan enlaces localizados dentro de la estructura molecular del substrato) y exo-enzimas (aquellas que atacan al substrato al o cerca del final de las cadenas o lado de las cadenas).



## Alfa Amilasa

La alfa amilasa es una endo-enzima que rompe uniones glucosídicas  $\alpha$ -1,4 de manera casi aleatoria produciendo cadenas más cortas llamadas destrinas (Figura 1). El resultado de la acción de la enzima es la reducción rápida del tamaño de las moléculas largas de almidón y por ende reducir la viscosidad de una solución de almidón. La enzima trabaja mucho más rápido en el almidón gelatinizado; sin embargo, con suficiente tiempo, también degradará almidón granular. Debido a su habilidad para "desnitizar" o "licuar"

FIGURA 1



Acción inicial de la Alfa Amilasa sobre la amilopectina (De Pylar, 1988)

almidón se le denomina enzima "destrinogénica". Durante la fermentación, las moléculas de almidón susceptibles son atacadas por la alfa amilasa reduciéndolas a destrinas las cuales son convertidas, posteriormente, a maltosa por la beta amilasa.

La harina producida de un trigo sano contiene un nivel bajo de alfa amilasa a menos que haya sido producida de un trigo parcialmente germinado. Consecuentemente, la harina deberá suplementarse con una fuente externa de alfa amilasa, siendo esto una práctica común tanto a nivel del molino como a nivel de la panadería o planta galletera. Con la finalidad de suplementar la alfa amilasa natural en la harina de trigo, se utilizan preparaciones de amilasas derivadas de varias fuentes. Las características del comportamiento de los suplementos varía con el origen.

## Beta Amilasa

La beta amilasa es una exo-enzima que ataca al almidón por los terminales no reductores del polímero. También ataca uniones glucosídicas  $\alpha$ -1,4 y rompe cualquier otra unión para producir el disacárido maltosa. Se podría esperar producir únicamente maltosa de la amilosa, ya que esta no es ramificada. Actualmente únicamente el 70% de la amilosa es convertida a maltosa, demostrándose

así que la ramificación también ocurre en la amilosa. Con amilopectina, la conversión a maltosa es únicamente alrededor de 50%, siendo la diferencia una  $\beta$ -destrina-límite de peso molecular alto. La acción de la beta amilasa sobre la amilopectina se muestra en la Figura 2. Esta actividad produce unidades de maltosa de la cadena ramificada, pero la acción es bloqueada cuando la enzima alcanza los enlaces mediante los cuales las ramas están unidas a la cadena principal. Debido a que la beta amilasa produce maltosa, se le denomina enzima "sacarificante".

La combinación de alfa y beta amilasa degrada al almidón mucho

más rápido y completamente que cualquiera de ellas solas. Cada ataque de la alfa amilasa produce un nuevo terminal no reductor para la acción de la beta amilasa. La beta amilasa prácticamente no tiene acción sobre gránulos de almidón intactos.

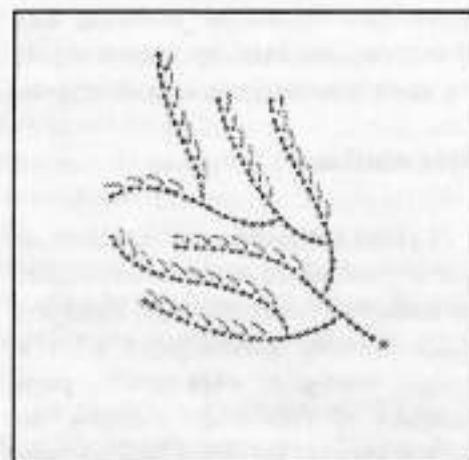
A diferencia de la alfa amilasa, la beta amilasa se encuentra en suficiente cantidad en la harina proveniente de un trigo intacto y sano.

### Isomilasas

Ni la alfa ni la beta amilasa son capaces de romper los enlaces  $\alpha$ -1,6 de la amilopectina. Esta reacción requiere de otras enzimas, conocidas como amilasas, tales como amilo-1,6-glucosidasa, destrinasa-límite o pululanasa. Estas enzimas son capaces de actuar en los enlaces  $\alpha$ -1,6 de la amilopectina al igual que en sacáridos de bajo peso molecular, produciendo una hidrólisis más completa de los carbohidratos ramificados. Se las obtiene de diversas fuentes, pero principalmente de malta de cebada, y se les denomina isoamilasas, glucoamilasas y destrinasas-límite.

La existencia en la malta de una destrinasa-límite fue reportado por Kneen y Spoerl casi cinco décadas atrás (Werkman, 1946). Esta enzima hidrolisa isomaltosa y destrinas-límite que contienen enlaces  $\alpha$ -1,6. El pH óptimo de esta enzima es 5,0 y su

FIGURA 2



Acción de la Beta Amilasa sobre la Amilopectina (De Pyler, 1988)

**TABLA I**

<b>TERMOESTABILIDAD DE ALFA-AMILASAS DE DIFERENTES FUENTES</b>				
<b>TEMPERATURA</b>		<b>PORCENTAJE DE ACTIVIDAD ENZIMATICA</b>		
<b>°C</b>	<b>°F</b>	<b>FUNGAL</b>	<b>MALTA</b>	<b>BACTERIAL</b>
65	149	100	100	100
70	158	52	100	100
75	167	3	58	100
80	176	1	25	92
85	185	---	1	58
90	194	---	---	22
95	203	---	---	8

temperatura óptima entre 55-60°C (131-140°F). Esta enzima muestra muy pequeña actividad a temperatura ambiente.

#### **Factores que afectan la Actividad Amiolítica**

Los factores más importantes que afectan la actividad amiolítica son el tiempo, la acidez (pH) y la temperatura.

**Tiempo:** La actividad de las amilasas no es instantánea pero continuará mientras exista suficiente sustrato o hasta que alguna otra condición inactive a la enzima.

**Temperatura:** Desde el punto de vista de su aplicación, las diferencias más importantes entre alfa amilasas de diferente origen están relacionadas con su termoestabilidad (Tabla I).

Cabe observar que las amilasas de origen fungal son inactivadas a una temperatura relativamente baja, bastante antes que el almidón sea gelatinizado y se encuentre disponible para la acción posterior de la enzima. Por otra parte, se requiere de una temperatura mayor para la inactivación de una alfa amilasa de origen cereal, mientras que una amilasa bacteriana es más estable y una porción resistirá temperaturas de horneado. La baja temperatura de

inactivación para la amilasa fungal provee un margen considerable de seguridad contra la sobre dosificación. De otro lado, la suplementación con amilasa bacteriana podría resultar en una acción que continúe luego que el pan ha sido removido del horno, resultando en una miga gomosa y pegajosa.

**Acidez (pH):** La actividad máxima de las amilasas está en el rango de pH de 4.5 a 7.0, pero la actividad óptima varía con el origen de la enzima. Silberstein (1964) afirma que el rango óptimo de pH para alfa amilasa bacteriana es de 5.8 a 6.0, 4.75 a 5.4 para alfa amilasa de origen cereal, y 4.85 a 5.8 para alfa amilasa fungal. Hace referencia, igualmente, que el relativamente alto pH óptimo para la alfa amilasa bacteriana no parece ser de importancia práctica para la estabilidad de la enzima durante la elaboración del pan.

### **Invertasa, Maltasa y Zimasa**

La alfa y beta amilasa convierten al almidón en maltosa, un disacárido compuesto de dos moléculas de dextrosa. Muchos productos de panificación contienen sucrosa (azúcar de caña remolacha), un disacárido compuesto de una molécula de dextrosa y una de fructuosa. Ninguno de estos disacáridos puede ser fermentados (utilizado) por la levadura y deben de ser convertidos

a monosacáridos con la finalidad de estar disponibles (utilizables) para la fermentación de la levadura.

La enzima invertasa está presente en la levadura y actúa en la sucrosa produciendo dextrosa y fructuosa, quedando disponibles para la fermentación. Esta acción es muy rápida. La sucrosa es convertida (muy temprano en el ciclo de la fermentación) prácticamente en su totalidad a dextrosa y fructuosa.

Al mismo tiempo la enzima maltasa, también presente en la levadura, ataca la maltosa produciendo dos moléculas de dextrosa, las cuales quedan a disposición para la fermentación de la levadura. Esta acción generalmente ocurre más tarde en el ciclo de fermentación.

La fermentación de azúcares por la levadura involucra al complejo grupo de enzimas denominado colectivamente zimasa. Es este grupo de enzimas el cual produce dióxido de carbono y alcohol de la dextrosa y fructuosa.

### **Proteasas**

Las enzimas que degradan complejos de proteínas y los productos de su descomposición en compuestos más simples son denominadas enzimas proteolíticas o proteasas. Las proteasas ocurren

naturalmente en el trigo, pero a nivel insignificante, y están presentes en la mayoría de productos malteados, pudiendo también ser de origen fúngico y bacteriano. De estas fuentes las proteasas fúngicas y bacterianas son de mayor importancia para el panadero.

En el sistema de la masa del pan, las proteasas causan el desdoblamiento de enlaces peptídicos en la estructura del gluten. Este tipo de acción es diferente a la de los agentes reductores, los cuales rompen los enlaces disulfídicos en el gluten.

Por ello, las modificaciones por la acción proteolítica son diferentes a las obtenidas por la acción mecánica del mezclado o la acción química de los agentes reductores.

El mezclado, mediante la aplicación de fuerzas en una dirección patrón repetida, tiende a romper los enlaces cruzados y a orientar las cadenas de proteínas en la misma dirección. Si la mezcla se exagera, resulta una masa floja y pegajosa sin mucha capacidad para retener gas.

Los agentes reductores, como la l-cisteína, rompen los enlaces disulfídicos entre los cabos de la proteína y forman grupos sulfidrilos en la cadena de la proteína. Esto permite luego a los cabos de la proteína deslizarse uno sobre el otro, resultando en una masa floja en la

cual todos los cabos están orientados en la misma dirección pero no son mantenidos juntos.

La proteólisis, o la acción de la enzima proteasa, no rompe los enlaces disulfídicos que producen la estructura tridimensional del gluten, pero separa las cadenas peptídicas, creando consecuentemente cadenas cruzadas, intermezcladas con cadenas lineales. Si la proteólisis se exagera, se romperán demasiados enlaces peptídicos, resultando en masas flojas con pobre capacidad para la retención de gas.

Los sistemas de proteasas son de gran interés para los químicos de cereales tanto desde el punto de vista práctico como teórico. La utilización de proteasas en la etapa de la esponja (sistema esponja-masa) reduce el requerimiento de mezclado en la etapa de la masa o remezcla. Las masas tratadas con proteasas son más extensibles y pueden ser plegadas más finamente y moldeadas con mayor facilidad. El estudio de las enzimas puras proporciona información muy útil referente a la composición y estructura de la proteína del trigo, al efecto enzimático en la reología de la masa y a la potencialidad panadera de las masas de harina de trigo.



## Factores que afectan la actividad de las Proteasas

**Tiempo:** Mientras que las amilasas actúan sobre el almidón dañado o gelatinizado, las proteasas pueden atacar al gluten después que la harina es humedecida, y consecuentemente son capaces de actuar durante la mezcla, fermentación y hasta su activación final durante el horneo. Debido a que el tiempo es un factor, los beneficios de la adición de proteasas son más evidentes cuando la harina es sometida a un período de fermentación largo. También el tipo de fermentación dictará el nivel de proteasas. Por ejemplo, se utilizará un nivel más bajo de proteasa en un sistema de esponja-masa que en un sistema corto o de masa rápida.

**Temperatura:** Las proteasas continúan su función en un sistema de masa durante la fermentación. La inactivación de las proteasas por el calor ocurre aproximadamente de manera paralela al de las amilasas. La actividad es acelerada durante las primeras etapas del horneo pero disminuye rápidamente cuando la temperatura interna de la masa excede 63°C a 71°C (145°F a 160°F).

**Acidez (pH):** Como en la actividad enzimática de las amilasas, las proteasas poseen un rango de pH óptimo para una actividad máxima y cualquier desviación de este rango disminuirá esta actividad. Este factor

es de mayor importancia con respecto a las enzimas proteasas. Las enzimas de origen fungal poseen actividad máxima en un medio ácido en el área de pH 5,5. La actividad de las proteasas bacteriales aumenta a un pH de alrededor 7,0. Esto indica que las proteasas fungales estarán a su nivel máximo de actividad en un rango normal de fermentación panadera, mientras que las proteasas bacteriales serán más activas cuando son añadidas a la masa de una galleta tipo saltina. La proteasa bacteriana también es activa en la esponja de este tipo de galleta, a pesar de que la esponja desarrolla una acidez considerable durante su período de fermentación de 16 a 20 horas.

**Sal:** Las proteasas son muy sensibles a concentraciones altas de sal y este factor debe de considerarse en el sistema de la masa. Por ejemplo, en un sistema esponja-masa, las enzimas son añadidas en la etapa de la esponja a fin de proveer más tiempo para su acción pero también a fin de evitar el efecto inhibitorio de la sal, la cual es añadida en la etapa de la remezcla o masa. Esta inhibición de la sal parece estar relacionada a su efecto sobre el gluten haciéndolo menos susceptible a la acción enzimática.

## Lipoxidasa

La lipoxigenasa fue inicialmente

referida como una enzima destructora de caroteno, caroteno oxidasa en frijol de soya. Posteriormente se demostró que el frijol de soya poseía una enzima, llamada consecuentemente lipoxidasa, que oxidaba grasas no saturadas. Caroteno oxidasa y lipoxidasa son la misma enzima. La lipoxidasa, en la forma de harina de soya (enzima activa), es utilizada extensivamente en la producción de pan debido a su efecto blanqueador, el cual cambia los pigmentos amarillos naturales de la harina y resulta en un pan con una miga muy blanca. Otros beneficios atribuidos al uso de esta enzima son el mejoramiento de la resistencia de la masa y el mejoramiento del sabor a través de la acción de esta enzima sobre los aceites en el sistema de la masa.

La actividad endógena de la lipoxigenasa en el trigo y especialmente en la harina de patente es baja. Esta actividad es más alta en el escutelo y en el embrión (removidos durante el proceso de molienda) y más baja en el endosperma (del cual proviene la harina). La actividad de la lipoxigenasa es mayor en los trigos rojos que en los trigos blancos o en las nuevas variedades del trigo durum ámbar. La actividad de la lipoxigenasa es particularmente importante en la producción de pastas; ya que una actividad enzimática excesiva deteriorará el color del producto final.

## CONCLUSIONES

Las enzimas son compuestos químicos producidos por organismos vivos tales como mohos, bacteria, levadura y plantas en crecimiento o semillas, y pueden ser extraídos de estos organismos sin pérdida de actividad. La acción de estas enzimas es catalítica por naturaleza ya que pueden generar un cambio químico en un sustrato, tal como almidón o una proteína, sin sufrir ningún cambio ellas mismas. Una enzima acelera una reacción específica. Todas las enzimas conocidas son proteínas y algunas facetas de la química de las proteínas deben de considerarse cuando tratamos con la naturaleza de las enzimas.

Las enzimas son proteínas largas, que al igual que otras proteínas, son producidas por células vivas de plantas, animales u otros organismos. En procesos industriales, pueden ser utilizadas para catalizar reacciones deseadas tales como la coagulación de la cuajada en la producción de quesos o para convertir almidón en jaraibe de maíz. Las enzimas aceleran la descomposición o síntesis de compuestos orgánicos tales como carbohidratos, grasas y proteínas. Las enzimas han sido utilizadas por muchos años por la Industria de Alimentos. Poseen una larga historia en la industria láctea, vitivinícola, cervecera, almidón y panificación.

La industria panadera utiliza enzimas en sus procesos de producción. La harina de trigo contiene suficiente cantidad de beta amilasa pero muy poca alfa amilasa. La alfa amilasa se le utiliza en la forma de malta, producida a partir de granos germinados o mediante el uso de preparaciones de amilasas fungales y bacteriales. Se consigue una buena producción de gas en la masa cuando estén presentes tanto la alfa amilasa como la beta amilasa, resultando un pan de mayor volumen y mejor color, grano, textura y compresibilidad de la miga. La utilización de enzimas proteolíticas en panificación reduce el tiempo de mezclado de la masa, proporcionando una buena textura al pan, una mejor estructura a la miga y un buen color a la corteza.

La utilización de enzimas proteolíticas es aconsejable para acondicionar harinas con alto nivel de proteínas, que serán utilizadas en la manufactura de galletas y pizzas. La enzima trabaja sobre la masa ablandándola y mejorando su extensibilidad (manipuleo). Disminuye el tiempo de mezclado necesario para desarrollar la masa, promoviendo uniformidad en el maquinado y dando en el horneado un mejor color, un grano más abierto y suave.

## REFERENCIAS

- Hoseney, R.C. 1986. Principles of Cereal Science and Technology. American Association of Cereal Chemists. St. Paul, Minnesota. U.S.A.
- Pyley, E.J. 1988. Baking Science & Technology. Third Edition. Sosland Publishing Company. Merriam, Kansas. U.S.A.
- Silverstein, O. 1964. Heat Stable Bacterial Alfa Amylase in Baking. Bakers Digest 38(4):66.
- Werkman, C.H. 1946. En: Enzymes and Their Role in Wheat Technology. Editor: J.A. Anderson. Interscience Publishers, Inc. New York. U.S.A.