

ENZIMAS: CIENCIA Y TECNOLOGÍA AL SERVICIO DE LOS ENÓLOGOS

DRA. DONATELLA PETEGOLLI
BRAND MANAGER ENZIMAS RAPIDASE

Enzimas

ORIGEN
PRODUCCIÓN
LEGISLACIÓN

Clases de Enzimas: qué es el número EC?

- EC = “Enzyme commission” , parte de IUBMB
- 1^{er} número describe el tipo de reacción
 - EC 1. oxidoreductasas
 - EC 2 Transferasas (acil metil, fosforil,..)
 - **EC 3 Hidrolasas**
 - EC 4 liasa = el enlace covalente se rompe sin hidrólisis
 - EC 5 isomerasa : Glucosa en fructosa
 - EC 6 ligasas : crea un enlace covalente

Clases de Enzimas: qué hidrolasas ?

- EC 3 Hidrolasas

EC 3.1 hidrólisis de enlaces éster

EC 3.2 glicosidasas

EC 3.3 hidrolisis de enlaces éter

EC 3.4 hidrolisis de enlaces péptidicos

13 clases en total

Clases de Enzimas : glicosilasas ?

- EC 3.2.1 rompe enlaces O- y S-glicosil
- El último dígito describe el sustrato
 - EC 3.2.1.1 . Alfa-amilasa
 - EC 3.2.1.4 Celulasa
 - EC 3.2.1.8 endo-xilanasa
 - EC 3.2.1.15 Poligalacturonasa
 - EC 3.2.1.21 beta-glucosidasa
 -
 - hasta EC 3.2.1.184 diacetil bacillosamine epimerasa

Enzimas Industriales: orígenes?

- Hongos :

- *A. niger* , *A. aculeatus*, *A. oryzae*
- *Trichoderma longibrachiatum*, *reesei*, *harzianum*
- *Disporotrichum dimorphosporum*
- *Talaromyces emersonii*
- ...



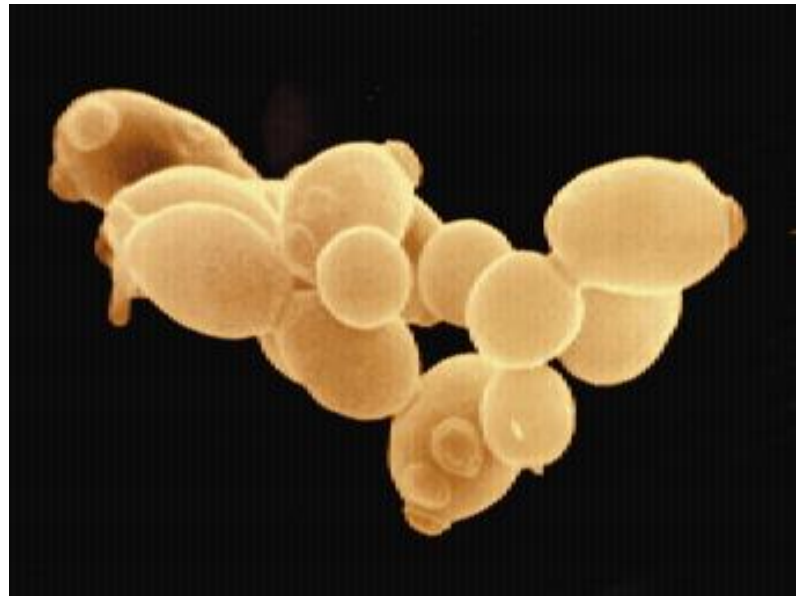
Enzimas Industriales: orígenes?

- Bacterias:
 - *Bacillus subtilis*
 - *Bacillus amyloliquefaciens*
 - *Bacillus licheniformis*
 - *Escherichia Coli*
 - ...



Enzimas Industriales: orígenes?

- Levaduras:
 - *S. cerevisiae*
 - *Kluyveromyces lactis*
 - ...



Enzimas Industriales: orígenes?

- Plantas:

- Malta de cebada

- Papaya

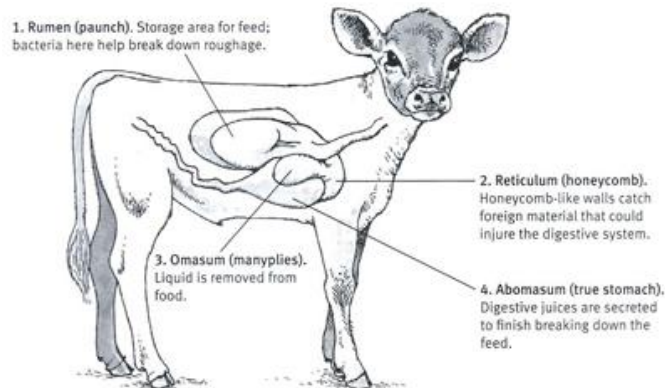
- Piña

- ...

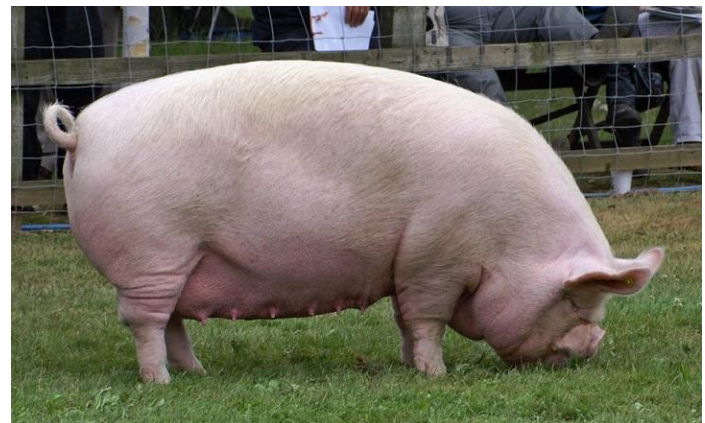


Enzimas Industriales: orígenes?

- Animales:
 - Clara de huevo
 - Pancreas de cerdo
 - Estómago del becerro
 - ...



Ruminants, such as cattle, have four-part stomachs.



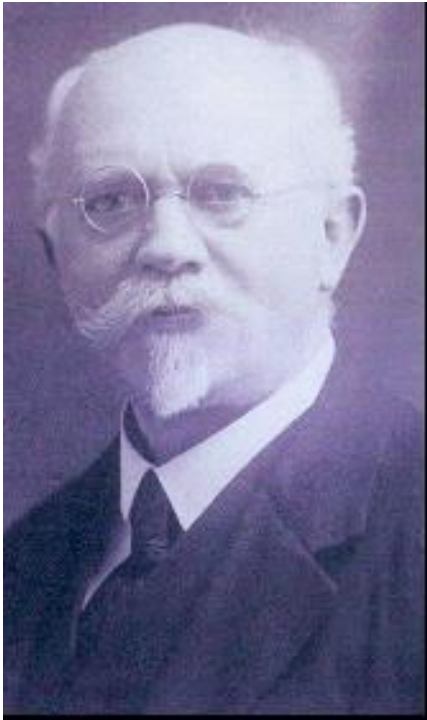
Producción de enzimas por fermentación: cuáles son los principales procesos?

- Fermentación Sumergida (líquida)
- SSF : “solid state fermentation”: fermentación en estado sólido

Más de un siglo en tecnología de Enzimas por Fermentación Sumergida

En 1906...Una AMILASA de origen bacteriano es descubierta por un alumno del Instituto Pasteur de Lille, Auguste BOIDIN.

Es el origen de su empresa, así empezó a producir enzimas en Seclin (Francia)



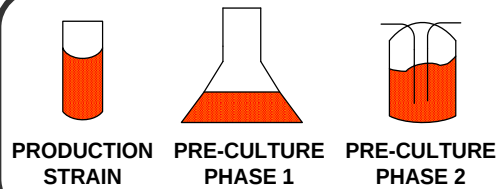
Producción de enzimas por fermentación Sumergida

Fermentación Sumergida Líquida: Seclin (Francia)

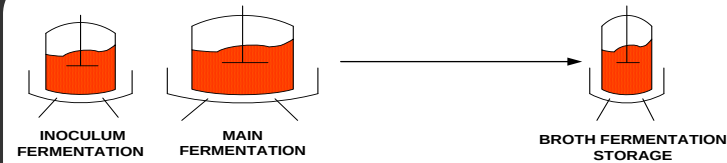


Proceso DSM de Producción por Fermentación Sumergida Líquida

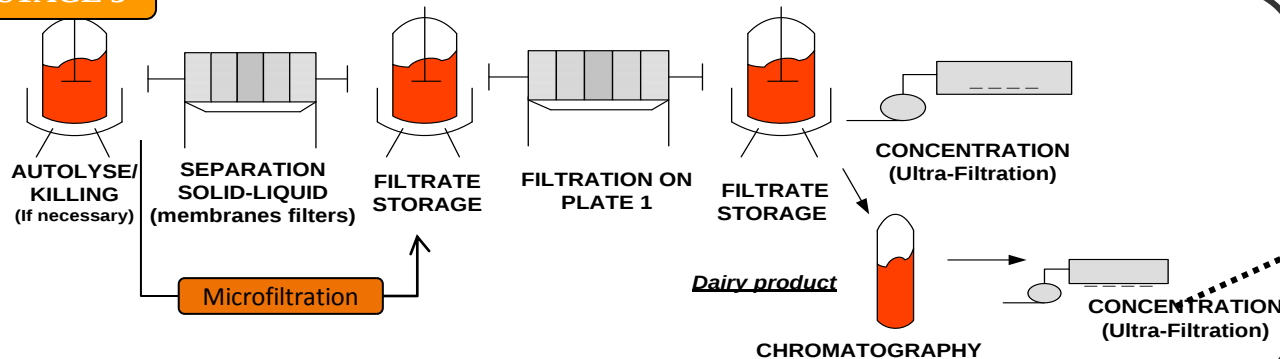
STAGE 1



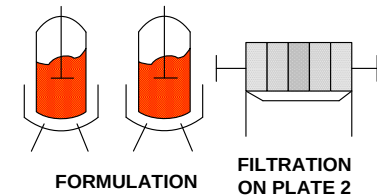
STAGE 2



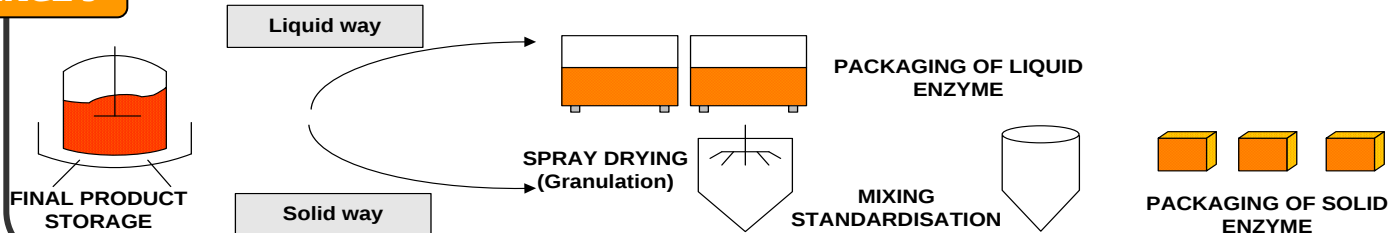
STAGE 3



STAGE 4



STAGE 5



PERÍMETRO DE CERTIFICACIÓN DE SEGURIDAD ALIMENTARIA

Producción de enzimas por fermentación: cuáles son los principales procesos?

- SSF es una tecnología relativamente sencilla; los hongos crecen en sustrato sólido con agua, cuyo contenido puede variar
- En algunos casos las enzimas se producen mediante SSF usando cultivadores en bandejas, de 15-30 cm de espesor
- Esterilización, inoculación, crecimiento en condiciones húmedas, nutrientes pulverizados
- Después el medio SSF se prensa/lava con agua para recuperar las enzimas
- Se puede aplicar a hongos filamentosos: *A niger*, *oryzae*, *aculeatus*, *japonicus*, *Talaromyces Penicilli*, *Trichoderma*, *Rhizopus*, ...

La salsa de soja se produce con *A oryzae*

Producción de Enzimas por Fermentación: pueden ser purificadas, cómo?

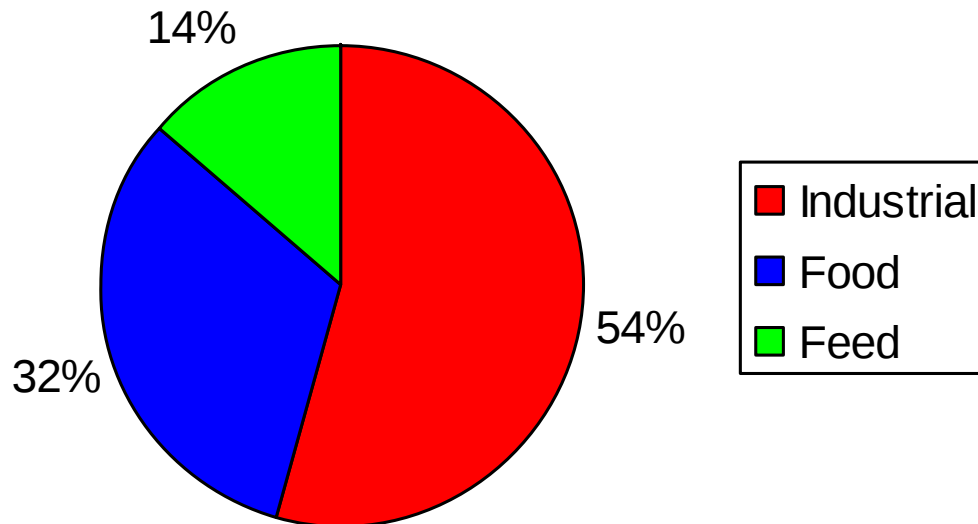
- La mayoría de las enzimas son un medio “crudo” de fermentación
- En algunos casos (Invertasa) la enzima se debe extraer del microorganismo
- Opciones de purificación
 - Chromatografía
 - Choques de pH
 - Choques de Temperatura

Mercados de aplicación de las Enzimas?

- Farmacéutica y salud
- Detergentes
- Bioetanol de 1ª y 2ª generación
- Bioplásticos
- Textil
- Conversión de almidón
- Alimentación animal
- Mejora digestiva
- Alimentación humana

La segmentación de mercado de las Enzimas: Industrial, Food (Alimentación) y Alimentación Animal

- Hoy en día, las enzimas se usan en muchas industrias. El mercado se segmenta de manera habitual en Enzimas para Alimentación (Food Enzymes), Alimentación Animal e Industriales

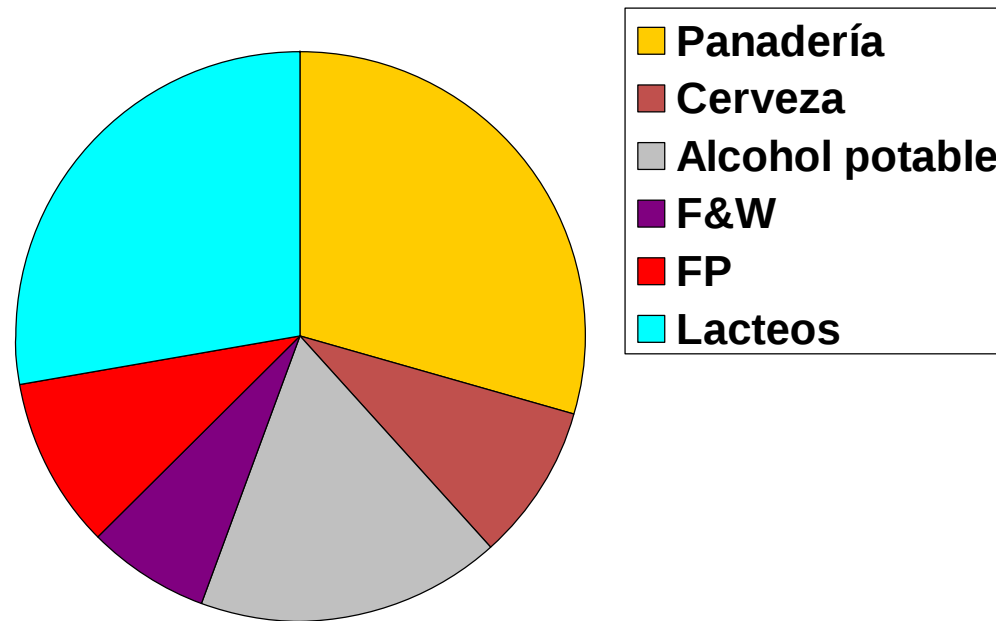


- Enzimas Industriales (detergentes, textil, almidón) es el mayor segmento de producción

“Food Enzymes” : mercados de aplicación?

- Food
 - Panadería (amilasas, galactolipasas , xilanasas, proteasas)
 - Lácteos (lactasa, chymosine , proteasas, lipasas)
 - Carne (transglutaminasa)
 - Desgomado de aceite en refinado (fosfolipasa)
 - Cervecería: glucanasas, xilanasas, amilasas
 - Procesado de fruta: pectinasas, xilanasas, amilasas, AG
 - Vino
 - Alcohol: amilasas , AG
 - Mayonesa (fosfolipasa)
 - Galletas y “snacks” (asparaginasa)

El Mercado de las “Food Enzymes”



Panadería, Lácteos y Alcohol “potable” son los segmentos más importantes dentro de las “Food Enzymes”

Ejemplos de « Food Enzymes »



Pan



Cerveza



Lácteos



Mayonesa



Procesado de Frutas



Vino



Alcohol



Tartas& snacks

Zumos de frutas



Aplicación de Enzimas: 1 único uso, alternativas?

- Las enzimas se usan de manera general 1 sola vez
 - Añadidas a un líquido o semi-líquido
- Enzimas encapsuladas: columna catalítica
 - Glucosa isomerasa

Las Enzimas y el etiquetado de los Alimentos: cuales son las reglas?

- Las enzimas son “coadyuvantes” de elaboración y no “Aditivos”
 - Ausente en el producto final
 - Presente pero no “funcionalmente activo”
- NO se requiere etiquetado en el producto final

Las Enzimas y el etiquetado de los Alimentos: las excepciones

- Invertasa
 - Lisozima
- Son considerados “Aditivos”, por lo que está sometidos a etiquetado

Las Enzimas y la Legislación Europea de Alimentos: qué regulación?

- **Reglamento 1332/2008**

- Define las reglas de etiquetado
 - Enzimas utilizadas en Vino = no se venden al consumidor final
-
- No se requiere etiquetado en el producto final

Las Enzimas y la Legislación Europea de Alimentos: qué regulación?

- **Reglamento 1332/2008**

- Hacia una lista positiva de todas las enzimas aprobadas. Una documentación por cada enzima desde 03/2015
- “Tox dossier” de cada enzima
- Publicación de una lista positiva en 2020

Regulación de las enzimas de vino

“OIV International Enological Codex
and Code”

Regulación de la EU

Las Enzimas Enológicas y la regulación de la OIV

International Code of Enological Practices ?

- Resolución 11/04 : enzimas en clarificación de mostos
- Resolución 12/04 : enzimas en clarificación de vinos
- Resolución 13/04 : enzimas en maceración de uva
- Resolución 14/04 : enzimas para mejorar la filtrabilidad de los mostos

Las Enzimas Enológicas y la regulación de la OIV

International Code of Enological Practices ?

- Resolución 15/04 : enzimas para mejorar la filtrabilidad de los
- Resolución 16/04 : enzimas para liberar sustancias aromáticas del mosto
- Resolución 17/04 : enzimas para liberar sustancias aromáticas del vino
- Resolución 18/04 : enzimas para solubilizar componentes de levaduras

Las Enzimas Enológicas y la regulación de la OIV

International Code of Enological Practices ?

- Resolución 3/84 : adición al vino de beta-glucanasas

Las Enzimas y la Regulación Europea del Vino

reglas y relaciones con la OIV ?

- Desde 2008, OIV se traducen en la legislación europea
 - Ley europea 606/2009, modificada 53/2011 : Anexo A 1 : tratamientos autorizados
- « Empleo de las preparaciones enzimáticas para uso enológico para la maceración, clarificación, estabilización, filtración y revelación de los precursores aromáticos de la uva presentes en el mosto y el vino »
- « Las preparaciones de enzimas y actividades enzimáticas que deben cumplir las correspondientes especificaciones de pureza e identidad del Codex enológico internacional publicado por la OIV »

La aplicación de las enzimas en enología está definida por el “OIV International Enological codex and Code”

Hasta 2013	Desde 2013
Pectinasas para la clarificación de mostos de uva	Pectinasas, celulasas, glucanasas, xilanasas para varias aplicaciones: maceración, rendimiento, clarificación , ...
Beta-glucanasas para filtración de vinos	Beta-glucanasas para filtración y crianza sobre lías
	Glicosidasas para la hidrólisis de precursores aromáticos de la uva
Lisozima para la prevención de contaminación microbiana durante la fermentación	Lisozima para la prevención de contaminación microbiana

Enzimas enológicas

Enzimas	Producción micro-organismo	Producción técnica	Formulaciones
Polisacarido-hidrolasas : pectinasas, celulasas, glucanasas, xilanasas ...	<i>A. niger</i> , <i>A. aculeatus</i> , <i>T. longibrachiatum</i> ...	Fermentaciones sumergida o de superficie	Líquida glicerol/ KCl
Glicosidasas	<i>A. niger</i>		Microgranuladas maltodextrina
Glucanasas	<i>T. harzianum</i> , <i>T. sp.</i>		
Lisozima	Clara de huevo	Purificada por Cromatografía	Microgranulada pura

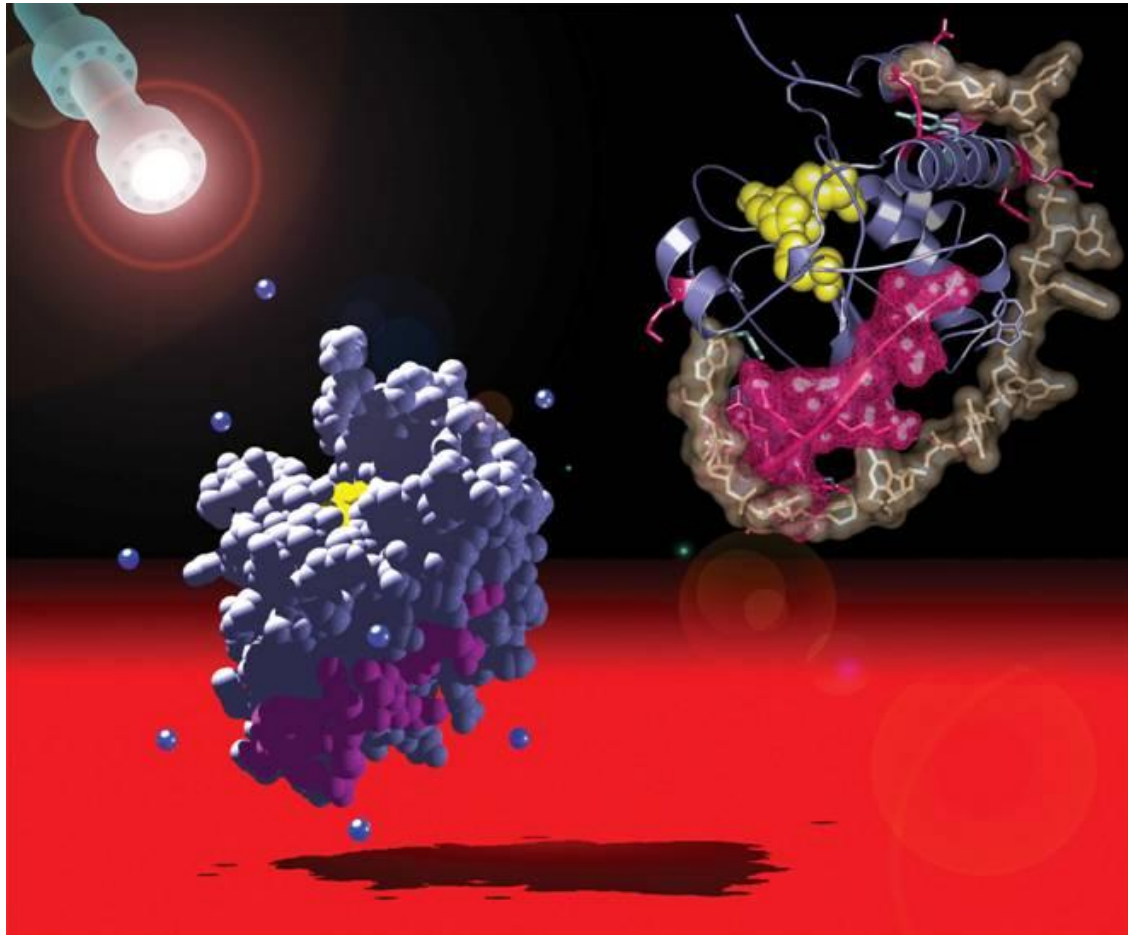
Formulaciones de enzimas enológicas: cuáles son las opciones?

- Granulada en maltodextrina
- Líquida en Glycerol + KCl

ENZIMAS, UN POCO DE BIOQUÍMICA

Enzimas, un poco de bioquímica

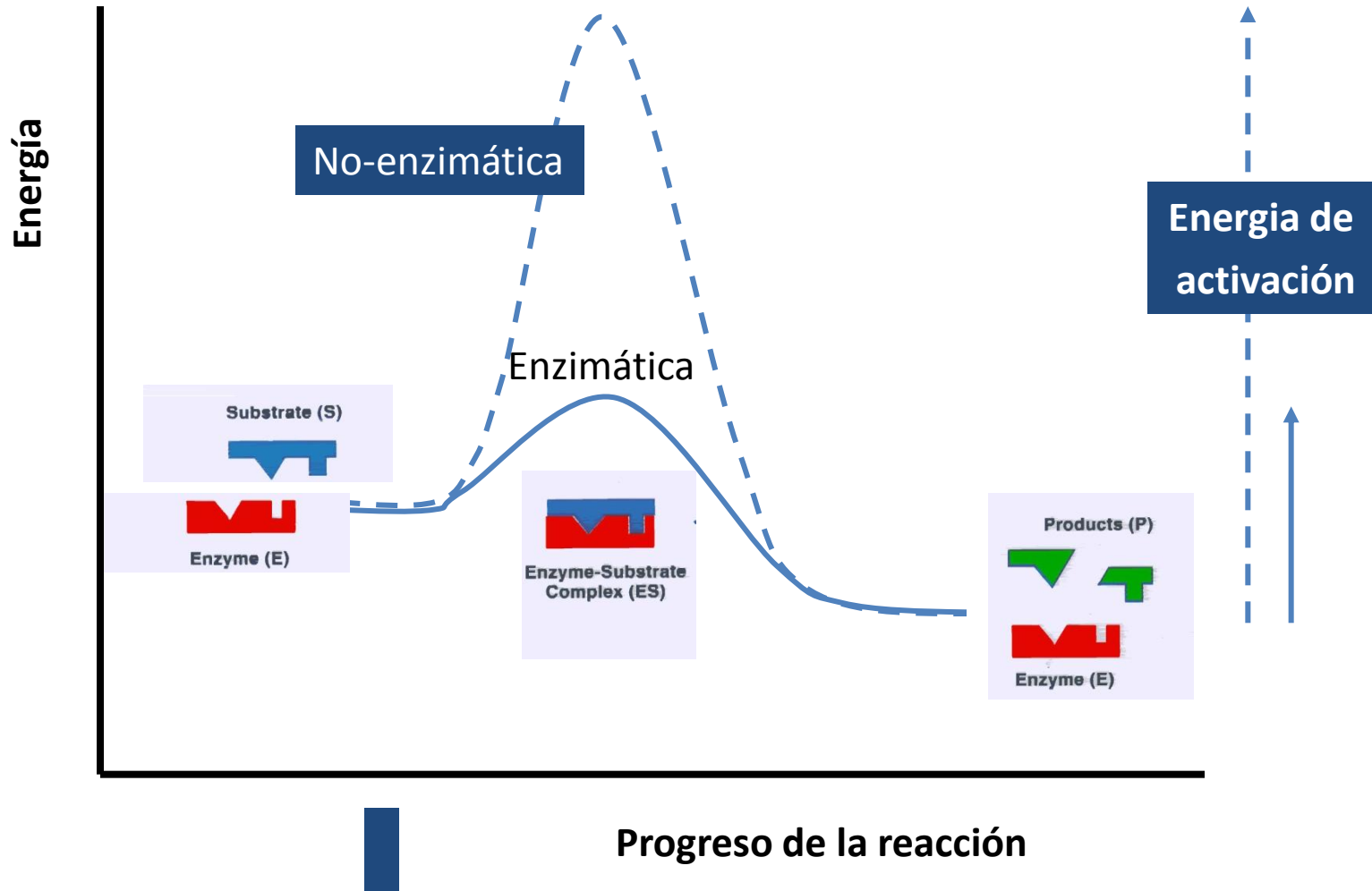
Qué es lo que parecen?



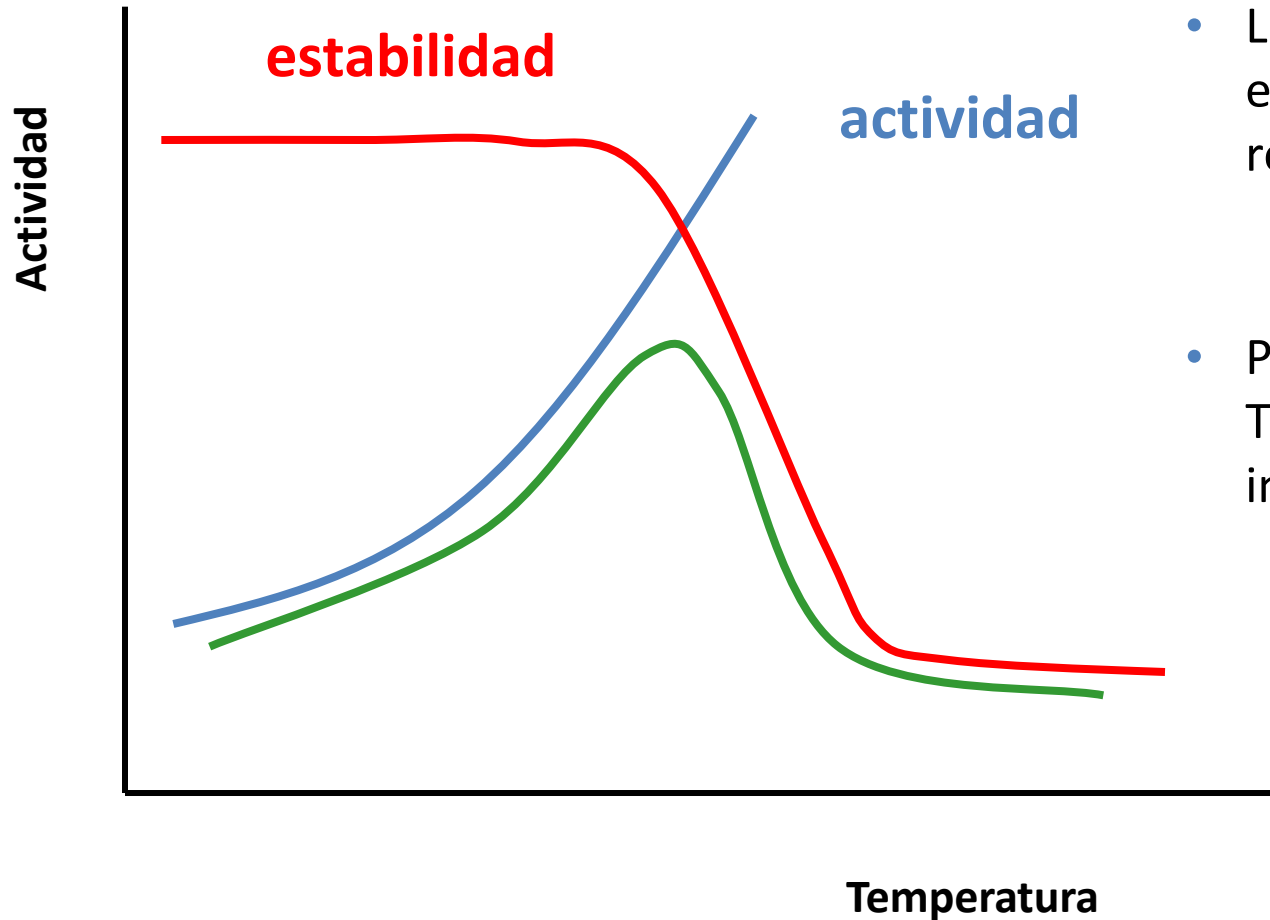
Las enzimas son proteínas

- Estructura primaria
 - Una proteína es una cadena de aa
- Estructura secundaria
 - El plegado de la cadena de aminoácidos en una estructura de elementos tridimensional
- Estructura terciaria
 - Los elementos secundarios de estructura y otros aminoácidos en 3D (incluidos puentes S-S)
- Estructura cuaternaria
 - Algunas enzimas necesitan un complejo de dos o más estructuras terciarias reunidos para ser activas

La energía de activación de una reacción



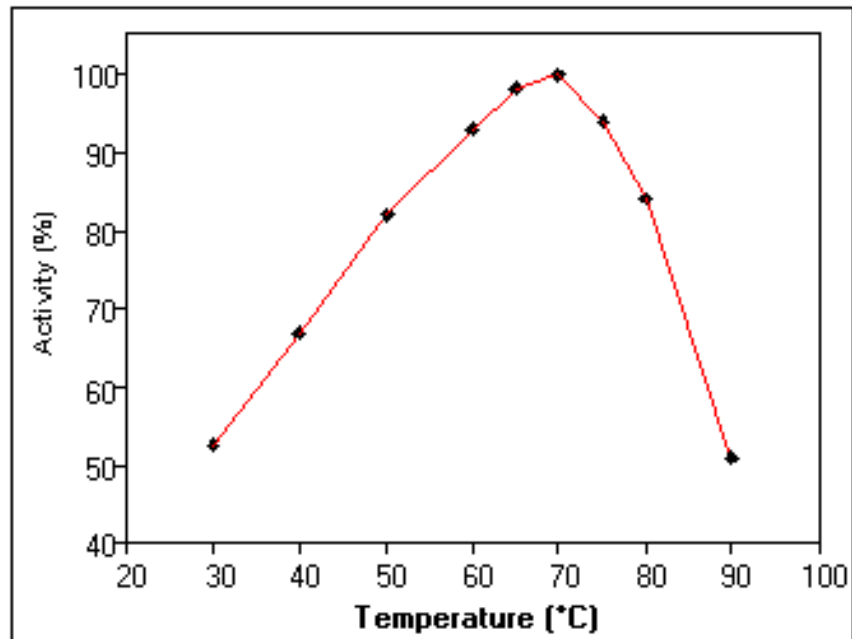
Temperatura Óptima



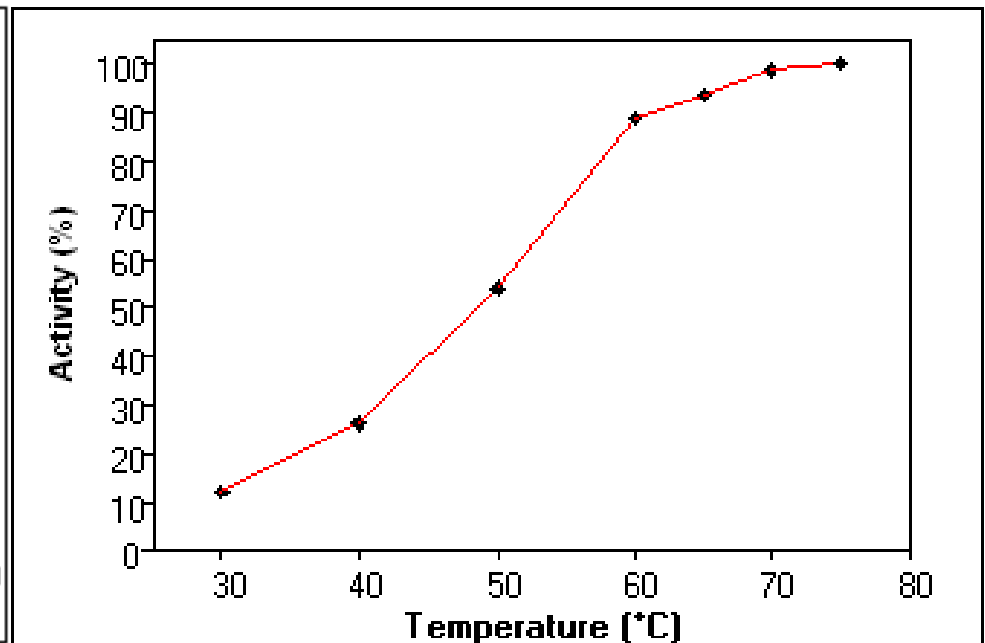
- La actividad enzimática es el resultado de
 - Incremento de actividad a mayor T^a
- Por encima de cierta T^a las enzimas se inactivan rápidamente

La actividad relativa en relación con la temperatura:
criterios esenciales para la elección de las enzimas!

Bacterial Alpha – amilasas

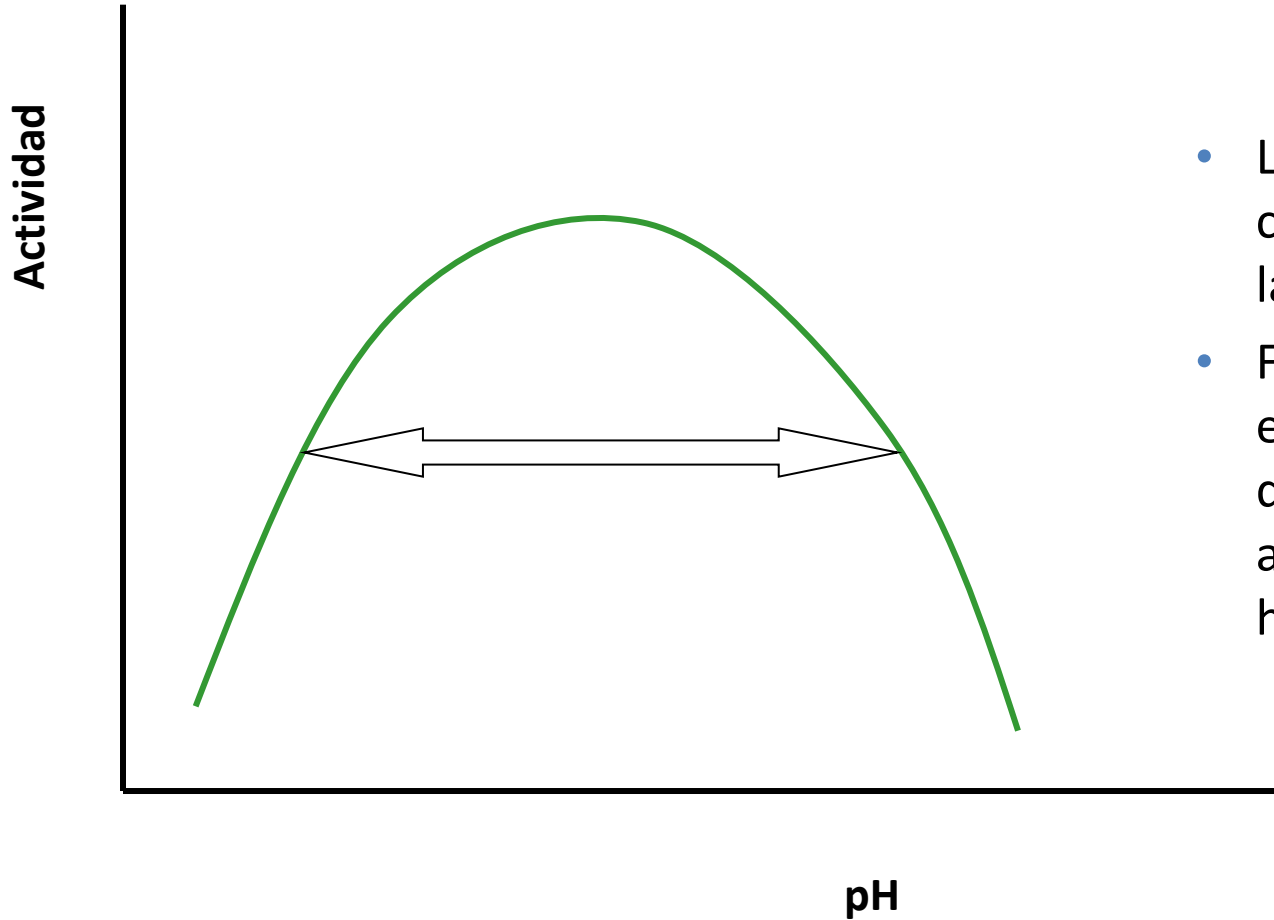


Bacillus amyloliquefaciens



Bacillus licheniformis

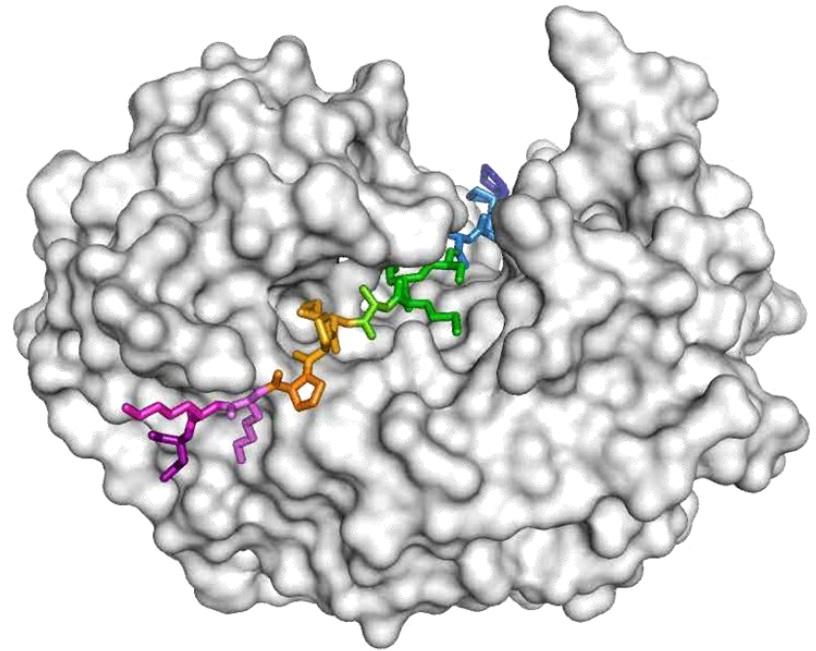
pH óptimo



- Las enzimas tienen un cierto rango de pH en la que son activas
- Fuera de este rango existe un fuerte decrecimiento de la actividad de manera habitual

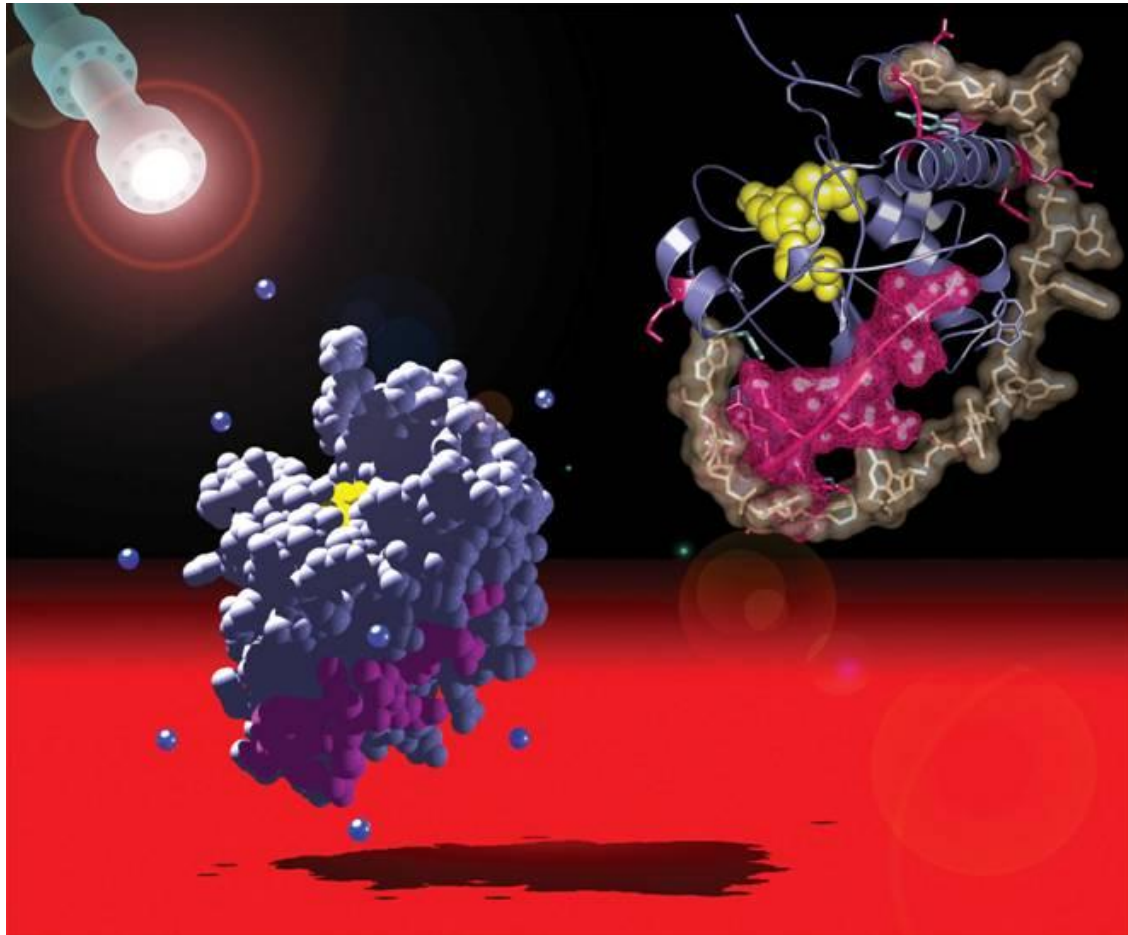
Enzimas: son fácilmente desnaturalizables?

- Choques de pH
- Calor, con excepciones caso de las enzimas termoestables



La complejidad de la bioquímica de la pectinasa

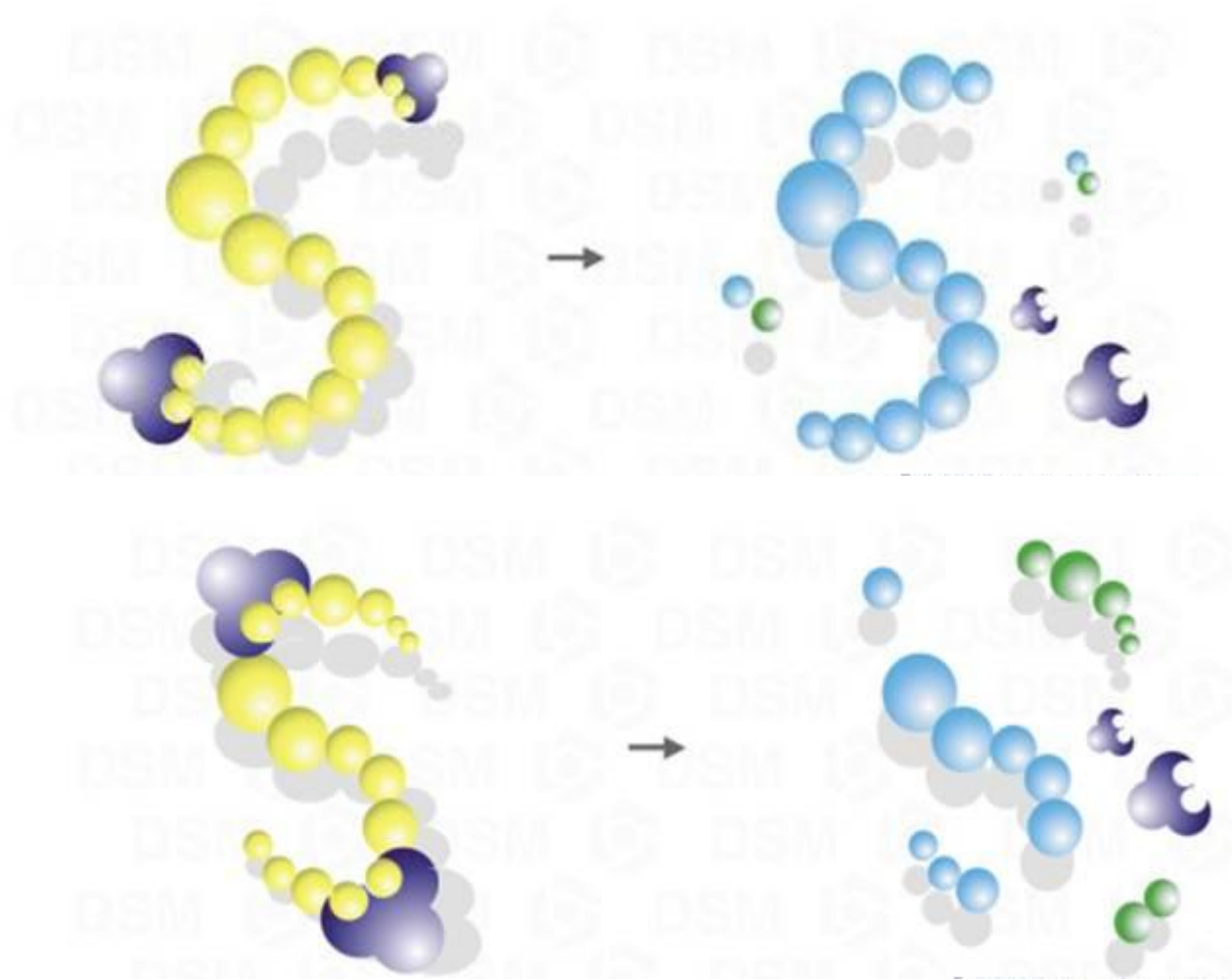
Cuántas poligalacturonasas en *A. niger* ?



Diversidad de los perfiles enzimáticos:
cuántas enzimas producidas por una cepa clásica de
A. niger ?

- 6 endo-PG
- 3 exo –PG
- 3 Pectin Liasas
- Pectato liasa
- 1 Endo-(alpha-1,5)-L-arabinanasa
- 3 arabinofuranosidasa
- 2 Rhamnogalacturonasas
- 3 Cellobiohidrolasas

Hidrolasa de ruptura “Exo” y “endo”



USO DE ENZIMAS EN ENOLOGÍA

Las enzimas son una herramienta fundamental para cualquier elaboración de vino!

3 familias de Enzimas función de sus objetivos:

1. Mejora de Proceso

2. Mejora de la calidad del vino

3. Resolución de problemas

Mejora del Proceso

Mejora de la calidad

Resolución de problemas

Debates en marcha

Enzimas de Mejora de proceso

Proceso mejorado	Perfil de la actividad	Beneficios para el enólogo
Mejora del Prensado & rendimiento mosto	Pectinasas activas en cadenas laterales de homogalacturónico y arabinan	Ahorro de costes , mas rendimiento de mosto
Clarificación del mosto por flotación	Pectinasa activa en homogalacturónico	Ahorro de tiempo y trabajo
Clarificación del mosto por desfangado estático	Pectinasa activa en homogalacturónico	Ahorro de energía
Clarificación de mostos y vinos por filtración	Pectinasa activa en homogalacturónico Glucanasas	Sostenibilidad: menos viñedo para el mismo volumen de producción
Termovinificación	Pectinasa termoestables	Más calidad de mosto: flor
		Menos oxidación por menor tiempo de producción antes de la FA

Enzimas de Mejora de proceso

Proceso mejorado	Perfil de la actividad	Beneficios para el enólogo
Mejora del Prensado & rendimiento mosto	Actividades Pectinasas activas en cadenas laterales de homogalacturónico y arabinan	Ahorro de costes, mas rendimiento de mosto
Clarificación del mosto por flotación	Pectinasa activa en homogalacturónico	Ahorro de tiempo y trabajo
Clarificación del mosto por desfangado estático	Pectinasa activa en homogalacturónico	Ahorro de energía
Clarificación de mostos y vinos por filtración	Pectinasa activa en homogalacturónico Glucanasas	Sostenibilidad: menos energía utilizada
Termovinificación	Pectinasa termoestables	Más calidad de mosto: flor
		Menos oxidación por menor tiempo de producción antes de la FA

Enzimas de Mejora de proceso

Proceso mejorado	Perfil de la actividad	Beneficios para el enólogo
Mejora del Prensado & rendimiento mosto	Actividades Pectinasas activas en cadenas laterales de homogalacturónico y arabinan	Ahorro de costes, mas rendimiento de mosto
Clarificación del mosto por flotación	Pectinasa activa en homogalacturónico	Ahorro de tiempo y trabajo
Clarificación del mosto por desfangado estático	Pectinasa activa en homogalacturónico	Ahorro de energía
Clarificación de mostos y vinos por filtración	Pectinasa activa en homogalacturónico Glucanasas	Sostenibilidad: menos energía utilizada
Termovinificación	Pectinasa termoestables	Mejor calidad de mosto: menor turbidez para mejor calidad del vino
		Menos oxidación por menor tiempo de producción antes de la FA

Enzimas de Mejora de proceso

Proceso mejorado	Perfil de la actividad	Beneficios para el enólogo
Mejora del Prensado & rendimiento mosto	Actividades Pectinasas activas en cadenas laterales de homogalacturónico y arabinan	
Clarificación del mosto por flotación	Pectinasa activa en homogalacturónico	Time and labour savings
Clarificación del mosto por desfangado estático	Pectinasa activa en homogalacturónico	Energy savings
Clarificación de mostos y vinos por filtración	Pectinasa activa en homogalacturónico Glucanasas	Sustainability : less energy used
Termovinificación	Pectinasa termoestables	Proceso no realizable sin enzimas

Mejora del Proceso

Mejora de la calidad

Resolución de problemas

Debates en marcha

Enzimas de Mejora de la calidad

Mejoras de la calidad	Perfiles de actividad	Aplicadas a la etapa del proceso	Beneficios para los enólogos
Liberación de precursores aromáticos de la piel de la uva	Pectinasas , Rgasas,	Maceración de pieles de uvas tintas y blancas	Incremento de aromas de uva como tioles y terpenos,
Taninos y otros polifenoles	Pectinasas , Rgasas, Xilanasas, celulasas	Maceracion de uvas tintas	Incremento del color y polifenoles esenciales para la calidad del vino
Aromas glicosidados de la uva no volátiles convertidos en aromas volátiles	Glucosidasa, arabinosidasa, rhamnosidasa, apiosidasa	Aplicada al vino	Incremento de terpenos y norisoprenoides
Liberación de compuestos específicos de la levadura	Beta-(1,6)-glucanasas	Crianza sobre lías, batonnage	Boca, aroma, mejora de la estabilidad

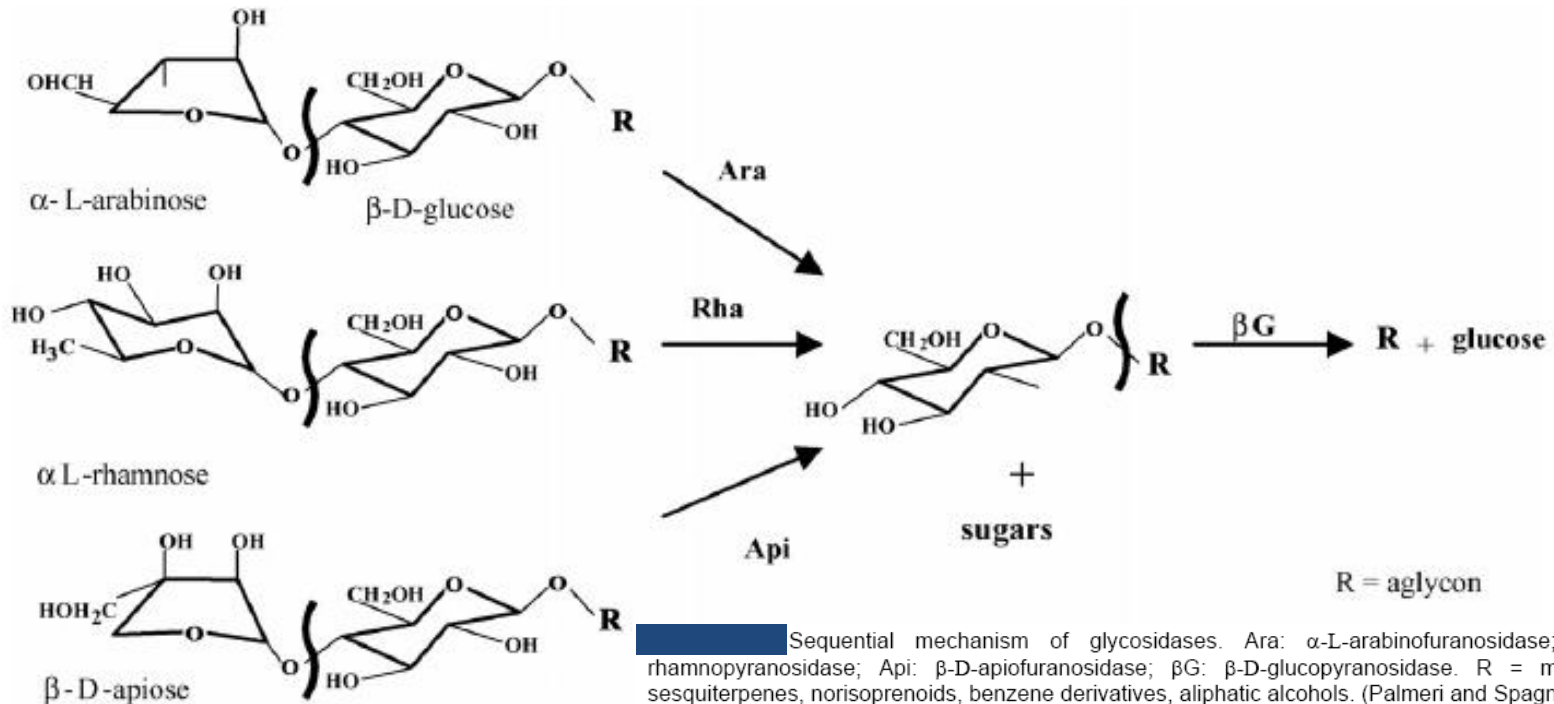
Enzimas de Mejora de la calidad

Mejoras de la calidad	Perfiles de actividad	Aplicadas a la etapa del proceso	Beneficios para los enólogos
Liberación de precursores aromáticos de la piel de la uva	Pectinasas , Rgasas,	Maceración de pieles de uvas tintas y blancas	Incremento de aromas de uva como tioles y terpenos,
Antocianos y polifenoles	Pectinasas , Rgasas, Xilanasas, celulasas	Maceracion de uvas tintas	Incremento del color y polifenoles esenciales para la calidad del vino
Aromas glicosidados de la uva no volátiles convertidos en aromas volátiles	Glucosidasa, arabinosidasa, rhamnosidasa, apiosidasa	Aplicada al vino	Incremento de terpenos y norisoprenoides
Liberación de compuestos específicos de la levadura	Beta-(1,6)-glucanasas	Crianza sobre lías, batonnage	Boca, aroma, mejora de la estabilidad

Enzimas de Mejora de la calidad

Mejoras de la calidad	Perfiles de actividad	Aplicadas a la etapa del proceso	Beneficios para los enólogos
Liberación de precursores aromáticos de la piel de la uva	Pectinasas , Rgasas,	Maceración de pieles de uvas tintas y blancas	Incremento de aromas de uva como tioles y terpenos,
Taninos y otros polifenoles	Pectinasas , Rgasas, Xilanasas, celulasas	Maceracion de uvas tintas	Incremento del color y polifenoles esenciales para la calidad del vino
Aromas glicosidados de la uva no volátiles convertidos en aromas volátiles	Glucosidasa, arabinosidasa, rhamnosidasa, apiosidasa	Aplicada al vino	Incremento de terpenos y norisoprenoides
Liberación de compuestos específicos de la levadura	Beta-(1,6)-glucanasas	Crianza sobre lías, batonnage	Boca, aroma, mejora de la estabilidad

Precursores aromáticos Glicosidados: hidrólisis enzimática secuencial



Mejora del Proceso

Mejora de la calidad

**Resolución de
problemas**

Debates en marcha

Enzimas de resolución de problemas

Problema solucionado	Enzima	Aplicadas a la etapa del proceso	Beneficios para los enólogos
Contaminación de bacterias lácticas	Lisozima	Fermentación	Evitar la contaminación debida a las bacterias lácticas heterofermentativas

Conclusión

las enzimas juegan un papel fundamental en el proceso de elaboración del vino

una mejor comprensión de los mecanismos moleculares de acción, permiten el diseño de enzimas más eficaz y adaptadas a cada objetivo

GRACIAS