

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

*Diana N. Juca-Villalta** y *Claudio E. Sánchez-Jáuregui*

Laboratorio de Biotecnología, Laboratorio de Tecnología de Lácteos, UDALAB, Facultad de Ciencia y Tecnología, Universidad del Azuay. Av. 24 de Mayo 7-77 y Hernán Malo, Cuenca, Ecuador.

E-mail: dianakue_21@hotmail.com

RESUMEN

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

Palabras clave: higo, chamburo, enzimas vegetales, queso fresco, vida útil.

ABSTRACT

Feasibility study of plant enzymes used in the production of fresh type cheese

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

Keywords: fig, mountain papaya, plant enzymes, cheese, shelf life.

INTRODUCCIÓN

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

***Diana Juca Villalta:** Graduada de Ingeniería en Alimentos (Universidad del Azuay Cuenca, Ecuador, 2015). Actualmente trabaja en la industria de lácteos, en el área de procesos de elaboración de dichos productos.

El cuajo y los coagulantes son preparaciones de enzimas proteolíticas, las cuales han sido utilizadas en la industria quesera por miles de años, siendo esta la enzima más antigua conocida. Los quesos son producidos por enzimas coagulantes de la leche de diferentes orígenes. Las enzimas activas en todos los cuajos y coagulantes, las cuales han sido utilizadas para la elaboración de quesos, son proteasas del ácido aspártico. La preparación original del cuajo, es un extracto del abomaso de rumiantes. Esta definición ha sido confirmada por la *International Dairy Federation* (IDF), que determinó que el nombre cuajo (*rennet*) debe ser reservado para la preparación de enzimas de estómagos de rumiantes y que las otras enzimas coagulantes de la leche se denominen coagulantes. Actualmente, también ha sido generalmente aceptado que la quimosina producida por un organismo modificado genéticamente (GMO) debe ser denominada quimosina producida por fermentación (FPC) (1).

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 (2). Las papayuelas de aroma contienen látex que exuda de su epicarpio al ser lacerao o punzado, este látex contiene en mayor concentración a la papaína, enzima proteolítica de acción semejante a la pepsina del jugo gástrico, característica de la familia Caricácea.

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

El queso es el producto que resulta de la precipitación de las caseínas, que deja como residuo el llamado suero de la leche. Para realizar este proceso se emplean básicamente dos métodos: por medio de la renina o cuajo, o bien, acidificar en el punto isoeléctrico de las caseínas (pH 4,6) (3). Aunque como se mencionó anteriormente, también se pueden utilizar otras enzimas como la papaína y la ficina, con el objetivo de obtener quesos con características específicas.

Durante la elaboración o almacenamiento de quesos suelen aparecer efectos positivos o negativos, de carácter organoléptico y quizá al utilizar enzimas bastante

proteolíticas como la papaína y la ficina para la coagulación de la leche, estas sean aún más probables que aparezcan, como es el caso del sabor amargo por la presencia de péptidos producidos por las enzimas vegetales antes mencionadas, que continúan hidrolizando las proteínas lácteas.

La proteólisis produce un aumento de digestibilidad, pudiendo obtenerse también péptidos "activos", con determinadas propiedades fisiológicas (4).

Diversos estudios han reportado que mediante la hidrólisis controlada *in vitro* de proteínas alimentarias es posible generar este tipo de péptidos. Se han aislado péptidos antimicrobianos principalmente a partir de hidrolizados enzimáticos limitados, de proteínas de origen animal como la leche, el huevo y algunas especies marinas de peces. Recientemente se han aislado hidrolizados limitados, con grados menores al 10 % de proteínas de origen vegetal como la soya y el maíz (5). Los péptidos con actividad antimicrobiana inhiben el crecimiento antibacteriano y fúngico, actúan frente a bacterias gran positivas y gran negativas.

El objetivo de este trabajo fue evaluar las características físico-químicas y sensoriales del queso tipo fresco, elaborado con extractos enzimáticos vegetales extraídos a partir de higo (*Ficus carica* L, *moraceae*) y chamburo (*Vasconcellea cundinamarcensis* Badillo, *caricaceae*), a fin de determinar la vida útil y estandarizar su adición durante la elaboración de quesos fresco.

MATERIALES Y MÉTODOS

La leche utilizada para el desarrollo de este trabajo fue analizada y contó con los estándares de calidad indicados (6).

Los frutos utilizados para la extracción de las enzimas papaína y ficina, fueron el chamburo y higo el respectivamente, en estado inmaduro para obtener mayor cantidad de látex fluido. Se deshidrató el látex a 40 °C y se preparó una solución con látex deshidratado en fosfato de sodio (5 mM y pH 7,5) a una concentración del 0,5 %, se dejó macerar durante 24 h para luego centrifugar a 2700 g durante 10 min, desechando finalmente los sólidos para tener una solución denominada extracto acuoso. Para obtener el extracto semipurificado de enzimas se utilizó el método de precipitación con disolvente orgánico para

obtener enzimas con mayor poder proteolítico (7): se tomaron 250 mL de extracto acuoso y se adicionaron 12,5 mL de NaCl 4 M, luego se homogenizó y se añadieron 500 mL de etanol al 96 %, se mezcló lentamente para evitar desnaturalización y se centrifugó a 2700 g durante 5 min, se desechó el sobrenadante y el extracto semiseco se resuspendió en NaCl al 13 %, para obtener una solución de proteína al 25 %.

Para la determinación de la fuerza de coagulación se utilizó el método Soxhlet que dice: "la fuerza F representa el número de volúmenes de leche coagulados por un determinado número de volúmenes de cuajo, en 40 min a 35 °C" (8). En un vaso de precipitación se colocaron 25 ml de leche previamente pasteurizada y se calentó hasta una temperatura de 40 °C, a continuación se adicionó cloruro de calcio 0,7 g/L y se ubicó en un baño maría a 35 °C, se agregó 0,5 mL de solución de proteínas del higo, se controló el tiempo que tardó en coagular la leche para de esta manera calcular la fuerza de coagulación de la solución enzimática. El mismo procedimiento se realizó para determinar la fuerza de coagulación de la solución enzimática de chamburo, así como del cuajo comercial quimosina CHY-MAX II que se utilizó como muestra testigo.

A continuación se desarrolló la fórmula base para la elaboración del queso, esto consistió en adicionar a la leche cantidades iguales de las dos enzimas he ir variando el volumen para que mediante pruebas de aceptabilidad se pueda determinar cuál de las mezclas es la mejor. Para mejorar la aceptabilidad del producto se utilizó un diseño factorial 2^3 (9), en este caso el nivel mínimo fue de 1,2 y el máximo de 1,8 para las dos enzimas estudiadas y de 40 min como mínimo y de 60 min como máximo para el caso del tiempo.

Para determinar el tiempo de vida del producto se utilizó el método a tiempo real (10). Se almacenaron los quesos entre 2 y 4 °C durante cuatro semanas y se tomaron muestras representativas una vez cada semana, para realizar los análisis sensoriales, químicos y microbiológicos. Los análisis sensoriales fueron hechos por 10 catadores entrenados, una vez por semana durante las cuatro semanas de almacenamiento del producto. Para esto se utilizaron fichas de cata que evaluaron las características olfato-gustativas y de textura.

Para el caso de los análisis químicos y microbiológicos se realizaron los que indica la norma INEN (6), con los métodos señalados en dicha norma.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para el caso de los frutos de chamburo se obtuvo un promedio de 0,5 a 1 g de látex fluido, mientras que los higos aportaron un promedio de 0,1 mL de látex fluido. Para ambos casos la cantidad de látex extraído están directamente relacionados con el tamaño de los frutos, debido a que en frutos más grandes se encontrará mayor cantidad de látex. En cuanto a la cantidad de látex deshidratado, se obtuvo un promedio de 0,05 a 0,1 g en ambos casos (Tabla 1).

La semipurificación revela que se obtiene de 3 a 5 g de enzima semiseca, dando un rendimiento cercano a los 75 a 85 %, teniendo en cuenta que aún pueden existir proteínas distintas a las proteolíticas pero en cantidades mínimas (Tabla 2).

En la Tabla 3 se observa que la fuerza de coagulación para las enzimas vegetales es menor que la fuerza de cuajo de la quimosina (cuajo comercial), debido a que la quimosina comercial tiene mayor especificidad para la caseína, además tiene una purificación alta; al hacer las pruebas esta coagula en menor tiempo que las enzimas vegetales.

En cuanto a la fórmula base, se determinó que la que tiene mayor aceptación es la mezcla de 1,5 mL de papaína y 1,5 mL de ficina con 50 min de tiempo de coagulación (Tabla 4). En base a estos datos se realizó el diseño experimental, luego de haber realizado todos los experimentos se realizaron pruebas de cata para determinar cuál es el mejor experimento. Para el análisis y determinación de vida útil se seleccionó el producto con mayor aceptación, en este caso el experimento # 7 tiene el porcentaje de aceptación mayor como se especifica en la Tabla 5.

El análisis de los datos demuestran que las variables que tienen mayor significación sobre las características organolépticas son: la combinación de enzimas papaína-ficina (AB), la papaína (A) y la combinación ficina-tiempo (BC); en el caso de AB tiene una significación negativa, por lo tanto no se debe incrementar el volumen de esta mezcla. De igual manera A también afecta de manera negativa al producto y solo BC tiene una significación positiva (Fig. 1).

En el caso del rendimiento, las variables que mayor significación tienen sobre esta característica son las combinaciones binarias de papaína-ficina (AB), papaína-tiempo (AC) y ficina-tiempo (BC).

Tabla 1. Rendimiento y porcentaje de humedad del higo y el chamburo

Fruta	Látex fluido (g)	Látex seco (g)	Humedad (%)	Rendimiento (%)
Chamburo	1,24	0,10	92,1	7,8
	0,55	0,05	90,9	9,1
	0,44	0,03	92,2	7,8
	0,61	0,05	91,6	8,4
Higo	0,21	0,06	70,3	29,2
	0,25	0,07	70,4	29,6
	0,38	0,11	71,4	28,6
	0,53	0,15	71,5	28,5

Tabla 2. Rendimiento de la semipurificación de las enzimas

Fruta	Látex seco en solución (g/250 mL)	Enzima semipurificada (g)	Enzima seca (g)	Humedad (%)	Rendimiento (%)
Chamburo	1,25	4,97	1,19	75,9	95,5
	1,25	4,22	1,01	75,9	81,1
	1,25	3,64	0,94	74,1	75,4
	1,25	4,59	1,06	76,9	84,4
Higo	1,25	3,63	1,09	70,1	87,1
	1,25	3,57	1,07	69,9	85,8
	1,25	3,67	1,06	71,1	85,1
	1,25	2,68	0,84	68,6	67,3

Tabla 3. Fuerza de cuajo (F) de papaína (chamburo), ficina (higo) y quimosina (cuajo comercial)

Enzima	Leche (mL)	Enzima (mL)	Tiempo de coagulación (s)	F (mL leche/mL enzima)
Papaína	25	0,5	60	2000
Ficina	25	0,5	30	4000
Quimosina	25	0,5	9	13333,33

Tabla 4. Rendimiento y aceptación del queso elaborado con enzimas vegetales en la elaboración de la fórmula base

Experimento	Papaína (mL)	Ficina (mL)	Leche (L)	Tiempo (min)	Masa de queso (g)	Aceptación (%)
1	0,5	0,5	2	No coaguló	Descartado	Descartado
2	0,5	0,5	2	No coaguló	Descartado	Descartado
3	1	1	2	90	194,9	30
4	1	1	2	85	230	32
5	1,5	1,5	2	70	307	51
6	1,5	1,5	2	50	250	55

Las dos primeras tienen significación negativa, es decir afectan de manera negativa al rendimiento; en cuanto a la combinación BC, esta influye de manera positiva (Fig. 2); entonces para no afectar las características organolépticas ni el rendimiento se debería disminuir el volumen de papaína (A) y mantener el resto de variables.

En la determinación de vida útil en cuanto a sus características físico-químicas (Tabla 6) no hay diferencias significativas entre el queso elaborado con enzimas vegetales (papaína-ficina) y el queso elaborado con cuajo comercial (quimosina).

Tabla 5. Experimento con mayor porcentaje de aceptación y rendimiento en función de sus características organolépticas y peso respectivamente

Experimento	A	B	C	AB	AC	BC	ABC	Características organolépticas %	Peso (g)	Rendimiento %
1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	70,9	365,6	13,8
2	1	-1	-1	-1	-1	1	1	68,9	338,7	12,8
3	-1	1	-1	-1	1	-1	1	70,3	334,9	12,6
4	1	1	-1	1	-1	-1	-1	66	331,4	12,5
5	-1	-1	1	1	-1	-1	1	67,2	312,3	11,8
6	1	-1	1	-1	1	-1	-1	68,8	353,7	13,4
7	-1	1	1	-1	-1	1	-1	72,2	374,4	14,2
8	1	1	1	1	1	1	1	69,1	347,5	13,1

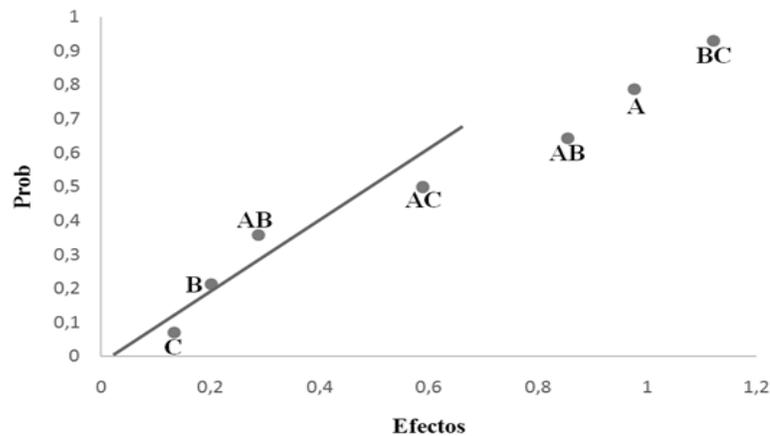


Fig. 1. Efecto de las variables sobre las características organolépticas del queso.

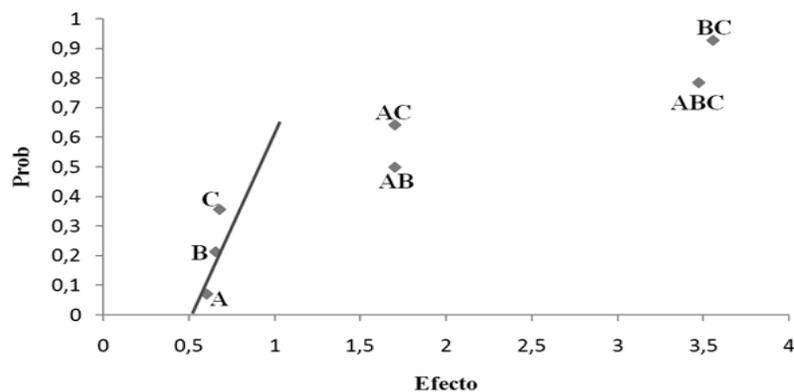


Fig. 2. Efecto de las variables y su combinación, sobre el porcentaje de rendimiento del queso.

En referencia a las características microbiológicas, el queso elaborado con enzimas vegetales (Tabla 7) presenta menor presencia de microorganismos que el queso elaborado con cuajo comercial (Tabla 8) durante el tiempo de almacenamiento; esto probablemente debido a la presencia de péptidos amargos producidos por la hidrólisis de la caseína por parte de las enzimas vegetales.

el crecimiento de enterobacterias (Fig. 3) y *Staphylococcus aureus* (Fig. 4) demuestran la disminución de bacterias que existe en el queso elaborado con enzimas vegetales en comparación con el queso comercial hecho con quimosina. En las características organolépticas el producto elaborado con las enzimas estudiadas tiene características propias en comparación

Tabla 6. Análisis bromatológicos

Semana	Quimosina	Papaína-Ficina	Quimosina	Papaína-Ficina
	Grasa (%)		Humedad (%)	
1	24	23	55,52	56,91
2	24	23	55,89	57,12
3	24	22,5	55,99	57,36
4	23,5	22,5	56,19	58,14

Tabla 7. Análisis microbiológicos del queso con enzimas vegetales durante cuatro semanas

Semana	<i>Enterobacteriaceas</i> UFC/g	<i>Escherichia Coli</i> UFC/g	<i>Staphylococcus Aureus</i> UFC/g	<i>Listeria Monocytogenes</i> en 25 g	<i>Salmonella</i> en 25 g
1	31x10 ¹	Ausencia	18x10 ¹	Ausencia	Ausencia
2	37x10 ¹	Ausencia	22x10 ¹	Ausencia	Ausencia
3	26x10 ²	Ausencia	41x10 ¹	Ausencia	Ausencia
4	28x10 ³	Ausencia	63x10 ²	Ausencia	Ausencia

Tabla 8. Análisis microbiológicos del queso comercial durante cuatro semanas

Semana	<i>Enterobacteriaceas</i> UFC/g	<i>Escherichia Coli</i> UFC/g	<i>Staphylococcus Aureus</i> UFC/g	<i>Listeria Monocytogenes</i> en 25 g	<i>Salmonella</i> en 25 g
1	32x10 ¹	Ausencia	20x10 ¹	Ausencia	Ausencia
2	46x10 ¹	Ausencia	21x10 ¹	Ausencia	Ausencia
3	18x10 ³	Ausencia	13x10 ²	Ausencia	Ausencia
4	13x10 ⁴	Ausencia	15x10 ³	Ausencia	Ausencia

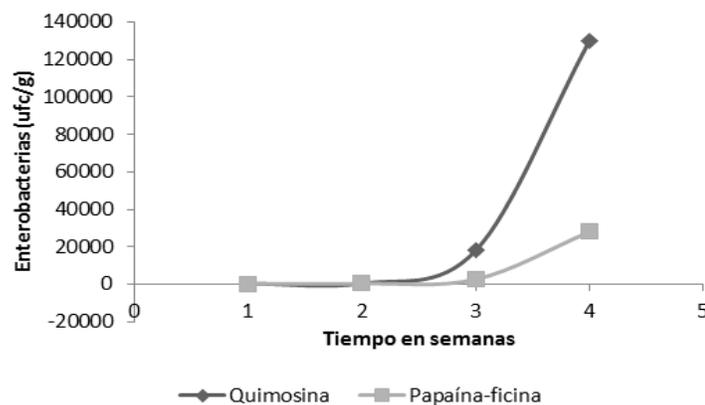


Fig. 3. Crecimiento de enterobacterias en quesos, quimosina vs papaína-ficina.

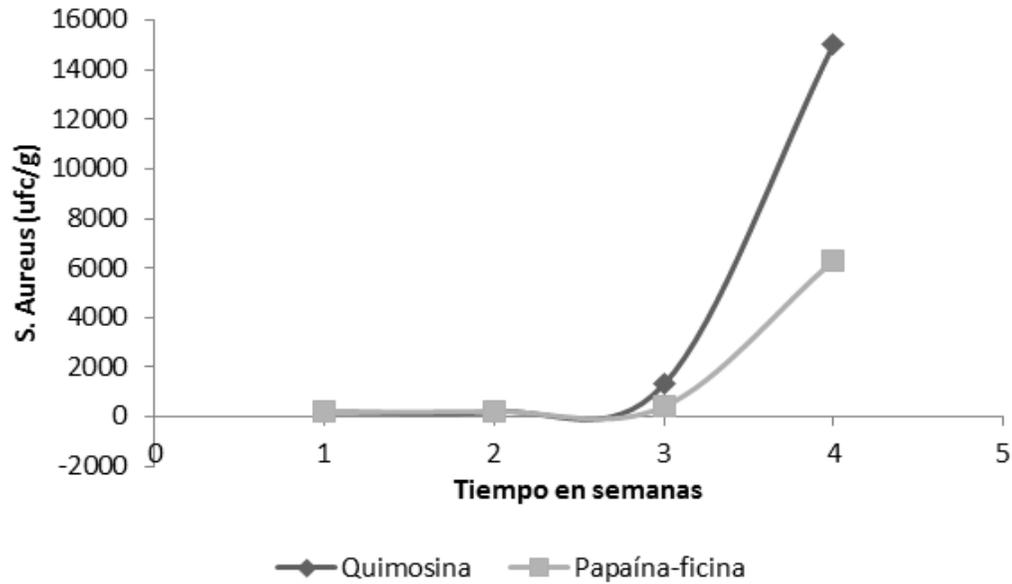


Fig. 4. Crecimiento de *Staphylococcus aureus* en quesos, quimosina vs papaína-ficina.

con el producto elaborado con cuajo comercial, pero durante el tiempo de almacenamiento el queso elaborado con quimosina mantiene sus características organolépticas y su aceptación no tiene gran variación (Fig. 5), mientras que el queso en estudio pierde mayor aceptación por la presencia de sabores amargos (Fig. 6).

En definitiva el queso elaborado con enzimas vegetales tiene menor tiempo de vida útil que un queso elaborado con quimosina, pero que podría alargarse con la sustitución parcial del cuajo comercial por las enzimas vegetales, además que estas ayudarían a evitar la proliferación de microorganismos indeseables, alargando aún más su vida en estante.

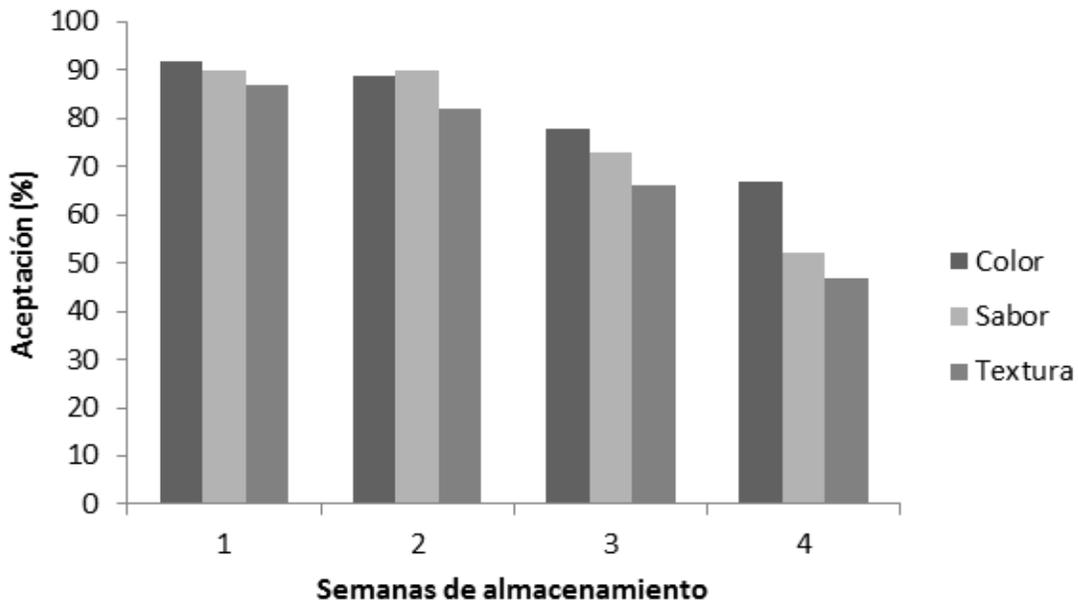


Fig. 5. Nivel de aceptación en función del tiempo de almacenamiento, para el queso elaborado con quimosina.

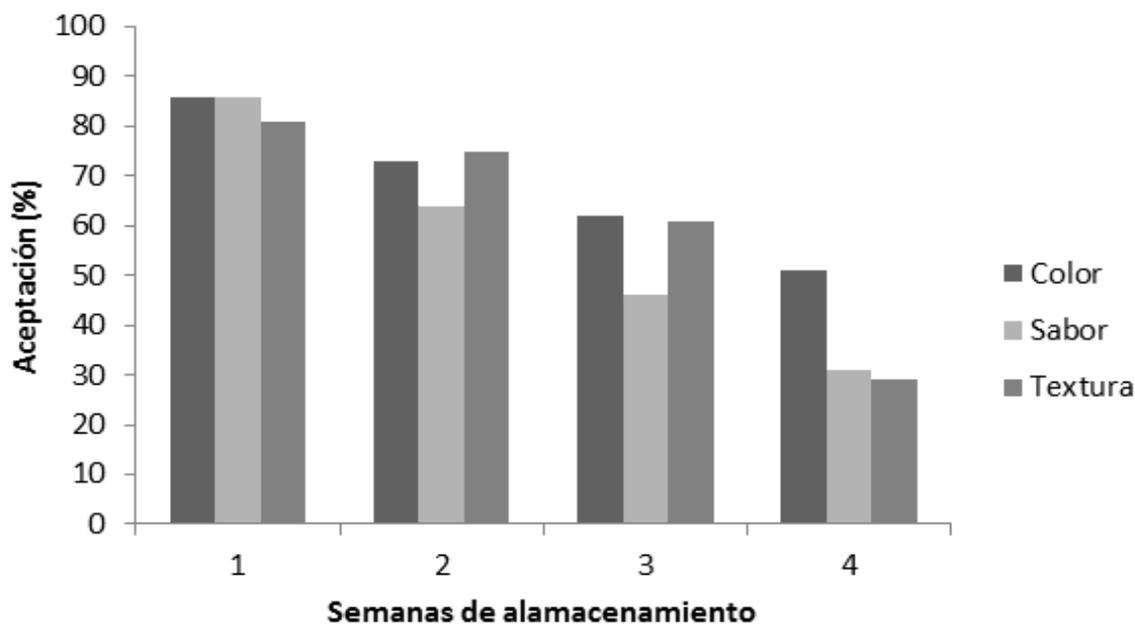


Fig. 6. Nivel de aceptación en función del tiempo de almacenamiento, para el queso elaborado con papaína-ficina.

CONCLUSIONES

La utilización de enzimas vegetales (Papaína-Ficina) para la producción de queso fresco, le da un tiempo aproximado de vida útil de tres semanas almacenado a 4 °C; además de beneficiarse con características propias que son aportadas por las enzimas vegetales.

REFERENCIAS

1. CHR Hansen. *Industria Alimenticia* [en línea]. Consultado 5 octubre 2014 en <http://www.industriaalimenticia.com/articulos/83036-enzimas-coagulantes>
2. Instituto Politécnico Nacional. *Determinación de enzimas proteolíticas en higo* [en línea]. Consultado 5 octubre 2014 en <http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:lpuBSwakJj0J:www.respyn.uanl.mx/especiales/2006/ee-14-2006/documentos/Art80.pdf+&cd=1&hl=en&ct=clnk&gl=ec>
3. Badui-Dergal, S. *Química de los Alimentos*. 4ta ed. Mexico D.F., Pearson Educación de Mexico, S.A. de C.V., 2006.
4. Gregory III, J. *Química de los Alimentos*. S. Damodaran, K.L. Parkin. (Eds.). Zaragoza, Acribia, 2010.
5. Dubin, A.; Mak, P.; Dubin, G.; Rzychon, M.; Stec, J.; Wladyca, B. *New Generation of peptide antibiotics* [en línea]. Consultado 5 octubre 2014 en http://www.actabp.pl/pdf/3_2005/633.pdf.
6. NTE INEN 1528. *Norma general para quesos frescos no madurados. Requisitos*. Ecuador, 2012.
7. Álvaro, T.; Uzcátegui, E. y Muñoz, R. *Investigación de una proteasa aislada de babaco Carica pentagona H.57*. Quito, Escuela Politécnica Nacional, 2002.
8. Alba-Cuéllar, N. *Ciencia Tecnología e Industria de los Alimentos*. Bogotá, Grupo Latino editores, 2008.
9. Gutiérrez-Pulido, H. y De la Vara-Salazar, R. *Análisis y Diseño de Experimentos*. 3ra ed. México D.F., Mc Graw Hill/ Interamericana editores, S.A. de CV., 2012.
10. Restrepo, A.F. y Montoya-Gómez, C.A. *Implementación y diseño de procedimiento para determinación de vida útil de queso fresco, chorizos frescos y aguas en bolsa* [en línea]. Consultado 26 enero 2015 en <http://repositorio.utp.edu.co/dspace/bitstream/11059/1787/1/6640286R436.pdf>