



UNIVERSIDAD DEL AZUAY
FACULTAD DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA
ESCUELA DE INGENIERÍA EN ALIMENTOS

**Estudio de factibilidad de la utilización de enzimas vegetales en la
elaboración del queso tipo fresco**

Trabajo de graduación previo a la obtención del título de:
INGENIERA EN ALIMENTOS

Autora:
DIANA NOEMÍ JUCA VILLALTA

Director:
CLAUDIO ESTEBAN SÁNCHEZ JÁUREGUI

CUENCA – ECUADOR

2015

DEDICATORIA

Este trabajo está dedicado a todos quienes de alguna manera formaron parte de mi formación y aprendizaje, que compartieron su tiempo tan valioso para que yo pueda avanzar hasta el término de este objetivo. Todos aquellos que en el transcurso de mi vida me han brindado su ayuda desinteresada, pensando simplemente en mi bienestar. Pero de manera muy especial este trabajo está dedicado a mi mami Lolita, que ha sido mi inspiración y con su ejemplo de fortaleza y trabajo me ha enseñado que nada es imposible para lograr lo que uno se propone.

AGRADECIMIENTO

Mi agradecimiento va primeramente a Dios porque me permitió formar parte de una gran familia llena de virtudes, porque me ha dado salud, vida y sabiduría para llegar a culminar mi meta, gracias.

Me permito también agradecer a mis padres, especialmente a mi mamá que ha sido mi fortaleza, mi pilar y la que me ha llevado en sus brazos cuando me han faltado fuerza para seguir caminando, aquella que nunca dudo en privarse de muchas cosas para que yo pueda continuar en esta gran travesía, gracias.

Mis hermanas y hermanos que de una u otra forma me han alentado, con sus palabras, sus acciones, su ayuda desinteresada e incondicional hacia mí, nunca lo olvidare, gracias.

A mis cuñadas/os, que haciendo muchos trabajos por mí, también han contribuido inmensamente para que yo no decaiga y siga este camino ya trazado, algún momento sabré retribuir tanta bondad, gracias.

A mis amigas/os y compañeras/os que en el transcurso de estos años de estudio se volvieron mis hermanas/os, confidentes, que siempre estuvieron ahí, animándome a continuar para concluir con mis estudios, siempre serán parte importante en mi vida, gracias.

Gracias también a mis profesores que compartieron sus conocimientos y sabiduría para formara la persona lo que soy; pero de manera muy especial quiero agradecer al director de este trabajo, Ing. Claudio Sánchez, quien con su apoyo y conocimiento me ayudaron a concluir este trabajo, gracias.

Pido disculpas si no he mencionado a todos quienes han sido parte importante de este camino, pues este papel quedaría tan corto para nombrarlos a todos, mi infinito agradecimiento a todos, gracias.

Que Dios los bendiga y los colme de dicha a cada uno de ustedes por tanta bondad.

ÍNDICE DE CONTEIDOS

CONTENIDOS	Pág.
DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTO	iii
ÍNDICE DE CONTEIDOS	iv
ÍNDICE DE TABLAS	viii
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
ÍNDICE DE ANEXOS	xi
RESUMEN	xii
ABSTRACT	xiii
INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVOS	3
CAPÍTULO I: MARCO TEÓRICO	4
1.1. Especies vegetales que coagulan la leche	4
1.1.1. El higo (<i>ficus carica</i>)	4
1.1.1.1. Enzimas presentes en el látex de higo	5
1.1.2. El Chamburo.....	5
1.1.2.1. Enzimas presentes en el látex de chamburo.....	6
1.2. Enzimas	6
1.2.1. Definición	7
1.2.2. Clasificación y nomenclatura	8
1.2.2.1. Oxidorreductasas	8
1.2.2.2. Transferasas:	8
1.2.2.3. Hidrolasas:	8
1.2.2.4. Liasas:	9
1.2.2.5. Isomerasas:.....	9
1.2.2.6. Ligasas:	9
1.2.3. Las enzimas como catalizadores	10
1.2.4. Estructura de las Enzimas (proteínas)	11
1.2.4.1. Estructura primaria	12

1.2.4.2.	Estructura secundaria	12
1.2.4.3.	Estructura terciaria	13
1.2.4.4.	Estructura cuaternaria	14
1.2.5.	Las proteasas	15
1.2.5.1.	Peptidasas serínicas (EC 3.4.21).....	16
1.2.5.2.	Peptidasas treonínicas	16
1.2.5.3.	Peptidasas cisteínicas (EC 3.4.22)	17
1.2.5.4.	Peptidasas aspárticas (EC 3.4.23).....	17
1.2.5.4.1.	Mecanismo de acción.....	18
1.2.5.5.	Metalo-peptidasas (EC 3.4.24)	19
1.2.5.6.	Enzimas coagulantes de la leche.....	20
1.2.5.7.	Sitio Activo (ruta de hidrólisis)	20
1.2.5.8.	Factores que afectan la velocidad de las reacciones enzimáticas	22
1.2.5.8.1.	pH.....	22
1.2.5.8.2.	Temperatura	23
1.2.5.8.3.	Concentración de la enzima y el sustrato.....	24
1.2.6.	Métodos de extracción de enzimas.....	24
1.2.6.1.	Precipitación con solventes orgánicos	25
1.2.6.2.	Cromatografía de filtración en gel	25
1.2.6.3.	Cromatografía de intercambio iónico	26
1.2.7.	Determinación del contenido de proteínas – enzimas	26
1.2.7.1.	Mediciones por espectrofotometría de absorción UV a 280nm	26
1.2.8.	Los coagulantes de la leche	27
1.2.8.1.	Coagulantes de origen animal (cuajo)	28
1.2.8.2.	Coagulantes de origen microbiano	28
1.2.8.3.	Coagulantes de origen vegetal	28
1.3.	Proteínas lácteas	29
1.3.1.	La Caseína	30
1.3.1.1.	Estado de dispersión en la leche y su estructura.....	31
1.3.1.2.	Propiedades	32
1.3.1.3.	Punto isoeléctrico.....	33
1.3.1.4.	Estabilidad al pH y temperatura.....	33
1.3.1.5.	Precipitación de la caseína.....	34

1.3.1.5.1. Por ácidos.....	34
1.3.1.5.2. Por enzimas.....	35
1.3.2. Productos lácteos	35
1.3.2.1. El queso.....	35
1.3.2.1.1. Clasificación	36
1.3.2.1.2. Composición química y valor nutricional.....	36
1.3.2.1.3. Características organolépticas y evaluación sensorial del queso.....	37
1.3.2.1.4. Propiedades de textura	38
1.3.2.1.5. Proceso de elaboración del queso tipo fresco	40
1.4. Vida Útil.....	41
1.4.1. Métodos para determinar la vida útil en alimentos	41
1.4.1.1. Pruebas de vida útil a tiempo real	42
1.4.1.2. Métodos de factor de aceleración Q_{10}	42
1.4.1.3. Diseños escalonados.	43
CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS	44
2.1. Materiales, equipos, reactivos y muestras.....	44
2.2. Métodos.....	45
2.2.1. Toma de muestras.....	45
2.2.1.1. Toma de muestras de los frutos de <i>vasconcella cundinamarcensis</i> (chamburo).....	45
2.2.1.2. Toma de muestras de los frutos de <i>ficus carica</i> (higo).....	45
2.2.2. Extracción y secado del látex	46
2.2.3. Preparación de extractos acuosos	48
2.2.4. Purificación parcial de proteínas por precipitación con solventes orgánicos.	48
2.2.5. Determinación de la concentración de proteínas.....	49
2.2.6. Determinación de la fuerza de coagulación.....	50
2.2.7. Fuerza de coagulación y selección de la formula base del queso tipo fresco con mezcla de enzimas vegetales	50
2.2.8. Aplicación de diseño factorial 2^3 para encontrar la mejor combinación de los extractos enzimáticos.....	52
2.2.9. Vida útil del queso obtenido en el diseño experimental, en función de sus características sensoriales, químicas y microbiológica	53

CAPÍTULO III: RESULTADOS	56
3.1. Obtención de látex deshidratado a 40°C por 24 horas	56
3.2. Purificación parcial de las proteínas presentes en el extracto acuoso	57
3.3. Determinación del contenido de proteínas (enzimas) en extractos acuosos y semipurificado	57
3.4. Determinación de la fuerza de coagulación de las enzimas	59
3.5. Fuerza de coagulación y selección de la fórmula base del queso tipo fresco con mezcla de enzimas vegetales	60
3.6. Diseño factorial 2 ³	61
3.7. Determinación de la vida útil	66
3.7.1. Análisis bromatológicos	66
3.7.2. Análisis microbiológicos	67
3.7.3. Análisis sensoriales	69
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	72
BIBLIOGRAFIA	75
ANEXOS	80

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Composición nutricional del higo.....	5
Tabla 2: Enzimas de interés en alimentos	10
Tabla 3: Proteasas comerciales	19
Tabla 4: Numero EC para enzimas coagulantes de la leche.	20
Tabla 5: pH de actividad óptima de algunas enzimas	23
Tabla 6: Proteínas presentes en la leche.....	30
Tabla 7: Composición química de leche, queso y suero	37
Tabla 8: Mezcla de enzimas vegetales	51
Tabla 9: Matriz de diseño 2 ³	52
Tabla 10: Requisitos físico-químicos queso fresco.....	54
Tabla 11: Requisitos microbiológicos queso fresco	55
Tabla 12: Rendimiento y % de humedad del Chamburo e higo	56
Tabla 13: Rendimiento de la semipurificación de las enzimas	57
Tabla 14: Contenido de proteínas (enzimas).....	58
Tabla 15: Fuerza de coagulación de papaína (chamburo), ficina (higo) y cuajo comercial.....	59
Tabla 16: Rendimiento y aceptación del queso elaborado con enzimas vegetales	60
Tabla 17: Características físico-químicas de la materia prima	61
Tabla 18: Niveles máximos y mínimos de las variables a estudiar.....	61
Tabla 19: Rendimiento expresado en % de aceptación de cada experimento.....	62
Tabla 20 Matriz de diseño para evaluar porcentaje de rendimiento.	64
Tabla 21: Análisis bromatológicos	67
Tabla 22: Análisis microbiológicos del queso comercial durante cuatro semanas....	67
Tabla 23: Análisis microbiológico del queso con enzimas vegetales durante cuatro semanas	68

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Aplicaciones industriales de las enzimas.....	7
Figura 2: Enlaces químicos encontrado en las proteínas y sus fuerzas de unión.....	12
Figura 3: Estructuras estimadas de lisozimas tipo c, g, y v. (a) Lisozima de pollo con vista al sitio activo. (b) Resalte de los cuatro puentes disulfuro. (c) Lisozima de ganso. (d) Lisozima T4 de huevo.....	13
Figura 4: Estructuras terciarias de la faseolina (a) y la b-lactoglobulina (b). Las flechas representan las placas β , y los cilindros a las α -hélices	14
Figura 5: Representación esquemática de las estructuras primaria, secundaria y terciaria de la mioglobina. Los puntos oscuros representan los átomos de carbono a de los aminoácidos. El grupo hemo se localiza en la parte central superior de la molécula.....	15
Figura 6: Centro activo de la quimotripsina.....	21
Figura 7: Hidrólisis de la caseína	22
Figura 8: Coagulantes de uso común y sus enzimas componentes.....	29
Figura 9: Molécula de caseína.....	32
Figura 10: Clasificación de los quesos.....	36
Figura 11: Descriptores para análisis sensorial de quesos	38
Figura 12: Proceso de elaboración de queso	41
Figura 13: Recolección de frutos de chamburo en los huertos de la comunidad de Maras.....	45
Figura 14: Recolección de frutos de higo utilizados para la extracción de látex.....	46
Figura 15: Extracción de látex de chamburo; b) Látex de chamburo seco	47
Figura 16: Diagrama de obtención de látex seco	47
Figura 17: a) Extracto acuoso látex de chamburo; b) Extracto acuoso látex higo	48
Figura 18: Semipurificación d proteínas; b) Extracto semipurificado	49
Figura 19: Coagulación de la leche mediante enzimas ficina y papaína.....	50
Figura 20: Proceso de elaboración del queso tipo fresco con enzimas vegetales	52
Figura 21: Corte de la cuajada para elaborar quesos con enzimas vegetales.....	53
Figura 22: Análisis microbiológicos durante el tiempo de almacenamiento del queso	53
Figura 23: Producto final empacado y almacenado para análisis de vida útil.	55
Figura 24: Efectos de las variables sobre las características organolépticas del queso.	63
Figura 25: Efecto de las variables y su combinación, sobre el porcentaje de rendimiento del queso	65
Figura 26: Análisis de grasa en queso.....	66
Figura 27: Crecimiento de Enterobacterias en queso con quimosina vs papaína-ficina.....	68
Figura 28: Crecimiento de S. Áureas en queso con quimosina vs papaína-ficina.....	69
Figura 29: Evaluación sensorial del queso por catadores de laboratorio.....	69

Figura 30: Nivel de aceptación en función del tiempo de almacenamiento para el queso elaborado con quimosina	70
Figura 31: Nivel de aceptación en función del tiempo de almacenamiento para el queso elaborado con papaína-ficina	71

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexos 1: Ficha de cata para queso	81
Anexos 2: Resultados obtenidos en la catación de quesos.....	82
Anexos 3: Datos de curvas - efectos de las variables –.....	83

FEASIBILITY STUDY OF PLANT ENZYMES USED IN THE PRODUCTION OF FRESH TYPE CHEESE

ABSTRACT

In order to find alternatives for the processing of products in the dairy industry, two plant enzyme extracts obtained from *Ficus carica* (figs) and *Vasconcellea cundinamarcensis* (chamburo or mountain papaya) were studied as coagulants to produce a fresh type cheese. The latex of the fruit was removed and a partial purification given; thereby, improving its coagulant capacity. A saline solution from each enzyme was developed from the extracts obtained; afterwards, a mixture by experimental design was carried out, and thus obtained a fresh type cheese with ideal characteristics for consumption. After choosing the more accepted final product, its shelf life was determined by testing the feasibility of substituting *chymosin* rennet with the enzymes studied, through physicochemical, microbiological and sensory or acceptance tests.

Keywords: Plant Enzymes, Cheese, Shelf Life



Ing. Fausto Tobías Parra Parra
School Director



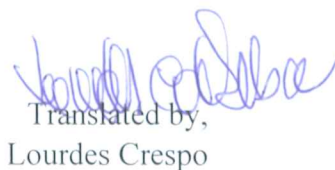
Ing. Claudio Esteban Sánchez Jáuregui
Thesis Director



Diana Noemí Juca Villalta
Author



UNIVERSIDAD DEL CAUCA
-AZUAY-
Dpto. Idiomas



Translated by,
Lic. Lourdes Crespo

ESTUDIO DE FACTIBILIDAD DE LA UTILIZACIÓN DE ENZIMAS VEGETALES EN LA ELABORACIÓN DEL QUESO TIPO FRESCO

RESUMEN

Con el propósito de buscar alternativas para la elaboración de productos en la industria láctea, se estudió a dos extractos enzimáticos vegetales, obtenidos del *Ficus carica* (higos) y del *Vasconcella cundinamarcensis* (chamburo), como coagulantes para elaborar un queso tipo fresco. Se extrajo el látex de los frutos y se les dio una purificación parcial, mejorando de esta manera su capacidad coagulante. Con los extractos obtenidos se elaboró una solución salina de cada enzima para posteriormente realizar una mezcla mediante diseño experimental; y de esta forma obtener un queso tipo fresco con características idóneas para el consumo. Tomando el producto final con mayor aceptación se determinó su vida útil, probando finalmente la factibilidad de sustituir el cuajo quimosina por las enzimas estudiadas, a través de pruebas fisicoquímicas, microbiológicas y sensoriales o de aceptación.

Palabras Clave: enzimas vegetales, queso fresco, vida útil



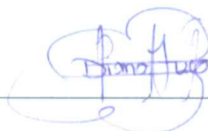
Ing. Fausto Tobías Parra Parra

Director de Escuela



Ing. Claudio Esteban Sánchez Jáuregui

Director de Tesis



Diana Noemí Juca Villalta

Autor

ABSTRACT

Juca Villalta Diana Noemí

Trabajo de Graduación

Ing. Claudio Esteban Sánchez Jáuregui MBA. PhD (c)

Noviembre, 2015

ESTUDIO DE FACTIBILIDAD DE LA UTILIZACIÓN DE ENZIMAS VEGETALES EN LA ELABORACIÓN DEL QUESO TIPO FRESCO

INTRODUCCIÓN

En nuestro medio existen diversos tipos de enzimas y dependiendo de la reacción que catalice y de donde provenga se las clasifica de distintas maneras. Este caso se refiere a las enzimas vegetales que se encuentran en la naturaleza en grandes cantidades y en un sinnúmero de plantas y frutos.

Las enzimas son de vital importancia en la vida cotidiana porque son estas la que ayudan a reacciones de vital importancia en nuestro organismo, sin ella estas mismas reacciones podrían tardar hasta años. En la industria no es la excepción, porque ayudan a poner en marcha reacciones químicas que ahorran tiempo y dinero; ayudando así a la elaboración de diversos productos en la industria textil, farmacéutica, alimenticia, etc.

En la industria de los alimentos las enzimas son ampliamente utilizadas durante el proceso de producción, en la industria láctea, específicamente en la producción de quesos las enzimas de mayor uso son las de origen animal, microbiano y las producidas en laboratorios, estas han desplazado a las enzimas vegetales que se utilizan en mínimas cantidades, o solo para elaboración de productos con características específicas o quesos con denominación de origen.

Antiguamente las personas al no contar con la tecnología de hoy en día ni las enzimas a la venta, solían elaborar sus quesos con mezclas de plantas y frutos que

contenían enzimas vegetales, que les proporcionaba un producto con características específicas dependiendo de su fórmula, es decir de su combinación de plantas.

Los frutos que mayormente se utilizan en la extracción de enzimas vegetales son la papaya, la pina, los frutos del género ficus, etc.; y en si productos muy comunes que ya han sido explotados su producción.

En este trabajo se pretende buscar alternativas de extracción de enzimas vegetales para la elaboración de queso tipo fresco con características específicas que son propias de la utilización de dichas enzimas. Al utilizar frutos como el higo y el chamburo se intenta sacar del olvido especialmente a este último que ha sido relegado a su producción en pequeños huertos o jardines.

La elaboración del queso tipo fresco sustituyendo las enzimas de origen animal (quimosina) por las de origen vegetal (papaína-ficina), servirá para compararlo con un queso comercial elaborado con quimosina, a través de sus características fisicoquímicas, microbiológicas y sensoriales; así conocer la factibilidad de utilizar las enzimas vegetales antes mencionadas y la obtención de un producto con características adicionales a las que se tiene en un queso elaborado con enzimas de origen animal.

OBJETIVOS

Objetivo General:

Evaluar las características físico-químicas y sensoriales del queso tipo fresco, elaborado con extractos enzimáticos vegetales extraídos a partir de *Ficus carica* (higos) y *Vasconcella cundinamarcensis* (chamburo); a fin de determinar la vida útil y estandarizar su adición durante la elaboración de quesos fresco.

Objetivos Específicos:

- Obtener extractos enzimáticos vegetales, ficina EC 3.4.22.3; papaína EC 3.4.22.2 de: higos y chamburo, purificarlas parcialmente para mejorar su calidad proteolítica; verificar su viabilidad, mediante pruebas de coagulación de leche con los extractos que se han obtenido.
- Determinar la fuerza de coagulación de cada concentrado enzimático y compararlas con cuajos comerciales, para conocer su efectividad durante la elaboración de quesos.
- Elaborar un queso con las enzimas vegetales y combinación de estas, para evaluar su calidad y vida útil, mediante pruebas físico-químicas, microbiológicas y de aceptabilidad, viendo la factibilidad de sustituir el cuajo quimosina EC 3.4.23.4 por la mezcla de coagulantes vegetal papaína-ficina.

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

1.1. Especies vegetales que coagulan la leche

La diversidad de especies vegetales en nuestro país, y la innovación que se busca día a día en las industrias impulsan la búsqueda de nuevas fuentes de enzimas proteolíticas, por su uso potencial en procesos biotecnológicos en el área de alimentos, medicina, industria textil, cosmetología, etc. En la industria de alimentos, las enzimas extraídas de frutos y plantas se han considerado sustitutos adecuados del cuajo para la elaboración de quesos, así como en la producción de ablandadores de carne, agentes digestivos, clarificación de jugos, industria cervecera, etc.

Algunas de estas especies que son ya utilizadas son: la papaya (*carica papaya*), la piña (*ananás comosus*), el cardo (*cynara cardunculus*), entre otras. En nuestro caso se utilizará las especies de higo (*ficus carica*) y chamburo (*vasconsella cundinamarcensis*) para la obtención de enzimas proteolíticas.

1.1.1. El higo (*ficus carica*)

El higo proporciona un succulento fruto apreciado en casi todo el mundo por su valor nutricional, como fruta fresca o seca, además de aportar una alta alcalinidad y acción laxante en fármacos de preparación (Criticar y Basu, 1986). Los higos son ricos en azúcares y vitaminas (A, B, C). Dentro de la medicina tradicional mediterránea, se recomienda para el tratamiento de la tos y enfermedades respiratorias. De los higos se fabrica alcohol y vinos dulces por fermentación. La leche de la higuera se emplea para combatir las verrugas. El higo es una rica fuente de benzaldehído, un agente anti-cancerígeno. Contiene enzimas y flavonoides que ayudan en el proceso digestivo, además, cantidades significativas de hierro, potasio, beta-caroteno y fibra. En muchos lugares de Asia el higo es considerado un poderoso afrodisíaco (Wallace, 1999 citado por Centro de Investigación en Biotecnología, 2007).

Tabla 1: Composición nutricional del higo

Composición por 100g de porción comestible	
Calorías	65.7
Hidratos de carbono (g)	16
Fibra (g)	2.5
Vitamina C (mg)	3.5
Provitamina A (microgramos mcg)	25
Potasio (mg)	235
Magnesio (mg)	20
Calcio (mg)	30

Fuente: (Frutas Consumer. EE.UU, 2007)

1.1.1.1. Enzimas presentes en el látex de higo

Las enzimas proteolíticas presente en el látex de la higuera, han sido extensamente estudiadas y son las denominadas "ficinas", comparando su actividad con la bromelina y la papaína. Sin embargo, en el fruto de la higuera, el higo, no se han reportado estudios sobre la actividad proteolítica y coagulante que estos presentan (Instituto Politécnico Nacional, 2006).

1.1.2. El Chamburo

El chamburo es una planta de altura denominada papayuela de los Andes, cuyo genotipo con mayor aroma y alto grado de fragancia por su concentración de terpenos en sus frutos, es una planta perteneciente a la familia *Vasconcella*, cuyas propiedades y características son similares al babaco y por ende suele ser cultivada en huertos familiares para el consumo local (SICA/MAG – INEC, 2000).

Varios estudios agrícolas constituyen un valioso aporte para preservar los recursos genéticos de este tipo de frutos con delicado aroma, factor de suma importancia en la industria de frutales alimenticios. Varias *Caricáceas* y otras identificadas como *Vasconcellas* representan un aporte de gran importancia económica regional al ser cultivos promisorios con grandes expectativas de

industrialización en el país, en lo que representa a la obtención y potencialización de su aroma y propiedades medicinales (Camargo et al., 1978).

1.1.2.1. Enzimas presentes en el látex de chamburo

Las papayuelas de aroma contienen látex que exuda de su epicarpio al ser lacerado o punzado, este látex contiene en mayor concentración a la papaína, enzima proteolítica de acción semejante a la pepsina del jugo gástrico, característica de la familia *Caricácea*. Entre las propiedades medicinales que se le atribuyen a las papayuelas de aroma, están las semillas en calidad de desparasitante y antipirético, las flores en infusión como expectorantes y antitusígenas (Bioextracto S.A, 2000).

Hay que tomar en cuenta que para obtener mejores resultados en la obtención de las enzimas: ficina del higo y papaína del chamburo, los frutos deben ser inmaduros ya que a medida que van avanzando en la maduración también las enzimas disminuyen su concentración. En el caso del látex que exudan estos frutos y que es en donde se encuentra mayormente las enzimas va disminuyendo; y cuando ya están completamente maduras el látex es mínimo y por consiguiente las enzimas.

(Gutiérrez, Geraldine, Velásquez, Virginia, & Ferre, 2009) determinaron que la maduración de las lechosas es inversamente proporcional al contenido de enzimas, es decir mayor tiempo de maduración resulta con menor contenido de enzimas, pero estas no desaparecen sino disminuyen considerablemente.

1.2. Enzimas

El nombre "enzima" fue acuñado en 1878 por Fredrich Wilhelm Kühne. Proviene del griego: *en* (dentro de) + *zima* (levadura).

Enfatiza que hay algo en la levadura, por oposición a la levadura misma, que cataliza los procesos, y distingue las enzimas de los organismos que las producen.

La mayoría de los procesos biotecnológicos tradicionales como la obtención de yogur, la producción de cerveza o la fermentación de la uva para fabricar vino, son realizados por las enzimas que cada microorganismo produce para su particular

metabolismo. Sin embargo también es posible realizar los procesos biotecnológicos con las enzimas, en ausencia de los microorganismos.

La mayoría de las enzimas industriales se extraen de bacterias y hongos. Entre ellas: Proteasa de bacilo, Amiloglucosidasa, α -Amilasa de bacilo, Glucosa isomerasa, Cuajo microbiano, α -Amilasa fúngica, Pectinasa, Proteasa fúngica. Las enzimas presentan muchísimas aplicaciones y su utilización en el ámbito industrial se lleva a cabo desde hace muchos años.

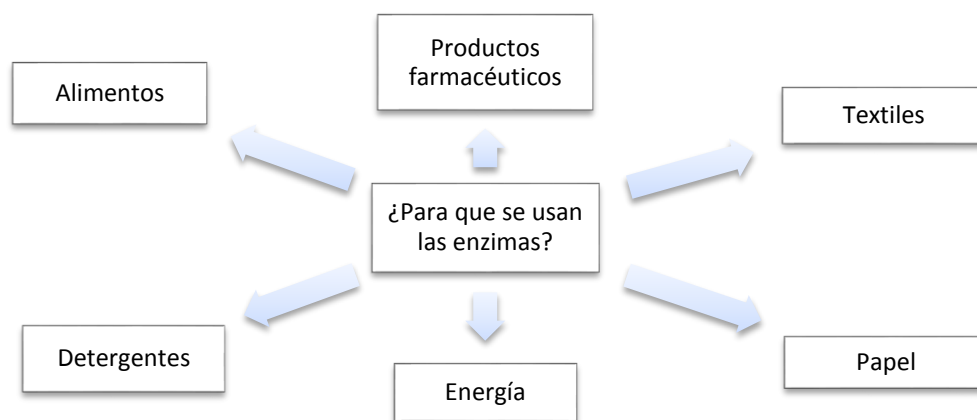


Figura 1: Aplicaciones industriales de las enzimas
Fuente: (ARGENBIO, 2014)

1.2.1. Definición

Siguiendo la definición de Dixon y Webb, “llamamos enzima a «una proteína dotada de actividad catalítica debida a su capacidad de activación específica” (Battaner Árias, 2013).

Otra definición de enzimas nos dice que son moléculas de proteínas que tienen capacidad de facilitar y acelerar las reacciones químicas que tienen lugar en los tejidos vivos, disminuyendo el nivel de la “energía de activación” propia de las reacciones. (Grupo Latino Editores, 2008).

1.2.2. Clasificación y nomenclatura

En general se ha nombrado a las enzimas de manera empírica y poco sistemática; ya que en algunos casos se ha tomado como raíz del nombre el del sustrato que reconoce la enzima y se le agrega el sufijo *asa*. Por ejemplo para enzimas que hidrolizan proteínas se las denomina *proteinasas* o *proteasas*. Algunas enzimas tienen nombres asignados antes de adoptar esta convención. Por ejemplo tripsina, papaína, diastasa. Posteriormente, hubo la necesidad de asignarles un nombre sistemático. Miembros de la IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) y del IUB (International Union of Biochemistry) y posteriormente de la IUBMB (International Union of Biochemistry and Molecular Biology) idearon un sistema de identificación en el que cada enzima se le asigna una serie de cuatro dígitos, al que se ha llamado número de la EC (Enzyme Commission). El primer dígito está relacionado con la reacción química que cataliza la enzima, de acuerdo a la siguiente clasificación (Badui Dergal, 2006).

1.2.2.1.Oxidoreductasas

Catalizan reacciones de óxido-reducción. En este grupo se incluyen las deshidrogenasas, oxidasas, oxigenasas y peroxidasas.

1.2.2.2.Transferasas:

Promueven la transferencia de distintos grupos químicos entre una molécula donadora y una aceptadora. Dentro de las más estudiadas se incluyen a las glicosiltransferasas, aminotransferasas y fosfotransferasas.

1.2.2.3.Hidrolasas:

Llevan a cabo la ruptura de enlaces covalentes con la introducción de una molécula de agua. Las enzimas hidrolíticas incluyen a las amilasas, esterasas,

glicosidasas, lipasas y proteasas, entre otra pero estas son las que se utilizan con mayor frecuencia, en la industria de alimentos.

1.2.2.4.Liasas:

Rompen los enlaces para la eliminación de un determinado grupo químico del sustrato y formar dobles ligaduras sin la adición de agua. Entre ellas se encuentran aldosas, descarboxilasas, deshidratasas y pectinliasas.

1.2.2.5.Isomerasas:

Catalizan el re-arreglo espacial de grupos del sustrato sin modificar su composición química; y son: epimerasas y racemasas.

1.2.2.6.Ligasas:

Promueven la unión covalente de dos moléculas acopladas con la ruptura de un enlace pirofosfato proveniente de ATP, UTP o CTP, como fuente de energía. El término ligasa es sinónimo de sintetasa (Badui Dergal, 2006).

Tabla 2: Enzimas de interés en alimentos

Grupo	Nombre común	Número EC	Sustrato
Oxidoreductasas	Glucosa oxidasa	1.1.3.4	D-glucosa y oxígeno
	Catecol oxidasa	1.10.3.1	Catecol y oxígeno
	Catalasa	1.11.1.6	Peróxido de hidrógeno
	Lipoxigenasa	1.13.11.12	Ácidos grasos poliinsaturados
Transferasas	Amilosacarasa	2.4.1.4	Sacarosa
	Dextranacarasa	2.4.1.5	Sacarosa
	Levansacarasa	2.4.1.10	Sacarosa
	Ciclomaltodextrin		
Hidrolasas	Glucosiltransferasa	2.4.1.19	Almidón
	Lipasa	3.1.1.3	Acilglicéridos
	Pectinesterasa	3.1.1.11	Pectina esterificada
	α -amilasa	3.2.1.1	Almidón
	β -amilasa	3.2.1.2	Almidón
	Amiloglucosidasa	3.2.1.3	Glucos oligosacáridos con enlaces α -(1-4) o α -(1-6)
	Endoglucanasa (celulasa)	3.2.1.4	Celulosa
	β -glucanasa	3.2.1.6	Glucanos con enlaces β -(1-4) o β -(1-6)
	Poligalacturonasa	3.2.1.15	Pectatos
	Invertasa	3.2.1.26	Sacarosa
	Pululanasa	3.2.1.41	Glucos oligosacáridos con enlaces α -(1-6)
	Subtilisina	3.4.21.62	Proteínas
	Papaína	3.4.22.2	Proteínas
Bromelina	3.4.22.32	Proteínas	
Renina	3.4.23.4	Caseína	
Liasas	Pectatoliasa	4.2.2.2	Pectatos
	Pectina liasa	4.2.2.10	Pectinas esterificadas
Isomerasas	Glucosa (xilosa) isomerasa	5.3.1.5	Glucosa (xilosa)

Fuente: (Badui Dergal, 2006.)

1.2.3. Las enzimas como catalizadores

Las enzimas son muy activas en medios acuosos y en condiciones muy suaves de temperatura, presión, pH, etc. Son catalizadores específicos y selectivos. Son específicos porque pueden modificar un único sustrato en una mezcla de sustratos

muy similares e incluso pueden discernir entre dos isómeros de una mezcla racémica de un compuesto quiral; y muy selectivo porque puede modificar un único enlace o un único grupo funcional en una molécula que tenga varias posiciones modificables (Grupo Latino Editores, 2008).

1.2.4. Estructura de las Enzimas (proteínas)

La conformación asumida por las proteínas nativas comprende diferentes tipos dentro de su molécula, que definen sus propiedades inmunológicas, **enzimáticas** u hormonales. Una pérdida de conformación modifica estas propiedades, como puede suceder con la actividad biológica de las enzimas, que se basa en su conformación tridimensional, estabilizada por un delicado balance fisicoquímico en su molécula, sensible a cambios en su entorno (Badui Dergal, 2006.).

Los cuatro niveles de estructuración están estabilizados por los diferentes tipos de uniones químicas que se muestran en el cuadro. Los enlaces covalentes son los responsables del enlace peptídico, son de menor longitud y los de mayor energía. Los puentes salinos o iónicos, también llamados interacciones electrostáticas, se crean por atracción coulombica entre grupos cargados con signo opuesto, y son las uniones polares más fuertes que existen. Los puentes de hidrógeno aun siendo más débiles desempeñan un papel primordial en la conformación 3D de una proteína por su abundancia. Las fuerzas atractivas de Van der Waals se establecen por la inducción de un momento dipolo entre grupos eléctricamente apolares (Badui Dergal, 2006).

Tipo	Mecanismo	Energía (Kcal/mol)	Distancia de interacción (Å)	Grupos de interaccionan
Covalente	Reparto de electrones	30 – 100	1 – 2	C-C, C-N, C=O, C-H, S-S, C-N-C
Interacciones electrostáticas o puentes salinos	Atracción coulombica entre grupos con cargas opuestas	10 – 20	2 – 3	-NH ₃ ⁺ , -COO ⁻ , -NH ₃ ⁺
Puentes de hidrógeno	El hidrógeno es compartido entre dos átomos electronegativos	2 -10	2 – 3	N-H O=C H -N-H O-H
Fuerzas de Van der Waals	Inducción mutua de momentos dipolo en grupos apolares	1 – 3	3 – 5	Grupos apolares

Figura 2: Enlaces químicos encontrado en las proteínas y sus fuerzas de unión
Fuente: (Badui Dergal, 2006).

1.2.4.1.Estructura primaria

El primer nivel de organización de una proteína es la secuencia de aminoácidos dictada por la secuencia de ADN del gen que la codifica, es decir, el orden en que se encuentran unidos los aminoácidos en la cadena polipeptídica. Ésta es una propiedad controlada genéticamente, altamente reproducible y única para cada proteína (Badui Dergal, 2006).

1.2.4.2.Estructura secundaria

Se refiere al ordenamiento regular y periódico de las proteínas en el espacio, a lo largo de su eje, y que se estabiliza por diversas fuerzas, de las cuales las electrostáticas, los puentes de hidrógeno, las interacciones hidrofóbicas y los dipolo-dipolo son los más importantes.

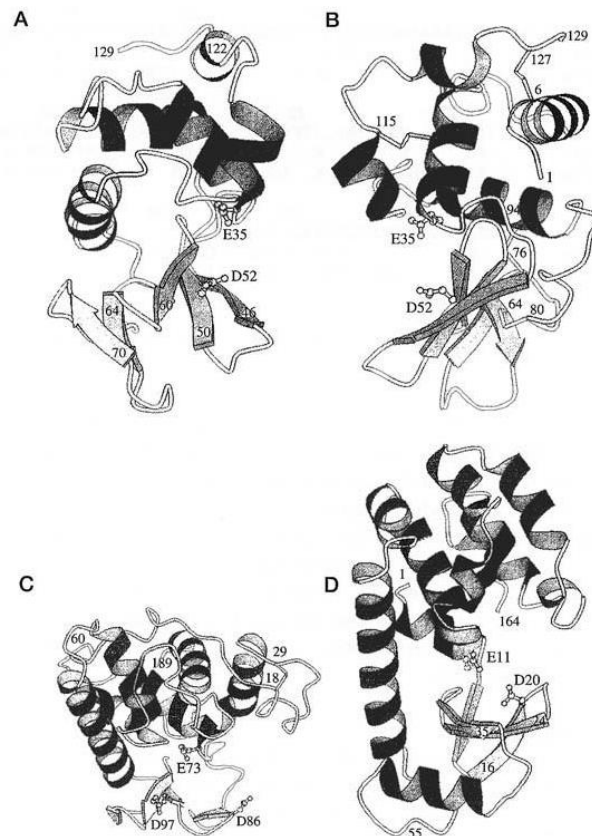


Figura 3: Estructuras estimadas de lisozimas tipo c, g, y v. (a) Lisozima de pollo con vista al sitio activo. (b) Resalte de los cuatro puentes disulfuro. (c) Lisozima de ganso. (d) Lisozima T4 de huevo. Fuente: (Badui Dergal, 2006.)

1.2.4.3. Estructura terciaria

Este término se refiere al modo en que la cadena polipeptídica se dobla sobre sí misma para producir una estructura plegada y compacta, característica de las proteínas globulares. La estructura terciaria de la β -lactoglobulina y faseolina, proteína de almacén de frijoles bayos. A diferencia de las proteínas fibrosas que presentan una estructuración lineal, las globulares tienen sus cadenas compactas con un alto grado de organización. La estructura terciaria de diferentes proteínas que contienen una sola cadena polipeptídica se compone de dominios que se definen como regiones de una secuencia polipeptídica que se pliegan en estructura terciaria de manera independiente. Podría pensarse que son una especie de “mini proteínas” y que todas juntas forman una sola proteína más grande (Badui Dergal, 2006).

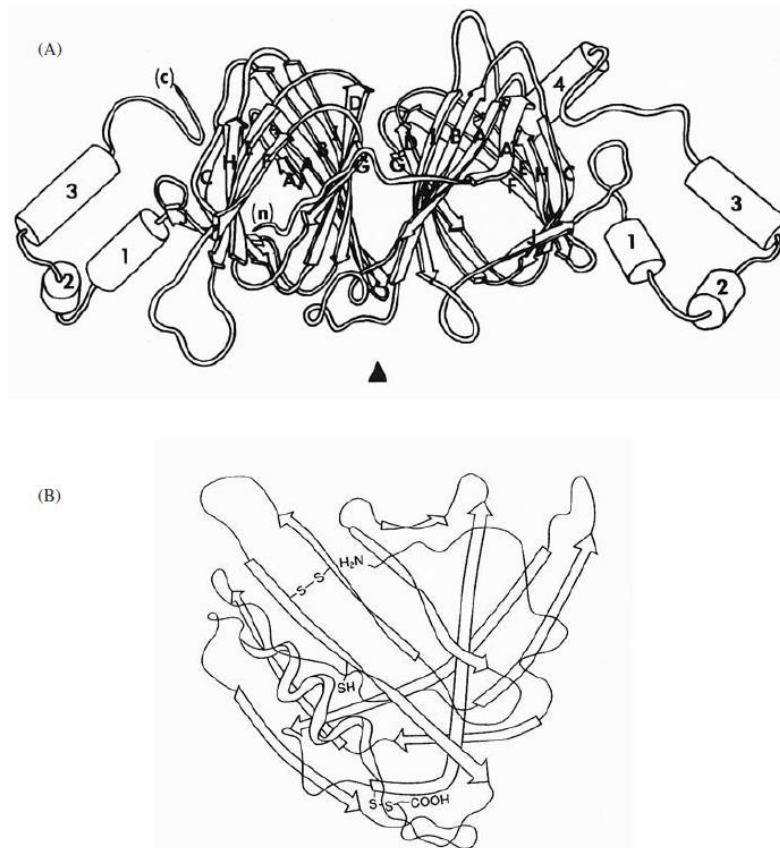


Figura 4: Estructuras terciarias de la faseolina (a) y la β -lactoglobulina (b). Las flechas representan las placas β , y los cilindros a las α -hélices
Fuente: (Badui Dergal, 2006).

1.2.4.4. Estructura cuaternaria

A diferencia de las anteriores, esta estructura no necesariamente existe en todos los polipéptidos y se refiere a la asociación de dos o más cadenas. Las interacciones que estabilizan las cadenas polipeptídicas plegadas en las proteínas con múltiples subunidades son de los mismos tipos que las que estabilizan la estructura terciaria: puentes salinos o interacciones electrostáticas, puentes de hidrógeno, fuerzas de Van der Waals, interacciones hidrófobas y, en ocasiones, enlaces disulfuro. Estas interacciones proporcionan la energía necesaria para estabilizar la estructura de múltiples subunidades. Cada cadena polipeptídica es una unidad asimétrica en el agregado, pero la estructura cuaternaria global puede exhibir una amplia variedad de simetrías, en función de la geometría de las interacciones. Existen diferentes proteínas de importancia biológica que adoptan la forma de dímeros, trímeros, tetrámeros, etc. Cualquiera de estos complejos constituyen la estructura cuaternaria; son también llamados estructuras oligoméricas, y pueden formarse de subunidades

de proteínas (monómeros) qué pueden ser iguales (homogéneos) o diferentes (heterogéneos) (Badui Dergal, 2006).

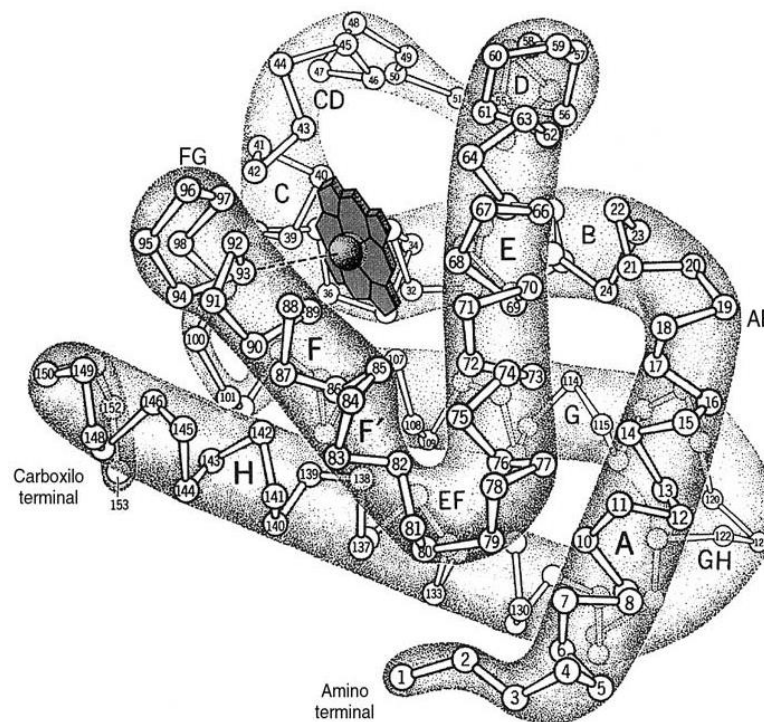


Figura 5: Representación esquemática de las estructuras primaria, secundaria y terciaria de la mioglobina. Los puntos oscuros representan los átomos de carbono a de los aminoácidos. El grupo hemo se localiza en la parte central superior de la molécula.

Fuente: (Badui Dergal, 2006).

1.2.5. Las proteasas

El primer término con el que se denominó a las enzimas proteolíticas fue el de proteasas y surgió a finales del siglo XIX como un término general que abarcaba a todas las hidrolasas que actúan sobre los enlaces peptídicos. Más adelante un grupo de investigadores alemán sugirió el término *proteinasas* para denominar a aquellas proteasas que tienen como sustrato a las proteínas y *peptidasas* a aquellas enzimas que tienen como sustrato a los péptidos de menor peso molecular. Sin embargo, también fue utilizado el término *peptidasa* en un sentido más amplio, abarcando a todas las hidrolasas del enlace peptídico. Según la ubicación de los enlaces hidrolizados, las *peptidasas* a su vez se dividen en dos grandes grupos: **Las endopeptidasas:** que rompen uniones peptídicas en distintos puntos del interior de la proteína. **Las exopeptidasas:** que remueven uno o más aminoácidos desde los extremos carboxilo o amino (Barrett, 2004 citado por Obregón, 2008).

(Barrett et al., 1998) agrupan las peptidasas en tipos catalíticos de acuerdo a la naturaleza de los grupos responsables de la catálisis. En ese sentido reconocen cinco clases: serínicas, treonínicas, cisteínicas, aspárticas y metalopeptidasas. Cada familia de peptidasas es nombrada con una letra que denota el tipo catalítico (S, T, C, A y M) seguida de un número arbitrario; las peptidasas cuyo mecanismo catalítico se desconoce se agrupan en la familia U.

1.2.5.1. Peptidasas serínicas (EC 3.4.21)

Las peptidasas en las cuales el mecanismo catalítico depende del hidroxilo de un residuo de serina que actúa como nucleófilo sobre el enlace peptídico son llamadas peptidasas serínicas. (Barrett et al., 1998) distinguen siete clanes de peptidasas serínicas al comparar las estructuras terciarias y el orden de los residuos catalíticos en las secuencias.

Pertenecen a este grupo las familias de la tripsina y de la subtilisina. Las enzimas que integran la familia de la tripsina son todas endopeptidasas y están presentes tanto en microorganismos procarióticos como eucarióticos, así como en plantas, invertebrados, vertebrados y en virus a ARN (Caffiniet al, 1988; Barrett et al, 1998).

La actividad de las peptidasas serínicas suele ser máxima a valores de pH alcalinos, no requiriendo en general activadores, aunque los iones calcio activan algunas pro-enzimas y podrían estabilizar determinadas enzimas (López, 1995).

1.2.5.2. Peptidasa treonínicas

Por razones prácticas, las poco conocidas familias de peptidasas dependientes de treonina son incluidas por (Barrett et al.1998) dentro del séptimo clan (TA) de las serín-peptidasas, que son todas endopeptidasas en las que el nucleófilo puede ser serina, treonina o cisteína y que incluye enzimas en las que la única actividad es activarse a sí mismas.

1.2.5.3. Peptidasas cisteínicas (EC 3.4.22)

Las peptidasas cisteínicas presentan gran analogía en el mecanismo catalítico con las serínicas; en ambos grupos la enzima y el sustrato forman un complejo covalente debido a que el nucleófilo es parte de un aminoácido. El dador de protones en todas las peptidasas cisteínicas identificadas es un residuo de histidina (al igual que en la mayoría de las peptidasas serínicas) y el nucleófilo es el grupo sulfidrilo de un residuo de cisteína (Barrett et al., 1998).

Son peptidasas cisteínicas la papaína, la quimopapaína, la bromelina, la cruzipaina, las caspasas, las catepsinas lisosomales de mamíferos, las calpains citosólicas y varias endopeptidasas virales.

Este tipo de enzimas manifiestan su actividad a pH variable según el tipo de enzima y de sustrato. Así, las ubicadas en los lisosomas actúan generalmente a pH ácido, en tanto que la papaína tiene actividad en un amplio rango de pH y las calpains son activas a pH superiores a 7,5 (López, 1995).

Dado que el mecanismo catalítico de estas enzimas utiliza a la cisteína como donador de protones, se pueden activar con tioles de bajo peso molecular como tioglicolato, ditiotreitól, 2-mercaptoetanol o cisteína (Storey & Wagner, 1986).

1.2.5.4. Peptidasas aspárticas (EC 3.4.23)

Las peptidasas aspárticas (APs) se pueden encontrar en vertebrados, hongos, plantas, protozoos y retrovirus. Son todas endopeptidasas y se caracterizan por presentar un pH óptimo en el rango ácido y por ser específicamente inhibidas por pepstatina A. Todos los miembros de la familia A1 de la pepsina han sido hallados en eucariotas. Esta familia incluye a enzimas del tracto digestivo animal, como la pepsina, gastricsina y quimosina, enzimas lisosomales como la catepsina D y E y enzimas involucradas en procesos postraduccionales, como la renina producida en el riñón, que procesa angiotensinógeno en el plasma (Caffini et al., 1988). Las aspartil-peptidasas fúngicas homólogas de la pepsina presentan diversas estructuras y algunas de ellas como la AP de *Rhizopus chinensis* (rizopuspepsina) intervienen en el proceso de esporulación. Las plasmepsinas I y II

aisladas del protozoo *Plasmodium falciparum* también son APs homólogas de la pepsina (Barrett et al., 1998) que participan en la degradación de la hemoglobina y cuya inhibición es el blanco de potenciales drogas antimaláricas (Bernstein & James, 1999).

La mayoría de las APs de mamíferos y hongos son enzimas de cadena simple con un peso molecular de aproximadamente 35 kDa. Son sintetizadas como zimógenos inactivos que contienen un segmento N-terminal de aproximadamente 45 aminoácidos, que es cortado y separado en la activación (DAVIES, 1990).

En plantas se han aislado peptidasas aspárticas en monocotiledóneas, dicotiledóneas. Ha sido determinada la especificidad hidrolítica de algunas de estas peptidasas aspárticas (Faro et al., 1992; Kervinen et al., 1993), pero su función biológica es poco conocida.

1.2.5.4.1. Mecanismo de acción

El mecanismo catalítico involucra residuos de ácido aspártico en el sitio activo de la cadena peptídica, unidos a una molécula de agua que es la que actúa como nucleófilo (Barrett et al., 1998). No existen grupos funcionales de estas enzimas que provoquen un ataque nucleofílico sobre el carbonilo de la unión peptídica a escindir y por lo tanto no hay intermediario covalente entre la enzima y el sustrato (Hofmann et al., 1984).

En general, las peptidasas aspárticas actúan mejor sobre uniones peptídicas de aminoácidos con cadenas laterales hidrofóbicas (Leu-Tyr, Phe-Phe, Phe-Tyr, etc.), pero la afinidad por el sustrato varía grandemente: la pepsina degrada la mayor parte de las proteínas hasta pequeños péptidos, pero las enzimas utilizadas en la fabricación de quesos coagulan la leche por medio de la escisión selectiva de la unión peptídica Phe105-Met106 de la κ -caseína (Asakura et al., 1997).

1.2.5.5. Metallo-peptidasas (EC 3.4.24)

Las familias de las metallo-peptidasas se pueden reunir en dos grupos: las peptidasas que sólo requieren iones zinc para la catálisis y las que necesitan dos iones metálicos que actúen cocatalíticamente, como es el caso de las peptidasas en las que el cobalto y el manganeso son esenciales para su actividad (Barrett et al., 1998).

El ataque nucleofílico sobre el enlace peptídico es mediado, al igual que en las peptidasas aspárticas, por una molécula de agua (Barrett et al., 1998). La más estudiada de las metalopeptidasas es la termolisina del *Bacillus thermoproteolyticus*, cuyo sitio activo contiene un átomo de zinc unido a cadenas laterales de histidina y de ácidos glutámico (Caffini et al., 1988).

Tabla 3: Proteasas comerciales

Tipo de proteasa	Origen	Nombre	Fuente	Temperatura (°C)	pH
Serinproteasa	Animal	Tripsina	Porcino, Bovino	30 - 60	7 a 9
		Quimotripsina		45 -55	8 a 9
		Elastasa			6 a 8
	Bacteriano	Subtilisin Carlsberg alcalasa	<i>Bacillus licheniformis</i>	50 - 60	6 a 10
		Subst. BPN, Subtilisin Novo	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	40 -55	6 a 10
Cisteinproteasa	Vegetal	Papaína	Papaya	40 - 75	5 a 8
		Bromelaina	Piña	20 - 65	5 a 8
		Ficina	Latex de Ficus		5 a 8
Aspartato proteasas	Animal	Pepsina	Porcino, Bovino		1 a 4
		Quimosina	Becerro		4 a 6
	Fúngico	Aspergillopeptidasa A	<i>Aspergillus saitoi</i>	35 - 50	2 a 5
		Newlasa	<i>Rhizopus sp.</i>	40 - 50	3 a 6
Metallo proteasas	Animal	Carboxipeptidasa A	Páncreas		7 a 8
	Bacteriano	Neutrasa®	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	40 - 55	6 a 7.5
		Termolisina	<i>B. Termoproteolyticus</i>		7 a 9
Preparaciones enzimáticas					
Mezcla de papaína, quimopapaína y lisozima		Papaína cruda	Fruto de la papaya		5 a 9
Mezcla de tripsina, quimotripsina, elastasa y carboxipeptidasa		Pancreatina	Páncreas (bovino y porcino)	30 - 80	7 a 9
Mezcla de serin-, aspartato- y metalo- proteasas		Veron P. Somicina LP. Bocina A	<i>Aspergillus oryzae</i>	40 - 55	4 a 8
Mezcla de endo- y exo- proteasas, actividad en pH alcalino y neutro		Pronasa	<i>Streptomyces griseus</i>		7 a 9

Fuente: (Benítez, 2008 citado por Pérez, 2014)

1.2.5.6. Enzimas coagulantes de la leche

No todas las proteasas existentes son óptimas para la coagulación de la leche, debido a que su sitio activo no es el adecuado para la hidrólisis de la caseína o en el caso de que haya una hidrólisis, esta podría no ser la adecuada para el objetivo que se persigue; el cual es obtener una cuajada con características adecuadas para elaborar quesos. A continuación se presenta las enzimas utilizadas para la coagulación de la leche.

Tabla 4: Numero EC para enzimas coagulantes de la leche.

ECNUMB ER	RECOMMENDED NAME	HISTORY
3.4.4.1	Pepsin	Transferred to EC 3.4.23.15
3.4.4.2	Pepsin B	Transferred to EC 3.4.23.2
3.4.4.3	Rennin	Transferred to EC 3.4.23.4
3.4.4.4	Trypsin	Transferred to EC 3.4.21.4
3.4.4.5	Chymotrypsin	Transferred to EC 3.4.21.1
3.4.4.6	Chymotrypsin B	Transferred to EC 3.4.21.1
3.4.4.7	Pancreatopeptidase E	Transferred to EC3.4.21.36; EC 3.4.21.37
3.4.4.8	Enteropeptidase	Transferred to EC 3.4.21.9
3.4.4.9	Cathepsin C	Transferred to EC 3.4.14.1
3.4.4.10	Papain	Transferred to EC 3.4.22.2
3.4.4.11	Chymopapain	Transferred to EC 3.4.22.6
3.4.4.12	Ficin	Transferred to EC. 3.4.22.3

Fuente: (BRENDA, 2014)

1.2.5.7. Sitio Activo (ruta de hidrólisis)

La fijación del sustrato se hace en un lugar específico de la enzima, cuya configuración espacial, determinada por las cadenas laterales de los aminoácidos que la integran o por la presencia de un grupo prostético, es tal que solo el sustrato o compuestos análogos del mismo pueden fijarse; de esta fijación resulta la transformación catalítica del sustrato. Llamamos centro activo a esta zona específica de la molécula enzimática (Battaner Árias, 2013.)

Las enzimas coagulantes de la leche como la quimotripsina son serinproteinasas y su centro activo está formado por una tríada catalítica serina-histidina-aspartato, propia de las serinproteinasas. (Battaner Árias, 2013.)

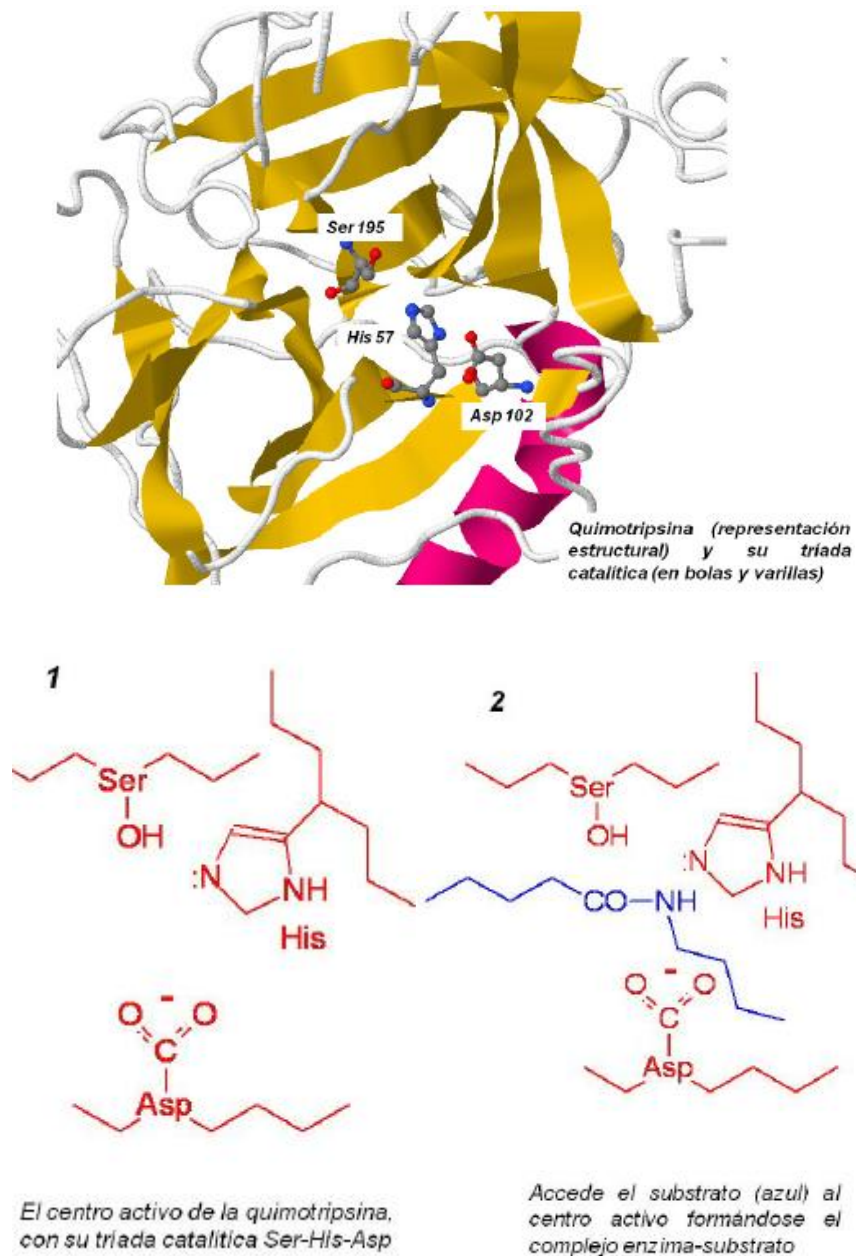


Figura 6: Centro activo de la quimotripsina
Fuente: (Battaner Árias, 2013.)

Gracias al pH ácido de ésta (6,6), se activan e hidrolizan el enlace Phe(105) – Met(106) de la kappa-caseína. La proteína queda partida en dos fragmentos: uno insoluble (1-105) que se mantiene en la micela, y otro soluble (106-169) que es

eliminado de ésta. En presencia de iones calcio, las micelas modificadas se agregan entre sí formando una red tridimensional llamada paracaseína, que precipita. La leche queda así separada en cuajada y suero (Grupo Latino Editores, 2008).

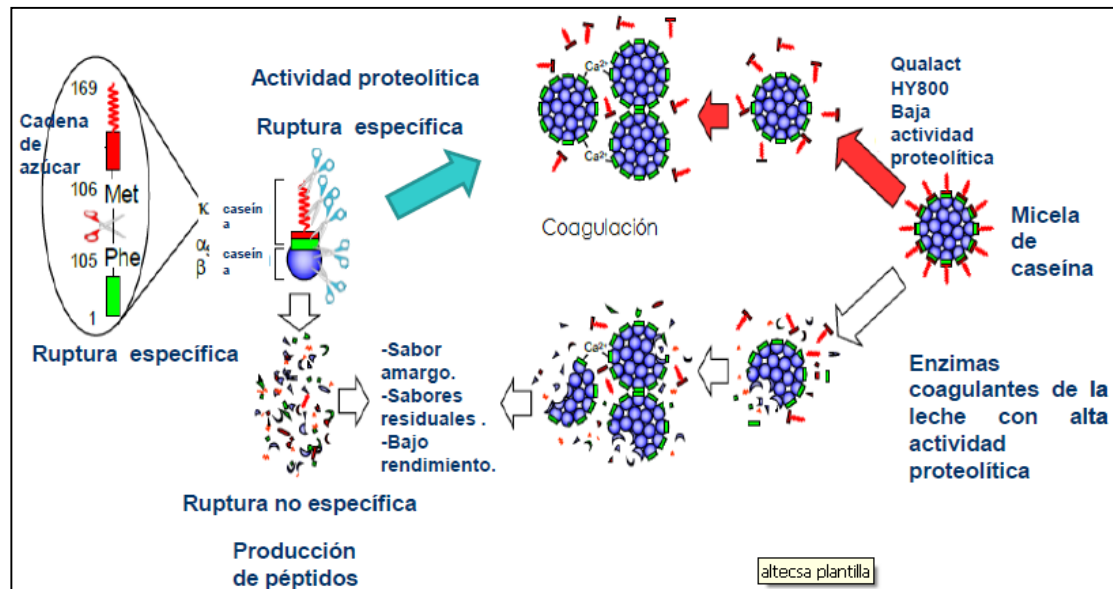


Figura 7: Hidrólisis de la caseína
Fuente: (ALTECSA., 2010.)

1.2.5.8. Factores que afectan la velocidad de las reacciones enzimáticas

Entre los factores más importantes que afectan la velocidad de reacción de las enzimas se destaca: el pH, la temperatura, la concentración de sustrato y de enzima en el medio.

1.2.5.8.1. pH

La actividad de las enzimas depende fuertemente de la concentración de iones hidronio del medio, ya que esto afecta el grado de ionización de los aminoácidos de la proteína, incluyendo a los del sitio activo, del sustrato (en caso de ser ionizable), o del complejo enzima-sustrato; de hecho el pH influye en la estructura tridimensional de la proteína y a su vez, sobre la afinidad que tenga la enzima por el sustrato.

La mayoría de las enzimas presentan un rango de pH relativamente estrecho en el que presentan una actividad óptima, desactivándose en pHs extremos. En el siguiente cuadro se muestran los valores de pH óptimo para algunas enzimas (Badui Dergal, 2006.).

Tabla 5: pH de actividad óptima de algunas enzimas

Enzima	pH
Pepsina (bobina)	2.0
Catalasa (hígado de bovino)	3 – 10
Renina (ternero)	3.5
Catepsina (hígado)	3.5 – 5
Poligalacturonasa (tomate)	4.0
β – amilasa (camote)	5.0
Ficina (higo)	5.6
Polifenoloxidasa (durazno)	6.0
Lipoxigenasa 2 (soya)	7.0
α – amilasa (saliva humana)	7.0
α – quimotripsina (bovina)	8.0
Lipoxigenasa 1 (soya)	9.0

Fuente: (Badui Dergal, 2006.)

1.2.5.8.2. Temperatura

Como sucede con cualquier otra reacción química, la velocidad de las reacciones enzimáticas se incrementa con la temperatura, al aumentar la energía cinética de las moléculas, pero sólo en el intervalo en que la enzima es estable y retiene su capacidad catalítica; en casos extremos, cuando el incremento es muy grande, se favorece la desnaturalización y consecuentemente la proteína pierde su capacidad catalítica.

Existen varios factores que, además de la estabilidad conformacional, también afectan la actividad enzimática al aumentar la temperatura, y son: la solubilidad de gases (oxígeno), el pH de la solución amortiguadora, la afinidad de la enzima por el sustrato, por activadores o inhibidores; así como la presencia de reacciones de competencia. Por esta razón, cada enzima tiene un intervalo óptimo de temperatura en el cual se logra la mayor actividad, para la mayoría está entre 30 y 45°C, y se

inactiva a más de 60°C, a esta temperatura la energía introducida en el sistema sobrepasa la energía de las fuerzas que mantienen la estructura activa de la enzima (Badui Dergal, 2006).

1.2.5.8.3. Concentración de la enzima y el sustrato

Una enzima funciona de manera más eficiente cuando la concentración de sustrato está en exceso en relación con la concentración de enzima. Esto se debe a que las colisiones “exitosas” con el reactivo son más frecuentes, asegurando así que la mayor cantidad de enzima se encuentre activa. En estas condiciones, el producto se obtiene a la máxima velocidad posible para la cantidad de enzima presente. En caso de que la concentración de sustrato sea menor, la velocidad de reacción disminuye (Badui Dergal, 2006).

1.2.6. Métodos de extracción de enzimas

Existen algunos métodos para extraer y purificar enzimas, pero antes de elegir alguno de ellos se debe considerar la baja estabilidad que presentan esos biocatalizadores, la baja concentración y la presencia de compuestos extraños en la materia prima, que pueden afectar la viabilidad de las enzimas obtenidas. Existen dos grupos principales de técnicas de purificación: las de baja resolución y las de alta resolución (Sinche Serra, 2009).

El primer grupo corresponde a técnicas de purificación basadas en la diferencia de solubilidad. Con ellas se eliminan los contaminantes más abundantes y se concentra la proteína deseada en el preparado. Estas técnicas poseen una gran capacidad de procesamiento, pero un bajo poder resolutivo. Entre ellas se encuentra la precipitación con solventes orgánicos (Sinche Serra, 2009).

Las técnicas de alta resolución no permiten una purificación de la proteína en un solo paso. Es necesario combinar, complementariamente, varias de ellas para alcanzar una alta pureza. Estas técnicas tienen un alto poder resolutivo y una baja capacidad de proceso. Entre ellas se pueden

mencionar la cromatografía de filtración en gel y la cromatografía de intercambio iónico (Chávez, 1990 citado por Sinche Serra, 2009).

1.2.6.1.Precipitación con solventes orgánicos

Los solventes orgánicos miscibles con el agua, como el etanol o la acetona, producen una variedad de efectos que, combinados, permiten la precipitación de las proteínas, al ser adicionados a una solución acuosa. El principal efecto es la reducción del poder de solvatación del agua, que puede ser explicado en términos de una reducción de su constante dieléctrica. La estructura ordenada del agua, alrededor de los aminoácidos hidrofóbicos, es desplazada por el solvente orgánico añadido. El efecto neto de este proceso es la disminución de la solubilidad de las proteínas en el medio, debido a lo cual se agregan y precipitan (Calvo, 2003 citado por Sinche Serra, 2009).

Los precipitados son agregados de moléculas proteicas en cantidad suficiente, de modo que puedan ser centrifugados a una velocidad razonablemente baja (Álvaro, Uzcátegui, & Muñoz, 2002 citado por Sinche Serra, 2009).

Para la selección de un adecuado solvente orgánico se deben considerar los siguientes criterios:

- a) El solvente debe ser completamente miscible en agua,
- b) El solvente no debe producir una reacción con la proteína y

El solvente debe garantizar una precipitación alta (Álvaro, Uzcátegui, & Muñoz, 2002 citado por Sinche Serra, 2009).

1.2.6.2.Cromatografía de filtración en gel

Las cromatografías son técnicas de separación selectiva de moléculas, con las que los componentes de una mezcla compleja pueden ser purificados. Existen varios tipos de cromatografías, según los fundamentos en que se basan para hacer los análisis, pero todas consisten de una fase estacionaria y una móvil (Sinche Serra, 2009).

La cromatografía de filtración en gel emplea matrices formadas por esferas porosas. Los poros tienen un volumen elevado y un diámetro determinado (10 – 500 m). Cuando penetra en el lecho de la columna una solución que contiene proteínas de tamaños distintos, las moléculas de menor o igual tamaño que el de los poros son retenidas en los poros de las esferas, a lo largo de la columna; mientras que las moléculas de proteína, cuyo tamaño es mayor al de los poros, no penetran en ellos y por tanto se desplazan con el flujo que atraviesa la columna (Caballero, Blanco, & Moyano, 2008 citado por Sinche Serra, 2009).

1.2.6.3. Cromatografía de intercambio iónico

La cromatografía de intercambio iónico se basa en la carga eléctrica neta que tienen las proteínas a un valor de pH determinado. La matriz o relleno de la columna es un polímero sintético que contiene grupos cargados positiva (catiónicos) o negativamente (aniónicos). Cuando en el lecho de la columna penetra una solución que contiene varios tipos de proteína, serán retenidas en la columna las proteínas que tengan carga opuesta a la de la matriz, con distintos grados de afinidad, y las restantes serán eluidas (Medina, 2005 citado por Sinche Serra, 2009).

1.2.7. Determinación del contenido de proteínas – enzimas

Existen distintos métodos para la determinación del contenido proteico en soluciones como las descritas por Bradford, 1976, Lowry y los ensayos; pero en nuestro caso se utilizará el método de absorción UV a 280nm, que se describe a continuación.

1.2.7.1. Mediciones por espectrofotometría de absorción UV a 280nm

El método es aplicable a las proteínas purificadas que contienen triptófano, los residuos de tirosina, fenilalanina o cisteína, enlaces disulfuro. Se utiliza el valor de absorbancia a 280nm en combinación con el coeficiente de extinción en masa o el coeficiente de extinción molar para calcular la concentración de la proteína

purificada de acuerdo con la ley de Lambert-Beer; debido a que las proteínas presentan un máximo de absorción a una longitud de onda de 280nm aproximadamente. La ventaja de las mediciones directas a 280nm es que la generación de una curva patrón no está obligada, para determinar la concentración de proteína. (Desjardins, Hansen, & Allen, 2009.).

Según la ley de Lambert-Beer, la siguiente ecuación expresa la relación entre la absorbancia y la concentración de una sustancia en una solución (Sinche Serra, 2009).

$$A = \epsilon \cdot c \cdot l$$

De donde:

- A Absorbancia
- ϵ Es el coeficiente de extinción, en $(\text{mg/ml})^{-1}\text{cm}^{-1}$
- c Es la concentración de la sustancia absorbente en la muestra, en mg/ml
- l Es la distancia que la luz atraviesa por la muestra, en cm

1.2.8. Los coagulantes de la leche

El cuajo y los coagulantes son preparaciones de enzimas proteolíticas, las cuales han sido utilizadas en la industria quesera por miles de años, siendo esta la más antigua conocida de las enzimas. Los quesos son producidos por enzimas coagulantes de la leche de diferentes orígenes. Las enzimas activas en todos los cuajos y coagulantes, las cuales han sido utilizadas para la elaboración de quesos, son proteasas del ácido aspártico. La preparación original del cuajo (rennet), es un extracto del abomaso de rumiantes. Esta definición ha sido confirmada por la organización *International Dairy Federation* (IDF), que determinó que el nombre cuajo (*rennet*) debe ser reservado para la preparación de enzimas de estómagos de rumiantes y que las otras enzimas coagulantes de la leche se denominen “Coagulantes”. Actualmente, también ha sido generalmente aceptado que la quimosina producida por un organismo modificado genéticamente (GMO) debe ser denominada “Quimosina producida por fermentación” (FPC). (Chr Hansen, 2008).

1.2.8.1.Coagulantes de origen animal (cuajo)

En el grupo de coagulantes de origen animal, el cuajo de ternero se considera ideal para la elaboración de quesos por su alto contenido de quimosina, siendo esta la propia enzima natural para coagular leche bovina. En el abomaso y los extractos de otros tejidos, la proporción de dos enzimas, quimosina y pepsina varía según la edad del animal y el tipo de alimentación. Los extractos provenientes de estómagos de terneros jóvenes tienen un alto contenido de quimosina, 80-90% y 10-20% pepsina. (Chr Hansen, 2008).

1.2.8.2.Coagulantes de origen microbiano

Todos los coagulantes microbianos conocidos utilizados en la elaboración de quesos son de origen fúngico. De los tres coagulantes microbianos usados en la quesera, el de *Rhizomucormiehei* es el predominante. (Chr Hansen, 2008).

1.2.8.3.Coagulantes de origen vegetal

Un gran número de enzimas vegetales han sido utilizadas como coagulantes de la leche, se trata de un extracto de *Cynara cardunculus* (L.), que es especialmente popular, dado que es utilizado para la elaboración de quesos artesanales y principalmente en Portugal para la elaboración de quesos Serra y Serpa. Cardoon contiene una mezcla de enzimas, las cuales parecen ser proteasas aspárticas, algunas de ellas para cortar la Kapa Caseína en forma más específica que la quimosina. (Chr Hansen, 2008).

Grupo	Fuente	Ejemplo	Componente enzimático activo
Animal	Estómago bovino	Cuajo bovino, de ternero, en pasta	Quimosina A y B, pepsina (A) y Gastricina ídem mas Lipasa
	Estómago ovino	Cuajo de cordero, oveja	Quimosina y Pepsina
	Estómago caprino	Cuajo de cabrito, cabra	Quimosina y Pepsina
	Estómago de porcino	Coagulante porcino	Pepsina A y B, Gastricina
Microbiano	Rhizomucormiehel	Hannilase	Proteasa aspártica de R. miehel
	Rhizomucorpusillus	Coag. Pusillus	Proteasa aspártica de R. pusillus
	Cryphonectria parasítica	Coagulante de Parasítica	Proteasa aspártica de C. parasítica
FPC (quimosina producida por fermentación)	Aspergillus niger	Chymax	Quimosina B
	Kluveromyceslactis		Quimosina B
Vegetales	Cynara cardunculus	Cardoon	Cyprosina 1, 2, 3 y/o CardosinaA y B

Figura 8: Coagulantes de uso común y sus enzimas componentes
Fuente: (Ibarlucea& López, 2008.)

1.3. Proteínas lácteas

La leche contiene cientos de distintos tipos de proteínas, muchas de las cuales se encuentran en muy pequeñas cantidades. Las proteínas pueden clasificarse de diversas formas según sus propiedades físicas o químicas, o sus funciones biológicas. El antiguo criterio de clasificar a las proteínas en caseína, albúmina y globulina han sido cambiados en la actualidad por un sistema de clasificación más adecuado; a continuación se muestra una lista abreviada de proteínas de la leche; y para simplificarlas se han excluido de la lista las proteínas que se encuentran en muy pequeñas proporciones. (Tetra pak processing systems AB, 2003).

Tabla 6: Proteínas presentes en la leche

Proteínas		Conc. en leche (g/kg)	% de proteína total (p/p)
Caseína	α s ₁ -caseína*)	10.0	30.6
	α s ₂ -caseína*)	2.6	8.0
	β -caseína**)	10.1	30.8
	κ -caseína	3.3	10.1
Total caseína		26.0	79.5
Seroproteínas	α -lactoalbúmina	1.2	3.7
	β -lactoalbúmina	3.2	9.8
	Albúmina del suero sanguíneo	0.4	1.2
	Inmunoglobulinas	0.7	2.1
	Otras (incluyendo peptona- proteasa)	0.8	2.4
Total seroproteínas		6.3	19.3
Proteínas de la membrana del glóbulo de grasa		0.4	1.2
Proteína total		32.7	100

*) En adelante denominada α s-caseína

***) Incluyendo γ -caseína

Fuente: (Walstra & Jennis, 2005)

Los tres principales grupo de proteínas presentes en la leche se distinguen por sus diferentes comportamientos y por su forma de existencia. Las caseínas son fácilmente precipitadas en la leche por diversos procedimientos, mientras que las proteínas del suero normalmente permanecen en solución. Las proteínas de las membranas de los glóbulos de grasa se adhieren, como su nombre lo indica, a la superficie de dichos glóbulos grasos y solamente se pueden separar mediante acciones mecánicas, tales como el batido de la nata en la fabricación de mantequilla. (Tetra pak processing systems AB, 2003)

1.3.1. La Caseína

La caseína da nombre a un grupo de proteínas que son las dominantes en la leche. Como todas las proteínas, la caseína forma fácilmente polímeros que contienen diversos grupos de moléculas idénticos o diferentes. Debido a la abundancia de

grupos ionizables y de polos hidrófobos e hidrófilos en la molécula de caseína, los polímeros formados por la caseína son muy especiales. Estos están constituidos por centenares o miles de moléculas individuales; y forman una solución coloidal que puede ser observada en la leche desnatada por su apariencia azul blanquecina. Estos complejos moleculares se conocen como micelas de caseína, las cuales pueden medir 0.4 micras que pueden ser observadas solamente con un microscopio electrónico. (Tetra pak processing systems AB, 2003).

1.3.1.1. Estado de dispersión en la leche y su estructura

Es un complejo de fosfoproteínas y glicoproteínas que está en forma de suspensión coloidal, en micelas estabilizadas que no coagulan al calentar la leche a ebullición, pero si lo hacen al disminuir el pH a 4,6 o, por tratamiento enzimático. Si las proteínas de la leche son sometidas a un proceso electroforético (en presencia de un agente disociante como urea), se pueden identificar varias fracciones: α , β , κ y γ -caseínas (Argullo & Carro, 2011.).

La α -caseína posee gran parte de su cadena polar debido a los grupos fosfatos de la serina y los grupos carboxílicos del glutamato. Estos grupos se encuentran concentrados en la región de la cadena que es la zona hidrófila, y el resto es una zona lipófila. Las dos proteínas, α_1 y α_2 , dan sales cálcicas insolubles.

La β -caseína, también precipita con los iones calcio. Presenta grupos fosfoserinas (zona polar) y el resto es una larga zona lipófila.

La κ -caseína, está poco fosforilada, pero es una glicoproteína con 4,5 % de azúcares (galactosa, galactosamina y ácido acetil-neuramínico), no precipita en presencia de iones calcio.

La γ -caseína tiene un peso molecular menor y su secuencia aminoacídica es análoga a la de la β -caseína por lo que se supone que procede de la degradación enzimática de ésta.

La unidad estructural de la micela, es la submicela formada por 25 – 30 unidades de α , β y κ -caseínas. La unión de muchas submicelas por puentes cálcicos, forman la micela (Argullo & Carro, 2011.).

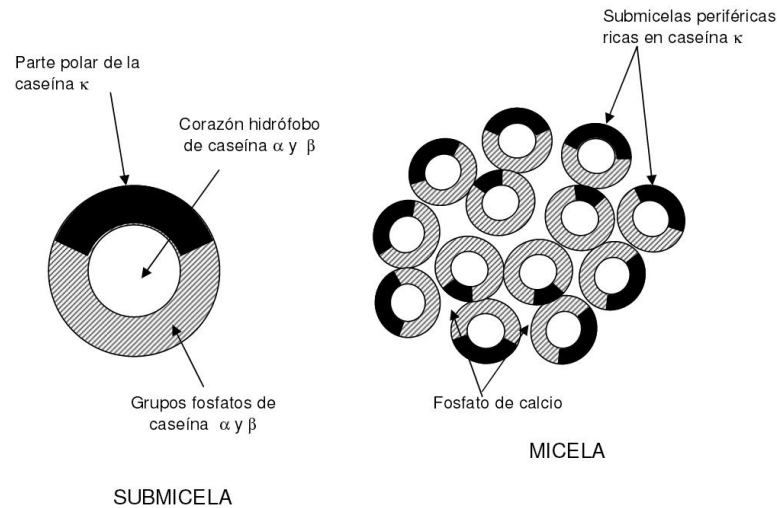


Figura 9: Molécula de caseína
Fuente: (Argullo& Carro, 2011.)

Las micelas se mantienen en suspensión gracias a que la caseína κ presenta grupos ácidos quedando la parte externa de la micela cargadas negativamente produciéndose repulsión entre unas micelas y otras. Estos grupos ácidos de la caseína κ se encuentran ionizados en el pH de la leche, si bajara este pH los grupos ácidos se protonarían y precipitarían las micelas; coagulando la leche (Fernández Sevilla, 2005).

1.3.1.2. Propiedades

- ❖ Un alto contenido de ácidos glutámico y aspártico, cuyos carboxilos se encuentran ionizados al pH 6.7 de la leche; esto hace que siempre se mantenga una carga negativa que las estabiliza gracias a la repulsión que se genera entre ellas.

- ❖ El aminoácido prolina, también abundante, está distribuido homogéneamente a lo largo de la estructura primaria de las caseínas y provoca, por impedimentos estéricos, que no se formen hélices como estructura secundaria. A excepción de la caseína κ que presenta una pequeña porción de hélice, las otras carecen prácticamente de ella y tienen una conformación al azar, razón por la cual algunos autores consideran que las caseínas son “proteínas desnaturalizadas de origen” y que por lo tanto, resisten los tratamientos térmicos severos sin sufrir modificaciones de desnaturalización.
- ❖ Debido a que contienen más aminoácidos hidrófobos que hidrófilos, presentan dentro de su estructura primaria zonas con propiedades francamente apolares.
- ❖ Las caseínas α , β , son muy sensibles a la alta concentración de los iones calcio propios de la leche; éstas precipitarían si no se contara con la caseína κ , que cumple una función protectora y estabilizadora.
- ❖ Contienen regiones cargadas que les permite unirse electrostáticamente.
- ❖ Presentan regiones fosforiladas que facilitan sus interacciones con calcio (Badui Dergal, 2006.).

1.3.1.3. Punto isoeléctrico

Una propiedad clásica, que ha servido durante un siglo para su definición operacional, es que las caseínas precipitan a pH 4,6, que es su punto isoeléctrico (a temperatura ambiente) (Calvo, 2006).

1.3.1.4. Estabilidad al pH y temperatura

En condiciones normales de pH y concentración de sales, las micelas de caseínas se encuentran muy hidratadas, teniendo ligados alrededor de 3,7 gramos de agua por gramo de proteína. La acidez tiene dos efectos: En primer lugar, según va bajando el pH se van rompiendo los enlaces entre los grupos fosfato y el ion calcio, al reducirse la ionización de los fosfatos. En segundo lugar, las repulsiones entre las micelas se reducen, al acercarse el pH al punto isoeléctrico de las caseínas. A un pH de

alrededor de 4,5 (y a una temperatura superior a 20°C) las caseínas se agregan, formando una cuajada poco mineralizada (Calvo, 2006).

La aplicación de calor afecta la estabilidad de las interacciones no-covalentes de la estructura tridimensional de las proteínas, pues se eleva la entalpía de la molécula y se rompe el delicado balance de los enlaces que mantienen el equilibrio. Los puentes de hidrógeno, las fuerzas de Van der Waals, y las interacciones electrostáticas por naturaleza son impulsados por la entalpía ΔH lo que implica que ocurren mediante procesos exotérmicos, y causa que se desestabilicen a altas temperaturas y se estabilicen a bajas temperaturas (Badui Dergal, 2006).

1.3.1.5. Precipitación de la caseína

Es ampliamente conocido que la caseína puede ser coagulada y precipitada para dar productos como queso, yogur, kéfir, cuajada, nata o leche agrias (buttermilk) y otros derivados. La caseína se precipita por dos procedimientos: acidificación que protona los grupos fosfato (y otros) que solubilizan a la caseína κ por acción de un enzima llamado cuajo animal (rennet) que descompone un pequeño trozo de la caseína κ precipitando la micela completa (Grupo Latino Editores, 2008).

1.3.1.5.1. Por ácidos

En alimentos como el yogur se produce la precipitación parcial de la caseína porque los grupos ácidos se protonan; y dejan de repelerse las micelas debido a una bajada de pH, causada por el ácido láctico. Para el caso de un queso, la adición de ácido provoca una baja en el pH; y al llegar al punto isoeléctrico la caseína precipita (Grupo Latino Editores, 2008).



Dependiendo de la cantidad y fortaleza del ácido agregado, la precipitación es más o menos drástica y completa, dando productos de consistencia pastosa, como la leche ácida, o en forma de gel, como en el caso del yogur hasta una precipitación completa con separación del suero si se emplea clorhídrico en caliente (Grupo Latino Editores, 2008).

1.3.1.5.2. Por enzimas

En este caso se produce una hidrólisis enzimática de las caseínas. El proceso, entre otras diferencias, es más lento ya que la enzima tarda varios minutos u horas en hacer efecto. En el cuajo se usan enzimas como la quimosina que se puede obtener del estómago de rumiantes jóvenes o bien de una especie de cardo (*Cynara cardunculus*). Esta quimosina es específica de la caseína κ (Grupo Latino Editores, 2008).

1.3.2. Productos lácteos

Como ya se mencionó anteriormente, existen un sinnúmero de derivados lácteos que están ampliamente distribuidos en los mercados, entre los de mayor consumo en nuestro país podemos mencionar el yogurt, mantequilla, quesos. En nuestro caso nos referiremos al queso que es el que se estudia en este trabajo de investigación.

1.3.2.1.El queso

El queso es el producto que resulta de la precipitación de las caseínas, que deja como residuo el llamado suero de la leche; para llevar a cabo este proceso, se emplean básicamente dos métodos: promedio de la renina o cuajo, o bien, acidificar en el punto isoelectrico de las caseínas (pH 4.6) (Badui Dergal, 2006.).

La NTEINEN 1528:2012 define al queso como el producto blando, semiduro, duro y extra duro, madurado o no madurado, y que puede estar recubierto, en el que la proporción entre las proteínas de suero y la caseína no sea superior a la de la leche.

1.3.2.1.1. Clasificación

Los quesos pueden presentar grandes diferencias en su composición además se elaboran por muchos métodos; todo ello da lugar a la existencia de un asombroso número de tipos y variedades. En la clasificación de los quesos, los parámetros característicos que se pueden usar para agruparlos son múltiples y no siempre son comunes a la totalidad de las variedades, por lo cual no es fácil clasificar los quesos en grupos definidos. Una de las clasificaciones más usadas es en quesos frescos o no madurados y los madurados; otro también bien simplista es teniendo en cuenta la consistencia: quesos blandos, semiduros y duros (Keating& Rodríguez, 2008).

De acuerdo a su composición y características físicas el producto, se clasifica en:

Según el contenido de humedad	Según el contenido de grasa láctea
Duro	Rico en grasa
Semiduro	Entero o graso
Semiblando	Semidescremado o bajo en grasa
Blando	Descremado o magro

Figura 10: Clasificación de los quesos
Fuente: (INEN 1528, 2012)

1.3.2.1.2. Composición química y valor nutricional

Los quesos son un derivado lácteo que por su sistema de fabricación, (coagulación de la leche y eliminación del suero), son muy ricos en grasas y proteínas, mientras que su contenido en azúcares y sales es bajo. La caseína es la proteína más importante que aparece en el queso, y deriva de la palabra Caseus, que significa precisamente queso. Otras proteínas como la globulina y la albúmina escapan con el suero (Walstra, 2001).

El contenido en hidratos de carbono de los quesos está constituido por la lactosa o azúcar de la leche, que acaba transformándose en gran parte en ácido láctico por acción de las bacterias lácticas. Parte del ácido láctico se encuentra ligado al Calcio

formando lactato cálcico. El suero arrastra casi toda la lactosa de la leche, por lo que, como decíamos antes, su presencia en los quesos es muy reducida. En cuanto a las sales minerales, su contenido oscila entre el 1,2 y el 4,5%, siendo los más importantes Calcio, Fósforo y Hierro (Walstra, 2001).

En cuanto al contenido en vitaminas, los quesos son más ricos en las solubles en grasa que en las solubles en agua. Por otra parte, cuanto mayor es el contenido graso de un queso mayor es su riqueza en vitamina A y D. La grasa es, en general, el componente más abundante en los quesos (Walstra, 2001).

Tabla 7: Composición química de leche, queso y suero

COMPARACIÓN ENTRE QUESO, LECHE Y SUERO.			
	LECHE	QUESO	SUERO
Agua	88%	45%	93%
Proteínas	3.3%	23%	0.9%
Grasas	3.5%	28%	0.3%
Azúcar	4.5%	---	4.9%
Minerales	0.7%	4%	0.6%

Fuente: (Grupo latino editores, 2008.)

1.3.2.1.3. Características organolépticas y evaluación sensorial del queso

Definición y clasificación de algunos descriptores empleados en el análisis sensorial de textura de quesos.

Figura 11: Descriptores para análisis sensorial de quesos

Características	Descriptor	Definición
Mecánicas	Firmeza	Fuerza requerida para deformar el queso.
	Elasticidad	Aptitud de la muestra de queso de recuperar su espesor inicial después de haber sido comprimido y deformado
	Adherencia	Trabajo que se realizar con la lengua para despegar un producto pegado en el paladar y los dientes
	Friabilidad	Aptitud que presenta la muestra de generar numerosos trozos desde el principio de la masticación
	Deformabilidad	Facilidad de la muestra bucal para deformarse de forma sucesiva o estirarse antes de romperse
Geométricas	Granulosidad	Se relaciona con la dimensión y la forma de las partículas del queso percibidas durante la masticación.
	Cristales	Percepción del número de pequeños cristales angulosos eventualmente presentes en el queso (su aplastamiento produce un crujido audible).
Otras	Solubilidad	Sensación que se pone de manifiesto cuando la muestra funde muy rápidamente en la saliva.
	Humedad	Percepción del grado de humedad de la muestra

Fuente: (Castro, Novoa, Algecira, & Buitrago, 2014.)

1.3.2.1.4. Propiedades de textura

Independientemente del origen de la leche, las propiedades físicas del queso se rigen por la interacción entre las moléculas de caseína (Tunick, 2000). Sin lugar a dudas para el consumidor la textura juega un rol importante en términos de inferir la calidad de un alimento. Particularmente en el queso, la textura es uno de los atributos

más importantes que ayudan a determinar la identidad del mismo (Bourne, 2002 citado por Castro et al., 2014).

La información textural y reológica es importante en el diseño de procesos de transformación en alimentos (mezclado, flujo de materiales, calentamiento, enfriamiento), en la determinación de la funcionalidad de los ingredientes para el desarrollo de productos, en el control de calidad de productos intermedios y finales, en estudios de tiempo de vida útil y en evaluaciones de propiedades texturales correlacionadas con pruebas sensoriales, entre otros (Steff, 1996), (Vélez-Ruiz & Barbosa-Cánovas, 1997), (Tabilo-Munizaga & Cánovas-Barbosa, 2005), (Foegeding & Drake, 2007).

Durante la elaboración o almacenamiento de quesos suelen aparecer efectos positivos o negativos, de carácter organoléptico, y quizá al utilizar enzimas bastante proteolíticas como la papaína y la ficina para la coagulación de la leche, estas sean aun más probables que aparezcan, como es el caso del sabor amargo por la presencia de péptidos producidos por las enzimas vegetales antes mencionadas, que continúan hidrolizando las proteínas lácteas.

La aparición de sabor amargo durante la etapa de almacenamiento podría disminuir el tiempo de vida útil del producto en el caso de las características organolépticas; pero incrementar su vida en el caso de las características microbiológicas.

La proteólisis produce un aumento de digestibilidad, pudiendo obtenerse también péptidos “activos”, con determinadas propiedades fisiológicas (Gregory III, 2010 citado por Lupano, 2013).

Diversos estudios han reportado que mediante la hidrólisis controlada *in vitro* de proteínas alimentarias es posible generar este tipo de péptidos. Se han aislado péptidos antimicrobianos principalmente a partir de hidrolizados enzimáticos limitados, de proteínas de origen animal como la leche, el huevo y algunas especies marinas de peces. Recientemente se han aislado hidrolizados limitados, con grados menores al 10% de proteínas de origen vegetal como la soya y el maíz (Dubin, y otros, 2005). Los péptidos con actividad antimicrobiana inhiben el crecimiento antibacteriano y fúngico, actúan frente a bacterias gran positivas y gran negativas. El amplio uso se debe a que tiene toxicidad selectiva que permiten atacar de manera

específica las células blanco, que al parecer dificultan la aparición de fenómenos de resistencia (Téllez& Castaño, 2010 citado por Segura-Campos, Chel-Guerrero, Betancur-Ancona, 2013).

1.3.2.1.5. Proceso de elaboración del queso tipo fresco

La elaboración de un queso está en función del tipo de queso que vayamos a producir, en este caso utilizaremos el diagrama para queso fresco, que es el que se utiliza para elaborar los distintos tipos de queso.

Etapa del proceso	Equipos y material utilizado	Objetivo
Recepción de leche.	Marmitas de aluminio	Controlar el peso y las características básicas para aceptar la materia prima
Pasteurización.	Pasteurizador de placas ó marmita de doble capa.	Bajar la carga bacteriana, eliminar patógenos e inactivar enzimas.
Estandarización.	Descremadora.	Estandarizar el contenido de grasa para elaborar el queso
Adición de ClNa y Cl ₂ Ca.	Pipetas, probetas u otro material de medición.	Incrementar el contenido de sales, estabilizar la cuajada, retener grasa y otros sólidos.
Inoculación con fermentos lácteos	Material de pesaje o de volumen	De acuerdo al tipo de queso a elaborar.
Adición de cuajo.	Pipetas o probetas.	Coagular la caseína, separando su parte hidrófila de la hidrófoba.
Corte de la cuajada.	Liras.	Incrementar la superficie de exudación y ayudar al desuerado.
Desuerado.	Espátulas.	Separación del suero de las moléculas de paracaseinato.

Etapa del proceso	Equipos y material utilizado	Objetivo
Moldeado.	Moldes de acero inoxidable.	Darle una forma y tamaño adecuado a la cuajada.
Prensado.	Prensas mecánicas o manuales	Eliminación de suero retenido, firmeza y contenido de grasa.
Salado	Marmitas para salmuera	A más del sabor el salado regulara el crecimiento de microorganismos y la firmeza del queso.

Figura 12: Proceso de elaboración de queso
Fuente: Autora

1.4.Vida Útil

La vida útil de un alimento representa aquel período de tiempo durante el cual el alimento se conserva apto para el consumo desde el punto de vista sanitario, manteniendo las características sensoriales, funcionales y nutricionales por encima de los límites de calidad previamente establecidos como aceptables (Hough& Fiszman, 2005.).

Este período depende de muchas variables en donde se incluyen tanto el producto como las condiciones ambientales y el empaque. Dentro de las que ejercen mayor peso se encuentran la temperatura, pH, actividad del agua, humedad relativa, radiación (luz), concentración de gases, potencial redox, presión y presencia de iones (Brody, 2003.).

1.4.1. Métodos para determinar la vida útil en alimentos

Existen distintos métodos para calcular la vida útil de un producto alimenticio, al momento de iniciar el análisis se debe tener en cuenta el tipo de alimento, ya que dependiendo de este se utilizara un método específico. Para el caso los alimentos pueden ser; no perecederos, que son aquellos que tiene baja actividad de agua (a_w) generalmente los productos secos o que tienen vida útil superior al año; poco

perecederos, se refieren a aquellos alimentos que tiene actividad de agua media o aquellos con vida útil mayor a 6 meses y perecederos, los alimentos con una alta actividad de agua o vida útil de 3 meses o menos.

1.4.1.1.Pruebas de vida útil a tiempo real

Este tipo de pruebas evalúa el efecto de la temperatura “normal” de conservación sobre las propiedades microbiológicas, físico-químicas y sensoriales de un alimento durante un periodo de tiempo, entendiéndose como temperatura normal aquella que será empleada durante la conservación comercial del producto. Para la determinación de la vida útil de un alimento deberán considerarse las variables microbiológicas, físico-químicas y sensoriales que mayor influencia tendrán sobre la calidad del producto (Restrepo-Ángel& Montoya-Gómez, 2010.).

La técnica consiste en almacenar un lote de muestra en las condiciones seleccionadas e ir haciendo un muestreo en tiempos prefijados (Hough & Fiszman, 2005 citado por Valencia-García, Millán-Cardona, & Jaramillo-Garcés, 2008).

1.4.1.2.Métodos de factor de aceleración Q_{10}

Las pruebas de aceleración de la vida útil es quizá la metodología más empleada hoy día para calcular la vida útil de un alimento no perecedero o estable (alimentos esterilizados como por ejemplo los enlatados). En esta técnica, se pretende estudiar varias combinaciones de producto/empaque acabados bajo diferentes condiciones de abuso de temperatura, examinando el producto periódicamente hasta el fin de la vida útil; los resultados obtenidos se usan para proyectar la vida útil del producto bajo las verdaderas condiciones de almacenamiento. Esta técnica se basa en la aplicación de la cinética de la velocidad de Arrhenius, el cual establece que la velocidad de las reacciones químicas se duplica aproximadamente por cada 10°C de aumento de la temperatura(Restrepo-Ángel& Montoya-Gómez, 2010).

1.4.1.3. Diseños escalonados.

Se almacenan diferentes lotes de producción en las condiciones seleccionadas a diferentes tiempos (Hough & Fiszman, 2005 citado por Valencia García et al., 2008).

CAPÍTULO II

MATERIALES Y METODOS

2.1. Materiales, equipos, reactivos y muestras

Las muestras utilizadas fueron los frutos de *vasconcella cundinamarcensis* (chamburos) y del *ficus carica* (higos).

Materiales	Reactivos	Equipos
Vasos de precipitación	Alcohol potable	Estufa
Pipetas	Fosfato acido de sodio	Centrifuga
Probetas	Cloruro de sodio	Baño maría
Varillas de vidrio	Ácido clorhídrico	Termocupla
Capsulas de porcelana	Cloruro de calcio	Balanza analítica
Bisturí	Papaína	Termómetros
Balones de aforo	Cuajo quimosina	Incubadoras
Embudos de vidrio	Ácido sulfúrico	Cocina
Soportes	Alcohol amílico	Descremadora
Cajas petri	Cultivo R-703	Esterilizador
Tubos de centrifuga 50ml		Moldes
		Ollas de acero inox
		Empacadora al vacio
		Espectrofotómetro de absorción UV

2.2.Métodos

2.2.1. Toma de muestras

2.2.1.1.Toma de muestras de los frutos de *vasconcella cundinamarcensis* (chamburo)

Los frutos utilizados para la obtención de la enzima papaína fueron recolectados en la zona rural del Cantón Paute, en la comunidad de Maras. En la cosecha se utilizaron guantes para evitar el contacto directo con la piel, se recolectaron frutos inmaduros que en nuestro caso son completamente de color verde; posteriormente se colocaron en fundas plásticas limpias y se los traslado a los laboratorios de biotecnología para la extracción de las enzimas.



Figura 13: Recolección de frutos de chamburo en los huertos de la comunidad de Maras

Fuente: Autora

2.2.1.2.Toma de muestras de los frutos de *ficus carica* (higo)

Para la recolección de los frutos de higo, se contó con la colaboración del INIAP (Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias) Estación Experimental del Austro, ubicado en el Km 25 vía Cuenca – Gualaceo en la provincia del Azuay, quienes permitieron el ingreso a su finca. En la recolección de látex de higo se

utilizaron guantes para evitar el contacto directo con la piel, el látex se recolectó de los frutos tiernos que tienen un color verde, debido a que estos tienen mayor cantidad de látex; este fue recogido en tubos de ensayo asépticos directamente al cortar los frutos de la higuera, los tubos con el látex se colocaron en un recipiente frío que mantiene la temperatura de refrigeración, para ser trasladados inmediatamente a los laboratorios de biotecnología de la Universidad del Azuay y realizar el respectivo procesamiento del látex.



Figura 14: Recolección de frutos de higo utilizados para la extracción de látex.
Fuente: Autora

2.2.2. Extracción y secado del látex

Con los frutos de chamburo ya en el laboratorio se seleccionaron los de mejor apariencia para la extracción del látex, luego se lavó con abundante agua y se desinfectó con una solución de etanol al 5%; se lavó nuevamente con agua destilada, para asegurar que los frutos estén completamente limpios. A continuación se realizaron de 3 a 4 cortes longitudinales de aproximadamente 2mm de profundidad, se colocaron los frutos en posición vertical y se recolectó el látex exudado en cajas petri para ser deshidratado a 40°C durante aproximadamente 24 horas o hasta peso constante durante 15 segundos. El látex seco se removió de las cajas Petri y se colocó en tubos eppendorf para almacenarlos en congelación a una temperatura de -10°C.

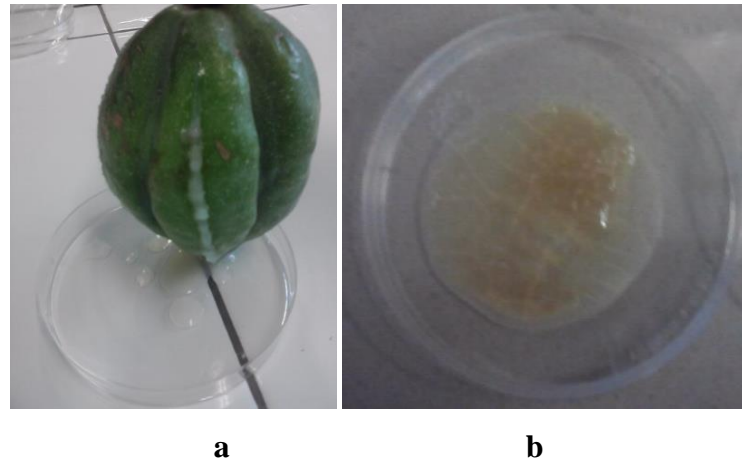


Figura 15: Extracción de látex de chamburo; b) Látex de chamburo seco
Fuente: Autora

Para el caso de los higos se realizó el mismo procedimiento a excepción de la primera parte, debido a que el látex de este fruto se lo recolectó al momento de cortarlo de la higuera, como se detalló en el punto anterior. Para especificar de mejor manera el proceso de obtención de látex seco, a continuación se detalla mediante un diagrama de proceso.

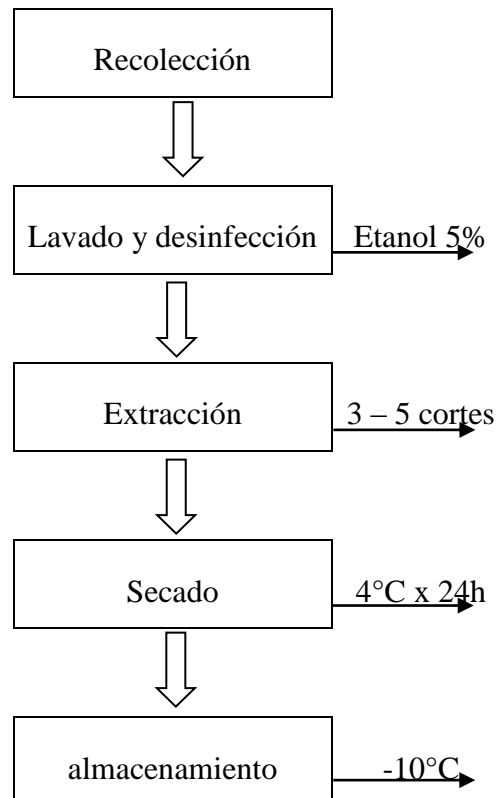


Figura 16: Diagrama de obtención de látex seco
Fuente: Autora

2.2.3. Preparación de extractos acuosos

Se preparó el extracto acuoso con una concentración al 0.5% de látex seco en un volumen de 250 ml, para lo cual se colocó aproximadamente 1.5g de látex seco de cada fruto por separado en un mortero con el fin de reducir su tamaño, esta operación se la realizó lentamente para evitar el aumento de temperatura a causa de la fricción en el momento de la trituración, a continuación se colocó 1.25g del látex triturado en un matraz de 250 ml y se añadió tampón fosfato de sodio 50mM y pH 7.5 hasta aforarlo, se dejó el matraz en refrigeración a 4°C durante 24 horas para la solubilización de las proteínas, se centrifugó la suspensión a 2700xg durante 10 minutos, se filtró el sobrenadante y se colocó en un vaso de vidrio en refrigeración.

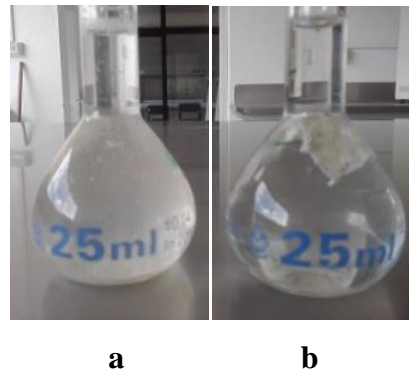


Figura 17: a) Extracto acuoso látex de chamburo; b) Extracto acuoso látex higo
Fuente: Autora

2.2.4. Purificación parcial de proteínas por precipitación con solventes orgánicos

Para poder realizar una solución concentrada de las enzimas presentes en el látex del higo y el chamburo se realizó la precipitación de las proteínas presentes en el extracto acuoso, para lo cual se tomaron 250mL de la solución y se adicionó 12.5mL de cloruro de sodio 4M, se homogenizó la mezcla, para luego añadir 500mL de etanol al 96% de pureza, se agitó levemente para evitar desnaturalización de las enzimas, la presencia de espuma es indicativo de esto; a continuación se centrifugó esta mezcla a 2700xg durante 5 minutos, se desechó el sobrenadante y se colocó los tubos hacia abajo sobre una toalla de papel absorbente durante 30 minutos con el objetivo de obtener un precipitado más seco.

Finalmente se pesó la cantidad de proteína semi-purificada y se resuspendió en ClNa (13% p/v) a una concentración del 25% p/v de proteínas.

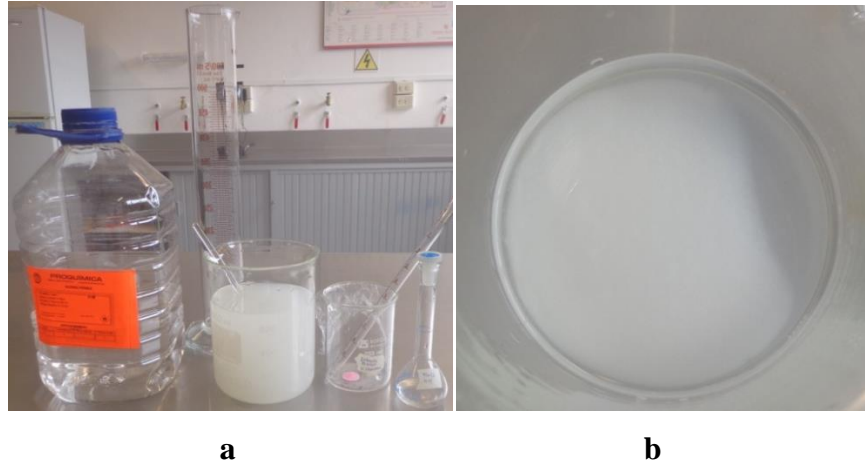


Figura 18: Semipurificación d proteínas; b) Extracto semipurificado
Fuente: Autora

2.2.5. Determinación de la concentración de proteínas

Para la determinación de la concentración proteica en los extractos acuosos, se utilizó el método de absorción en el ultravioleta (Yáñez, 2006). Cuando las lecturas de la densidad óptica de las muestras estuvieron sobre el valor de 1,000, se realizaron diluciones de las mismas con la solución tampón, en relaciones y 1 a 10 ml (Sinche Serra, 2009).

La ecuación para el cálculo fue la siguiente

$$[P] = \frac{DO_{280} \cdot f}{\epsilon \cdot L}$$

- [P] Es la concentración de proteínas solubles en mg/ml.
 DO 280 Densidad óptica medida a 280nm.
 f Es el factor de dilución.
 L Es la longitud al paso de la luz en la celda, en cm.
 ε Es el coeficiente de extinción de la enzima a 280nm, cuyo valor se considera igual a $1.0 \text{ (mg/ml)}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

2.2.6. Determinación de la fuerza de coagulación

Para la determinación de la fuerza de coagulación se utilizó el método de SOXHLET que dice: la fuerza F representa el número de volúmenes de leche coagulados por un determinado número de volúmenes de cuajo, en 40 minutos a 35°C.

Se tomó un litro de leche previamente pasteurizado y se calentó hasta una temperatura de 40°C, se adicionó cloruro de calcio 0.7g/litro, luego se transfirió 25ml de esta leche a 9 matraces que fueron colocados en baño maría a 35°C, a continuación se adicionó 0.5ml de solución de proteínas del higo y chamburo, así como de cuajo comercial quimosina CHY-MAX II que se utilizó como muestra testigo; se controló el tiempo que tardó en coagular la leche para de esta manera calcular la fuerza de coagulación de cada solución enzimática. Todos los ensayos se realizaron por triplicado para asegurar la veracidad de los resultados.



Figura 19: Coagulación de la leche mediante enzimas ficina y papaína.
Fuente: autora

2.2.7. Fuerza de coagulación y selección de la formula base del queso tipo fresco con mezcla de enzimas vegetales

Utilizando la información antes mencionada y basándonos en la cantidad que se adiciona de cuajo animal se elaboró la formula base con la mezcla de las enzimas en cantidades iguales; en la tabla siguiente se detallan las pruebas realizadas.

Tabla 8: Mezcla de enzimas vegetales

Experimento	Papaína	Ficina	Vol. leche
1	0.5	0.5	2 L
2	0.5	0.5	2 L
3	1	1	2 L
4	1	1	2 L
5	1.5	1.5	2 L
6	1.5	1.5	2 L

Fuete: Autora

Con la formula base y conociendo ya cuales son las cantidades a ser mezcladas del las enzimas papaína y ficina, se inició el proceso de elaboración del queso fresco, pero ya sustituyendo el cuajo comercial quimosina por las mezclas enzimáticas obtenidas de papaína-ficina.

En el cuadro a continuación se detalla paso a paso el proceso utilizado para transformar la materia prima en queso a base de enzimas vegetales.

Etapa del proceso	Detalle
Recepción de leche.	Se controló las características químicas de la leche, para asegurarnos que la calidad sea la óptima.
Pasteurización.	Se bajó la carga bacteriana, y se inactivó enzimas que podrían afectar al producto a lo largo de su vida útil.
Estandarización.	Se estandarizo el contenido de grasa para elaborar el queso
Adición de ClNa y Cl ₂ Ca.	Con el fin de incrementar el contenido de sales y estabilizar la cuajada para tener una mejor textura del producto.
Inoculación con fermentos lácteos	Se adicionó los fermentos lácteos para obtener un queso tipo fresco.
Adición de enzimas (papaína-ficina).	Se adiciona las enzimas en partes iguales, para precipitar la caseína.
Corte de la cuajada.	Se cortó la cuajada en cubos de aproximadamente 5mm.
Desuerado.	La cuajada se movió durante 10 minutos para un mejor desuerado y que los enlaces de la caseína se fortalezcan.
Moldeado.	Para darle forma al queso se utilizaron moldes de acero inoxidable de forma rectangular.

Etapa del proceso	Detalle
Prensado.	Con la ayuda de una prensa manual se eliminó el suero que aun retenida la cuajada y se moldeo completamente el queso.
Salado	Se sumergió el queso en salmuera al 20% para darle sabor y evitar que bacterias contaminen el queso, mejorando si tiempo de vida útil.

Figura 20: Proceso de elaboración del queso tipo fresco con enzimas vegetales

Fuente: Autora

2.2.8. Aplicación de diseño factorial 2^3 para encontrar la mejor combinación de los extractos enzimáticos

Se estudió el efecto de tres factores: Papaína, Ficina y tiempo; con dos niveles en cada uno, a continuación se detallan las matrices del diseño.

Tabla 9: Matriz de diseño 2^3

Exp	A	B	C	AB	AC	BC	ABC
1	-1	-1	-1	1	1	1	-1
2	1	-1	-1	-1	-1	1	1
3	-1	1	-1	-1	1	-1	1
4	1	1	-1	1	-1	-1	-1
5	-1	-1	1	1	-1	-1	1
6	1	-1	1	-1	1	-1	-1
7	-1	1	1	-1	-1	1	-1
8	1	1	1	1	1	1	1

Fuente: Autora

Con base en esta matriz se elaboraron los quesos con las distintas variables, con el objetivo de encontrar un producto con características físico-químicas, sensoriales y microbiológicas óptimas, para que dicho producto sea aceptado por el consumidor.



Figura 21: Corte de la cuajada para elaborar quesos con enzimas vegetales
Fuente: Autora

2.2.9. Vida útil del queso obtenido en el diseño experimental, en función de sus características sensoriales, químicas y microbiológica

Para determinar el tiempo de vida del producto se utilizó el método a tiempo real señalado por (Restrepo-Ángel & Montoya-Gómez, 2010). Se almacenaron los quesos a temperatura de refrigeración de 2°C a 4°C durante cuatro semanas y se tomaron muestras representativas una vez cada semana, para realizar los análisis sensoriales, químicos y microbiológicos.

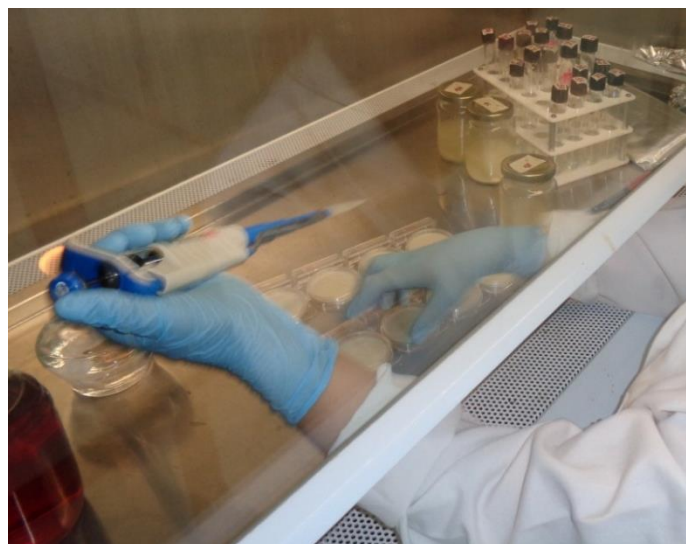


Figura 22: Análisis microbiológicos durante el tiempo de almacenamiento del queso
Fuente: Autora

Los análisis sensoriales se realizaron de igual manera que en el diseño de experimentos, las pruebas fueron hechas por 10 catadores de laboratorio, una vez por semana durante las cuatro semanas de almacenamiento del producto. Para esto se utilizaron fichas de cata que evaluaron las características olfato-gustativas y de textura.

Para el caso de los análisis químicos y microbiológicos se realizaron los que indica la norma INEN 1528, 2012, con los métodos señalados en dicha norma.

Tabla 10: Requisitos físico-químicos queso fresco

Tipo o clase	Humedad % max NTE INEN 63	Contenido de grasa en extracto seco, % m/m mínimo. NTE INEN 64
Semiduro	55	-
Duro	40	-
Semiblando	65	-
Blando	80	-
Rico en grasa	-	60
Entero o graso	-	45
Semidescremado o bajo en grasa	-	20
Descremado ó magro	-	0.1

Fuente: (INEN 1528, 2012)

Tabla 11: Requisitos microbiológicos queso fresco

Requisitos	n	m	M	c	Método de ensayo
Enterobacteriaceas, UFC/g	5	2×10^2	10^3	1	NTE INEN 1529-13
Escherichia coli, UFC/g	5	<10	10	1	AOAC 991.14
Staphylococcus aureus UFC/g	5	10	10^2	1	NTE INEN 1529-14
Listeria monocytogenes /25 g	5	ausencia	-		ISO 11290-1
Salmonella en 25g	5	AUSENCIA	-	0	NTE INEN 1529-15

Dónde:

n = Número de muestras a examinar.

m = Índice máximo permisible para identificar nivel de buena calidad.

M = Índice máximo permisible para identificar nivel aceptable de calidad.

C = Número de muestras permisibles con resultados entre m y M.

Fuente: (INEN 1528, 2012)



Figura 23: Producto final empacado y almacenado para análisis de vida útil.

Fuente: Autora

CAPÍTULO III

RESULTADOS

3.1. Obtención de látex deshidratado a 40°C por 24 horas

Tabla 12: Rendimiento y % de humedad del Chamburo e higo

	Látex fluido (g)	Látex seco (g)	Humedad %	Rendimiento %
CHAMBURO <i>(V. cundinamarcensis)</i>	1,237	0,097	92,158	7.842
	0,553	0,05	90,958	9.042
	0,437	0,034	92,220	7.78
	0,608	0,051	91,612	8.388
HIGOS <i>(F. carica)</i>	0,212	0,063	70,283	29.217
	0,25	0,074	70,400	29.6
	0,377	0,108	71,353	28.647
	0,526	0,15	71,483	28.517

Fuente: Autora

Para el caso de los frutos de chamburo se obtuvo un promedio de 0.5g a 1g de látex fluido. Los higos aportaron con aproximadamente 0.1ml de látex fluido por cada fruto.

Para ambos casos la cantidad de látex extraído están directamente relacionados con el tamaño de los frutos, debido a que en frutos más grandes se encontrara mayor cantidad de látex.

3.2.Purificación parcial de las proteínas presentes en el extracto acuoso

Después de preparado el extracto acuoso con látex seco se hizo una semipurificación con el extracto, el cual revela que se obtiene de 3 a 5 g de enzima semiseca, dando un rendimiento cercano a los 75% -85%, teniendo en cuenta que aun pueden existir proteínas distintas a las proteolíticas pero en cantidades mínimas. En la tabla a continuación podemos observar el resultado de la semipurificación en 4 ocasiones.

Tabla 13: Rendimiento de la semipurificación de las enzimas

	Látex seco en solución (g/250ml)	Enzima semi purificada (g)	E. seca (g)	%H	% Rend
CHAMBURO (<i>V. cundinamarzensis</i>)	1,25	4,973	1,1942	75,986	95,536
	1,25	4,224	1,0143	75,987	81,144
	1,25	3,639	0,9435	74,072	75,48
	1,25	4,587	1,0557	76,985	84,456
HIGO (<i>F. carica</i>)	1,25	3,631	1,0892	70,002	87,136
	1,25	3,574	1,0733	69,969	85,864
	1,25	3,671	1,0643	71,007	85,144
	1,25	2,682	0,8414	68,627	67,312

Fuente: Autora

3.3.Determinación del contenido de proteínas (enzimas) en extractos acuosos y semipurificado

Para la determinación del contenido proteico se realizo la lectura ultravioleta en el extracto acuoso y en la solución de proteína semipurificada a la misma concentración para observar el rendimiento antes y después.

Los cálculos se realizaron según la ecuación:

$$[P] = \frac{DO_{280} \cdot f}{\epsilon \cdot L}$$

- [P] Es la concentración de proteínas solubles en mg/ml.
 DO 280 Densidad óptica medida a 280nm.
 f Es el factor de dilución.
 L Es la longitud al paso de la luz en la celda, en cm.
 ϵ Es el coeficiente de extinción de la enzima a 280nm, cuyo valor se considera igual a $1.0 \text{ (mg/ml)}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Tabla 14: Contenido de proteínas (enzimas)

Enzimas	Extracto acuoso 0.5%		Extracto semipurificado resuspendido en 40ml		% rend
	Absorbancia DO ₂₈₀	Concentración de proteína en mg/ml	Absorbancia DO ₂₈₀	Concentración de proteína en mg/ml	
Papaína	0.106	1.06	0.050	0.5	47
Ficina	0.191	1.91	0.040	0.4	21
Papaína	0.099	0.99	0.042	0.42	42
Ficina	0.197	1.97	0.043	0.43	22
Papaína	0.107	1.07	0.049	0.49	46
Ficina	0.204	2.04	0.044	0.44	22

Fuente: Autora

Los resultados expuestos en la tabla 14 muestran que al realizar la semipurificación del extracto acuoso baja considerablemente el contenido de proteínas, esto debido a que al realizar el proceso de purificación se eliminan proteínas y residuos proteicos no deseados, pero de la misma manera se incrementa el poder coagulante de las mimas, es decir que se requieren mucha menor cantidad de extracto semipurificado para coagular un mismo volumen de leche.

3.4.Determinación de la fuerza de coagulación de las enzimas

La fuerza de cuajo representan la cantidad de ml de leche coagulada al adicionar un ml o gramo de cuajo en un tiempo y temperatura constante de 35°C y 40 minutos respectivamente. En la tabla siguiente podemos observar que la fuerza de coagulación para las enzimas vegetales es menor que la fuerza de cuajo de la quimosina (cuajo comercial), esto debido a que la quimosina comercial tiene mayor especificidad para la caseína; al hacer las pruebas esta coagula en menor tiempo que las enzimas vegetales.

Se dice entonces que para el caso de la papaína, se requiere de 1ml para coagular 2L de leche y la ficina necesita de 1 ml de leche para coagular 4L de leche.

Para evaluar la fuerza de coagulación se utilizó el extracto semipurificado evaluado en el acápite anterior.

Tabla 15: Fuerza de coagulación de papaína (chamburo), ficina(higo) y cuajo comercial

Enzimas	Vol. Leche ml	Vol. Enzima ml	Tiempo coagulación seg.	Fuerza de cuajo
Papaína	25	0.5	60	2000
Ficina	25	0.5	30	4000
Quimosina	25	0.5	9	13333.33

Fuente: Autora

La fuerza de cuajo según SOXHLET viene dado por la siguiente fórmula:

$$F = \frac{2400 * V}{T * v}$$

De donde:

V = volumen de leche utilizada en ml

T = tiempo en segundos

v = volumen de cuajo en ml.

3.5.Fuerza de coagulación y selección de la fórmula base del queso tipo fresco con mezcla de enzimas vegetales

Luego de realizar la coagulación con mezclas enzimáticas y elaborar el queso se procedió a hacer pruebas de aceptación, esto con el fin de seleccionar el mejor experimento y utilizarlo como fórmula base para el diseño experimental. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla a continuación.

Tabla 16: Rendimiento y aceptación del queso elaborado con enzimas vegetales

Exp.	Papaína	Ficina	Vol. leche	Tiempo	Peso queso	Aceptación
1	0.5	0.5	2 L	No coaguló	-	-
2	0.5	0.5	2 L	No coaguló	-	-
3	1	1	2 L	90 min	194.9 g	30%
4	1	1	2 L	85 min	230 g	32%
5	1.5	1.5	2 L	70 min	307 g	51%
6	1.5	1.5	2 L	50 min	250 g	55%

Fuente: Autora

Con estos resultados se realizó el diseño experimental, tomando el experimento 6 que es el que tiene mayor aceptabilidad.

3.6.Diseño factorial 2³

Para la elaboración de los quesos la materia prima utilizada se recogió del sector de la parroquia Tarqui, ubicada en el Cantón Cuenca. Las características físico-químicas de esta se detallan en el siguiente cuadro.

Tabla 17: Características físico-químicas de la materia prima

PROPIEDAD	VALORES
pH	6.62
Proteínas	3.20%
Grasa	4%
Solitos totales	8.7%
Densidad	1.32 g/cc

Fuente: Autora

Teniendo la materia prima necesaria y estandarizada a los valores mencionados en la tabla anterior se procedió a elaborar el queso de acuerdo al diagrama descrito en el acápite 2.2.7; teniendo en cuenta la tabla de diseño experimental que fue descrita en el acápite 2.2.8.

Tabla 18: Niveles máximos y mínimos de las variables a estudiar

Factores	Equivalencia	Niveles	
		Mínimo	Máximo
Papaína	A	1.2	1.8
Ficina	B	1.2	1.8
Tiempo	C	50	70

Fuente: Autora

Tabla 19: Rendimiento expresado en % de aceptación de cada experimento

Exp	A	B	C	AB	AC	BC	ABC	CARAC ORGAN %
1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	70.97
2	1	-1	-1	-1	-1	1	1	68.97
3	-1	1	-1	-1	1	-1	1	70.26
4	1	1	-1	1	-1	-1	-1	66.00
5	-1	-1	1	1	-1	-1	1	67.24
6	1	-1	1	-1	1	-1	-1	68.75
7	-1	1	1	-1	-1	1	-1	72.17
8	1	1	1	1	1	1	1	69.11

Fuente: Autora

Luego de haber realizado todos los experimentos se realizaron pruebas de cata para determinar cuál es el mejor experimento. Las cataciones fueron realizadas por 10 catadores de laboratorio, que ya tienen conocimientos previos, pero que fueron entrenados para hacer dichas pruebas.

Para el análisis y determinación de vida útil se seleccionó el producto con mayor aceptación, en este caso el experimento # 7 tiene un porcentaje mayor, lo cual indica que el consumidor tiene preferencia por este producto y sus características organolépticas.

Con los resultados obtenidos se realizó un análisis de los datos para determinar la significatividad de los factores de experimento, es decir cómo influye cada variable en las características organolépticas del producto final. En la siguiente figura se muestran los efectos de las distintas variables y su combinación.

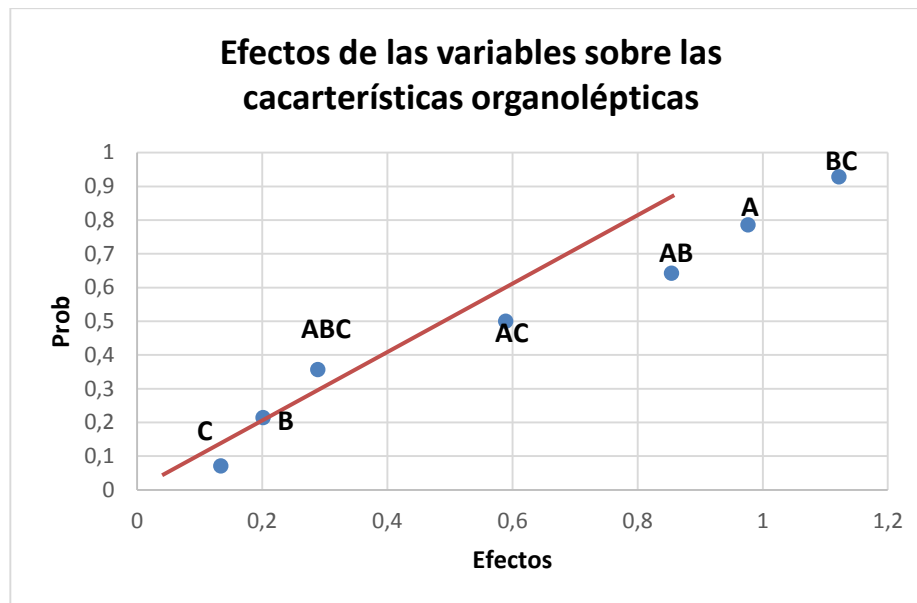


Figura 24: Efectos de las variables sobre las características organolépticas del queso.
Fuente: Autora

Como se observa en la figura 27 las variables que tienen mayor influencia sobre las características organolépticas son los puntos más alejados de la recta, en este caso tenemos la combinación de enzimas (AB), la papaína (A) y la combinación ficina-tiempo (BC).

Para conocer si el efecto de cada factor es positivo o negativo, podemos observar la tabla 19. Para el caso de combinar las enzimas tenemos un efecto significativo negativo, esto quiere decir que si se incrementa el volumen adicionado para coagular la leche, las características organolépticas se verán afectadas pero de manera negativa, esto podría conducir a la disminución del porcentaje de aceptación.

Al referirse a la papaína, esta variable también afecta de manera negativa las características organolépticas del producto, por lo tanto es importante tener en cuenta que no se debe incrementar su volumen de adición, sería mejor disminuir el volumen adicionado en la coagulación de la leche para mejorar sus características y al mismo tiempo incrementar el porcentaje de aceptación.

En el caso de la combinación ficina-tiempo tenemos un efecto positivo sobre las características del queso, esto se entiende como lógico debido a que con un mayor tiempo de coagulación la enzima tendrá un mejor resultado; pero esto no es razón

suficiente como para incrementar el valor de estos factores ya que al combinarlos con el factor A tiene efectos negativos, por lo tanto se debe mantener sus valores.

Se dice entonces para reducir los efectos negativos se debería disminuir el contenido de papaína (A), mantener el tiempo de coagulación, e incrementar en mínima proporción el contenido de ficina (B).

Para el análisis de los datos en función del rendimiento que obtuvimos se tomó la misma matriz pero con los valores correspondientes al peso y rendimiento del producto.

Tabla 20 Matriz de diseño para evaluar porcentaje de rendimiento.

No	I	A	B	C	AB	AC	BC	ABC	Peso (g)	% rend
1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	365,6	13,848
2	1	1	-1	-1	-1	-1	1	1	338,7	12,830
3	1	-1	1	-1	-1	1	-1	1	334,9	12,686
4	1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	331,4	12,553
5	1	-1	-1	1	1	-1	-1	1	312,3	11,830
6	1	1	-1	1	-1	1	-1	-1	353,7	13,398
7	1	-1	1	1	-1	-1	1	-1	374,4	14,182
8	1	1	1	1	1	1	1	1	347,5	13,163

Fuente: Autora

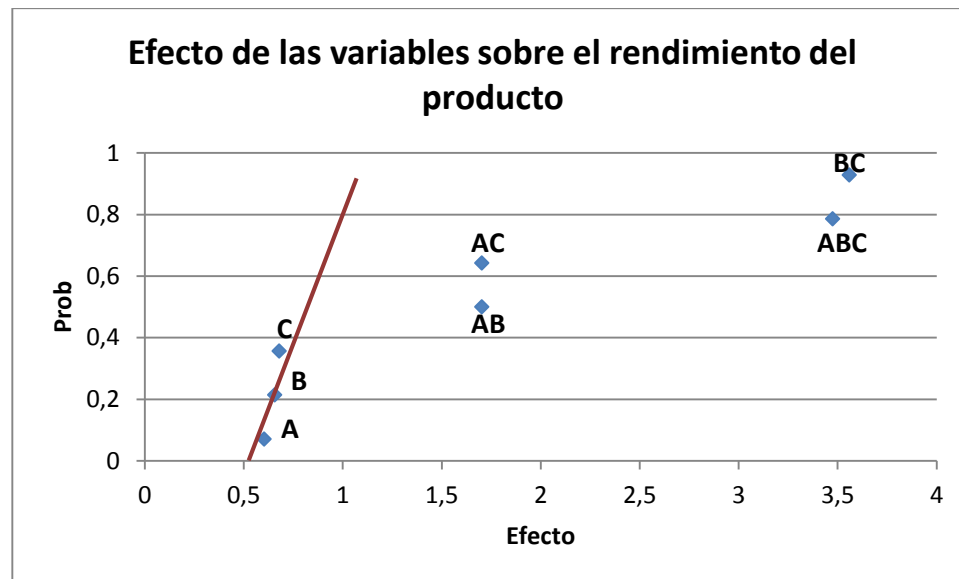


Figura 25: Efecto de las variables y su combinación, sobre el porcentaje de rendimiento del queso

Fuente: Autora

Para el caso del rendimiento las variables que mayor significatividad tienen sobre estas características son las combinaciones binarias de papaína-ficina, papaína-tiempo y ficina-tiempo; la combinación ternaria papaína-ficina-tiempo se descarta.

La combinación de la papaína (A) con la ficina (B) y con el tiempo (C) respectivamente, produce un efecto negativo como lo podemos ver en la tabla 20, esto debido a que al ser la papaína una enzima muy proteolítica, durante un largo tiempo puede desestabilizar al coágulo, produciéndose una gran pérdida de queso en el desuerado, lo mismo va a ocurrir al combinarla con la ficina ya que las dos producirían un efecto sinérgico de coagulación, que podría ser excesivo, desestabilizando de igual manera a la caseína.

En la combinación ficina-tiempo, al igual que en el caso de las características organolépticas producen un efecto positivo en el rendimiento del queso, esto quiere decir que si alargamos el tiempo se tendría un mejor coágulo y por consiguiente mayor rendimiento.

En forma general se puede decir que para obtener mejores resultados se requiere de la disminución de papaína para coagular la leche, manteniendo un tiempo constante e incrementar la ficina.

3.7. Determinación de la vida útil

Como ya se mencionó anteriormente, las características que se tomaron en cuenta para determinar la vida útil del queso elaborado con enzimas vegetales fueron: características fisicoquímicas, características microbiológicas y características organolépticas.

3.7.1. Análisis bromatológicos

Los análisis bromatológicos expresados en la tabla 20 indican que no existe una diferencia significativa en el porcentaje de grasa durante el tiempo de almacenamiento; en el caso del porcentaje de humedad tampoco existe diferencias significativas, pero los datos indican un mínimo incremento en la humedad, esto debido a que las bacterias alteran la lactosa y la transforma en ácido láctico y agua, lo cual produce un incremento del contenido de agua, al final de la vida útil del producto este porcentaje de agua ayuda a la proliferación de bacterias que vuelven al producto no apto para el consumo.

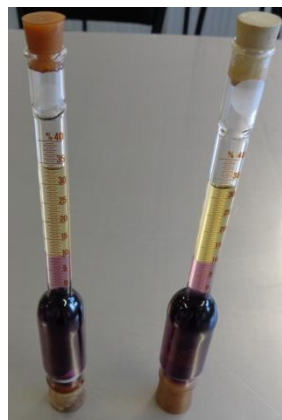


Figura 26: Análisis de grasa en queso

Fuente: Autora

Para el caso de nuestro estudio, el queso elaborado con cuajo quimosina tiene un mayor tiempo de vida útil que el queso elaborado con papaína-figina, ya que el porcentaje de agua que incrementa dicho queso es mucho menor y prácticamente no hay diferencia significativa, lo cual nos da una idea de que el queso puede durar mucho más tiempo en estante.

Tabla 21: Análisis bromatológicos

Semana	Quimosina	Papaína-ficina	Quimosina	Papaína-ficina
	Grasa %		Humedad %	
1	24	23	55.52	56.91
2	24	23	55.89	57.12
3	24	22.5	55.99	57.36
4	23.5	22.5	56.16	58.14

Fuente: Autora

3.7.2. Análisis microbiológicos

Las características microbiológicas son las más comúnmente utilizadas para determinar el tiempo de vida útil en quesos, al tener colonias de bacterias superiores a la normas el producto habrá terminado su vida útil.

Los quesos estudiados muestran que durante el tiempo de almacenamiento se mantiene las dos primeras semanas con diferencias no significativas, pero para las siguientes semanas, hay un incremento en las cepas bacterianas y en la última semana de almacenamiento están ya al límite de la norma, por lo cual el producto no podrá continuar en estante.

Tabla 22: Análisis microbiológicos del queso comercial durante cuatro semanas

Semana	Queso elaborado con cuajo quimosina				
	Enterobacteriac eas, UFC/g	Escherich ia coli, UFC/g	Staphylococc us aureus UFC/g	Listeria monocytoge nes /25 g	Salmonel la en 25g
1	32×10^1	-	20×10^1	Ausencia	Ausencia
2	46×10^1	-	21×10^1		
3	18×10^3	-	13×10^2		
4	13×10^4	-	15×10^3	Ausencia	Ausencia

Fuente: Autora

Tabla 23: Análisis microbiológico del queso con enzimas vegetales durante cuatro semanas

Seman a	Queso elaborado con papaína - ficina				
	Enterobacteriac eas, UFC/g	Escherich ia coli, UFC/g	Staphylococc us aureus UFC/g	Listeria monocytoge nes /25 g	Salmonel la en 25g
1	31×10^1	-	18×10^1	Ausencia	Ausencia
2	37×10^1	-	22×10^1		
3	26×10^2	-	41×10^1		
4	28×10^3	-	63×10^2	Ausencia	Ausencia

Fuente: Autora

Al comparar el queso elaborado con quimosina vs el elaborado con papaína-ficina, existe un recuento mayor de bacterias en queso elaborado con cuajo quimosina, lo cual indica que en lo que se refiere a características microbiológicas el queso elaborado con enzimas vegetales tiene mayor tiempo de vida útil; se dice entonces que la adición de enzimas vegetales al queso influyen de manera positiva en los resultados microbiológicos, porque al parecer el incremento de péptidos de sabor amargos en el producto a inhibido la velocidad de desarrollo de las bacterias.

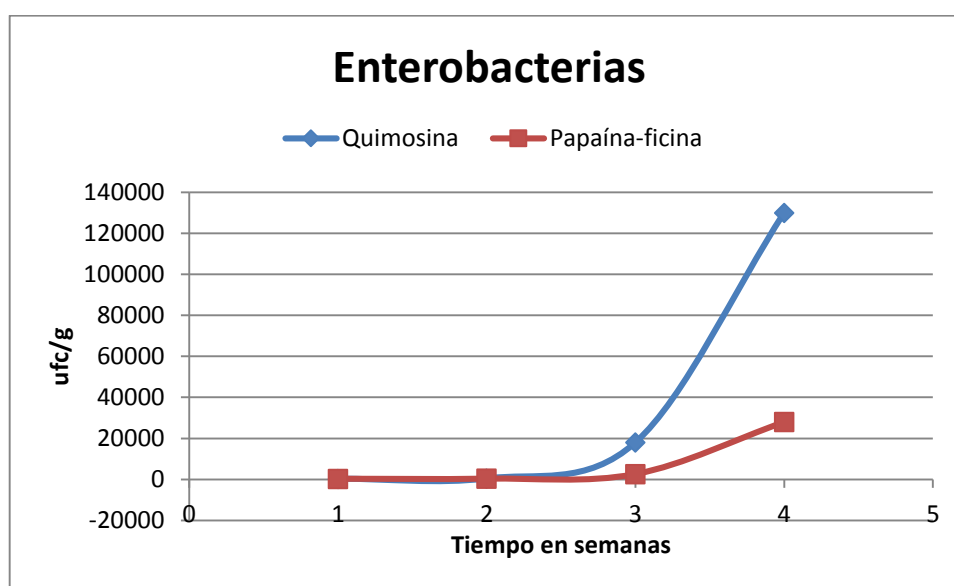


Figura 27: Crecimiento de Enterobacterias en queso con quimosina vs papaína-ficina
Fuente: Autora

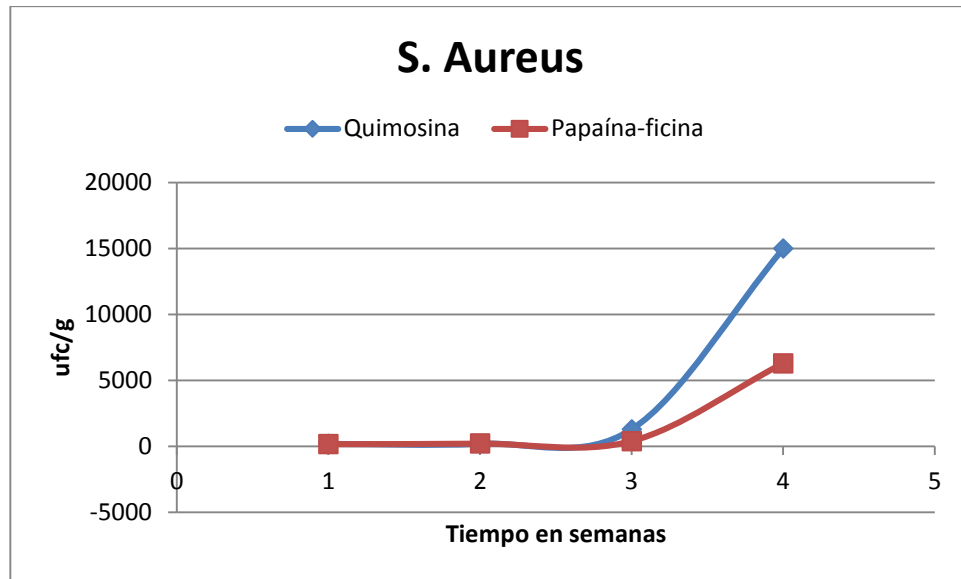


Figura 28: Crecimiento de *S. Áureas* en queso con quimosina vs papaína-ficina
Fuente: Autora

3.7.3. Análisis sensoriales

Los análisis sensoriales son también una característica importante en la determinación de la vida útil de un producto, esta nos ayuda a conocer hasta que tiempo el consumidor aceptará el producto con sus características organolépticas (color, olor, sabor y textura).



Figura 29: Evaluación sensorial del queso por catadores de laboratorio.
Fuente: Autora

Los análisis organolépticos que se realizaron al productos indican que el queso elaborado con cuajo quimosina tiene un tiempo de vida mayor que el queso hecho con la mezcla de enzimas papaína-ficina. Esto debido a que con el pasar del tiempo en el queso elaborado con enzimas vegetales aparece un regusto amargo, producido por la hidrólisis de proteínas en péptidos de sabor amargo, ocasionado por las enzimas vegetales utilizadas para la coagulación de la leche.

En las gráficas que a continuación se muestran podemos observar como baja el nivel de aceptación durante el tiempo de almacenamiento, llegando a ser prácticamente indeseable para el consumidor.

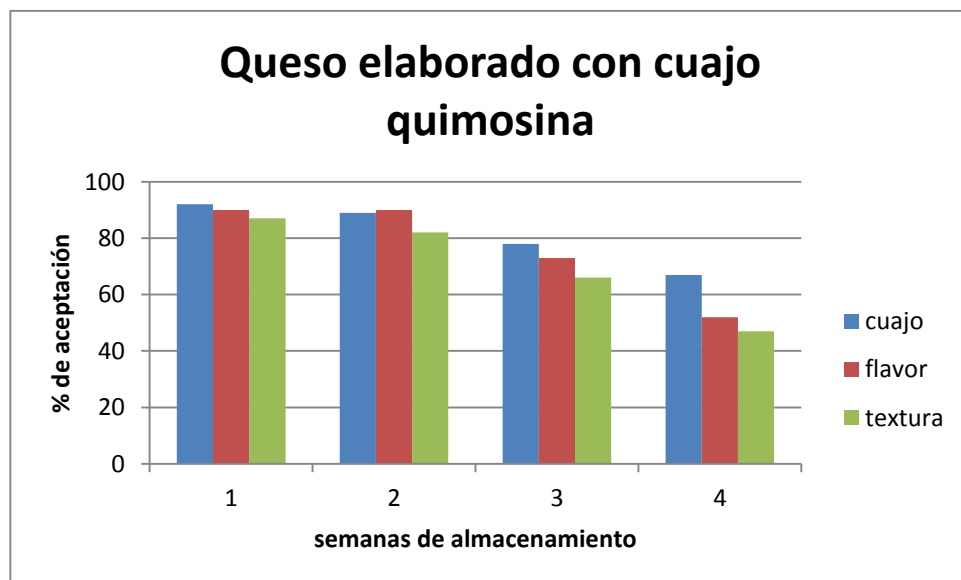


Figura 30: Nivel de aceptación en función del tiempo de almacenamiento para el queso elaborado con quimosina

Fuente: Autora

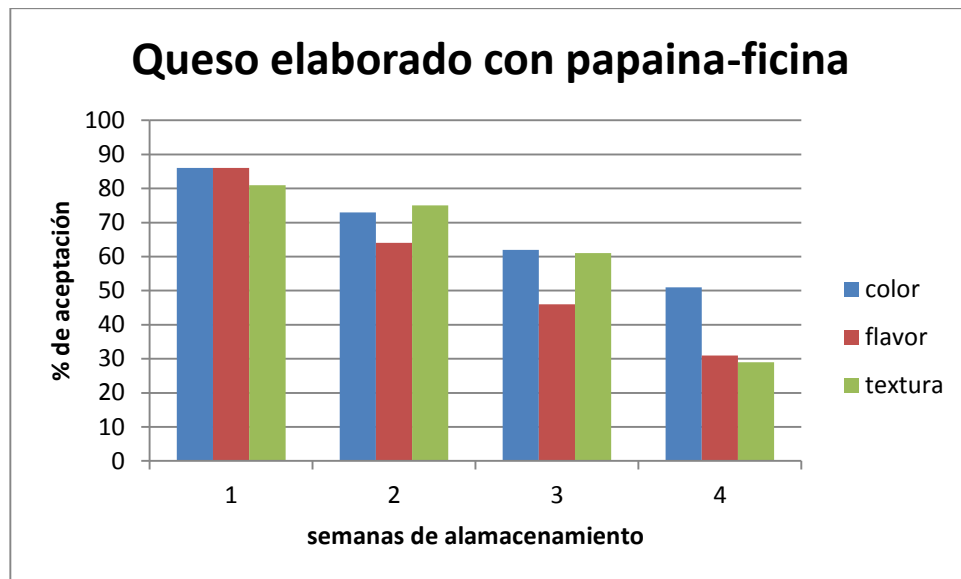


Figura 31: Nivel de aceptación en función del tiempo de almacenamiento para el queso elaborado con papaína-ficina

Fuente: Autora

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Conclusiones:

Después de realizado el trabajo investigativo para evaluar la factibilidad de utilizar enzimas vegetales en la elaboración del queso tipo fresco, se ha llegado a las siguientes conclusiones:

- Las enzimas vegetales que incluyen a la papaína y ficina son altamente proteolíticas, y no son específicas para ciertas proteínas; más bien pueden ser utilizadas en distintos tipos de éstas, que incluyen a la caseína.
- Al analizar las enzimas utilizadas en este trabajo, se determinó que aunque existe mayor rendimiento en el porcentaje de extracción por parte de la papaína, la ficina es mucho más proteolítica, ya que requiere de menor tiempo para coagular la misma cantidad de leche.
- Estas enzimas al ser adicionadas a la leche en cantidades elevadas producen una proteólisis acelerada que da como resultado cadenas de péptidos de sabor amargo, esto debido a que la caseína no ha sido hidrolizada en el enlace 105-106, sino desde la parte exterior de la cadena proteica.
- Se ha podido comprobar la factibilidad de utilizar enzimas vegetales en la elaboración de queso, ya que éste adquiere características organolépticas especiales al inicio de su vida útil, que son apreciadas por el consumidor; siempre y cuando se tome muy en cuenta la cantidad adicionada para evitar características indeseables.
- Al evaluar las características físico-químicas en el queso elaborado con cuajo comercial y el que fue elaborado con enzimas vegetales se pudo observar que no existe mayor diferencias, los dos cuentan con una vida útil muy parecida, es decir que las enzimas que se utilizaron como sustituto del cuajo no influyen de ninguna manera sobre las características bromatológicas.

- Los análisis microbiológicos realizados durante el tiempo de almacenamiento para determinar la vida útil del queso muestran que la mezcla de enzimas papaína-figina influyen de manera positiva, ya que de alguna manera evitan el crecimiento acelerado de las bacterias; alargando así su vida útil en función de sus características microbiológicas.
- En lo que se refiere a las características organolépticas del queso, el producto adquiere características propias como cremosidad que son apreciadas por el consumidor, es decir que al inicio de su vida útil no existe desventaja para el queso elaborado con enzimas vegetales comparado con el queso elaborado con cuajo comercial. Sin embargo al final de la vida útil el queso con enzimas vegetales van disminuyendo de manera más acelerada las características organolépticas que el queso comercial, debido al regusto amargo por la presencia de péptidos, generados por la hidrólisis de las proteínas por parte de las enzimas vegetales; teniendo de esta manera menor aceptación que el queso elaborado con cuajo comercial al final de su vida útil.
- En general se puede decir que la elaboración de queso sustituyendo el cuajo comercial es factible, ya que no presenta alteraciones indeseables al inicio de su vida útil; en función de sus características fisicoquímicas y microbiológicas, presenta mejores resultados que un queso elaborado con cuajo comercial, aunque sus características organolépticas podrían interferir en la aceptación del consumidor ya que al final de su vida en estante aparecen sabores que no son apreciados por el consumidor, disminuyendo así su vida frente al queso tipo fresco.

Recomendaciones:

- Se sugiere la sustitución parcial del cuajo comercial por enzimas vegetales, con el propósito de evitar la aparición de regustos amargos por la adición elevada de enzimas vegetales, incrementando su vida útil en función de sus características organolépticas y al mismo tiempo dándole diferenciación del resto de productos existentes en el mercado.
- Se requiere una investigación a profundidad para conocer cuáles son los compuestos producidos por la presencia de enzimas vegetales, que están evitando la proliferación de microorganismos, ayudando así a alargar la vida útil de los productos lácteos.

BIBLIOGRAFIA

- ALTECSA. (2010.). *Coagulantes en la industria lactea*. Obtenido de <http://www.altecsa.com.mx/>
- ÁLVARO, T., Uzcátegui, E., & Muñoz, R. (2002.). Investigación de una proteasa aislada de babaco Carica pentagona H. 57. Politécnica.
- ARGENBIO. (2014). *PQBio Porqué Biotecnología. Programa educativo de Argentina*. Recuperado el 5 de Octubre de 2014, de Consejo Argentino para la Informacion y el Desarrollo de la Biotecnología: <http://porquebiotecnologia.com.ar/index.php?action=cuaderno&opt=5&tipo=1¬e=30>
- ARGULLO, E., & Carro, J. (1 de Septiembre. de 2011.). Bromatología de la leche. La Plata., Argentina.
- BADUI Dergal, S. (2006.). *Quimica de los Alimentos*. (Cuarta Edición, 2006 ed.). Mexico., Mexico: Pearson Educación de Mexico, S.A. de C.V.
- BATTANER Árias, E. (2013.). *Compendio de enzimologia*. Salamanca.: Ediciones Universidad de Salamanca.
- BOURNE, M. (2002.). *Food Texture and Viscosity: Concept and Measurement*.(Vol. 2da Edición.). San Diego.: Academic Press. San Diego California.
- BRENDA. (2014). *The Comprehensive Enzyme Information System*. Recuperado el 23 de Agosto de 2014, de Technische Universität Braunschweig: http://www.brenda-enzymes.info/all_enzymes.php
- BRODY, A. (2003.). Predicting Packaged Food Shelf Life. *Food Technology*. , 100-102.
- CABALLERO, J., Blanco, J., & Moyano, E. (2008.). *Cromatografía de filtración en gel*. Recuperado el 28 de Enero. de 2008., de Universidad de Córdoba España.: <http://www.uco.es/organiza/departamentos/bioquimica-biol-mol/pdfs>
- CALVO, J. (2003.). *Precipitación por desnaturalización selectiva*. Recuperado el 31. de Enero. de 2008., de Universidad de Buenos Aires.: <http://www.qb.fcen.uba.ar/quimicabiologica/>
- CALVO, M. (2006). *Bioquímica de Alimentos*. (U. d. Zaragoza, Ed.) Recuperado el 18 de Noviembre de 2014, de <http://milksci.unizar.es/bioquimica/temas/TEMA19.html>
- CARRILLO, E., Suarez-Solis, V., & Duquesne, F. (2009.). Queso pasta hilada con bajo contenido de grasa. *Ciencia y Tecnología de Alimentos*. , 69-74.

- CASTAÑEDA, R. (2002.). La reología en la tipificación y la caracterización de quesos. *Tecnología Láctea Latinoamericana.* , 48-53.
- CASTRO, A. C., Novoa, C. F., Algecira, N., & Buitrago, G. (2014.). Reología y textura de quesos bajos en grasa. *RECyT.* , 58-66.
- CENTRO de investigación en biotecnología. (Mayo. de 2007.). Desarrollo del cultivo del higo (ficus carica) para consumo fresco y procesado, como una alternativa de diversificación para el sector agrícola. Costa Rica.
- CHÁVEZ, M. (1990.). Temas de enzimología. *ENPES.*, 2, 25-30, 35-39, 60-63.
- CHR HANSEN. (1 de Febrero de 2008). *Industria Alimenticia* . Recuperado el 5 de 10 de 2014, de <http://www.industriaalimenticia.com/articles/83036-enzimas-coagulantes>
- COOKE, D., Khosrowshahi, A., & Mcsweeney, P. (2013). Effect of gum tragacanth on the rheological and functional properties of full-fat and half-fat Cheddar cheese. *Dairy Science & Technology.* , 45-62.
- DESJARDINS, P., Hansen, J. B., & Allen, M. (11. de 4. de 2009.). *Concentración de proteínas microvolumen Determinación mediante el NanoDrop 2000c Espectrofotómetro.* Obtenido de <http://www.jove.com/video/1610/concentracin-de-protenas-microvolumen-determinacin-mediante-el?language=Spanish>
- DUBIN, A., Mak, P., Dubin, G., Rzychon, M., Stec, J., Wladyca, B., y otros. (2005). New Generation of peptide antibiotics. Polonia.
- EVERETT, D., & Auty, M. (2008.). Cheese structure and current methods of analysis. *International Dairy Journal.* , 759-73.
- FERNÁNDEZ Sevilla, J. M. (17. de febrero. de 2005.). *Estructura y función de proteínas.* Recuperado el 3. de diciembre. de 2014., de <http://www.itescham.com/Syllabus/Doctos/r637.PDF>
- FOEGEDING, E., & Drake, M. (2007.). Sensory and mechanical properties of cheese texture. *Journal of Dairy Science.* , 1611-1624.
- GREGORY III, J. (2010). Química de los alimentos. En K. P. S. Damodaran (Ed.). Zaragoza., España.: Acribia.
- GRUPO latino editores. (2008.). *Ciencia Tecnologia e Industria de los Alimentos.* Colombia.
- GUINEE, T., & Kilcawley, K. (2004). Cheese as an ingredient. *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology.*, Volumen 2, 395-428.

- GUTIÉRREZ, M., Geraldine, S., Velásquez, S., Virginia, E., & Ferre, J. (2009). Determinación del efecto de la maduración de la lechosa (*Carica Papaya L*) sobre la concentración de papaína . Maracaibo, Venezuela .
- HOUGH, G., & Fiszman, S. (2005.). Estimación de la vida útil sensorial de los alimentos. 111. Madrid., España.: Programa CYTED.
- IBARLUCEA, I., & López, G. (9. de Diciembre. de 2008.). *The Industrial Enzimologist*. Recuperado el 5. de Octubre. de 2014., de <http://theindustrialenzymologist.blogspot.com/2008/11/enzimas-del-cuajo-para-la-produccion-de.html>
- INEN 0009. (2012). *Instituto Ecuatoriano de Normalización*. Obtenido de <http://www.normalizacion.gob.ec/>
- INEN 1528. (3 de 2012). *Instituto Ecuatoriano de Normalización*. Obtenido de <http://www.normalizacion.gob.ec/>
- INSTITUTO politécnico nacional. (2006). Determinación de Enzimas proteolíticas en higo. 1.
- KEATING, P., & Rodríguez, H. (2008.). *Introducción a la lactología*. (Segunda edición ed.). México.: Editorial Limusa.
- KOCA, N., & Metin, M. (2004). Textural, melting and sensory pro-perties of low-fat fresh kashar cheeses produced by using fat replacers. *International Dairy Journal*. , 365-73.
- KONUKLAR, G., Ingleta, G., Warnerb, K., & Carriere, C. (2004). Use of a b-glucan hydrocolloidal suspension in the manufactu-re of low-fat Cheddar cheeses: textural properties by instrumental methods and sensory panels. *Food Hy-drocolloids*. , 535-45.
- LASHKARI, H., Khosrowshahi, A., Madadlou, A., & Alizadeh, M. (2012). Chemical composition and rheology of low-fat Ira-nian white cheese incorporated with guar gum and gum arabic as fat replacers. *Journal of Food Science and Technology*. , 1-8.
- LUPANO, C. E. (2013). *Universidad Nacional de La Plata*. (EduLP, Ed.) Recuperado el 2 de 8 de 2015, de <http://www.biol.unlp.edu.ar/nutricionybromatologiaF/ModificacionesComponentes.pdf>
- MEDINA, M. (2005.). *Técnicas cromatográficas de uso general para la separación de mezclas proteicas*. Recuperado el 30. de Enero. de 2008., de Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular, Universidad de Zaragoza, España.: http://www.unizar.es/departamentos/bioquimica_biologia/docencia/FMBvirtual/PurProt/Croma.htm

- MÉNDEZ Montealvo, M. G., Núñez Santiago, M. C., & Solorza Feria, J. (2010.). *Introducción a la reología*. México.: Instituto Politécnico Nacional.
- O'CALLAGHAN, D., & Guinee, T. (2004.). *Rheology and Texture of Cheese. Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology., Volumen 1*, 511-40.
- OBREGÓN, W. D. (2008.). Hidrolasas de látex de especies del género araujia. Purificación y caracterización de las enzimas proteolíticas.
- RAMÍREZA López, C., & Vélez Ruiz, J. (2012.). Quesos frescos: propiedades, métodos de determinación y factores que afectan su calidad. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos.* , 131-148.
- RESTREPO Ángel, A. F., & Montoya Gómez, C. A. (2010.). Implementación y diseño de procedimiento para determinación de vida útil de queso fresco, chorizos fresco y aguas en bolsa. Pereira.
- ROMEIH, E. A., Michaelidou, A., Biliaderis, C. G., & Zerfiridis, G. K. (2002). Low-fat white-brined cheese made from bovine milk and two commercial fat mimetics: chemical, physical and sensory attributes. *International Dairy Journal.* , 525-40.
- ROUDOT, A.-C. (2004.). *Reología y análisis de la textura de los alimentos*. España.: Editorial Acribia S.A.
- SEGURA-Campos, M., Chel-Guerrero, L., & Betancur-Ancona, D. (2013). Bioactividad de péptidos derivados de proteínas alimentarias . Yucatan, México.
- SINCHE Serra, M. V. (Junio. de 2009.). Aislamiento, purificación parcial y caracterización cinética de las proteasas presentes en el látex de los frutos de una planta del género Vasconsella. Quito., Pichincha., Ecuador.
- STEFF, J. (1996). *Rheological Methods in Food Process Engineering.*(Vol. Segunda Edición.). Michigan: Freeman Press,.
- TABILO Munizaga, G., & Cánovas-Barbosa. (2005). Rheology for food industry. *Journal of Food Engineering.* , 147-156.
- TÉLLEZ, G., & Castaño, J. (2010). Péptidos antimicrobianos.
- TETRA PAK PROCESSING SYSTEMS AB. (2003). *Manual de industrias lacteas.* (E. A. Madrid Vicente, Ed.) Madrid, España: Iragra, S.A. Madrid.
- TUNICK, M. (2000). Rheology of dairy foods that gel, stretch, and fracture. *Journal of Dairy Science* .
- TUNICK, M., Mackey, K., Shieh, J., Smith, P., Cooke, P., & Malin, E. (1993). Rheology and Microstructure of Low-Fat Mozza-rella Cheese. *Int Dairy Journal.* , 649-62.

VALENCIA García, F., Millán Cardona, L. D., & Jaramillo Garcés, Y. (2008.). Estimación de la vida útil fisicoquímica, sensorial e instrumental de queso crema bajo en calorías. *Revista Lasallista de Investigación.*, 5 (1), 28-33.

VAN VLIET, T., Van Dijk, H., Zoon, P., & Walstra, P. (1991.). Relation between syneresis and rheological properties of particle gels. *Colloid & Polymer Science.* , 620-7.

VÉLEZ-Ruiz, J., & Barbosa-Cánovas. (1997.). Rheological properties of selected dairy products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition.* , 311-359.

WALSTRA, P. (2001.). *Ciencia de la leche y tecnología de los productos lácteos*. Zaragoza.: Acribia S.A.

ANEXOS

Anexos 1: Ficha de cata para queso**CARACTERÍSTICAS SENSORIALES PARA QUESO FRESCO ELABORADO
CON COAGULANTES VEGETALES (PAPAÍNA – FICINA)**

Número de ficha: _____ Fecha: _____ Experimento N° _____

Sírvese degustar las muestras de queso e indique el grado de intensidad de cada factor, según la nomenclatura que se indica a continuación.

Nomenclatura	
MA	Muy alto
A	Alto
N	Normal
P	Poco
MP	Muy poco

Análisis y calificación sensorial

ASPECTO VISUAL						
Factor	MA	A	N	P	MP	Observaciones
Color						
Apariencia						
Homogeneidad						
ASPECTO TÁCTIL						
Factor	MA	A	N	P	MP	Observaciones
Rugosidad						
Elasticidad						
Humedad						
ASPECTO OLFATIVO						
Factor	MA	A	N	P	MP	Observaciones
Láctico						
Vegetal						
Acido						
ASPECTO GUSTATIVO						
Factor	MA	A	N	P	MP	Observaciones
Salado						
Amargo						
Acidez						
Cremoso						
Dureza						
Fundibilidad						
Masticabilidad						
Rigidez						
Elasticidad						
CALIFICACIÓN GENERAL PARA EL QUESO						
Factor	MA	A	N	P	MP	Observaciones
Le gusto						

TOTAL CARACTERÍSTICAS SENSORIALES: _____ /180

Anexos 2: Resultados obtenidos en la catación de quesos

Parámetro	CAL MAX	CALIFICACIÓN TABLA							
		1 - 12120	2 - 18120	3 - 12180	4 - 18180	5 - 12121	6 - 18121	7 - 12181	8 - 18181
Color	10	8,89	8,67	8,67	8,00	9,33	8,89	9,33	9,11
Apariencia	10	7,56	8,44	8,44	8,44	8,44	8,22	8,00	8,22
Homogeneidad	10	6,67	8,44	8,22	7,78	8,44	8,44	8,89	8,22
Rugosidad	10	7,78	8,00	7,78	7,33	8,22	7,78	8,44	8,22
Elasticidad	10	7,11	6,89	7,78	6,89	6,67	6,44	8,22	7,33
Humedad	10	6,89	6,22	6,89	6,44	6,67	7,33	7,78	6,44
Olor láctico	10	7,56	7,11	6,22	6,89	6,89	6,67	7,78	6,00
Olor a vegetal	10	8,22	6,67	6,22	6,22	6,22	6,44	6,22	6,00
Olor ácido	10	7,56	6,89	8,00	7,33	7,11	7,56	8,22	7,11
Salado	10	6,44	5,78	7,11	5,56	5,78	7,11	6,67	6,67
Amargo	10	6,00	5,56	6,00	4,89	6,00	5,33	5,56	5,11
Ácido	10	6,44	7,33	5,78	7,56	6,67	5,78	6,67	6,67
Dureza	10	6,67	6,00	5,33	5,33	5,78	5,56	6,22	5,33
Fundibilidad	10	6,67	7,33	6,89	6,22	5,56	7,33	5,78	7,11
Masticabilidad	10	5,56	6,22	6,00	5,78	4,67	5,56	5,56	5,56
Cremoso	10	7,56	7,56	7,33	7,33	6,67	7,56	7,56	8,00
Elasticidad	10	7,11	5,78	7,11	6,00	6,22	6,44	7,11	6,67
Rigidez	10	6,00	5,56	5,78	4,89	5,11	5,11	5,11	5,56
TOTAL	180	150,7	146,2	147,1	140,0	142,2	145,6	152,2	146,2

Anexos 3: Datos de curvas - efectos de las variables –

EFECTO DE LAS VARIABLES SOBRE LAS CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS		
FACTOR	COEF.	PROB
C	0,13375	0,07142857
B	0,20125	0,21428571
ABC	0,28875	0,35714286
AC	0,58875	0,5
AB	0,85375	0,64285714
A	0,97625	0,78571429
BC	1,12125	0,92857143

EFECTO DE LAS VARIABLES SOBRE EL RENDIMIENTO DEL PRODUCTO		
FACTOR	COEF	PROB
A	0,60227273	0,07142857
C	0,65530303	0,21428571
B	0,6780303	0,35714286
AB	1,70075758	0,5
AC	1,70075758	0,64285714
ABC	3,47348485	0,78571429
BC	3,55681818	0,92857143