



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS
CARRERA DE INGENIERÍA EN INDUSTRIAS PECUARIAS

“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE ENZIMAS PROTEOLÍTICAS MEDIANTE SU APLICACIÓN EN LA INDUSTRIA QUESERA”

Trabajo de Titulación

Tipo: Trabajo Experimental

Presentado para optar el grado académico de:

INGENIERA EN INDUSTRIAS PECUARIAS

AUTORA: JOSSELIN GABRIELA BERMEO BERRONES

DIRECTOR: Ing. Iván Patricio Salgado Tello MSc.

RIOBAMBA-ECUADOR

2020

©2020, Josselin Gabriela Bermeo Berrones

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procesamiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento, siempre y cuando se reconozca el Derecho de Autor.

Yo, Josselin Gabriela Bermeo Berrones, declaro que el presente trabajo de titulación es de mi autoría y los resultados del mismo son auténticos. Los textos en el documento que provienen de otras fuentes están debidamente citados y referenciados.

Como autora, asumo la responsabilidad legal y académica de los contenidos de este trabajo de titulación. El patrimonio intelectual pertenece a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

Riobamba, 23 de enero del 2020

A handwritten signature in blue ink, appearing to be 'J. Bermeo Berrones', written on a light-colored background.

Josselin Gabriela Bermeo Berrones

060497585-4

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS
CARRERA DE INGENIERÍA EN INDUSTRIAS PECUARIAS

El Tribunal del trabajo de titulación certifica que: El trabajo de investigación: “**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE ENZIMAS PROTEOLÍTICAS MEDIANTE SU APLICACIÓN EN LA INDUSTRIA QUESERA**”, de responsabilidad de la señorita Josselin Gabriela Bermeo Berrones, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros de Tribunal del trabajo de titulación, quedando autorizada su presentación.

	FIRMA	FECHA
Ing. Vayas Machado Enrique César M.Sc PRESIDENTE DEL TRIBUNAL	 _____	2020-01-23
Ing. Salgado Tello Iván Patricio MSc. DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN	 _____	2020-01-23
Ing. Flores Mancheno César Iván. PhD. MIEMBRO DEL TRIBUNAL	 _____	2020-01-23

DEDICATORIA

Al finalizar el presente trabajo de titulación quiero utilizar este medio para dedicar y agradecer principalmente a mi Dios Todo Poderoso por llegar a mi vida por darme fuerzas para continuar en este proceso. A mis Padres Jesús y María pues son quienes me han ofrecido su ayuda para que se concrete con éxito la finalización de mis estudios, por su amor, paciencia, trabajo y esfuerzo que realizan cada día para sacarnos adelante, gracias a ustedes he logrado llegar hasta aquí y convertirme en lo que soy.

A mi hermano Roberto con su partida me enseñó a valorar cada cosa por más pequeña, sea buena o mala a apreciar la vida de otra manera, formar mi carácter.

A mis demás hermanos Tito, Oscar, Josué, Marcos, Helen, Jazmín por su cariño y enojos son mi inspiración.

A ti mi Nathanael por llegar a mi vida, porque casi te vas y por regresar de nuevo por su amor, paciencia, apoyo e inspiración en los últimos semestres de mi carrera y gracias por el apoyo en la realización de este trabajo.

Al ser más chiquito y hermoso que viene en camino serás mi fuerza mi debilidad e inspiración en mi vida, aun no te conozco y desde ya TE AMO tanto.

A Inés Elena por su gran amistad, hermandad y buenos consejos. A mis compañeras y amigas Marlluri, Lourdes, Patricia y Adelita.

A todos ustedes, con mucho amor

Josselin Bermeo

TABLA DE CONTENIDO

ÍNDICE DE TABLAS.....	ix
ÍNDICE DE GRÁFICOS.....	x
ÍNDICE DE ANEXOS.....	xi
RESUMEN	1
ABSTRACT.....	2
INTRODUCCIÓN.....	3
CAPITULO I	
1. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL.....	5
1.1. Enzimas.....	5
1.2. Especificidad de las enzimas.....	5
1.3. Clasificación de las enzimas.....	6
1.4. Factores que influyen en las enzimas.....	7
1.4.1. <i>Efecto del pH</i>	7
1.4.2. <i>Efecto de la temperatura</i>	7
1.4.3. <i>Efecto acuoso</i>	8
1.4.4. <i>Efecto de los metales pesados</i>	8
2. CINÉTICA ENZIMÁTICA.....	8
2.1. Factores que afectan a velocidad de reacción.....	9
2.1.1. <i>Influencia de la temperatura</i>	9
2.1.2. <i>Influencia del pH</i>	9
2.1.3. <i>Concentración</i> <i>enzimática</i>	10
2.1.4. <i>Concentración de</i> <i>sustrato</i>	11
2.1.5. <i>Influencia de la actividad del</i> <i>agua</i>	11
3. LA CINÉTICA DE MICHAELIS MENTEN.....	11
4. APLICACIONES DE LAS ENZIMAS PROTEOLITICAS.....	13

5.	ENZIMAS VEGETALES.....	14
5.1.	<i>La papaína.....</i>	<i>14</i>
5.1.2.	<i>Propiedades Físicas de la Papaína.....</i>	<i>15</i>
5.2.	La bromelina.....	16
5.3.	La ficina.....	17
6.	PROCESO DE COAGULACIÓN EN LA LECHE.....	18
6.2.	Tipos de coagulantes.....	19
6.2.1.	<i>Coagulante animal.....</i>	<i>19</i>
6.2.2.	<i>Coagulante microbiano.....</i>	<i>19</i>
6.2.3.	<i>Coagulante de origen vegetal.....</i>	<i>20</i>
7.	QUESO.....	20
7.1.	<i>Tipos de quesos existentes en el Ecuador.....</i>	<i>20</i>
8.	CUAJO VEGETAL.....	21
8.1.	<i>Función del cuajo vegetal.....</i>	<i>21</i>
8.2.	Obtención del cuajo vegetal.....	21
8.3.	Ventajas de uso del cuajo vegetal.....	22
CAPITULO II		
2.	MARCO METODOLÓGICO.....	23
2.1.	Localización y duración del experimento.....	23
2.2.	Unidades experimentales.....	23
2.3.	Materiales, equipos e instalacion.....	23
2.4.	Tratamientos y diseño experimental.....	26
2.5.	Mediciones experimentales.....	27
2.6.	Análisis estadístico y prueba de significancia.....	28
2.8.	Procedimiento experimental.....	29
2.8.1.	Elaboración del queso fresco.....	30
2.9.	Metodología de la evaluación.....	32
2.9.1.	<i>Caracterización físico-química de los tres tipos de frutas.....</i>	<i>32</i>
2.9.1.1.	<i>pH.....</i>	<i>32</i>
2.9.1.2.	<i>Sólidos Solubles (° Brix).....</i>	<i>32</i>
2.9.2.	<i>Extracción del látex de las frutas.....</i>	<i>33</i>
2.9.2.1.	<i>Obtención del látex de higo y papaya.....</i>	<i>33</i>

2.9.3.	<i>Procesamiento del látex</i>	33
2.9.4.	<i>Evaluación de las enzimas</i>	34
2.9.5.	<i>Cantidad de proteína formada por unidad de tiempo</i>	35
2.9.6.	<i>Cantidad de enzima necesaria a utilizar por medio</i>	35
2.9.7.	<i>Características físico-químico del medio luego de aplicado la enzima</i>	36

CAPITULO III

3.	MARCO DE RESUSTADOS, DISCUSIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADO	42
3.1.	Análisis físico químico de los tres tipos de frutas	42
3.1.1.	<i>Sólidos solubles (SST)</i>	42
3.1.2.	<i>pH</i>	42
3.2.	Análisis del rendimiento del látex de la fruta y la enzima	43
3.2.1.	<i>Rendimiento del látex de la fruta (%)</i>	43
3.2.2.	<i>Rendimiento de la enzima</i>	43
3.3.	Análisis de la actividad enzimática	44
3.4.	Análisis de los tiempos de coagulación	45
3.5.	Análisis de la fuerza de coagulación de la papaína, bromelina y ficina	45
3.6.	Análisis de las características físico químicas del queso fresco comercial y queso fresco utilizando ficina	46
3.6.1.	<i>Análisis de Proteína</i>	46
3.6.2.	<i>Análisis del pH</i>	47
3.6.3.	<i>Análisis de aw</i>	48
3.6.4.	<i>Análisis del porcentaje de humedad</i>	49
3.8.	Análisis microbiológico	50
	CONCLUSIONES	51
	RECOMENDACIONES	52
	BIBLIOGRAFÍA	
	ANEXOS	

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-1.	Composición química de la bromelina	17
Tabla 2-1.	Características de las dos formas más habituales de coagulación de la leche.	18
Tabla 3-2.	Esquema del experimento de los tres tipos de fruta.....	26
Tabla 4-2.	Esquema del experimento de la evaluación enzimática.....	27
Tabla 5-2.	Esquema del T-student para la evaluación del queso fresco.....	27
Tabla 6-2.	Esquema del experimento para la fruta.....	29
Tabla 7-2.	Esquema del experimento para la evaluación enzimática.....	29
Tabla 8-2.	Esquema del experimento para la evaluación del queso.....	29
Tabla 9-2.	Requisitos microbiológicos para queso fresco no madurado.....	40
Tabla 10-2.	Condiciones de incubación de acuerdo a los microorganismos.....	41
Tabla 11-3.	Análisis físico químicas de los tres tipos de frutas	42
Tabla 12-3.	Análisis de la obtención de las tres enzimas proteolíticas.	43
Tabla 13-3.	Análisis de la actividad enzimática de las tres enzimas proteolíticas.	44
Tabla 14-3.	Análisis de los tiempos de coagulación de los tres tipos de enzimas.	45
Tabla 15-3.	Análisis de la fuerza de coagulación de los tres tipos de enzimas.	46
Tabla 16-3.	Análisis de las características físico químicas del queso	47
Tabla 17-3.	Análisis de las características físico químicas del	48
Tabla 18-3.	Análisis de las características físico químicas del	48
Tabla 19-3.	Análisis de las características físico químicas del queso	49
Tabla 20-3.	Análisis microbiológico de una muestra de queso fresco comercial	50
Tabla 21-3.	Análisis microbiológico de una muestra de queso fresco utilizando la enzima ficina.....	50

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1-1.	Curva esquemática temperatura-actividad.....	9
Gráfico 2-1.	Curva esquemática de velocidad de.....	10
Gráfico 3-1.	Velocidad de reacción en función de la	10
Gráfico 4-1.	Velocidad de hidrolisis de la sacarosa por la invertasa.....	11
Gráfico 5-1.	Cinética enzimática.....	13
Gráfico 6-2.	Diagrama de flujo de la elaboración del queso fresco	30
Gráfico 7-3.	Análisis sensorial de preferencia: muestra 200 (queso comercial), muestra 250 (queso fresco utilizando la enzima ficina.	49

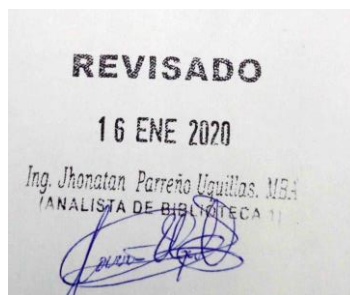
ÍNDICE DE ANEXOS

- Anexo A:** Estadística de características físico químicas de los tres tipos de frutas.
- Anexo B:** Estadística de obtención de las tres enzimas
- Anexo C:** Estadística de la actividad enzimática
- Anexo D:** Estadística de los tiempos de coagulación.
- Anexo E:** Estadística de la fuerza de coagulación
- Anexo F:** Estadística de las características físicas químicas luego de aplicado la enzima
Ficina comparado con la enzima Renina
- Anexo G.** Estadística de las características físicas químicas del queso con ficina comparado
con el queso con renina
- Anexo H:** Prueba de preferencia pareada

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue obtener tres enzimas proteolíticas a partir de la papaya (*Carica-papaya*), piña (*Annanas-cosmosus L*) e higo (*Ficus-carica L*), aplicando un diseño completamente al azar y la prueba de Tukey, con 5 repeticiones, con un tamaño de unidad de 5kg encontrándose diferencias altamente significativas obteniendo el látex mediante los siguientes métodos: ruptura mecánica para la piña, cortes longitudinales para la papaya e higo, en la evaluación físico-químicas de las frutas, se reportaron valores de 7,62 Brix y pH 5,48 para la papaya, 12,12 Brix y pH de 2,20 para la piña, 7,24 Brix y pH de 6,48 para el higo, donde el mejor rendimiento fue de 18 g/Kg para la ficina. Mientras que para la actividad enzimática se empleó un diseño completamente al azar con un tamaño de unidad de 0,0375mg de enzima encontrándose diferencias altamente significativa reportándose valores de 15,09 U/mg proteína con un tiempo de coagulación de 61,44seg para la papaína, 15,74 U/mg proteína con un tiempo de 73,92seg para la bromelina y 14,87 U/mg proteína con un tiempo de 58 segundos para la ficina, concluyendo que la última es mejor presentando una velocidad enzimática y tiempo de coagulación eficaces. Para los análisis comparativos realizados al queso elaborado con la mejor enzima y el queso comercial se utilizó la prueba T-student, con tamaño de unidad de 4 Litros con 5 repeticiones donde en el análisis físico-químico se obtuvo valores similares en % de humedad, Aw, pH a excepción de la proteína que existe una diferencia de 8,86%. No se reportó presencia de microorganismos patógenos en el análisis microbiológico. En el análisis sensorial se utilizó la prueba de preferencia pareada donde el 100% de catadores prefirió el queso fresco comercial. Se recomienda realizar una purificación enzimática para mejorar el contenido de proteína.

Palabras claves: <TECNOLOGÍA Y CIENCIAS AGROPECUARIAS>, <ENZIMA (PROTEÍNA)>, <ENZIMAS PROTEOLÍTICAS>, <ACTIVIDAD ENZIMÁTICA>, <FUERZA DE COAGULACIÓN>, <TIEMPOS DE COAGULACIÓN>.



ABSTRACT

The objective of this research work was to obtain three proteolytic enzymes from papaya (*Carica-papaya*), pineapple (*Annanas-cosinosus* L) and fig (*Ficus-carica* L), applying a completely random design and the Tukey test, with 5 repetitions, with a unit size of 5kg finding highly significant differences obtaining the latex by the following methods: mechanical rupture for pineapple, longitudinal cuts for papaya and fig, in the physicochemical evaluation of fruits, values of 7.62 Brix were reported and pH 5.48 for papaya, 12.12 Brix and pH of 2.20 for pineapple. 7.24 Brix and pH of 6.48 for the fig, where the best yield was 18 g / Kg for ficin While for the enzymatic activity a completely randomized design with a unit size of 0.0375mg of enzyme was used finding highly significant differences Reporting values of 15.09 U / mg protein with a coagulation time of 61.44sec for papain. 15.74 U / mg protein with a time of 73.92sec for bromelain and 14.87 U / mg protein with a time of 58 seconds for ficin, concluding that the latter is better presenting an effective enzymatic speed and coagulation time. For the comparative analyzes carried out on the cheese made with the best enzyme and the commercial cheese, the T-student test was used, with a unit size of 4 liters with 5 repetitions where in the physicochemical analysis similar values were obtained in percentage of humidity, Aw, pH except for the protein that there is a difference of 8.86%. No presence of pathogenic microorganisms was reported in my biological analysis. In the sensory analysis, the paired preference test was used where 100% of tasters preferred commercial fresh cheese. Enzymatic purification is recommended to improve the protein content.

Keywords: <AGRICULTURAL TECHNOLOGY AND SCIENCES>, <ENZYME (PROTEIN)>, <PROTEOLYTIC ENZYMES>, <ENZYMATIC ACTIVITY>, <FORCE OF COAGULATION>, <COAGULATION TIMES>.



INTRODUCCIÓN

Durante los últimos años la biotecnología ha venido experimentando grandes avances en aplicaciones industriales, debiéndose a la demanda de productos de calidad, así como también procesos industriales óptimos, esto ha incentivado el estudio de nuevas tecnologías para lograr dichas metas obteniendo así beneficios tanto para la industria como para el consumidor (Dalgo, V, 2012: p. 1)

Las enzimas proteolíticas conocidas también como peptidasas o proteasas, pueden utilizarse en la elaboración de variedad de productos y en diversas industrias, como los procesos catalizados por las enzimas siendo cada vez más numerosos, presentando una serie de ventajas frente a los catalizadores convencionales. ya que son proteínas formadas por uno o más cadenas de polipéptidos, trabajan en secuencia y catalizan ciento de procesos químicos, desnaturalizan proteínas y la convierten en energía. (Acosta, R, 2011, p.1).

Las enzimas vegetales son muy eficaces como catalizadores, son capaces de aumentar la velocidad de las reacciones químicas mucho más rápido que cualquier catalizador artificial conocido, cabe recalcar que son altamente específico es decir que cada uno de ellos induce la transformación de un solo tipo de sustancia y son muy activas a temperatura y presión atmosférica. (Acosta, R, 2011, p.1).

Las frutas como la papaya, piña e higo presentan enzimas con actividad proteolítica. Debido a problemas de suministro de cuajo animal y la expansión de la industria de quesos forzaron la búsqueda de enzimas alternativas, por las amplias aplicaciones que tiene en la industria ha generado gran interés en la extracción de las enzimas con la finalidad de evaluar la mejor actividad enzimática. (Yanza, E, 2010, p. 17)

La papaína es aplicada en las preparaciones enzimáticas crudas obtenidas del látex (*Carica papaya*) como distintas fracciones proteicas del mismo. La papaína y quimopaina son proteínas presentes en el látex (10 y 45 % de la proteína soluble), el cual contiene también lisozima (20 %). La cisteína número veinticinco es esencial para la actividad de la papaína, y su oxidación por agentes oxidantes o iones de metales pesados causa inactivación. (Rivera, V, 2005, p.46)

La enzima bromelina se obtiene a partir del jugo de la fruta o de los tallos de la piña (*Ananas comosus*). Es una glicoproteína del grupo de la cisteína proteasas. Actúa preferencialmente sobre

aminoácidos básicos y aromáticos de las proteínas, su pH óptimo se encuentra en el rango de 5 a 8. Tiene baja tolerancia térmica. (Clavijo et al., 2012: p.43)

La enzima proteolítica ficina proveniente del látex del fruto verde, su actividad proteolítica se manifiesta al desnaturalizar sus proteínas sustrato mediante la ruptura de los enlaces disulfuro generados por aminoácidos sulfurados, es similar a la papaína que se extrae del látex de la papaya. (Carrera, J, 2003, p.15)

En Ecuador actualmente no existen muchas investigaciones sobre las enzimas proteolíticas de origen vegetal ya que actúan como catalizadores de reacciones metabólicas muchas de estas reacciones llegan a tener interés industrial debido a que su uso se está haciendo cada vez más importante.

Debido a que hay un gran desconocimiento en temas de la actividad enzimática de las enzimas proteolíticas ya sea por falta de recursos humanos, materiales para el desarrollo de proyectos en este tema, esta investigación brindará resultados estadísticos que pueden servir para la pequeña y media industria ofreciendo como alternativa el uso de las enzimas proteolíticas en sus procesos de producción como es la obtención de quesos.

Esta investigación conlleva a la utilización de mecanismos en la producción de muchos alimentos y productos especialmente como es el queso con la ayuda de las enzimas proteolíticas de origen vegetal, debido a que su función es transformar sustancias para dar productos finales.

Por lo expuesto anteriormente se planteó los siguientes objetivos:

- Determinar el rendimiento de látex obtenidos a partir de la papaya (Carica papaya), higo (Ficus carica), y piña (Annanas cosmosus L).
- Evaluar el rendimiento de las enzimas (Papaína, Ficina y Bromelina).
- Comparar la actividad de coagulación de las tres enzimas proteolíticas (Papaína, Ficina y Bromelina), obtenidos de tres frutas aplicado a la industria quesera.
- Analizar las características físico-químicas, microbiológicas y sensoriales de una muestra de queso fresco con la mejor actividad enzimática.

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL

1.1. Enzimas

Las enzimas son moléculas de proteínas que tienen la capacidad de facilitar y acelerar las reacciones químicas, disminuyendo el nivel de la “energía de activación” propia de la reacción. Se entiende por energía de activación al valor de la energía que es necesario aplicar (en forma de calor, electricidad o radiación) para que las moléculas determinadas colisionen y se produzca una reacción química entre ellas. (Alba, N, p.759)

Las enzimas no reaccionan químicamente con las sustancias sobre las que actúan (que se denominan sustrato), ni alteran el equilibrio de la reacción. Solamente aumentan la velocidad con que estas se producen, actuando como catalizadores. La velocidad de las reacciones enzimáticas depende de la concentración de la enzima, de la concentración del sustrato (hasta un límite) y de la temperatura y el pH del medio. (Alba, N, 2016: p.759)

Las enzimas pueden acelerar las reacciones químicas, por su estructura globular se entrelazan y se pliegan en una o más cadenas polipeptídicas, que aportan un pequeño grupo de aminoácidos para formar el centro activo. La enzima y el sustrato deben tener formas exactas entre sí para lograr adherirse. La acción de las enzimas se caracteriza por la formación de un complejo que representa en el estado de transición. (Acosta, R, 2011, p.9)

1.2. Especificidad de las enzimas

Las enzimas son altamente específicas en cada reacción catalizada y en sus cambios de reactantes, los cuales son llamados sustratos. Una enzima generalmente cataliza una reacción simple o un grupo de reacciones estrechamente ligadas. Reacciones laterales que conducen al derroche de subproductos rara vez ocurren en las reacciones catalizadas al contrario de la sin catalizar. (Lodeiro, R, 2000, pp. 65-68)

1.3. Clasificación de las enzimas

Existe una clasificación normalizada con seis categorías principales dependiendo de la reacción que catalice la enzima, las enzimas se denominan añadiendo así al nombre del sustrato con el cual reaccionan.

1.3.1. *Oxido-reductasa*

Catalizan reacciones de óxido reducción. Precisan la colaboración de las coenzimas de óxido reducción, que aceptan o ceden los electrones correspondientes; tras la acción catalítica, estas coenzimas quedan modificadas en su grado de oxidación, por lo que deben ser transformadas antes de volver a efectuar la reacción catalítica. (Alba, N, 2016: pp.759-780)

1.3.2. *Transferasas*

Las enzimas de este tipo permiten el cambio de grupos específicos de una molécula a otra. Transfieren grupos activos (obtenidos de la ruptura de ciertas moléculas) a otras sustancias receptoras. Suelen actuar en procesos de Inter conversión de monosacáridos, aminoácidos. (Alba, N, 2016: pp. 759-780)

1.3.3. *Hidrolasas*

Este grupo de enzimas permite romper moléculas de alto peso molecular, como reacciones de hidrólisis con la consiguiente obtención de monómeros a partir de polímeros. Actúan en la digestión de los alimentos, previamente a otras fases de su degradación. (Alba, N, 2016: pp. 759-780)

1.3.4. *Isomerasas*

Actúan sobre determinadas moléculas obteniendo de ellas sus isómeros de función o de posición. Suelen actuar en procesos de Inter conversión. (Alba, N, 2016: pp. 759-780)

1.3.5. *Liasas*

Rompen enlaces carbono-carbono, carbono-oxígeno, carbono-nitrógeno y carbono-azufre. En la parte de enzimas sustrato es una molécula que sobre actúa en una enzima, el sustrato se une al

sitio activo de la enzima, y se forma un complejo enzima-sustrato. El sustrato por acción de la enzima es transformado en producto y es liberado del sitio activo, quedando libre para recibir otro sustrato. (Alba, N, 2016: pp. 759-780)

1.3.6. Ligasas

Este tipo de enzimas permite la unión de dos moléculas, valiéndose de la energía obtenida por la degradación del ATP. Por lo tanto, general crean enlaces carbono-carbono, carbono-nitrógeno, carbono-oxígeno, carbono-azufre. (Alba, N, 2016: pp. 759-780).

1.4. Factores que influyen en las enzimas

Los factores que influyen en el comportamiento enzimático son: efecto del pH, temperatura, agua y metales pesados.

1.4.1. Efecto del pH.

La actividad de la enzima depende mucho de la concentración de iones de hidrógeno del medio, ya que esto afecta el grado de ionización de los aminoácidos del sitio activo del sustrato o del complejo enzima-sustrato. En el caso de que los sustratos no son ionizables (la mayoría de los hidratos de carbono y de los lípidos), los grupos iónicos de las enzimas son los únicos afectados por el pH. (Badui, S, 2012, p.292)

Todas las enzimas presentan una máxima actividad catalítica a un cierto valor óptimo de pH, en un intervalo de 5 a 8, aun cuando existen excepciones muy importantes, como es el caso de la pepsina del estómago, que tiene un pH óptimo de 1.8. (Alvarado, E, 2012, p.11)

1.4.2. Efecto de la temperatura.

La velocidad de las enzimas aumenta con la temperatura, pero sólo en el intervalo en que la enzima es estable y retiene su capacidad catalítica, en casos extremos cuando se incrementa mucho la temperatura, se favorece la desnaturalización y consecuentemente esta proteína pierde su capacidad catalizadora. Por esta razón, cada enzima tiene un intervalo óptimo de temperatura en el cual se logra la mayor actividad; la mayoría tiene su óptimo entre 30 y 45°C, y se inactiva a más de 55 °C. (Alvarado, E, 2012, pp.11-12)

A temperaturas bajas también modifican la actividad enzimática; algunas enzimas llegan a actuar bien aún a -10 °C. La velocidad de congelamiento tiene un efecto muy importante en la estabilidad de la mayoría de proteínas. Los puentes de hidrógeno se favorecen a temperaturas bajas por lo que las moléculas de enzimas interaccionan más fácilmente entre sí, o con el agua, lo que ocasiona que el sitio activo se modifique. (Alvarado, E, 2012, pp.11-12)

1.4.3. Efecto acuoso.

La actividad acuosa es un factor que influye en la función enzimática, existen dos tipos básicos de análisis de agua. El primero es el contenido de agua, el cual es una determinación cuantitativa o volumétrica de la cantidad total de agua presente en un producto. El segundo tipo mide la actividad del agua e indica la fuerza con la que esta agua está ligada, estructural o químicamente, a un producto. (Alvarado, E, 2012, p.13)

1.4.4. Efecto de los metales pesados.

Los metales pesados como mercurio, plata y plomo, inhiben la acción enzimática, mientras que el calcio, magnesio, sodio, potasio, hierro y zinc, actúan como agentes activadores de muchas otras. Este efecto activador se debe probablemente a que forman parte del sitio activo a que se requieren para la creación del complejo enzima-sustrato, o que ayudan a mantener la conformación tridimensional. (Alvarado, E, 2012, p. 14).

2. CINÉTICA ENZIMÁTICA

La cinética enzimática estudia la velocidad de las reacciones catalizadas por enzimas. Estos estudios proporcionan información directa acerca del mecanismo de la reacción catalítica y de la especificidad del enzima. La velocidad de reacción observada es la velocidad máxima (V_{max}). La velocidad puede determinarse bien midiendo la aparición de los productos o la desaparición de los reactivos. (Aguirre y Castillo, 2012, pp.5-8)

Los mejores medios detectados de estudio es el examen de la variación de la velocidad de la reacción con la concentración, el sustrato de pH y la temperatura, se constituye como la cinética enzimática, la actividad catalítica de las enzimas se encuentra sometida a diversos tipos de regulación (Perez, et al., 2011: p.33)

2.1. Factores que afectan a velocidad de reaccion.

2.1.1. *Influencia de la temperatura.*

De acuerdo a la ecuación de Arrhenius la velocidad de reacción en función de la temperatura, similar efecto se tiene en las reacciones enzimáticas en un rango óptimo de temperatura muy estrecho, debido a que pequeños cambios tienen una gran influencia en la reacción. Cada enzima presenta una temperatura óptima a la cual su actividad enzimática es máxima como se indica en la Gráfico 1-1. (Pachacama, 2014, p.22)

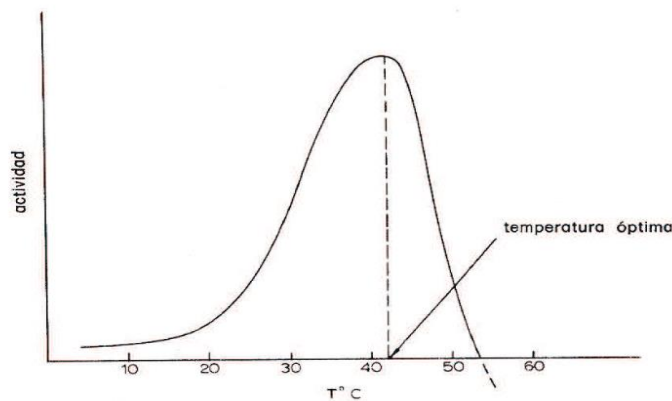


Gráfico 1-1. Curva esquemática temperatura-actividad

Fuente: (Braverman, 1980, p. 49)

2.1.2. *Influencia del pH.*

El pH es dependiente de los sustratos y condiciones de reacción como el tiempo de reacción, temperatura y concentraciones de enzima y sustrato, su rango de trabajo es estrecho como se muestra en la Gráfico 2-1. Un pH muy ácido o muy básico provoca la desnaturalización irreversible de la enzima. La influencia que tiene el pH en las reacciones enzimáticas es aprovechada en la tecnología de alimentos para acelerar o retardar reacciones enzimáticas. (Braverman, 1980, p.49) citado por (Pachacama, C, 2014, p. 22)

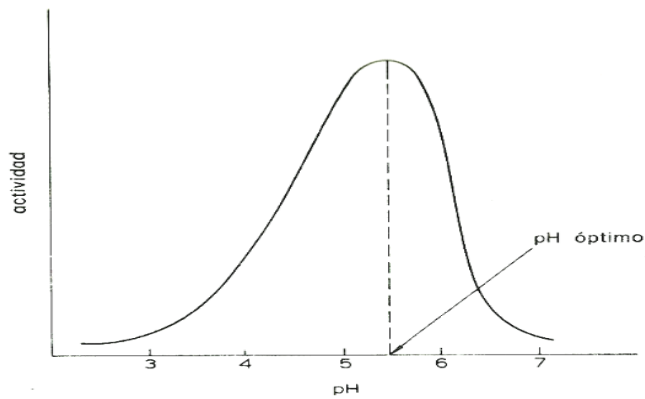


Gráfico 2-1. Curva esquemática de velocidad de reacción- pH de la reacción

Fuente: (Braverman, 1980, p.51)

2.1.3. *Concentración enzimática.*

Mientras las variables de temperatura, pH y concentración de sustrato sean las óptimas, la velocidad de la reacción será directamente proporcional a la concentración de la enzima. La Gráfico 3-1 representa el comportamiento causado por el incremento de la concentración de enzima, también se incrementa la concentración de producto obtenido, es decir aumenta su velocidad de reacción debido a que transforma una mayor cantidad de sustrato en menor tiempo (Braverman, 1980, p.50) citado por (Pachacama, C, 2014, p. 22)

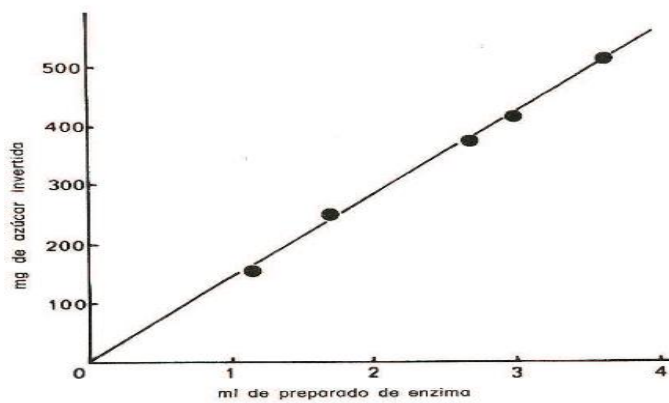


Gráfico 3-1. Velocidad de reacción en función de la concentración de enzima

Fuente: (Braverman, 1980, p. 52)

2.1.4. *Concentración de sustrato.*

La velocidad de reacción se incrementará con la concentración de sustrato, hasta cuando la velocidad no presentará variación, es decir se mantendrá constante por más sustrato que se le añada, bajo esta última condición la enzima se satura de sustrato. Todas las enzimas presentan el efecto de saturación, pero en rangos de concentración de sustrato diferente. En el Gráfico 4-1 se observa el efecto de la concentración de sustrato sobre la velocidad de reacción, a una concentración de enzima constante, si se incrementa la concentración de enzima la velocidad de reacción también lo hará, y el efecto de saturación se conseguirá a mayor concentración de sustrato que el anterior. (Pachacama, C, 2014, p. 24)

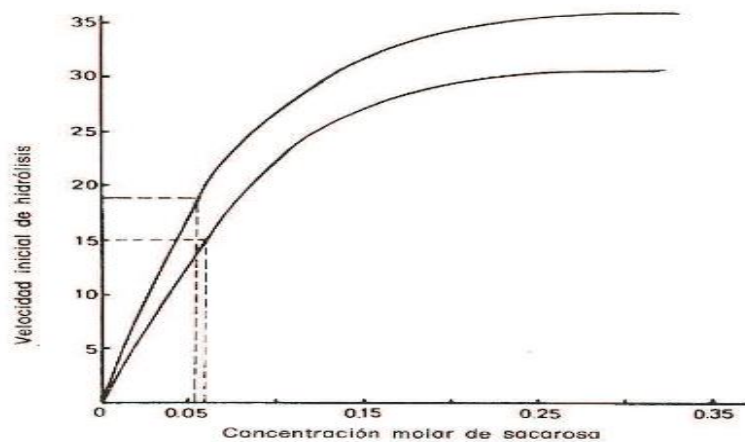


Gráfico 4-1. Velocidad de hidrólisis de la sacarosa por la invertasa a diferentes concentraciones de sustrato.

Fuente: (Braverman, 1980, p.52)

2.1.5. *Influencia de la actividad del agua.*

La tarea del agua está en activar las enzimas y sustratos por hidratación, además de actuar como un medio de transporte permitiendo la difusión del sustrato hacia la enzima, debido a esto es parte fundamental en las reacciones hidrolíticas (Pachacama, C, 2014, p.25).

3. LA CINÉTICA DE MICHAELIS MENTEN

En 1903 se propuso la idea de que las enzimas cambian con su sustrato para formar un complejo, esta idea fue desarrollada por Michaelis y Maunt Menten y se convirtió en la teoría general de las enzimas. Las reacciones enzimáticas se caracterizan porque, aunque se aumente la concentración de sustrato la velocidad no aumenta linealmente, aparece un efecto de saturación. La saturación

se debe a que todos los centros activos están ocupados. La velocidad depende de la cantidad de enzima con sustrato suficiente. Consideraremos sólo la velocidad inicial de las reacciones para cada concentración de sustrato cuando se construya una gráfica, evitando el error introducido por el deterioro del enzima. Como en el primer momento no hay producto no consideraremos la reacción contraria. (Lopez y Garcia , 2015. pp. 39-41)

Se rigüe por la siguiente relación matemática:

- V_1 = Velocidad de reacción.
- V_{max} = Velocidad máxima
- K_m = Constante
- S = Concentración de sustrato.

(1)

$$V_1 = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]}$$

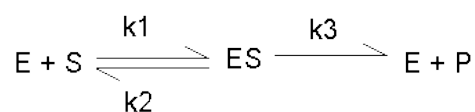
Fuente: (Michaelis-Menten, 1912)

La velocidad de una reacción catalizada por un enzima depende de:

- La concentración de moléculas de sustrato [S]
- La temperatura
- La presencia de inhibidores
- pH del medio, que afecta a la conformación (estructura espacial) de la molécula enzimática.

En primer lugar, el sustrato (S) y la enzima (E) se unen y forman un complejo enzima-sustrato (ES). Una vez formado el complejo **ES**, este o bien se disocia en enzima más el sustrato o se transforma el sustrato en producto formado el complejo enzima-producto (EP), que se disocia para dar enzima (E) más producto (P). (Halvor, C, 1980, p. 9)

(1)



Fuente: (Michaelis y Meten, 1913)

El proceso fue modelizado por Michaelis y Menten y le permitió obtener una ecuación, en donde la velocidad de la acción de un enzima en función de la cantidad de sustrato presente, la cantidad de enzima y las características del enzima, la afinidad del enzima por el sustrato y el poder catalítico del enzima. (Halvor, C, 1980, p.12)

En la siguiente Gráfico 5-1 se observa como la velocidad [V] que indica el número de moléculas del sustrato que se convierten en producto por segundo, responde a la variación de sustrato. Con concentraciones crecientes de sustrato [S], la enzima va acercándose asintóticamente a su velocidad máxima V_{max} , pero nunca la alcanza. Por esta razón, no hay un valor de [S] determinado para la V_{max} . De todas formas, se puede definir un parámetro característico de la enzima empleando la concentración de sustrato a la cual se alcanza la mitad de la velocidad máxima ($V_{max}/2$), en este punto la [S] es igual a la K_m . Valores bajos de K_m indican que el complejo ES está unido muy fuertemente y raramente se disocia sin que el sustrato reaccione para dar producto. (Lopez y Garcia, 2015: p.40)

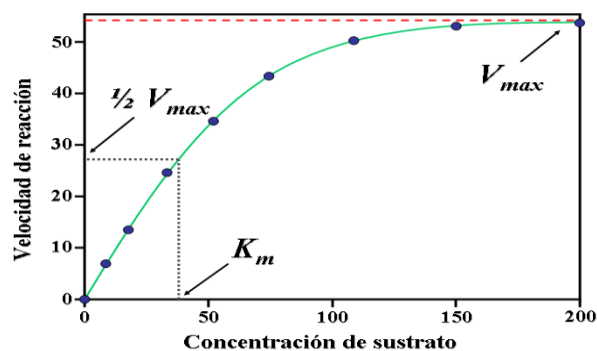


Gráfico 5-1. Cinética enzimática

Fuente: (Lopez y Garcia, 2015)

4. APLICACIONES DE LAS ENZIMAS PROTEOLÍTICAS

Las enzimas proteolíticas son ubicuas y capaces de llevar a cabo reacciones muy específicas. Esta última característica las ha posicionado como enzimas muy atractivas para diferentes industrias. Las enzimas hidrolíticas representan el 75%, del mercado mundial de enzimas industriales, de los cuales el 60% corresponde a las proteasas (Juca, D, 2015: pp. 84-86).

Tienen aplicaciones en diversos campos industriales, siendo la industria de detergentes y alimenticia sus principales mercados. A su vez, considerando las tendencias actuales de

implementar tecnologías ambientalmente amigables, la utilización de enzimas proteolíticas se ha extendido a otras industrias. Algunos procesos químicos que usualmente se realizaban en condiciones de temperatura y pH extremos, o altas presiones, pueden realizarse por reacciones enzimáticas en condiciones más moderadas. (Juca, D, 2015: pp. 84-86).

Las aplicaciones son muy diversas y se puede pensar que serían similares a las de la papaína, proveniente del látex de la papaya y otras proteasas entre las cuales se pueden enumerar las siguientes (Pilar, et al., 2007: p 20)

- Industria cervecera.
- Industria de la carne.
- Industria del cuero.
- Industria textil.
- Industria medicinal.
- Industria de alimentos (jugos).
- Industria de alimentos (dietéticos infantiles).
- Industria alimenticia (lácteos).

En la industria alimenticia la principal aplicación de las proteasas es en la elaboración de quesos, en donde su función es la coagulación de las proteínas lácteas, específicamente hidrolizando el enlace Phe₁₀₆-Met₁₀₆ de la k-caseína para dar lugar a para-k-caseína y otros macropéptidos (Gallardo, et al., 2008: pp. 1-3)

5. ENZIMAS VEGETALES.

5.1. La papaína.

La papaína es una enzima proteolítica que se extrae del fruto llamado papaya y es esta familia de las papaínas que según el tipo de tejidos se encuentran relacionadas. Desde poder antiinflamatorio hasta distintas aplicaciones en procesos industriales se cuentan entre las propiedades de la papaína y que permite utilizar el fruto en distintas dolencias como un medicamento natural. (Gutiérrez y Velásquez, 2018: p. 46)

La papaína bruta, contiene un poco de agua, glúcidos, ácidos orgánicos y una mezcla de enzimas, donde destacan las denominadas proteasas que actúan rompiendo los enlaces peptídicos en cualquier lugar de la cadena peptídica en la que se hallen situados (endopeptidasas), la que se encuentra en mayor cantidad es la papaína, de la que se distinguen la papaína I o papaína propiamente dicha y la papaína II o quimo papaína, que es más estable en medio ácido, pero su actividad proteolítica es cuantitativamente menos marcada que la de la anterior, pues sólo coagula la leche. Además, también contiene pequeñas cantidades de otros enzimas: papaya peptidasa A, lipasa y lisozima (enzima que rompe las paredes de las células bacteriana). (Chimborazo, C, 2012: p.14)

La papaína pura, es una proteína constituida por 212 aminoácidos, que se encuentran enrollados en dos partes separadas por un puente que tiene un lugar activo con un grupo tiol (SH) libre. Es activada por la cisteína (aa), el tiosulfato (compuesto de azufre) y el glutatión. Es inhibida o inactivada por iones metálicos (zinc, cadmio, hierro, plomo), oxidantes (H₂O₂, radicales libres, etc.) y por agentes que reaccionan con los tioles (ácido ascórbico). (Gutiérrez y Velásquez, 2018: p. 25)

La papaína normalmente se consigue por la extracción del látex, que es un líquido blanco obtenido mediante cortes en los frutos inmaduros. Luego, en laboratorio, se separa la enzima y se purifica hasta alcanzar un nivel óptimo de calidad para la comercialización y uso. La cualidad principal de la papaína es el uso como mejorador de las carnes, (ablandamiento y aclaramiento), y en el aclaramiento y para evitar la sedimentación en las cervezas por su acción en los enlaces de las proteínas. (Gutiérrez y Velásquez, 2018: p. 27)

5.1.1. Composición química.

El látex del fruto contiene enzimas proteolíticas: papaína, quimiopapaína y lisozima, además contiene ácidos orgánicos, carotenoides, vitamina A, C y E y sales minerales como potasio. Las hojas maduras contienen un alcaloide llamado carpaina, que se deshace con el calor. La semilla contiene tropacolina, mirocina, caricina y carpasemina, ácido málico, pepsina, pancreatina. (Gutiérrez y Velásquez, 2018: p.30)

5.1.2. Propiedades Físicas de la Papaína.

- Peso Molecular: 23.406 kg/kmol.
- pH óptimo de actividad: 6.0 – 7.0
- Temperatura optima de actividad: 65°C.

- Solubilidad: Es soluble en agua a 10 mg/ml. La enzima es típicamente diluida en solución buffer con 5mM de l-cistina; y sus agentes estabilizantes y de activación incluyen EDTA, cistina y dimercaptopropanol. (Gutiérrez y Velásquez, 2018: p.30).

5.1.3. *El látex de la papaya.*

El látex se encuentra bajo la cáscara de la papaya verde y plenamente desarrollada. Este látex está contenido en unos pequeños vasos largos que se encuentran justamente debajo de la piel. Cuando estos vasitos son cortados, exudan un líquido claro como el agua, el cual se vuelve opaco por su exposición al aire, siendo este líquido la fuente más importante de papaína. El látex de papaya consiste en una mezcla de proteasas o enzimas. Schack demostró la existencia de cuatro componentes principales con actividad proteolítica: (Mundo, J, 2012: pp.61-62)

La papaína, quimopapaina y Lisozima juntas estas proteínas son más o menos el 64% de las proteínas solubles del látex. La fracción denominada quimiopapaína es el componente proteolítico más abundante en el extracto. La papaína fue cristalizada por primera vez por Ball et. Al. En 1937. Citado por (Mundo, J, 2012: pp.61-62)

5.2. **La bromelina**

La bromelina es una enzima proteolítica con código enzimático EC 3.4.22.33; encontrada inicialmente en las hojas y en el tallo de las plantas *Ananas comosus* (L.) Merr. Posteriormente, se constató su presencia en el fruto de la misma planta y en otras especies pertenecientes a la familia Bromeliaceae. La enzima purificada del fruto es una cisteínproteasa de carácter ácido, perteneciente a la misma familia que la papaína, extraída de la papaya (*Carica papaya L.*). Se trata de una glicoproteína, aparentemente homogénea. (Alvarado, E, 2012: p. 47)

Se obtiene del jugo, de la fruta o de los tallos de la piña (*Ananas comosus*). Es una glicoproteína del grupo de las cisteín proteasas. Actúa de preferencia sobre los aminoácidos básicos y aromáticos de las proteínas. Su pH óptimo varía con el sustrato, en el rango de 5 a 8. Tiene baja tolerancia térmica. La enzima se utiliza principalmente como ablandador de carne (tiene buena actividad sobre los tendones y el tejido conectivo rico en elastina), y para hidrolizar proteínas solubles de la cerveza que pudieran precipitar y causar opacidad por el enfriamiento. (Prieto, C, 2007: p.17).

5.2.1. Características de la Bromelina

La Bromelina es una enzima que cataliza la hidrólisis de los enlaces peptídico de la carne de ganado bovino, actúa sobre otras proteínas como la caseína, la hemoglobina y la gelatina. El pH óptimo de actuación de la enzima sobre la caseína y la hemoglobina desnaturalizada es, respectivamente, de 8.3 y 8.0. Su propiedad más conocida es su capacidad de digerir proteínas de los alimentos, contribuyendo a facilitar este proceso al estómago y al páncreas. (Alfaro, Y, 2012: p. 28-29).

Tabla 1-1: Composición química de la bromelina del fruto

AMINOÁCIDO (1)	FRUTA VERDE	FRUTA MADURA
Ác. Aspártico	29.8	29.8
Ác. Glutámico	23.2	23.4
Glicina	32.6	32.2
Alanina	23.8	24.4
Valina	19.8	20.1
Leucina	10	10
Isoleucina	16.4	16.2
Serina	32.2	32
Treonina	13.5	13.8
Cisteína	10	10
Metionina	6	5.8
Prolina	11.6	12
Fenilalanina	7.6	8
Tirosina	22.4	22.2
Triptófano	5.6	---
Histidina	1.4	1.3
Lisina	7.8	8.3
Arginina	8.6	9.1
Amonio amida	43	43.4
Glucosamina	0.2	0.2
Carbohidratos (%)	3.2	3.3

Fuente: (López, et al., 2009)

5.2.2. Propiedades químicas.

El extracto acuoso crudo del tallo y el fruto de la piña es una mezcla de diferentes tioles endopeptidasas y otros componentes como fosfatasas, glucosidasa, peroxidasa, celulasas, glicoproteínas, carbohidratos y varios inhibidores de la proteasa. La bromelina del tallo es diferente de la del fruto cuyas actividades enzimáticas comprenden un amplio espectro con un rango de pH de 5.5-8.0, con diferentes sustratos tales como caseína, gelatina y tripéptidos cromogénicos. (Villavicencio, M, 2011: p.18)

5.3. La ficina

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. (Juca, D, 2015: p.18).

La ficina, al igual que la bromelina y la papaína es una cisteína proteasa que se obtiene del látex de las plantas del género Ficus. Presenta hidrólisis preferencial por los aminoácidos aromáticos. El pH óptimo varía con el sustrato y se encuentra en el rango de 5 a 8. La temperatura óptima está alrededor de 60 °C, inactivándose completamente a los 80 °C. (Vega, K, 2017, p.22)

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 (Juca, D, 2015: p.19).

6. PROCESO DE COAGULACIÓN EN LA LECHE

La coagulación se da por dos formas habituales por acidificación y mediante la acción enzimas como se muestra en el Cuadro 1. Tradicionalmente las enzimas coagulantes han sido extraídas de fuentes, principalmente de estómagos de rumiantes. Sin embargo, debido a la disminución de estas fuentes de cuajo y el aumento de la producción de quesos en el país, es de interés buscar nuevas alternativas como coagulantes de la leche, considerando factores económicos y de calidad. (Perez, K, 2018: pp. 34-35)

Tabla 2-1: Características de las dos formas más habituales de coagulación de la leche.

	Coagulación por	
	Acción de las enzimas	Acidificación
Proceso bioquímico	Acción enzimática (lactosa no degradada)	Fermentación láctica
Modificación de la caseína	Transformación en paracaseína y separación de una parte no proteica.	Sin modificación química de la proteína
Ph	6.8	4.6
Composición del coágulo	Fosfoparacaseinato de calcio.	Caseína (desmineralizada)
Naturaleza del coágulo	Gel elástico impermeable	Cuajada desmenuzable, sin cohesión.
Sinéresis	Rápida	Lenta

Fuente: (ALAIS, 1985)

La leche puede ser coagulada mediante numerosas enzimas proteolíticas que provienen de variadas fuentes, tales como diferentes especies de animales, proteinasas microbianas y proteínas extraídas de frutas como la frutas, como la papaya, piña, higo, cardo. Según diversos autores dicen que una de las principales características que poseen las enzimas provenientes del reino vegetal es la ausencia de toxinas que podrían afectar la salud de los consumidores. (Pezo, K, 2018: p.34-35)

6.1. Coagulación enzimática.

La coagulación por acción enzimática ocurre en dos fases sucesivas, siendo ratas:

Fase enzimática o “reacción primaria”, en el curso de la cual la enzima ataca a la caseína y solubiliza una pequeña parte. La reacción no necesita la presencia de ion calcio.

Fase de coagulación o “fase secundaria”, involucra a la mayor parte de las sustancias que proceden de la reacción química. Esta reacción precisa la presencia de calcio iónico.

Además, el mismo autor señala que es necesario añadir dos fases más para obtener el conjunto de fenómenos consecutivos a la acción enzimática. (Abril, A, 2013: pp. 20-22).

6.2. Tipos de coagulantes

6.2.1. Coagulante animal.

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. (Martinez, J, 2002: pp.65-68)

6.2.2. Coagulante microbiano.

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 *Rhizomucor miehei* es el predominante. Existen tres tipos de enzimas: La nativa, comúnmente denominada “Tipo L”, la enzima desestabilizada, denominada “Tipo TL”, la extra termolábil, denominada “Tipo XL” elaborada mediante una mayor oxidación que el tipo TL. (Martinez, J, 2002: pp.65-68)

6.2.3. Coagulante de origen vegetal.

Mucho antes que los microorganismos, los vegetales han sido objeto de investigaciones con el fin de aislar sus enzimas. Efectivamente el jugo de muchas especies puede dar origen a la coagulación de la leche, pero las enzimas sé que se extraen tienen una actividad proteolítica bastante intensa en relación a su actividad coagulante. (Maigua, A, 2017: p.32)

7. QUESO.

Según la norma define al queso como un producto blando, semiduro, duro y extra duro, madurado o no madurado, y que pueden estar recubiertos, en el que la proporción entre las proteínas de suero y la caseína no sea superior a la de la leche, obtenido mediante: (INEN 1528: 2012, p.2)

- a) Coagulación total o parcial de la proteína de la leche, leche descremada, leche parcialmente descremada, crema, crema de suero o leche, de mantequilla o de cualquier combinación de estos ingredientes, por acción del cuajo u otros coagulantes idóneos, y por escurrimiento parcial del suero que se desprende como consecuencia de dicha coagulación, respetando el principio de que la elaboración del queso resulta en una concentración de dicha proteína láctea y que por consiguiente, el contenido de proteína del queso deberá ser evidentemente más alto que el de la mezcla de los ingredientes lácteos. (NTE INEN 1528: 2012, p.3)
- b) Técnicas de elaboración que comportan la coagulación de la proteína de la leche y/o de productos obtenidos de la leche que dan un producto final que posee las mismas características físicas, químicas y organolépticas que el producto definido en el apartado. La leche utilizada para la fabricación del queso fresco, debe cumplir con los requisitos de la NTE INEN 10, y su procesamiento se realizará de acuerdo a los principios del Reglamento de Buenas Prácticas de Manufactura del Ministerio de Salud Pública. (INEN 1528: 2012, p.3)

7.1. Tipos de quesos existentes en el Ecuador

En la (NTE INEN 1528:2012); señala que en el Ecuador existen los siguientes tipos de quesos.

- Queso madurado.
- Queso fresco.
- Queso cottage crema
- Queso ricote.

- Queso crema.
- Queso duro.
- Queso mozzarella.
- Quesillo criollo.

8. CUAJO VEGETAL

Un coagulante vegetal es cualquier producto vegetal que presente uno o varios componentes activos con capacidad coagulante y que, por lo tanto, pueda producir la desestabilización de las micelas de caseína y la formación del gel láctico o cuajada en la fabricación quesera. Los extractos vegetales se han utilizado desde tiempos antiguos como coagulantes para la elaboración de queso, ya que la primera referencia escrita data del año 50 a.C. y hace referencia a la coagulación con cardo, semillas de cártamo o los flujos de la higuera (Victor, 2015, p.23).

Las proteinasas vegetales encargadas de la coagulación comparten un segmento extra de alrededor de 100 residuos, específico de las plantas. Este segmento tiene una secuencia de aminoácidos que las hace distintas a las proteinasas aspárticas de origen animal o microbiano (Molina, F, 2009: p. 4).

8.1. Función del cuajo vegetal.

La función del cuajo vegetal es separar la caseína (el 80 % aproximadamente del total de proteínas) de su fase líquida (agua, proteínas del lactosuero y carbohidratos), llamado suero. Por acción del cuajo la caseína pierde una parte de su molécula y como consecuencia sus sales de calcio se vuelven insolubles. El uso del cuajo vegetal produce la precipitación de la caseína y el calcio disuelto en la leche para formar para caseinato de calcio, comúnmente llamado cuajo. (Mallma, A, 2017: p. 11)

8.2. Obtención del cuajo vegetal

El cuajo vegetal es obtenido a partir de plantas, las más utilizadas son enzimas de flores (ej. cardo) o del látex (ej. higuera). Se pueden obtener de las fuentes naturales, es decir, de las hojas y los higos verdes que contienen un látex (líquido lechoso) con una mezcla de enzimas llamadas (Esterasa, ficina, fucomarina) que tiene la capacidad de destruir las proteínas de la leche. (Nolivos, M, 2011: pp. 21-22).

Para extraer el látex se realiza cortes horizontales en la parte superior del fruto que va unida a la rama de 1 a 2 mm de espacio; se recoge en frascos previamente esterilizados y el látex se congela para su conservación. En la cosecha del higo se debe evitar desprender los frutos verdes arrancándolos, para la cual se utilizan implementos como tijeras o alicates realizando cortes en el pedúnculo (Herrera, 2009, p.45).

La ficina, extraída de la higuera (*Ficus carica L.*), la bromelina, extraída de los tallos y fruto de la piña (*Ananas satirus L.*), son parecidos a la papaína extraídos del fruto de papaya (*Carica papaya L.*), que por sí sola puede romper los enlaces peptídicos que la tripsina y la pepsina rompen separadamente. Ocurre lo mismo, probablemente, para las preparaciones enzimáticas de cardo, calabaza, etc. (Nolivos, M, 2011: pp. 21-22).

En términos económicos, las proteasas representan casi las dos terceras partes de las enzimas que se comercializan en el mercado mundial. La mayor parte de estas provienen de fuentes microbianas, pero varias proteasas vegetales como papaína, bromelina y ficina, son irremplazables en un gran número de procesos. (Villavicencio, M, 2011: pp.28-30)

8.3. Ventajas de uso del cuajo vegetal

El cuajo vegetal posee la propiedad de cuajar la leche, gracias a las enzimas naturales proteolíticas. (Villavicencio, M, 2011: pp.28-30)

Produce una cuajada más suave y cremosa que el de procedencia animal, si bien es cierto que el coágulo resulta más delicado a la hora de trabajar el queso.

Es un cuajo muy proteolítico, lo que significa que produce una transformación más rápida e intensa de las proteínas presentes en la leche.

Es un cuajo muy bueno para quesos frescos y tiernos, aunque da excelentes resultados también en queso duros. No conviene, sin embargo, para las coagulaciones lácticas, ya que provoca unas cuajadas muy blandas y difíciles de escurrir.

El coagulante vegetal se considera adecuado para dietas vegetarianas en las que no se quiera consumir ningún producto derivado del sacrificio de animales. (Nolivos, M, 2011: p.87)

CAPITULO II

2. MARCO METODOLÓGICO

2.1. Localización y duración del experimento

El desarrollo de la siguiente investigación se realizó en la Facultad de Ciencias Pecuarias y en la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, ubicada en la Panamericana Sur km 1 ½ en la ciudad de Riobamba, provincia de Chimborazo-Ecuador.

Los análisis se realizaron en los laboratorios Bromatología y de Procesos Industriales, encontrándose a una altitud de 2 740 msnm, 78° 4' de Longitud Oeste y 1° 38' de Latitud Sur. La investigación tuvo una duración de 120 días laborables en el cual se realizó la extracción de las tres enzimas proteolíticas y su evaluación enzimática y aplicación en la industria quesera como es la elaboración de queso fresco.

2.2. Unidades experimentales

En esta investigación para la obtención de las enzimas proteolíticas se utilizó 5 kg de cada tipo de fruta (papaya, piña e higo), para la obtención de látex y para la evaluación de la actividad enzimática se utilizó 0,0375 g de enzima (papaína, bromelina y ficina), por tratamiento y repetición. En la elaboración del producto final que es el queso fresco se utilizó 4 litros de leche por cada repetición, con cinco repeticiones cada tratamiento.

2.3. Materiales, equipos e instalaciones

Para la realización de la siguiente investigación será necesario la disponibilidad de los siguientes materiales, equipos e instalaciones.

2.3.1. *Materiales*

- Recipientes de plástico.
- Cuchillos.
- Bisturí.
- Pipeta.

- Vasos de precipitación.
- Frascos de vidrio.
- Espátula.
- Matraces Erlenmeyer.
- Probeta.
- Crisoles de porcelana
- Pinzas
- Varilla de vidrio
- Vasos de precipitación
- Papel parafina
- Mandil
- Cofia
- Guantes

2.3.1.1 Materia prima

- Materia prima para la obtención de las enzimas (Papaya, piña, higo).
- Materia prima para la elaboración de queso (leche vaca)

2.3.2. Materiales de oficina

- Cuaderno de apuntes
- Calculadora
- Esferos
- Hojas de papel bond
- Laptop

2.3.3. Equipos

- Centrifuga.
- Autoclave

- Estufa.
- Mufla
- Equipo de determinación de proteína (Macro Kjeldahl)
- Balanza analítica.
- Termómetro.
- Refrigerador.
- Licuadora.
- Liofilizador
- pH-metro
- Refractómetro
- Ollas
- Moldes
- Mesa de trabajo
- Prensa

2.3.4. Laboratorios

- Laboratorio de bromatología.
- Laboratorio de Procesos Industriales

2.3.5. Reactivos

- Etanol al 96%
- Ácido sulfúrico
- Ácido clorhídrico
- Hidróxido de sodio
- Ácido bórico
- Ácido acético
- Agua destilada

2.3.6. Instalaciones

La presente investigación se realizó en el laboratorio de Procesos Industriales de la Facultad de Ciencias y en el laboratorio de Bromatología de la Facultad de Ciencias Pecuarias.

2.4. Tratamientos y diseño experimental

En la presente investigación se utilizó tres tratamientos que corresponden a los tres tipos de enzimas proteolíticas (*Ficina, Bromelina, Papaína*) con cinco repeticiones por cada tratamiento. Las unidades experimentales serán modeladas bajo un Diseño Completamente al Azar (DCA), que se ajustarán al siguiente modelo lineal aditivo.

(3)

$$Y_{ij} = \mu + \alpha_i + \epsilon_{ij}$$

Dónde

Y_{ij} = Valor del parámetro en determinación.

μ = Efecto de la media por observación.

α_i = Efecto de los tratamientos.

ϵ_{ij} = Efecto del error experimental.

2.4.1. Esquema del experimento

El esquema del Análisis de Varianza que se aplicó al trabajo experimental se detalla a continuación en el Tabla 3-2, 4-2, 5-2.

Tabla 3-2. Esquema del experimento de los tres tipos de fruta

FV		GL
Total	(n-1)	14
Tratamiento	(t-1)	2
Error	(n-1) -(t-1)	12
n	(t*r)	15

Fuente: Bermeo Berrones Josselin, 2019.

Tabla 4-2: Esquema del experimento de la evaluación enzimática

FV		GL
Total	(n-1)	19
Tratamiento	(t-1)	3
Erro	(n-1) -(t-1)	16
n	(t*r)	15

Fuente: Bermeo Berrones Josselin, 2019

Tabla 5-2: Esquema del T-student para la evaluación del queso fresco

FV		GL
Total	(n-1)	9
Tratamiento	(t-1)	1
Error	(n-1) -(t-1)	8
n	(t*r)	10

Fuente: Bermeo Berrones Josselin, 2019

2.5. Mediciones experimentales

Las mediciones experimentales que se consideraron en esta investigación fueron:

2.5.1. Características físico-químicas de los tres tipos de frutas

Sólidos solubles.

pH

2.5.2. Determinación de actividad enzimática

Método de coagulación de la leche (Balls and Hoover)

Método de determinación de proteínas en la leche.

2.5.3. Cantidad de proteína formado por unidad de tiempo

Tiempos de coagulación

2.5.4. Cantidad de enzimas necesarias a utilizar por medio

Fuerza o Actividad de Coagulación

2.5.5. Características físico-químicas de una muestra de queso fresco

Contenido de Proteínas

Medición de pH.

Medición del porcentaje de humedad.

Determinación de aw.

2.5.6. Análisis microbiológicos

Enterobacteriáceas

Echericha coli

Staphylococcus áureos

Listeria monocytogenes

Salmonela

2.5.7. Análisis sensorial

Para evaluar la aceptación del producto Aceptación o rechazo (Prueba de preferencia Pareada), como se puede ver en el Anexo F

2.6. Análisis estadístico y prueba de significancia

Las pruebas de significancia que se emplearon en el presente trabajo de investigación se describen a continuación:

Análisis de varianza para las diferencias (ADEVA).

Separación de medias con la prueba estadística TUKEY con nivel de significancia 5%.

Prueba de T-students para el producto final.

2.7. Esquema del ADEVA

El esquema del ADEVA que se utilizó en el presente trabajo de investigación se describe a continuación en la Tabla 6-2, 7-2, 8-2.

Tabla 6-2: Esquema del experimento para la fruta

				TOTAL
TRATAMIENTO	CÓDIGO	REPETICIONES	T.U.E(Kg)	Kg/trat
(BROMELINA)	T1	5	5	25
(PAPAÍNA)	T2	5	5	25
(FICINA)	T3	5	5	25
Total, g de fruta para muestra enzimática				75
T.U.E: Tamaño de la Unidad Experimental.				Kg
Fuente: Bermeo Berrones Josselin, 2019				

Tabla 7-2: Esquema del experimento para la evaluación enzimática

				TOTAL
TRATAMIENTO	CÓDIGO	REPETICIONES	T.U.E(mg)	mg/trat
(BROMELINA)	T1	5	0,0375	0,1875
(PAPAÍNA)	T2	5	0,0375	0,1875
(FICINA)	T3	5	0,0375	0,1875
Total, mg de fruta para muestra enzimática				0,5625
T.U.E: Tamaño de la Unidad Experimental.				
Fuente: Bermeo Berrones Josselin, 2019				

Tabla 8-2: Esquema del experimento para la evaluación del queso

				TOTAL
TRATAMIENTO	CÓDIGO	REPETICIONES	T.U.E(L)	L /trat
(Queso fresco Utilizando ficina)	T1	5	4	20
(Queso fresco comercial)	T2	5	4	20
Total, Lt de leche				40
T.U.E: Tamaño de la Unidad Experimental.				
Fuente: Bermeo Berrones Josselin, 2019				

2.8. Procedimiento experimental

En la Gráfico 6-2 se indica el diagrama de flujo de la elaboración del queso fresco.

2.8.1. Elaboración del queso fresco

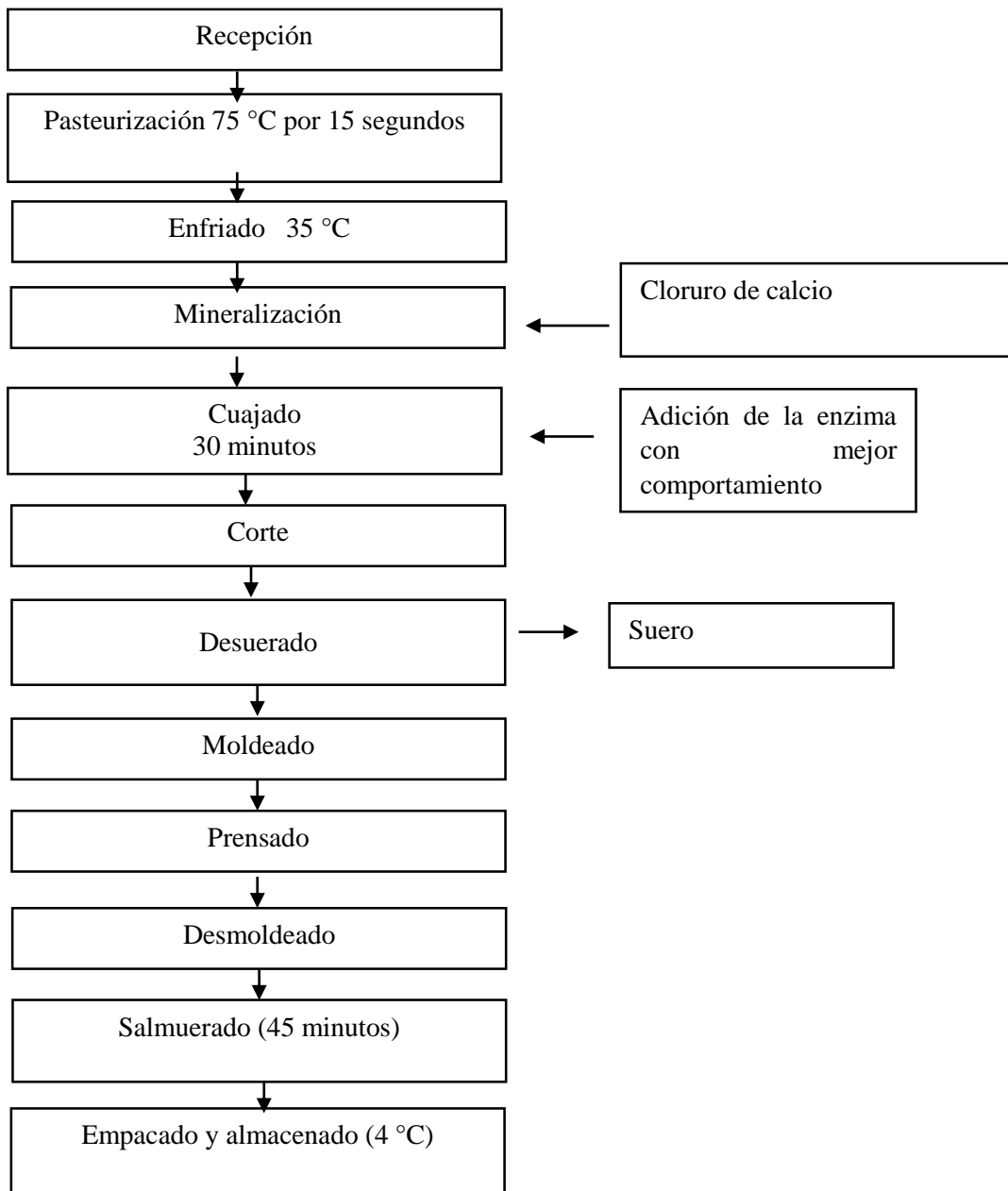


Gráfico 6-2: Diagrama de flujo de la elaboración del queso fresco

Realizado por: Bermeo Berrones Josselin, 2019

2.8.1.1. Recepción

Como primer punto se realizó la limpieza y desinfección de los materiales y equipos para evitar posibles contaminaciones del producto final. Luego se procedió a la recepción de la materia prima y el control correspondiente, para asegurar que el producto final cumpla con las normas de calidad requeridas para el consumo humano, se pesó las cantidades de materia prima a utilizar en la elaboración del queso fresco.

2.8.1.2. Pasteurización

Se realizó la pasteurización a 75 °C durante 15 segundos, con la finalidad de reducir principalmente la carga microbiana patógena de la leche.

2.8.1.3. Enfriado

Se lo realizo con agua potable hasta alcanzar una temperatura de 35 °C, temperatura requerida para continuar con la siguiente fase.

2.8.1.4. Mineralización.

Aquí se añade el cloruro de calcio para reconstituir el calcio perdido durante la pasteurización y ayudara en la formación de la cuajada.

2.8.1.5. Cuajado

Adición de cuajo comercial para el queso fresco comercial y la enzima ficina para el queso fresco utilizando la enzima vegetal con mejor comportamiento enzimático.

2.8.1.6. Cortado

Se lo realiza con la ayuda de una lira realizando cortes transversales y longitudinales permitiendo un mejor desuerado.

2.8.1.7. Desuerado

Se extrae todo el suero que se separa de la caseína.

2.8.1.8. Moldeado

La cuajada se introduce en los moldes para darle así forma y tamaño final al queso.

2.8.1.9. Prensado

Se lo realiza con la finalidad de expulsar la humedad o el exceso de suero logrando así mejorar la contextura del queso.

2.8.1.10. *Salmuerado*

El salado contribuye en el sabor y consta de colocar el queso en la salmuera por un tiempo de 45 minutos.

2.8.1.11. *Empacado y almacenado*

Se lo realizó en fundas Ziploc y fueron almacenado en refrigeración a 4 °C, para su posterior análisis.

2.9. Metodología de la evaluación

2.9.1. Caracterización físico-química de los tres tipos de frutas

2.9.1.1. pH.

Este método determina la concentración de ion de hidrogeno del pH en las muestras.

Procedimiento.

- Tritura la fruta.
- Tamizar para obtener el zumo de la fruta.
- Comprobar el correcto funcionamiento del potenciómetro.
- Determinar el pH introduciendo el electrodo en la muestra.
- Anotar los resultados.

2.9.1.2. Sólidos Solubles (° Brix)

Los ° Brix se determinó mediante la utilización de un Brixómetro.

Procedimiento.

- Triturar la fruta.
- Tamizar la muestra para obtener el zumo.
- Determinar los ° Brix con la ayuda de un refractómetro.
- Anotar los resultados.

2.9.2. Extracción del látex de las frutas

2.9.2.1. Obtención del látex de higo y papaya.

- Limpiar y desinfectar el área de trabajo y utensilios a utilizar para dicho proceso.
- Colocarse guates desechables.
- Para la extracción del látex de la papaya y el higo se selecciona los frutos verdes y completamente desarrollados. Basándose en el método expuesto por (Aguirre, & Castillo, 2009, p. 3)
- Lavar las frutas de papaya e higo que van a ser utilizadas para el proceso.
- Secar las frutas con papel toalla para evitar posibles contaminaciones.
- Pesar las frutas para determinar el rendimiento del látex extraído una vez procesado.
- Realizar incisiones verticales de 1 a 2 mm de espesor en cada incisión para la extracción del látex.
- Colocar recipientes bajo la fruta para la recepción del látex.

2.9.3. Procesamiento del látex.

El látex debe ser procesado inmediatamente después de ser extraído de la fruta, para preservar la actividad proteolítica de la enzima.

- Colocar el látex extraído en bandejas de aluminio y congelar.
- Realizar el secado del látex utilizando un liofilizador a 60 °C por 12 horas dependiendo de la cantidad del látex. Chequear cada 30 minutos.
- Una vez que el látex este granulado, el proceso de secado a finalizado.
- Colocar el polvo en un mortero y molerlo hasta que se pulvericen.
- Se Coloca en refrigeración a 3 °C para un mejor mantenimiento de la enzima.

2.9.3.1. Extracción de la enzima en la piña.

Para la extracción de esta enzima se aplicó el método propuesto por (Gallardo et al, 2008: p. 6), donde el la mejor condicion para extraer la bromelina fue con el solvente etanol a una temperatura de -10 °C y durante un tiempo de siete días, constando del siguiente procedimiento:

- Limpiar y desinfectar el área de trabajo y utensilios a utilizar para dicho proceso.
- Colocarse guates desechables.
- Lavar la fruta y pelar.
- Cortar en fragmentos pequeños
- Triturar con la ayuda de una licuadora.
- Tamizar
- Agregamos 1 ml de etanol por cada 5 ml de bromelina
- Congelar a -10°C por 7 días.
- Descongelar.
- Centrifugar a 3500 rpm durante 10 minutos

2.9.3.2. *Procesamiento del látex.*

- Colocar el látex extraído en bandejas de aluminio y congelar.
- Realizar el secado del látex utilizando un liofilizador a 60 °C por 12 horas dependiendo de la cantidad del látex. Chequear cada 30 minutos.
- Una vez que el látex este granulado, el proceso de secado a finalizado.
- Se Coloca en refrigeración a 3 °C para un mejor mantenimiento de la enzima

2.9.4. *Evaluación de las enzimas*

2.9.4.1. *Método de coagulación en la leche (Balls and Hoover)*

Para la determinación de la coagulación de leche por el método de Balls and Hoover se realizó el método aplicado por (Aguirre & Castillo, 2009: p, 6) con algunas modificaciones donde menciona la capacidad que tiene la enzima en coagular la leche.

Los análisis se realizaron en 10 mililitros de leche entera a diferentes concentraciones de cada enzima (0, 0025, 0, 0050, 0, 01, 0, 02) gramos por mililitro de ácido acético, una vez preparada la solución de cada enzima con ácido acético se agregaron en los 10 mililitros de leche.

Se homogeniza en contenido y se controla el tiempo que demora hasta detectar la coagulación de la leche o la formación de coágulos y se registra para cada uno de las cantidades y repeticiones. Según este autor los tiempos de coagulación deben estar entre 20 y 150 segundos para los resultados óptimos sin depender de la cantidad de enzima.

Para lo cual se aplicará la siguiente ecuación.

$$V = \frac{V_{m\acute{a}x} * S}{K_m + S} \quad (2)$$

Dónde:

V= Velocidad

V máx= Velocidad máxima

S = Sustrato

Km = Constante de Michaelis-Menten

(3)

$$K_m \frac{V_{m\acute{a}x}}{2}$$

2.9.5. Cantidad de proteína formada por unidad de tiempo

2.9.5.1. Tiempos de coagulación

En los tiempos de coagulación se toma el tiempo en que la enzima se demora en reaccionar con la proteína de la leche hasta formar coágulos.

2.9.6. Cantidad de enzima necesaria a utilizar por medio

2.9.6.1. Fuerza de coagulación

Para determinar la fuerza de coagulación se utilizó el método de SOXHLET que dice la fuerza representa el número de volúmenes de leche coagulados por un determinado número de volúmenes de cuajo en 40 minutos a 35 ° C. Se aplica la siguiente ecuación.

$$F = \frac{2400 \cdot K}{C \cdot D}$$

Dónde:

F = Fuerza de coagulación.

2400 = Tiempo en segundos que normalmente la leche coagula a una temperatura de 35 ° C.

K = Cantidad de leche en ml.

C = Cantidad de cuajo en gramos.

D = Tiempo de coagulación en segundos

Procedimiento

- Se Tomó 10 ml de leche entera y se colocó en un tubo de ensayo.
- Calento en baño maria hasta una temperatura de 35 ° C.
- Adicionar la respectiva cantidad de cuajo vegetal de papaina, bromelina y ficina.
- Controlar el tiempo que tardo en coagular la leche con cada una de las enzimas y sus diferentes cantidades, para poder calcular la fuerza de coagulación.

2.9.7. Características fisico-químico del medio luego de aplicado la enzima

2.9.7.1. Contenido de proteína

Para la determinación de proteína se debe pasar por tres etapas que son la digestión, destilación y titulación por el método de Kjeldahl.

Procedimiento:

Primer etapa digestión

- Pesar de 2 gramos de muestra.
- Pesar un pedazo de papel boon.
- Colocar la muestra en un balón Kjeldahl.
- Añadir 10 gramos de catalizador (CuSO₄+Na₂SO₄).
- Adicionar 25 mL de ácido sulfúrico concentrado, adicinar oor los bordes del balón.

- Se introduce la muestra en el equipo de determinación de proteína (digestor) por un tiempo de 2 a 4 horas a una temperatura de 68 °C.
- Para dar por finalizado esta etapa se debe observar la aparición de una solución de color verde esmeralda y que no exista presencia de humo y dejar enfriar por 30 minutos.

Etapa de destilación

- Adicionar 200 mL de agua destilada en el tubo digestor.
- Añadir 100 mL de hidróxido de sodio al 50 % en una balón.
- Añadir granalla de zinc.
- Agitar y observar un color celeste.
- En un matraz erlenmeyer añadir 100 mL de ácido bórico.
- Y trasladar al equipo de destilación.
- Prender los reverbos.
- Abrir la llave de paso de agua del equipo para la destilación.
- Destilar hasta que el matraz erlenmeyer llegue a 200 ml.

Etapa de titulación

- En el matraz de la destilación agregamos 3 gotas de indicador macro.
- Colocamos en la bureta 50 ml de ácido clorhídrico al 0.1 N.
- Realizamos la titulación hasta que de un color rosa pálido.
- Registramos el volumen gastado del agente titulante.

Cálculos:

(5)

$$\%Proteina = \frac{V * N * 0,014 * f}{W} * 100\%$$

Dónde:

V= Volumen de HCl utilizado en la titulación.

N= Normalidad de HCl.

0,014 = Equivalente-gramo de nitrógeno.

W = Peso de la muestra.

F = Factor proteico (6,38)

2.9.8. Características físico químicas del queso

2.9.8.1. Medición del pH

Para el análisis de pH se utilizó un pH-metro que se emplea para expresar el grado de acidez o alcalinidad de la muestra. utilizando el método aplicado por (Bustamante. M, 2012)

Procedimiento

- Tritura la muestra
- Tamizar la muestra
- Comprobar el correcto funcionamiento del potenciómetro.
- Determinar el pH introduciendo el electrodo en la muestra.
- Anotar los resultados.

2.9.8.2. Determinación de la aw.

Se realizó con la ayuda del equipo Lab Touch-aw que determina la actividad del agua, siguiendo el procedimiento propuesto por (COMINTEC. 2017)

Procedimiento

- Preparar una muestra representativa.
- Colocar la muestra en la capsula de medida solo hasta la mitad.
- Cerrar la capsula y colocar en el equipo.
- Esperar que el equipo termine de leer la muestra y anotar los resultados.

2.9.8.3. Medición del porcentaje de humedad

Procedimiento aplicado por (García. E & Fernández. I. 2001, p.9)

- Tarar los crisoles en la estufa durante dos horas.
- Sacar los crisoles de la estufa y colocar en un desecador durante 30 minutos.

- Pesar los crisoles y anotar los resultados.
- Pesar 2 gramos de muestra.
- Colocar la muestra en los crisoles tarados.
- Colocar la muestra en la estufa a 105 ° C durante 12 horas con la ayuda de pinzas.
- Sacar los crisoles con las muestras y colocar en el desecador durante 30 minutos.
- Pesar la muestra seca de los crisoles y anotar los resultados.

Cálculos:

$$\% \text{ Humedad} = \frac{W2 - W3}{W2 - W1} * 100\% \quad (6)$$

Donde:

H = Humedad en porcentaje.

W1 = Peso del crisol vacío.

W2 = Peso del crisol mas la muestra húmeda.

W3 = Peso del crisol mas la muestra seca.

2.9.9. Análisis sensorial

Con la finalidad de evaluar la aceptación del producto que fue elaborado utilizando la enzima con mejor comportamiento enzimático, se realizó la prueba Afectiva de preferencia pareada, a dos muestras de queso fresco, tales como queso fresco utilizando la enzima ficina (200) y muestra de queso comercial (250), como se puede ver en el Anexo F. La prueba consistió en elegir una muestra en base al gusto y disgusto. siguiendo el procedimiento aplicado por (Domínguez. M, 2008. p, 6)

Esta prueba consiste en presentar a los panelistas dos muestras del producto alimenticio a evaluar, preguntándole en el formulario sobre alguna característica que se esté evaluando del producto como: cuál de las dos muestras es más dulce, cuál de las dos muestras es insípida, cuál de las dos muestras es más acida, etc. (Liria, M. 2007. pp 11-12)

Las muestras se presentaron en recipientes idénticos, codificados, las mismas que fueron evaluadas por 150 panelistas no entrenados (estudiantes que hayan cursado la cátedra de Análisis Sensorial) de la Facultad de Ciencias Pecuarias, ESPOCH.

2.9.10. Análisis microbiológicos.

Para determinar la presencia de microorganismos en la muestra de queso fresco se utilizó la norma (NTE INEN 1528). Donde señala que los quesos frescos no madurados, ensayados de acuerdo con las normas ecuatorianas correspondientes deben cumplir con requisitos microbiológicos establecidos en la Tabla 9-2

Tabla 9-2. Requisitos microbiológicos para queso fresco no madurado.

Requisitos	N	M	M	C	Método de ensayo
Enterobacteriáceas, UFC/g	5	2×10^2	10^3	1	NTE INEN 1529-13
Escherichia, UFC/g	5	<10	10	1	AOAC 991.14
Staphylococcus aureus, UFC/g	5	10	10^2	1	NTE INEN 1529-14
Listeria monocytogenes /25g	5	Ausencia	-		ISO 11290-1
Salmonella en 25 g	5	AUSENCIA	-	0	NTE INEN 1529-1

Fuente: NTE INEN 1528

Donde:

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.

Preparación de la muestra:

Limpiar con alcohol el empaque que contiene los quesos y abrir.

Colocar el queso sobre una superficie limpia y seca.

Realizar el cuarteamiento de la muestra.

Pesar 50 g de muestra y colocar en una bolsa Ziploc.

Triturar y mezclar hasta conseguir una masa homogénea.

Para la determinación de estos microorganismos se debe seguir con el siguiente procedimiento:

- Una vez adquirida las placas petrifilm se almaceno los paquetes cerrados a una temperatura de $\leq 8 \text{ }^\circ\text{C}$ ($\leq 46 \text{ }^\circ\text{F}$). Las placas deben usarse antes de su fecha de caducidad.

- Preparar una dilución 10^{-1} de la muestra; se toma 1 gr de la muestra y se agrega 9 ml de agua peptonada como diluyente estéril.
- Homogenizar la muestra mediante los métodos usuales.
- Colocar la placa petrifilm en una superficie plana y nivelada. Levantar la película superior en forma perpendicular a la Placa Petrifilm, colocar 1 ml de la dilución de la muestra en el centro de la película cuadrículada inferior.
- Bajar con cuidado la película superior para evitar que atrape burbujas de aire.
- Con el lado liso hacia abajo, colocar el dispersor en la película superior sobre el inoculo, presionar suavemente el dispersor para distribuir el inoculo sobre el área circular. No girar ni deslizar el dispersor.
- Levantar el dispensador, esperar un minuto a que solidifique el gel.
- Incubar las placas caras arriba en grupos de no más de 20 piezas. A una temperatura de $35 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 horas ± 2 horas.
- Las placas Petrifilm pueden ser contadas en un contador de colonias estándar u otro tipo de lupa con luz.
- En la Tabla 10-2 se puede observar la temperatura y tiempo de incubación de los microorganismos.

Tabla 10-2. Condiciones de incubación de acuerdo a los microorganismos

Microorganismo	Condiciones de incubación
Enterobacteriáceas	$35 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas
Echericha coli	$35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 48 horas ± 2 horas
Staphylococcus áureos	$35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas
Listeria monocytogenes	$35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 76 horas
Salmonela	$35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 72 horas

Fuente: Guía de interpretación 3M Placas Petrifilm

CAPÍTULO III

3. MARCO DE RESUSTADOS, DISCUSIÓN Y ANALISIS DE RESULTADO

3.1. Análisis físico químico de los tres tipos de frutas.

3.1.1. Sólidos solubles (SST)

Al analizar en la (Tabla 11-3) el contenido de sólidos solubles totales de las diferentes frutas utilizadas en esta investigación se pudo conocer que, la piña, la papaya y el higo poseen valores de (12,12 ° Brix, 7,62 ° Brix y 7,24 ° Brix) respectivamente donde existe diferencias altamente significativas ($<0,001$), comparándolos con la norma técnica ecuatoriana (INEN 2 337:2008, p. 4) donde nos indica que la papaya debe tener un mínimo de 8 ° Brix, la piña un mínimo de 10° Brix, encontrándose dentro de los rangos establecidos sin tener mayor afectación, mientras que según él (CODEX STAN 247, p. 18) el higo debe tener un mínimo de 18 ° Brix, siendo el valor que más difiere con la presente investigación, esto puede deberse a lo mencionado por (Ingrid, y otros, 2007, p 92) en donde indican que la madurez es uno de los aspectos que refleja el comportamiento de los sólidos solubles o ° Brix, mientras que la cantidad de azúcares en los frutos depende de la variedad de los mismos.

Tabla 11-3: Análisis físico químicas de los tres tipos de frutas

Parámetros	Características Físico químicas						EE.	Prob
	Papaya		Piña		Higo			
Sólidos solubles	7,62	a	12,12	b	7,24	a	0,37	0,001
Ph	5,48	b	2,20	a	6,48	c	0,07	0,001

Realiza por: BERMEO Berrones, Josselin, 2019

Fuente: INFOSTAT, 2019

EE. error estándar

Prob $>0,05$: no existe diferencias estadísticas

Prob $<0,05$: existe diferencias significativas

Prob $<0,01$: existen diferencias altamente significativas

Medias con letras iguales en la misma fila no difieren estadísticamente de acuerdo a la prueba de Tuckey.

3.1.2. pH

Al realizar el análisis del pH en los tres tipos de frutas higo, papaya y piña, existen diferencias altamente significativas ($<0,001$) mostrando valores (6,48 , 5,48 y 2,20) respectivamente, donde según la investigación de (Badui, 2006) dice que, todas las enzimas tienen un rango de pH óptimo para su correcto funcionamiento y para ser aplicadas en alimentos deben tener un valor entre 3 y 7, esto puede deberse a lo mencionado por (Guacho, y otros, 2017, p 25) donde recalca que el pH en

las enzimas determina el nivel de complejidad de su estructura tridimensional y la afinidad que la enzima tendrá con el sustrato donde la papaya y el higo se encuentran dentro de los establecido, siendo la piña la que se encuentra fuera del rango, debido a lo mencionado por (Pérez et al, 2006: p.6) donde señala que un pH por debajo de 3 es el resultado de la degradación enzimática por factores de obtención y almacenamiento.

3.2. Análisis del rendimiento del látex de la fruta y la enzima.

3.2.1. Rendimiento del látex de la fruta (%)

Al analizar el rendimiento del látex en los tres tipos de frutas, se puede apreciar en la (Tabla 12-3) que existen diferencias altamente significativas, obteniendo valores de rendimiento de (14,69% en la papaya, 11,81% del higo y 3,89% en la piña) esto puede deberse a lo mencionado por (Villavicencio, 2011, p, 64) donde indica que el estado de maduración de la fruta influye en la presencia de látex, obteniendo los mejores resultados en frutas en estado de maduración verde donde se encuentra mayor cantidad, facilitando la extracción de la enzima.

Tabla 12-3: Análisis de la obtención de las tres enzimas proteolíticas.

Parámetros	Fruta			EE.	Prob
	Papaya	Piña	Higo		
Rendimiento del latex la fruta	14,69	3,89	11,81	0,42	0,001
Rendimiento de la enzima	13,61	0,75	18,39	0,39	0,001

Realiza por: BERMEO, Berrones, Josselin, 2019

Fuente: INFOSTAT, 2019

EE. error estándar

Prob >0,05: no existe diferencias estadísticas

Prob <0,05: existe diferencias significativas

Prob <0,01: existen diferencias altamente significativas

Medias con letras iguales en la misma fila no difieren estadísticamente de acuerdo a la prueba de Tuckey

3.2.2. Rendimiento de la enzima

Los valores de rendimiento enzimático se encuentran en 18,39 g/Kg para la ficina, 13,61 g/Kg para la papaína y 0,75 g/Kg para la bromelina, mostrándose diferencias altamente significativas (<0.001), según lo investigado por (Arana y Quijano, 2012), (Borella y Stavanato, 2015), el rendimiento puede se debe a factores genéticos y de cultivo, como también al método de extracción para cada una de ellas.

3.3. Análisis de la actividad enzimática

Al realizar el análisis de la actividad enzimática se encuentran diferencias altamente significativas ($<0,001$) como se muestra en la (Tabla 13-3), dando valores de (máx. 15,87 U/mg prot utilizando 0,0025 mg, min. 15,09 U/mg prot utilizando 0,005mg) para la papaína, (máx. 17,66 U/mg prot utilizando 0,0025 mg, min. 15,74 U/mg prot utilizando 0,02mg) para la bromelina y para la ficina (máx. 16,19 U/mg prot utilizando 0,0025 mg, min. 14,84 U/mg prot utilizando 0,02 mg).

En estudios realizados por (Aguirre y Castillo, 2009, p.9) menciona que los análisis de la actividad enzimática con el método de coagulación de leche (Balls and Hoover), obtuvieron una gama de tiempo de coagulación con la utilización de varias concentraciones de enzima, observando que a medida que aumenta la concentración de la enzima diluida en ácido el tiempo de coagulación de la leche disminuye en los análisis realizados. Resultado que coincide con la presente investigación en lo que corresponde a la bromelina y ficina ya que a medida que va aumentando la concentración de la enzima el tiempo de coagulación va disminuyendo.

Al analizar la determinación de proteínas en la leche con el método de Kjeldahl, se obtuvo un valor de 2,92 % cumpliendo con lo establecido en la Norma Técnica Ecuatoriana (INEN 16) donde el contenido de proteína en la leche debe ser mínimo de 2,9 %, encontrándose dentro de la normativa para ser utilizada en elaboración de productos lácteos.

Tabla 13-3: Análisis de la actividad enzimática de las tres enzimas proteolíticas.

DOSIS	Cantidad						
	PAPAINA		BROMELINA		FICINA		
0,0025	15,87	c	17,66	d	16,19	d	
0,005	15,09	a	17,26	c	16,01	c	
0,01	15,42	b	16,39	b	15,42	b	
0,02	15,79	c	15,74	a	14,87	a	
EE.	0,03		0,02		0,04		
Prob.	0,001		0,001		0,001		

Realiza por: BERMEO, Josselin, 2019

Fuente: INFOSTAT, 2019

EE. error estándar

Prob $>0,05$: no existe diferencias estadísticas

Prob $<0,05$: existe diferencias significativas

Prob $<0,01$: existen diferencias altamente significativas

Medias con letras iguales en la misma fila no difieren estadísticamente de acuerdo a la prueba de Tuckey.

3.4. Análisis de los tiempos de coagulación

Al analizar los tiempos de coagulación en las diferentes enzimas utilizadas en esta investigación se pudo conocer que los mejores resultados se obtuvieron con 0,005 mg de papaína en un tiempo de 61,44 seg, 0,02 mg de bromelina en un tiempo de 73,92 seg y con 0,02 mg de ficina un tiempo de 58 seg, presentando diferencias altamente significativas como se muestra en la (Tabla 14-3) esta diferencia puede deberse a lo mencionado por (Alais, 2003, p.40) donde menciona que el tiempo de coagulación depende del volumen de cuajo como del volumen de leche a utilizar, este será medido en segundos y dependerá de la afinidad que tenga la enzima con el sustrato. Dando como mejor tiempo de coagulación a la ficina con una cantidad de 0,02 mg de enzima ya que coagula en menor tiempo de 58 segundos comparado con las otras enzimas y cantidades demostrando que es más proteolítica que la papaína y bromelina.

Tabla 14-3: Análisis de los tiempos de coagulación de los tres tipos de enzimas.

DOSIS	Cantidad					
	PAPAINA	BROMELINA	FICINA			
0,0025	76,92	c	151,2	D	84,84	b c
0,005	61,44	a	126,12	C	67,32	a b
0,01	67,32	b	90,84	B	92,4	c
0,02	75,12	c	73,92	A	58	a
EE.	0,73		0,67		5,76	
Prob.	0,001		0,001		0,001	

Realiza por: BERMEO, Josselin, 2019

Fuente: INFOSTAT, 2019

EE. error estándar

Prob >0,05: no existe diferencias estadísticas

Prob <0,05: existe diferencias significativas

Prob <0,01: existen diferencias altamente significativas

Medias con letras iguales en la misma columna no difieren estadísticamente de acuerdo a la prueba de Tuckey

3.5. Análisis de la fuerza de coagulación de la papaína, bromelina y ficina.

En la investigación realizada por (Juca, 2015, p. 59) menciona que la fuerza de coagulación para las enzimas vegetales es menor que la fuerza de coagulación de la quimosina (cuajo comercial), debido a que tiene mayor especificidad para la caseína presentando un menor tiempo de coagulación, dando concordancia a los valores obtenidos en la presente investigación, siendo los mejores resultados 0,0025 mg de papaína con 738432000 US, 0,0025 mg de bromelina con 1451520000 US, y 0,0025 mg de ficina con 814464000 US. Como se muestra en la (Tabla 15-3) presentando diferencias altamente significativas.

Tabla 15-3: Análisis de la fuerza de coagulación de los tres tipos de enzimas.

DOSIS	Cantidad					
	PAPAINA		BROMELINA		FICINA	
0,0025	738432000,00	d	1451520000,00	d	814464000,00	d
0,005	294912000,00	c	605376000,00	c	323136000,00	c
0,01	161568000,00	b	218016000,00	b	221760000,00	b
0,02	90144000,00	a	88704000,00	a	69600000,00	a
EE.	6531991,43		2920662,94		14404109,4	
Prob.	0,001		0,001		0,001	

Realiza por: BERMEO, Josselin, 2019

Fuente: INFOSTAT, 2019

EE. error estándar

Prob >0,05: no existe diferencias estadísticas

Prob <0,05: existe diferencias significativas

Prob <0,01: existen diferencias altamente significativas

Medias con letras iguales en la misma fila no difieren estadísticamente de acuerdo a la prueba de Tuckey

3.6. Análisis de las características físico químicas del queso fresco comercial y queso fresco utilizando ficina.

3.6.1. Análisis de Proteína

En el análisis del contenido de proteína en la (Tabla 16-3) se muestra diferencias significativas (<0,005) para el queso fresco comercial y el queso fresco utilizando la ficina donde nos muestran valores de proteína de (18,50 % y 9,46 %) respectivamente, comparando con la investigación realizada por (Alais, 1985), (Hekken y Farkye, 2003), (García y Islas, 2006) señalan que el porcentaje de proteína en el queso fresco está en un rango de 17 a 21 %. Donde la proteína del queso fresco comercial se encuentra dentro de lo establecido sin tener afectaciones, mientras que para el queso elaborado con ficina el porcentaje de proteína difiere notoriamente esto puede deberse a lo mencionado por (Aguirre y Castillo, 2009, p.9) donde señala que cuando existe una disminución en el porcentaje de proteína en el queso se debe a que la enzima vegetal no ha reaccionado por completo con la proteína debido a que no se ha realizado un proceso de purificación en la enzima.

Tabla 16-3: Análisis de las características físico químicas del queso (Proteína).

<i>PROTEINA</i>	Queso utilizando la enzima ficina	Queso Comercial
Media	9,46	18,50
Varianza	0,95911552	0,8114316
Observaciones	5	5
Coefficiente de correlación de Pearson	0,77680778	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	4	
Estadístico t	-31,3103971	
P(T<=t) una cola	3,1004E-06	
Valor crítico de t (una cola)	2,13184678	
P(T<=t) dos colas	6,2008E-06	
Valor crítico de t (dos colas)	2,77644511	

Realiza por: BERMEO, Josselin, 2019

Fuente: INFOSTAT, 2019

Prob >0,05: no existe diferencias estadísticas

Prob <0,05: existe diferencias significativas

Prob <0,01: existen diferencias altamente significativas

3.6.2. Análisis del pH.

Al realizar el análisis del pH en el queso fresco comercial y el queso fresco elaborado con ficina, como se muestra en la (Tabla 17-3) existen diferencias significativas (<0,005) encontrándose valores de (6,53 y 6,74) respectivamente, y que en comparación con diferentes investigaciones realizadas como los de (Alais, 1985), (Van Hekken y Farkye, 2003), (García y Islas, 2006) señalan que el pH en el queso fresco va desde (6,1 a 6,7) demostrando que la presente investigación se encuentra dentro de los rangos. Además (Antenaza, 2015, p.55) indica que algunas de las causas del descenso en el pH se atribuyen al crecimiento de bacterias sobrevivientes a la pasteurización y/o contaminación cruzada en la elaboración y almacenamiento del mismo.

Tabla 17-3: Análisis de las características físico químicas del queso (pH).

<i>pH</i>	Queso utilizando la enzima ficina	Queso Comercial
Media	6,746	6,534
Varianza	8E-05	8E-05
Observaciones	5	5
Coefficiente de correlación de Pearson	-0,0625	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	4	
Estadístico t	36,3577001	
P(T<=t) una cola	1,7082E-06	
Valor crítico de t (una cola)	2,13184678	
P(T<=t) dos colas	3,4165E-06	
Valor crítico de t (dos colas)	2,77644511	

Realiza por: BERMEO, Josselin, 2019

Fuente: INFOSTAT, 2019

Prob >0,05: no existe diferencias estadísticas

Prob <0,05: existe diferencias significativas

3.6.3. Análisis de la actividad de agua (aw).

Al realizar el análisis de la aw en los quesos frescos se encontraron diferencias significativas como se puede apreciar en la (Tabla 18-3) dando valores de 0,79 para el queso comercial y 0,78 para el queso elaborado con ficina, encontrándose dentro de los rangos sin tener mayor afectación según lo señalado por (Arévalo, 2014, p, 27) la aw varía en quesos frescos desde 0,70 a 1 por lo que el crecimiento de los microorganismos alcanza un máximo entre 0,9 y 1,0 después decrece rápidamente con la reducción de la aw.

Tabla 18-3: Análisis de las características físico químicas del queso fresco (aw).

<i>Aw</i>	Queso utilizando la enzima ficina	Queso Comercial
Media	0,7858	0,7958
Varianza	5,47E-05	0,0000137
Observaciones	5	5
Coefficiente de correlación de Pearson	0,44566229	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	4	
Estadístico t	-3,37099931	
P(T<=t) una cola	0,01400889	
Valor crítico de t (una cola)	2,13184678	
P(T<=t) dos colas	0,02801779	
Valor crítico de t (dos colas)	2,77644511	

Realiza por: BERMEO, Josselin, 2019

Fuente: INFOSTAT, 2019

Prob >0,05: no existe diferencias estadísticas

Prob <0,05: existe diferencias significativas

Prob <0,01: existen diferencias altamente significativas

3.6.4. Análisis del porcentaje de humedad

Al realizar el análisis del porcentaje de humedad en el queso fresco comercial y el queso fresco utilizando ficina no se encuentran diferencias significativas como se muestra en la (Tabla 19-3) obteniendo valores de (60,82 y 60,54) mismos que se encuentran dentro de la Norma Técnica Ecuatoriana (INEN 63) en el que el queso fresco no debe tener un porcentaje de humedad superior al 80 % donde se encuentran dentro del rangos establecidos sin tener mayor afectación.

Tabla 19-3: Análisis de las características físico químicas del queso del porcentaje de humedad.

<i>% HUMEDAD</i>	Queso utilizando la enzima ficina	Queso Comercial
Media	60,5401111	60,8221557
Varianza	13,9863871	0,61372078
Observaciones	5	5
Coefficiente de correlación de Pearson	0,28281102	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	4	
Estadístico t	-0,1753017	
P(T<=t) una cola	0,43467937	
Valor crítico de t (una cola)	2,13184678	
P(T<=t) dos colas	0,86935873	
Valor crítico de t (dos colas)	2,77644511	

Realiza por: BERMEO, Josselin, 2019

Fuente: INFOSTAT, 2019

Prob >0,05: no existe diferencias estadísticas

Prob <0,05: existe diferencias significativas

Prob <0,01: existen diferencias altamente significativas

3.7. Análisis sensorial

Al realizar el análisis de preferencia pareada para los dos tipos de quesos, tanto el queso fresco comercial como el elaborado utilizando la mejor enzima, se pudo obtener como resultado que la mayor aceptación la obtiene el queso comercial con el 100% de preferencia, como se puede observar en el Grafico 1-3.

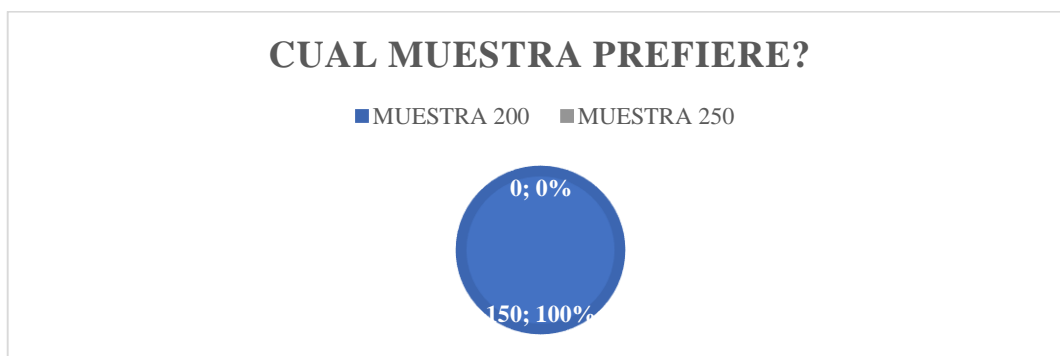


Gráfico 7-3. Análisis sensorial de preferencia: muestra 200 (queso comercial), muestra 250 (queso fresco utilizando la enzima ficina).

Realizado por: BERMEO, Josselin, 2019.

3.8. Análisis microbiológico.

Al analizar la muestra de queso fresco comercial y queso fresco utilizando la mejor enzima, se observa en la Tabla 20-3 y Tabla 21-3, no hubo existencia de Enterobacteriaceas, Echericha coli, Staphylococcus aureus, Listeria monocytogenes, Salmonela, encontrándose dentro de la Norma Técnica Ecuatoriana INEN 1528 como se señala en la Tabla 22-3 los índices máximo permisible para identifica una buena calidad y el índice máximo permisible para identificar nivel aceptable de calidad.

Tabla 20-3: Análisis microbiológico de una muestra de queso fresco comercial

Microorganismos						
Repeticiones	Enterobacteriáceas	Echericha coli	Staphylococcus aureus	Listeria monocytogenes	Salmonela	
1	0	0	0	0	Ausencia	Ausencia
2	0	0	0	0	Ausencia	Ausencia
3	0	0	0	0	Ausencia	Ausencia
4	0	0	0	0	Ausencia	Ausencia
5	0	0	0	0	Ausencia	Ausencia

Realiza por: BERMEO, Josselin, 2019

Tabla 21-3: Análisis microbiológico de una muestra de queso fresco utilizando la enzima ficina

Microorganismos						
Repeticiones	Enterobacteriáceas	Echericha coli	Staphylococcus áureos	Listeria monocytogenes	Salmonela	
1	0	0	0	0	Ausencia	Ausencia
2	0	0	0	0	Ausencia	Ausencia
3	0	0	0	0	Ausencia	Ausencia
4	0	0	0	0	Ausencia	Ausencia
5	0	0	0	0	Ausencia	Ausencia

Realiza por: BERMEO, Josselin, 2019

CONCLUSIONES

- Se determinó que el rendimiento de látex procedentes de los tres tipos de frutas para el higo es de 11,81 %, 14,69 % para la papaya y 3,89 % para la piña.
- Se evaluó el rendimiento en las tres enzimas donde el mejor rendimiento es de 18,39 g/kg para la ficina, 13,61 g/kg para la papaína y 0,75 g/kg para la bromelina.
- El mejor comportamiento enzimático y la velocidad de reacción es de 15,09 U/mg prot para la papaína con un tiempo de coagulación de 61,44min; 15,74 U/mg prot para la bromelina con un tiempo de coagulación de 73,92 min y 14,87 U/mg prot para la ficina con un tiempo de coagulación 58 min, siendo esta última la que presentó un mejor comportamiento y velocidad enzimática.
- Se analizaron los resultados físico-químicos obtenidos mediante la utilización de la ficina en la elaboración de una muestra de queso fresco en % de humedad fue de 60,54, aw 0,78 %, 9,27 % de proteína y pH 6,74, valores que en comparación con un queso fresco comercial no difieren cuantitativamente a excepción de la proteína con una diferencia de 8,86 % entre ambos.
- En el análisis sensorial el 100% de catadores prefirió el queso fresco comercial.
- En los análisis microbiológicos no se reportó presencia de microorganismos como Enterobacteriaceas, Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Listeria monocytogenes y Salmonella.

RECOMENDACIONES

- Realizar la limpieza y desinfección de la fruta para evitar contaminación en el látex y pérdidas en su actividad enzimática.
- Utilizar temperaturas de 1 a 4 °C para la preservación del látex extraído de las frutas, evitando la desnaturalización enzimática.
- Efectuar un método de purificación parcial para las enzimas vegetales, y así obtener mejores resultados en la cantidad de proteína y en sus características sensoriales.
- Desarrollar investigaciones que permitan obtener mejores condiciones en lo que se refiere a la fuerza y tiempo de coagulación, utilizando combinaciones entre las enzimas investigadas en cantidad y especie de fruta del cual proviene.

BIBLIOGRAFÍA

ABRIL TORRES, Andrea Fernanda & PILCO OROZCO Viviana Elizabeth. Calidad fisicoquímica de la leche cruda que ingresa a la ciudad de Cuenca, para su comercialización. (Tesis de Grado). Universidad de Cuenca, Facultad de Ciencias Químicas, Carrera de Bioquímica y Farmacia, Cuenca-Ecuador. 2013. pp. 20-22

ACOSTA JAYA, Rodrigo Mauricio. Estudio de la variación de la actividad enzimática proteolítica del látex del babaco (*Vasconcellea heilbornii* cv babaco) en función de la edad del fruto. [en línea] (Tesis de Grado). Escuela Politécnica Nacional, Facultad de Ingeniería Química y Agroindustria, Quito-Ecuador. 2011. p. 35. [Consulta: 09 de abril del 2019]. Disponible en: <https://bibdigital.epn.edu.ec/bitstream/15000/3924/1/CD-3656.pdf>.

AGUIRRE, Edwin, & CASTILLO, Pablo. Extracción y estudio comparativo de las enzimas proteolíticas del fruto toronche (*Carica-Stipulata*) y de la papaya (*Carica-Papaya*) y su aplicación en la industria alimentaria. [en línea] (Tesis de Grado). Escuela Superior Politécnica del Litoral, Facultad de Ingeniería Mecánica y Ciencias de la Producción, Guayaquil-Ecuador. 2009. pp. 5-8. [Consulta: 10 de abril del 2019]. Disponible en: <https://www.dspace.espol.edu.ec/bitstream/123456789/7532/1/Extraccion%20y%20Estudio%20Comparativo%20de%20las%20Enzimas%20Proteol%C3%ADticas.pdf>

ALBA CUÉLLAR, Nidia. Ciencia, Tecnología e Industria de Alimentos. 1ª. ed. Bogotá-Colombia, Grupo Latino, 2016. pp. 756-780.

ALFARO UREÑA, Yohana. Nuevo nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasa de *desulfotalea psychrophila*. [en línea] (Tesis de Grado). Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Ciencias Biológicas, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Madrid-España. 2012. p. 17. [Consulta: 17 de junio del 2019]. Disponible en: <https://eprints.ucm.es/16635/1/T33994.pdf>

ANTEZANA VÁSQUEZ, Cinthya Isabel. Efecto de la hidrólisis enzimática de la lactosa en el perfil de textura de queso fresco normal u bajo en grasa. (Tesis de Grado). Universidad Nacional Agraria la Molina, Facultad de Industrias Alimentarias. Lima-Peru. 2015. p. 29.

ARÉVALO ARÉVALO, Mirian Lorena. Determinación de la actividad de agua y pH y su relación en la actividad microbiológica de queso que se expende en el mercado central de

Machala. [en línea] (Tesis de Grado). Universidad Técnica de Machala, Unidad Académica de Ciencias Químicas y de la Salud. Carrera de Ingeniería en Alimentos. Machala-El Oro-Ecuador. 2014. pp. 22-26. [Consulta: 10 de mayo del 2019]. Disponible en: <http://repositorio.utmachala.edu.ec/bitstream/48000/2866/3/CD000003-TRABAJO%20COMPLETO-pdf>

CARRERA, Jorge Eliécer. Producción y aplicación de enzimas industriales. [en línea] (Tesis de Grado). Universidad del Cauca, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Departamento de Ingeniería Agroindustrial, Popayán-Bogotá. 2003. pp. 11-12. [Consulta: 10 de junio del 2019]. Disponible en:

https://www.academia.edu/6125354/PRODUCCION_Y_APLICACION_DE_ENZIMAS_INDUSTRIALES_PRODUCTION_AND_APPLICATION_OF_INDUSTRIAL_ENZYMES_JORGE_ELICER_CARRERA_1_PALABRAS_CLAVE_RESUMEN

CLAVIJO Diego, PORTILLA Cecilia, & QUIJANO Alfonso. Cinética de la bromelina obtenida a partir de la pina petrolera (Ananás Cosmosus) de Lebrija-Santander. [en línea] (Tesis de Grado). Universidad de Pamplona, Facultad de Ciencias Básicas, Departamento de Alimentos, Pamplona-España. 2012. pp. 41-19. [Consulta: 20 de agosto del 2019]. Disponible en: <http://132.248.9.34/hevila/BistuaPamplona/2012/vol10/no2/6.pdf>

CHIMBORAZO LÓPEZ, Cristina Lorena. Determinación de la actividad enzimática de un concentrado que contiene papaína, obtenida de la papaya (Carica-papaya), medida en soluciones proteínicas. [en línea] (Tesis de Grado). Universidad Técnica de Ambato, Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos, Carrera de Ingeniería Bioquímica, Ambato-Ecuador. 2012. p. 30-32. [Consulta: 10 de agosto del 2019]. Disponible en: <https://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/3060/1/SBQ.26.pdf>

DALGO FLORES, Violeta Maricela. Obtención de un concentrado con bromelina a partir de piña (Ananás Comosus), y determinación de su actividad enzimática en sustratos proteínicos. [en línea] (Tesis de Grado). Universidad Técnica de Ambato, Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos, Carrera de Ingeniería Bioquímica, Ambato-Ecuador. 2012. p. 27. [Consulta: 20 de abril del 2019]. Disponible en: <https://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/3061/1/SBQ.27.pdf>

ECUADOR. INSTITUTO ECUATORIANO DE NORMALIZACIÓN (INEN). Norma Técnica Ecuatoriana INEN 10. Leche pasteurizada, requisitos. 1ª ed. Quito-Ecuador. 2012. p. 2

ECUADOR. INSTITUTO ECUATORIANO DE NORMALIZACION (INEN). Norma Técnica Ecuatoriana INEN 62. Quesos Clasificación y designaciones. 1ª ed. Quito-Ecuador. INEN. 1973. p. 2

ECUADOR. INSTITUTO ECUATORIANO DE NORMALIZACIÓN (INEN). Norma Técnica Ecuatoriana INEN 337. Jugos, Pulpas, Concentrados, Néctares, Bebidas de Frutas y Vegetales, Requisitos. 1ª ed. INEN. 2008. p. 4

ECUADOR. “INSTITUTO ECUATORIANO DE NORMALIZACIÓN” (INEN). Norma Técnica Ecuatoriana INEN 1528. Norma general, para quesos no madurados, requisito. 1ª ed. INEN. 2012. p. 4

GALLARDO, Linda. Et al. Extracción de Bromelina a partir de residuos de piña. [en línea] (Tesis Posgrado), Universidad Autónoma de Puebla, Instituto de Ciencias. Puebla-México. 2008. p.1-3. [Consulta: 3 de marzo del 2019]. Disponible en: <https://www.oceandocs.org/bitstream/handle/1834/5225/1-PDF.%20Alejandro.pdf?sequence=1>

GARCÍA ALCARAZ, Víctor. Estudio del empleo de coagulantes vegetales en la elaboración de queso de cabra. [en línea] (Tesis de Grado). Universidad de Murcia, Facultad de Veterinaria, Murcia- España. 2015. p.30. [Consulta: 12 de abril del 2019]. Disponible en: <https://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/310411/TVGA.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

GARCÍA PAZMIÑO, María Eugenia. Extracción e inmovilización de enzimas proteolíticas de tres tipos de frutas mediante dos métodos y su aplicación en la industria alimentaria, en el laboratorio de biotecnología de la universidad estatal de Bolívar. [en línea] (Tesis de Grado). Universidad Estatal de Bolívar, Facultad de Ciencias Agropecuarias Recursos Naturales y del Ambiente, Escuela de Ingeniería Agroindustrial. Guaranda-Ecuador. 2013. pp.13-21. [Consulta: 17 de mayo del 2019]. Disponible en: <http://dspace.ueb.edu.ec/bitstream/123456789/927/1/062.pdf>

GONZÁLEZ BELLO, Angela Lucía. Producción de enzimas en la industria láctea (lactasa y renina). [en línea] (Tesis de Grado). Universidad Nacional Abierta y a Distancia UNAN Sede Zipaquirá, Escuela de Ciencias Básicas e Ingeniería, Facultad de Ingeniería de alimentos, Zipaquirá-Colombia. 2009. p. 125. [Consulta: 20 de abril del 2019]. Disponible en: <http://stadium.unad.edu.co/preview/UNAD.php?url=/bitstream/10596/1539/1/2009-04P-08.pdf>

GUTIÉRREZ, Geraldine, & VELÁSQUEZ, Virginia. Determinación del efecto de la maduración de la lechosa (*Carica papaya* L) sobre la concentración de papaína. [en línea] (Tesis de Grado). Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado, Programa Ingeniería Agroindustrial, Lara-Venezuela. 2018. p. 46. [Consulta: 12 de abril del 2019]. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/327142290_Purificacion_de_la_papaina_del_latex_de_la_lechosa_y_cuantificacion_de_la_actividad_enzimatica

JUCA VILLALTA, Diana Noemi. Estudio de factibilidad de la utilización de enzimas vegetales en la elaboración del queso tipos fresco. [en línea] (Tesis de Grado). Universidad del Azuay, Facultad de Ciencias y Tecnología, Escuela de Ingeniería en Alimento, Cuenca-Ecuador. 2015. pp. 28-29. [Consulta: 3 de marzo del 2019]. Disponible en: <http://dspace.uazuay.edu.ec/bitstream/datos/4897/1/11338.pdf>

LÓPEZ VILA, Rosario. Caracterización físico-química del membrillo japonés (*Chaenon Sp. Lindl*). Desarrollo fisiológico y conservación frigorífica. [en línea] (Tesis Doctoral). Universidad de Murcia, Departamento de Tecnología de Alimentos, Nutrición y Bromatología, Murcia-España. 2007, p. 23. [Consulta: 13 de marzo del 2019]. Disponible en: <https://www.tesisenred.net/handle/10803/11058;jsessionid=92B485B0D61CDDA8B1DCC4B5F8A1E142#page=1>

MAIGUA TIERRA, Ana María. Evaluación de enzimas coagulantes del estómago de conejo en la elaboración de queso fresco. [en línea] (Tesis de Grado). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Facultad de Ciencias Pecuarias, Carrera Zootecnia, Riobamba-Ecuador. 2017. p. 32. [Consulta: 25 de mayo del 2019]. Disponible en: <http://dspace.espech.edu.ec/bitstream/123456789/7094/1/17T1464.pdf>

MALLMA ÑAUPA, Aydee. Efectos del cuajo vegetal látex de higuera (*Ficus Carica* Linnaeus) en la elaboración del queso fresco. (en línea) [Tesis de Grado] Universidad Nacional José María Arguedas, Facultad de Ingeniería, Escuela Profesional de Ingeniería Agroindustrial, Andahuaylas-Perú. 2017. p. 13-15. [Consulta: 20 de marzo del 2019]. Disponible en: http://repositorio.unajma.edu.pe/bitstream/handle/123456789/250/Aydee_Tesis_bachiller_2017.pdf?sequence=3&isAllowed=y

MUNDO ZUNA, Juan Carlos. Extracción de la enzima papaína del látex de *Carica-papaya* cultivado en el país y su aplicación en cicatrices tipo queloides y verrugas. [en línea] (Tesis de Grado): Universidad de El Salvador Facultad de Química y Farmacia, San Salvador- Bolivia. 2012.

pp. 100-104. [Consulta: 20 de marzo del 2019]. Disponible en: http://ri.ues.edu.sv/2300/1/Extracci%C3%B3n_dela_enzima_papina_del_latex_de_Carica_papaya_%28payo%29_cultivado_en_el_pa%C3%ADs_y_su_aplicaci%C3%B3n_en_cicatrices_tipo_queloides_y_verrugas.pdf

NOLIVOS CARCHI, María Rebeca. Uso de cuajo vegetal (Leche de higo Verde-Ficus Carica Linnaeus) para la elaboración de queso fresco. [en línea] (Tesis de Grupo). Universidad Técnica de Ambato, Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos, Ambato-Ecuador. 2011. pp. 24-30. [Consulta: 20 de junio del 2019]. Disponible en: <https://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/3258/1/PAL262.pdf>

PACHACAMA CAIZA, Cristina Gabriela. Diseño de un proceso para la elaboración de pasta de soya hidrolizada con enzimas presentes en cascaras de piña (Ananas Commous) y papaya (Carica Papaya. [en línea] (Tesis de Grado). Escuela Politécnica Nacional, Facultad de Ingeniería Química y Agroindustria, Quito-Ecuador. 2014. pp. 48-50. [Consulta: 2 de junio del 2019]. Disponible en: <https://bibdigital.epn.edu.ec/bitstream/15000/7388/1/CD-5543.pdf>

PÉREZ, Aurora; et al. Revista Cubana de Plantas Medicinales. Actividad Proteolítica de extractos enzimáticos obtenidos de plantas de la familia Bromeliácea. [en línea], 2006, Cuba, Vol.11, N.2, p.4. [Consulta: 20 de junio 2019]. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962006000200003

PÉREZ YUSEF, Juan Pablo. Extracción de proteasas de Ulex Europaeus L. y su potencial utilización como sustituto de cuajo. [en línea] (Tesis de Grado). Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias, Escuela de Ingeniería en Alimentos, Valdivia-Chile. 2004. pp.21-22. [Consulta: 2 de junio del 2019]. Disponible en: <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2004/fap4381e/pdf/fap4381e.pdf>

PEZO SOLÍS, Katherin Abigail. Determinación de la actividad proteolítica de la enzima Bromelina Obtenida de la corteza de Annanas comosus, sobre extracto acuoso de carne. [en línea] (Tesis de Grado). Universidad de Guayaquil, Facultad de Ciencias Químicas, Modalidad Investigación. Guayaquil-Ecuador. 2018. pp. 34-35. [Consulta: 3 de agosto del 2019]. Disponible en: <http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/36132/1/BCIEQ-T0341%20Del%20Pezo%20Sol%C3%ADs%20Katherin%20Abigail.pdf>

RIVERA GUERRA, Verónica Elizabeth. Evaluación de distintos cuajos naturales y procesados (Bovinos, Ovinos y Cuy) para la realización de queso fresco. [en línea] (Tesis de Grado). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Facultad de Ciencias Pecuarias, Escuela de Ingeniería Zootécnica, Riobamba-Ecuador. 2012. p. 46. [Consulta: 3 de agosto del 2019]. Disponible en: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/1855/1/17T01083.pdf>

VEGA CAÑIZARES, Karla Alejandra. Extracción de bromelina obtenida a partir de residuos del procesamiento de piña (Ananas Comosus). [en línea] (Tesis de Grado). Escuela Politécnica Nacional, Facultad de Ingeniería Química y Agroindustria. Quito-Ecuador. 2017. pp. 19-22. [Consulta: 3 de junio del 2019]. Disponible en: <https://bibdigital.epn.edu.ec/bitstream/15000/18867/1/CD-8258.pdf>

VILLAVICENCIO MARCIAL, María Cristina. Extracción, concentración y cuantificación de la actividad enzimática de la papaína a partir de la papaya (Carica papaya). [en línea] (Tesis de Grado). Universidad Técnica de Ambato, Facultad de Ciencias e Ingeniería en Alimentos, Carrera de Ingeniería Bioquímica. Ambato-Ecuador. 2011. pp.28-30. [Consulta: 3 de junio del 2019]. Disponible en: https://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/5226/1/SBQ.16.pdf?fbclid=IwAR0quALPQRZ1tJ4CHfbF7c4F-ysXXPwCdIMNUw2Y7xGjFp_lt-xmwa0kT4.

YANZA GUANANGA, Elena Patricia. Utilización del látex de las hojas, tallo y frutos de la papaya (tipo Hawaiana) como coagulante Natural en la elaboración de queso fresco. [en línea] (Tesis de Grado). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Facultad de Ciencias Pecuarias, Escuela de Ingeniería en Industrias Pecuarias. Riobamba-Ecuador. 2010. p. 17. [Consulta: 30 septiembre del 2018]. Disponible en: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/811/1/27T0164.pdf>