



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
"ANTONIO NARRO"**

DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL.



CONSEJO ESTATAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA

**Obtención y Caracterización de Proteasas
con Aplicación en la Industria Quesera
a Partir del Cardo (*Cynara cardunculus L.*).**

Por:

FRANCISCO HERNÁNDEZ CENTENO.

TESIS

**Presentada como Requisito Parcial para Obtener el
Título de:**

INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS.

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.

Enero de 2004.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA "ANTONIO NARRO"

División de Ciencia Animal

Departamento de Nutrición y Alimentos

**Obtención y Caracterización de Proteasas
con Aplicación en la Industria Quesera
a Partir del Cardo (*Cynara cardunculus L.*).**

Por:

Francisco Hernández Centeno.

TESIS

Que somete a consideración del H. Jurado Examinador, como requisito parcial
para obtener el título de **Ingeniero en Ciencia y Tecnología de Alimentos.**

Aprobada por:

M. C. María Hernández González.
Presidente del jurado

M. C. Oscar Noé Reboloso Padilla.
Sinodal

Ph. Dr. Anna Iliná.
Sinodal

M. C. Xóchitl Ruelas Chacón.
Sinodal

M. C. Ramón F. García Castillo.
Coordinador de la División de Ciencia Animal

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México,
Enero de 2004.

MENSAJE

“NO QUIERO SER UNO MÁS”

No quiero ser uno más;
quiero ser una cumbre
que muy alto se eleve
y con su pico el cielo toque.

Quiero ser águila real
y extender mis alas,
para así poder alcanzar
los más lejanos horizontes.

O quizá paloma blanca
para llevar esperanzas
a todos los rincones
donde haya tristezas.

No quiero ser uno más;
quiero ser sol brillante
que se levante de mañana
y desplace a las sombras.

Quiero ser lucero
que con su presencia
anuncie siempre la llegada
de un nuevo y bello día.

O quizá cometa viajero
que se acerque a veces
para ser observado
y augurar cosas buenas.

No quiero ser uno más;
no quiero ser una estrella fugaz
que con su luz ilumine
sólo un momento de existencia.

O como gota de lluvia
que cae de la nube entre mil
y que al quedar en la hoja
en un instante muera.

No quiero ser un minuto
que se va y no regresa,
que solo vive lo que dura
y que pasa de fría manera.

Mil batallas he ganado;
no quiero ser una derrota
que me humille y avergüence
ante el juez del destino.

No quiero ser uno más;
no quiero ser flor marchita
que se deshoje poco a poco
y al final quede desnuda.

Quiero ser el triunfador
y quedarme con la victoria,
quiero ser diamante perfecto;
¡No quiero ser uno más!...

Francisco Hernández Centeno

AGRADECIMIENTOS

A **Dios**, cuya bondad y misericordia infinita ha permitido mi existencia en este espacio – tiempo.

A mi **Alma Mater**, por brindarme la oportunidad de alcanzar un sueño que ni en mi imaginación existió en determinado momento de mi pasado.

A **mi familia**, cuya confianza en el esfuerzo desarrollado permitió el alcance de la meta que hoy cruzo.

A la **M. C. María Hernández González**, por haber aceptado dirigir el presente trabajo y por su gran y desinteresada amistad a lo largo de los últimos años.

Al **M. C. Oscar Noé Reboloso Padilla** y la **M. C. Xóchitl Ruelas Chacón** por su apoyo a lo largo de mi formación profesional y por el interés puesto en el desarrollo de este proyecto. Y a la **Dra. Anna Iliná**, por aceptar ser parte del jurado evaluador de la presente.

Al **Consejo Estatal de Ciencia y Tecnología (COECyT)**, por el apoyo económico para el desarrollo del presente trabajo a través del programa de Becas Tesis de Licenciatura (edición Julio – Diciembre de 2003) y la confianza depositada en un servidor para llevarlo a cabo.

A la **Lic. Norma E. Sánchez García**, porque sin su apoyo moral y consejos al inicio de este caminar, quizá nunca hubiera cruzado la meta.

A los maestros y personal del Departamento de Nutrición y Alimentos: **M. Ed. y Méd. Ma. De Lourdes Morales Caballero, Lic. Laura Olivia Fuentes Lara, Q.F.B. Antonio F. Aguilera Carbó**, por sus valiosos consejos durante mi formación como profesionista, pero sobre todo por la amistad desinteresada que me profesaron; a la secre **Rocío** y al **T.L.Q. Carlos**, por la atención, el apoyo y amistad brindada desde que los conocí.

A la **T.L.Q. Chacha, Ing. Lulú** y la **Q. F. B. Carmen Julia** por poner siempre en mi pensamiento ideales de superación y por su gran amistad.

A la secre **Gaby**, encargada de la carrera en el Depto. de Control Escolar hasta Noviembre de 2003, por el apoyo brindado a lo largo de mi estancia en la UAAAN.

A los departamentos de: **Nutrición y alimentos** (Lab. de Nutrición), **Parasitología** (Lab. de Parasitología Molecular), **Botánica** (Herbario), **Ciencias Básicas** (Lab. de Apoyo a la Investigación), **Producción Animal** (Lab. de Producción Animal) y el **C. C. D. T. S.** (Lab. de Ensayo de Semillas) de esta Universidad por las facilidades otorgadas para la elaboración de la presente investigación.

A todos los **docentes** que dieron forma a esta vasija de barro que, aunque humilde, brinda un servicio a quien lo tome de manera adecuada; por los buenos consejos y los malos ejemplos que muchos de ellos me brindaron, pues gracias a ello me fue posible forjar mi sentido de ética profesional y personal frente al comportamiento que se debe tener ante la vida.

DEDICATORIAS

A **Dios**, por permitirme concluir esta etapa de mi vida con más que éxito: Tú lo hiciste posible, Señor.

A mis padres:

**Sr. Francisco Hernández García
Sra. Ma. Juana Centeno Maldonado**

Y a mis hermanos:

Juan José, Carlos Eduardo y Ricardo.

Todos ellos me han enseñado a valorar la vida y a cada persona con sus cualidades y defectos: los amo a todos.

A mis **Abuelos, tíos y primos maternos y paternos**, porque siempre confiaron en que lograría alcanzar esta meta.

A mis **amigos y compañeros**: Checco, Conchis, Machuca, Fajardo, Tamba, Zac, Bey, Javier, Ramiro, Gladys, Juan, Nemecio, Rafael Imir, Martha, Nancy, Nely I., Loreli Larissa, José Carlos, Rubén Darío, Carmen G., Carmen D., Eduardo, Ulises; Juan Manuel, Daniel, Luis Arturo, y demás compañeros de la generación XCVIII; Patricia, Julio y demás compañeros de la generación C; Perla, Luis, Elena, Sarahí, y demás compañeros de la generación CII; Emilio, Romeo, Juan, Bety, y demás compañeros de la generación CIV; a mis demás amigos: Laura, Lupita, Juanita, Reina, Bety, Pishus, C.K., Fer, Pedro, Leobardo, Gildardo, Gustavo, Jacob y los que me falten. Todos ellos me han enseñado a ignorar la soledad y el aislamiento personal del cual fui presa en el inicio de este caminar, por la confianza depositada en mi y por valorarme como persona.

ÍNDICE GENERAL

MENSAJE	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
DEDICATORIAS	vi
ÍNDICE GENERAL	vii
ÍNDICE DE CUADROS	xi
ÍNDICE DE FIGURAS	xii
RESÚMEN	xiii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1. Definición de “queso”.....	3
2.2. Breve historia del queso.....	3
2.3. La coagulación de la leche.....	5
2.3.1. Definición de “leche para consumo humano”.....	6
2.3.2. Propiedades físico – químicas de la leche.....	6
2.3.3. Las proteínas de la leche.....	7
2.3.3.1. Caseínas.....	7
2.3.3.2. Las proteínas séricas.....	9
2.3.4. Tipos de coagulación de la leche.....	9
2.3.4.1. Coagulación por presencia de sales en alta concentración.....	10
2.3.4.2. Coagulación ácida.....	10
2.3.4.3. Coagulación por acción de enzimas.....	11
2.3.4.3.1. Fase enzimática.....	12
2.3.4.3.2. Fase de coagulación.....	13
2.3.5. Factores que intervienen en la coagulación de la leche.....	14
2.3.5.1. pH.....	14
2.3.5.2. Temperatura.....	14
2.3.5.3. Disponibilidad de Calcio.....	15
2.3.5.4. Concentración de la enzima.....	15
2.3.5.5. Concentración del sustrato.....	16
2.3.6. Las enzimas de origen vegetal.....	16

2.3.6.1. Ventajas del uso de las enzimas de origen vegetal.....	17
2.3.6.2. Desventajas del uso de enzimas vegetales.....	20
2.4. El cardo (<i>Cynara cardunculus L.</i>).....	20
2.4.1. Descripción botánica.....	21
2.4.2. Historia y antecedentes de investigación del uso del cardo (<i>Cynara cardunculus L.</i>) en la elaboración de queso.....	22
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	28
3.1. ETAPA 1: Recolección y conservación del material biológico.....	28
3.2. ETAPA 2: Determinación de la parte de la planta con actividad proteolítica.....	30
3.2.1. Determinación de pH de las diferentes partes de la planta.....	30
3.2.2. Técnica para la extracción de la enzima.....	31
3.2.3. Determinación de la concentración de proteína (método Bradford)....	32
3.2.4. Pruebas de coagulación en fresco.....	33
3.3. ETAPA 3: Extracción y purificación de la fracción enzimática a partir de flor.....	34
3.3.1. Técnica para la extracción y fraccionamiento de las proteínas presentes.....	34
3.3.2. Diálisis.....	35
3.3.3. Cromatografía de intercambio iónico.....	37
3.4. ETAPA 4: Caracterización cinética del extracto enzimático purificado.....	38
3.4.1. Evaluación de la actividad proteolítica del extracto enzimático Purificado.....	38
3.4.2. Caracterización cinética.....	39
3.4.2.1. Determinación del coeficiente de extinción molar (ϵ) del sustrato específico (κ -caseína).....	39
3.4.2.2. Determinación de parámetros cinéticos.....	40
3.5. ETAPA 5: Evaluación y aplicación práctica del extracto enzimático en la tecnología quesera.....	41
3.5.1. Determinación de la fuerza de cuajo.....	42
3.5.2. Aplicación práctica del extracto parcialmente purificado (dializado) en la tecnología quesera.....	43

IV. RESULTADOS	44
4.1. ETAPA 1: Recolección y conservación del material biológico	44
4.2. ETAPA 2: Determinación de la parte de la planta con actividad Proteolítica	44
4.2.1. Determinación de pH de las diferentes partes de la planta.....	44
4.2.2. Técnica para la extracción de las proteínas.....	45
4.2.3. Determinación de la concentración de proteína (método Bradford)....	46
4.2.4. Pruebas de coagulación en fresco.....	46
4.3. ETAPA 3: Extracción y purificación de la fracción con actividad enzimática a partir de flor	47
4.3.1. Técnica para la extracción de la enzima.....	48
4.3.2. Diálisis.....	48
4.3.3. Cromatografía de intercambio iónico.....	51
4.4. ETAPA 4: Caracterización cinética del extracto enzimático purificado	52
4.4.1. Evaluación de la actividad proteolítica del extracto enzimático Purificado.....	52
4.4.2. Caracterización cinética.....	53
4.5. ETAPA 5: Evaluación y aplicación práctica del extracto enzimático en la tecnología quesera	55
4.5.1. Determinación de la fuerza de cuajo.....	55
4.5.2. Aplicación práctica del extracto parcialmente purificado (dializado) en la tecnología quesera.....	55
V. DISCUSIÓN	58
5.1. Recolección y conservación del material biológico.....	58
5.2. Determinación del pH de las partes de la planta.....	58
5.3. Extracción.....	59
5.4. Purificación.....	60
5.5. Evaluación del extracto ezimático.....	61

VI. CONCLUSIONES	64
VII. ANEXOS	66
7.1. Características de la renina.....	66
7.2. Características geográficas del lugar de recolección.....	67
7.2.1. Localización.....	67
7.2.2. Orografía.....	67
7.2.3. Hidrografía.....	67
7.2.4. Clima.....	68
7.2.5. Flora y fauna.....	68
7.2.6. Clasificación y uso del suelo.....	68
7.3. Algunas condiciones climatológicas de Portugal.....	69
7.4. Diferencias morfológicas entre diversos ejemplares caracterizados como <i>Cynara cardunculus L.</i>	70
7.5. Técnicas auxiliares utilizadas durante la realización del trabajo experimental.....	71
7.5.1. Preparación de soluciones Buffer.....	71
7.5.2. Determinación de sulfatos.....	73
7.5.3. Preparación del azul de Coomassie.....	73
7.5.4. Tecnología de elaboración de queso asadero (o de pasta hilada).....	74
7.5.5. Tecnología de elaboración de queso fresco molido.....	75
7.6. Contenido de aminoácidos de la κ -caseína.....	75
VIII. BIBLIOGRAFÍA CONSULTADA	77
IX. REFERENCIAS DE INTERNET	84

INDICE DE CUADROS

Cuadro No.	Pág.
CUADRO 1: Plantas productoras de enzimas útiles para la coagulación de la leche.....	17
CUADRO 2: Clasificación botánica del Cardo según Merops (2003).....	22
CUADRO 3: Condiciones de empleo del coagulante empleado en la producción de los distintos lotes de queso Serpa en Portugal....	27
CUADRO 4: Concentraciones de sulfato de amonio utilizadas para precipitar Proteínas, solubilizadas en búfer fosfatos, de la flor de cardo (<i>C. cardunculus L.</i>).....	35
CUADRO 5: Valores de pH de cada parte de la planta.....	45
CUADRO 6: Contenido de proteína en las diversas partes de la planta.....	46
CUADRO 7: Pruebas de coagulación en fresco.....	47
CUADRO 8: Actividad proteolítica de las diferentes fracciones proteínicas de la flor del cardo (<i>C. cardunculus L.</i>).....	48
CUADRO 9: Detección espectrofotométrica de sulfato de amonio en solución saturada por la técnica de Bradford.....	49
CUADRO 10: Determinación de proteína por método de Bradford en extracto enzimático precipitado de flor antes y después de la purificación por diálisis.....	49
CUADRO 11: Pruebas de coagulación en fresco para demostrar el efecto de la concentración del sulfato de amonio en la coagulación de leche fresca.....	50
CUADRO 12: Contenido de proteína en la fracción de purificación por intercambio iónico.....	51
CUADRO 13: Contenido de proteína en 2ª fracción de purificación por intercambio iónico (lavado final de columna).....	51
CUADRO 14: Evaluación del proceso de purificación de la proteasa del cardo (<i>C. cardunculus L.</i>).....	53
CUADRO 15: Fuerza de cuajo de las fracciones cruda y dializada.....	55
CUADRO 16: Volúmenes de soluciones concentradas A y B y pH que se obtiene.....	72
CUADRO 17: Contenido de aminoácidos en la k caseína (número de aminoácidos en la molécula de proteína).....	76

INDICE DE FIGURAS

FIGURA No.	Pág.
FIGURA 1: El cardo (<i>Cynara cardunculus L.</i>).....	21
FIGURA 2: Capítulos florales del Cardo.....	27
FIGURA 3: Área geográfica de recolección de las diferentes partes de la planta [cardo (<i>C. cardunculus L.</i>)].....	29
FIGURA 4: Arreglo gráfico de Lineweaver - Burk para la ecuación de Michaelis – Menten.....	41
FIGURA 5: Concentración de proteína en extracto precipitado con acetona y con sulfato de amonio y resuspendido en igual volumen de diluyente.....	45
FIGURA 6: Comportamiento de la formación de macropéptido durante la reacción con extracto dializado a pH 6.6.....	52
FIGURA 7: Comportamiento de la formación de macropéptido durante la reacción con extracto enzimático purificado a pH 6.6.....	53
FIGURA 8: Arreglo gráfico de Lineweaver - Burk para la proteasa del cardo...	54
FIGURA 9: Queso fresco molido.....	56
FIGURA 10: Queso asadero (o de pasta hilada).....	56
FIGURA 11: Diferentes ejemplares morfológicamente diferentes clasificados como <i>Cynara cardunculus L.</i>	70

RESUMEN

La presente investigación se realizó con el objetivo de obtener y caracterizar un posible sucedáneo del cuajo animal, que tradicionalmente es utilizado en la manufactura de quesos. La fuente utilizada es una maleza: el cardo (*Cynara cardunculus L.*), cuyas flores se utilizan para el mismo proceso.

La parte experimental constó de cinco partes: recolección y conservación del material biológico, determinación de la parte de la planta con actividad proteolítica, extracción y purificación de la fracción enzimática a partir de flor, caracterización cinética del extracto enzimático purificado y, por último, la evaluación y aplicación práctica del extracto enzimático en la tecnología quesera.

Los resultados dieron a conocer que la flor es la única parte de la planta con actividad proteolítica, que la proteasa del cardo (*C. cardunculus L.*) presenta un comportamiento michaeliano cuyos parámetros cinéticos son: $V_{\max}=1.6834 \times 10^{-2}$ U_{ABS}/min, y una $K_m = 2.1687 \times 10^{-3}$ mM/ml. Se obtuvieron valores para la fuerza de cuajo (valor F) de 1:2 500 para el extracto crudo de las flores y un valor F estimado de 1:17 400 para el extracto precipitado y dializado. En la aplicación práctica de los extractos se obtuvieron rendimientos de alrededor de 10% en producto terminado. Lo anterior coloca a las flores del cardo (*C. cardunculus L.*) como una fuente viable de proteasas que pueden aplicarse en la tecnología quesera como un sucedáneo del cuajo animal e incluso de los coagulantes fúngicos comerciales, cuyo valor F es de 1:10 000.

I.- INTRODUCCIÓN

El hombre, en su afán de obtener una mayor calidad de vida desde todas las épocas, ha creado tecnologías que le permitan la transformación de los alimentos que lo sustentan a lo largo de su vida, una de esas tecnologías es la elaboración de queso a partir de la leche que obtiene de otras especies de mamíferos.

El descubrimiento de la elaboración del queso, según varias fuentes, ocurrió como un mero hecho fortuito, cuya fecha es incierta aunque muy antigua. “El hombre ha venido utilizando desde hace siglos coagulantes tanto de origen vegetal como animal [...]. Sin embargo, los primeros queseros no empleaban más coagulante que el cuajo extraído del estómago de los mamíferos”. (SCOTT, 1991). El conocimiento empírico así obtenido se ha heredado a través del tiempo; pero ha sido hasta tiempos recientes que se ha dilucidado la naturaleza de dicho proceso, lo cual ha favorecido la obtención, mediante diversas fuentes, de agentes coagulantes que actúan sobre las principales proteínas de la leche: las caseínas.

Durante mucho tiempo ha sido empleado el cuajo animal, pero en los últimos tiempos se ha visto afectada la disponibilidad del mismo debido a la escasez de animales del cual obtenerse. Buscando una solución a esa problemática, se ha echado mano de la biotecnología y la bioingeniería con cuyas herramientas se ha logrado obtener enzimas de origen microbiano y fúngico idénticas a las producidas en los estómagos de los mamíferos.

Sin embargo, desde tiempos bíblicos se han encontrado sustitutos de cuajo en varias fuentes vegetales, algunos ejemplos son el látex de la higuera (*Ficus carica*) y las flores del cardo (*Cynara cardunculus L.*), y es en esta última fuente que se ha puesto el presente esfuerzo, con el objetivo de obtener un sustituto lo más cercano posible al cuajo en cuanto a actividad, como un aditivo auxiliar en la elaboración de queso.

La investigación desarrollada en el presente trabajo plantea y argumenta una opción viable encaminada a completar la demanda cada vez más creciente de este tipo de aditivo el cual, a su vez, podría cubrir la necesidad de una producción cada vez mayor de queso dirigida a la alimentación de una población humana en aumento.

Es importante aclarar que falta mucho por estudiar en cuanto al funcionamiento y descripción de la alternativa enzimática vegetal que aquí se expone, y que esta es sólo una pequeña contribución al desarrollo de un posible sucedáneo del cuajo animal.

II.- REVISIÓN DE LITERATURA

2.1.- Definición de “queso”:

“Quesos, productos elaborados con la cuajada de leche estandarizada y pasteurizada de vaca o de otras especies animales, con o sin adición de crema, obtenida por la coagulación de la caseína con cuajo, gérmenes lácticos, enzimas apropiadas, ácidos orgánicos comestibles y con o sin tratamiento ulterior por calentamiento, drenada, prensada o no, con o sin adición de fermentos de maduración, mohos especiales, sales fundentes e ingredientes comestibles opcionales, dando lugar a las diferentes variedades de quesos pudiendo por su proceso ser: fresco, madurado o procesado” (SECRETARÍA DE SALUD, NOM-121-SSA1-1994).

2.2.- Breve historia del queso:

“El queso es uno de los derivados lácteos más sabrosos y variados. Hay indicios que en el año 3 000 a.C., en el Oriente Medio, este sabroso alimento fue hecho por primera vez.

Existe la leyenda que fue descubierto por un mercader árabe, quien realizaba un viaje a través del desierto y queriendo aprovisionarse de leche para este viaje, la colocó en una bolsa hecha con el estómago de un cordero. Cuando trató de

tomarla, se percató que estaba coagulada y fermentada; esto fue ocasionado por el cuajo de la panza del cordero aunado al calor del desierto.

Así, el queso fue descubierto accidentalmente, ya que al amanecer la leche, en recipientes hechos con estómagos de rumiantes, se producía la coagulación y podían consumirlo días o meses después” (CEA: Centro de Estudios Agropecuarios, 2001).

Otras fuentes describen un origen mucho más antiguo, Scott (1991) refiere que “la antigua cuna de la civilización, por lo que a los principales alimentos se refiere, en especial al pan y al queso, parece haber sido esta fértil área agrícola conocida como “creciente fértil” situada entre los ríos Tigris y Éufrates, en el Irak (6 000 – 7000 a. C.)”. En la obra del mismo autor, hace mención de otras fuentes de información acerca de la antigüedad de la elaboración del queso, entre otras, se resaltan aquí las que a continuación aparecen.

“Sir Leonar Wooley, en 1924, tras un estudio arqueológico en la zona de Ur concluía que el queso se elaboró por primera vez, precisamente en esta área, a partir de la leche de cabras y vacas (WOOLEY y MAY, 1931)”.

“Un frisio sumerio muy antiguo de El – Ubaid muestra las operaciones y ordeño del cuajado de la leche. El examen de los restos encontrados en la tumba de Hories – Aha (3 000 a. C.) demostraron que aquél material había sido queso.” “[...]. Grabados de cestos encontrados en Windmill Hill, en Dorset, Inglaterra, (de hace

unos 1 800 a. C.) indican que es muy posible que el queso se fabricara ya en este país bastante antes de la llegada de los romanos.

También existen referencias al queso en los tiempos bíblicos – Job X. 10 (1520 a. C.) y Samuel 1. XVII. 18 y 2. XVII. 29 (aproximadamente 1017 a. C.) [...].

Homero, (1184 a. C.) hace referencia al queso elaborado en las cuevas por el “Ciclope” Polifemo a partir de la leche de ovejas y cabras (HOMERO, 1919). [...] Más tarde Herodoto (484 – 408 a. C.) se refiere al queso “Scynthian” elaborado con leche de yegua (HERODOTO, 1921), mientras que Aristóteles (384 – 322 a. C.) menciona que el queso “Frigio” (“Phrygian”) se elaboraba con leche de yegua y burra. [...]” (SCOTT, 1991).

La evolución en las metodologías en distintos lugares del mundo antiguo y moderno ha dado lugar a la creación de los distintos tipos de queso conocidos en la actualidad; sin embargo, todos tienen en común algunas etapas básicas del procedimiento, principalmente la coagulación y el desuerado en el grado que sea necesario para cada caso en particular.

2.3.- La coagulación de la leche.

Dentro del proceso de elaboración de los distintos tipos de queso, la coagulación de la leche es la etapa más importante, pues es un paso estrictamente necesario para la obtención de la cuajada la cual pasará por otras etapas hasta convertirse en el queso del tipo deseado. La materia prima principal para la obtención de este

producto es la leche, la cual debe cumplir con las especificaciones legales y sanitarias a fin de evitar afecciones en las características del producto terminado y en el consumidor final.

2.3.1.- Definición de “leche para consumo humano”.

Según la Norma Mexicana vigente (NMX-F-026-1997-SCFI), se entiende con este nombre a “la secreción de las glándulas mamarias de las vacas sanas, se excluye el producto obtenido quince días antes del parto y cinco días después de éste o cuando tenga calostro, la cual debe ser sometida a tratamientos térmicos que garanticen la inocuidad del producto; además puede ser sometida a otras operaciones tales como clarificación, homogeneización u otras, siempre y cuando no contaminen al producto y cumpla con los valores nutrimentales de la leche de acuerdo a su clasificación y composición”. “Cuando la leche provenga de otra especie distinta a la de vaca se debe indicar el nombre de la especie” (SECRETARÍA DE SALUD, 1997).

2.3.2.- Propiedades físico - químicas de la leche.

“La leche está formada por glóbulos de grasa suspendidos en una solución que contiene el azúcar de la leche (lactosa), proteínas (fundamentalmente caseína) y sales de Ca, P, Cl, Na, K y S. No obstante, es deficiente en hierro y es inadecuada como fuente de vitamina C. La leche entera está compuesta en un 80 a un 90 % de agua. La leche fresca tiene un olor agradable y sabor dulce. Su densidad relativa varía entre 1.018gr/lit y 1.045gr/lit, y la de la leche de vaca entre 1.028gr/lit y

1.035gr/lt. Los glóbulos de grasa tienen una densidad relativa inferior a la de la fase líquida” (Enciclopedia ENCARTA, 2001).

2.3.3.- Las proteínas de la leche.

El sistema proteico de la leche es uno de los más completos con que la dieta humana puede contar en todas las etapas de su vida, debido a su riqueza en aminoácidos esenciales, además de su riqueza en vitaminas liposolubles (A y D, principalmente), minerales (Ca, P, K y Mg), entre otros nutrientes indispensables para el buen desarrollo de la fisiología, especialmente la de los niños.

“Las caseínas (fosfoproteínas) representan el 80% de las proteínas de la leche de vaca; el resto está constituido por β - lactoglobulina (alrededor del 10% de las proteínas totales), α - lactoalbúmina (en torno al 2% de las proteínas totales) y pequeñas cantidades de diversas proteínas (enzimas, inmunoglobulinas, etc.)” (CHEFTEL y SALINAS, 2003).

2.3.3.1.- Caseínas.

Las proteínas mayoritarias de la leche son las caseínas, “comprenden varios tipos de moléculas de las cuales el 50% aproximadamente es de α -caseínas, 30% de β -caseína, 15% de κ -caseína y 5% de γ -caseína” (CHEFTEL y SALINAS, 2003) entre otros componentes minerales.

“La caseína κ se diferencia de las otras caseínas por su gran sensibilidad a la quimosina, su escasa afinidad al Calcio (Ca^{++}) y la presencia de glúcidos en su cadena. Su carácter de glicoproteína se traduce por una heterogeneidad de estructura particular.

La composición y estructura primaria de las caseínas les confieren determinadas propiedades fisicoquímicas importantes:

- Carácter aniónico marcado en medio neutro, debido a la presencia de radicales fosfoserina y/o a un número importante de radicales del ácido glutámico.
- Insolubilidad en agua en el punto isoeléctrico (pH 4.6 para la caseína entera) debido a la elevada proporción de radicales apolares.
- Comportamiento en medio cálcico, relacionado con la existencia de radicales fosfoserina, que determinan la complejación del Ca^{++} por las caseínas α_{S1} , α_{S2} y β ; tienden por consecuencia a disminuir la carga eléctrica y su hidrofilia, determinando su insolubilización.

Este comportamiento corresponde a las caseínas consideradas aisladamente, pero en presencia de la caseína κ en proporción suficiente (cerca de un 10%), las demás caseínas son insolubles en presencia de Ca^{++} . La caseína κ forma, en efecto, con las caseínas α_{S1} y β , complejos estables en medio cálcico. Ello es debido al poder estabilizante de su parte carboxilo terminal de carácter hidrófilo” (ECK, et al., 1990).

“El poder de estabilización de la caseína κ está también directamente ligado a las propiedades asociativas tan marcadas que existen en todas las caseínas” (DARLING Y DICKSON, 1979 / MERCIER, et al., 1972). “Lo más importante de la caseína κ en quesería es que la renina (quimosina) la hidroliza entre los aminoácidos 105 (fenilalanina) y 106 (metionina)” (SCOTT, 1991).

2.3.3.2.- Proteínas séricas.

“El suero lácteo contiene aproximadamente el 0.6% de las proteínas de la leche de las que la β lactoglobulina supone el 0.3% y la lactoalbúmina el 0.07%. En el suero hay además albúminas e inmunoglobulinas. Las proteínas séricas se hallan en solución y no en solución coloidal como las caseínas. Las β lactoglobulinas, por efecto del calor, se agregan y pueden reaccionar en la leche con la caseína κ prolongando el tiempo de cuajado” (KANNAN y GENES, 1961; ZITTLE, et al., 1962 y McKENZIE, 1971).

2.3.4.- Tipos de coagulación de la leche.

Dentro de la composición de la leche ya se ha mencionado que parte de las proteínas se encuentran en suspensión coloidal (las caseínas), estabilizadas por la κ caseína gracias a su carácter hidrofílico. Dicha estabilidad puede ser rota por tres factores: la presencia de sales en alta concentración, la presencia de acidez hasta el punto isoeléctrico de las caseínas en general (pH 4.6) o la acción

específica de ciertas enzimas proteolíticas; ambos constituyen los métodos para la obtención del producto que es conocido como “queso”.

2.3.4.1.- Coagulación por presencia de sales en alta concentración.

“Una descripción simplificada del mecanismo de insolubilización por salado está basada en el hecho de que la adición de las sales elimina el agua de la proteína hidratada, dejando las regiones hidrofóbicas en libertad de combinarse intermolecularmente (GLATZ, 1990). Aquellas proteínas que presentan mayor número de regiones hidrofóbicas sobre su superficie, forman agregados y precipitan más rápidamente que aquellas que presenten pocas regiones hidrofóbicas” (TEJEDA, et al. 1995).

En el caso de la leche, la mayoría de las caseínas son de éstas características, a excepción de la caseína κ , que es la que actúa como estabilizante de las demás caseínas, como se ha mencionado anteriormente.

2.3.4.2.- Coagulación ácida.

“La acidificación intensa, por adición de un ácido mineral u orgánico, determina la floculación de las caseínas, cuyo pI se alcanza a un pH igual a 4.6, en forma de un precipitado más o menos granuloso que se separa del lactosuero. Por el contrario, una acidificación progresiva, obtenido bien sea por fermentación láctica, bien por hidrólisis de la glucolactona, determina a la formación de un coágulo liso, homogéneo que ocupa totalmente el volumen inicial de la leche.

El descenso de pH tiene por efecto hacer disminuir la ionización de los radicales ácidos de las caseínas (radicales aspárticos, glutámicos, fosfoserínicos). [...] a lo largo de la acidificación se produce una profunda desorganización de la micela acompañada de una modificación de la estructura cuaternaria de las caseínas. En las cercanías del pH isoelectrico se da una neutralización de la carga y una reducción importante de la hidratación de las caseínas, lo cual determina su insolubilización” (ECK, et al., 1990).

2.3.4.3.- Coagulación por acción de enzimas.

Eck (1991) menciona que “un gran número de enzimas proteolíticas, de origen animal, vegetal o microbiano, poseen la propiedad de coagular el complejo caseínico”. Sin embargo, para efectos de antecedente y por ser la enzima mejor estudiada, se tomará la actividad coagulante del cuajo por ser la más utilizada desde un tiempo considerable en la elaboración de queso a nivel industrial.

“La quimosina o renina, aunque también en menor cuantía la pepsina, son responsables de la acción proteolítica ejercida sobre la caseína κ (estabilizante de las restantes caseínas en presencia de iones Ca^{++}) de la leche” (MARIÑO, et al., 2003).

El mecanismo de la coagulación por cuajo se divide a su vez en dos etapas bien diferenciadas que se exponen a continuación.

2.3.4.3.1.- Fase enzimática.

“Corresponde a la hidrólisis de la κ caseína a nivel de un determinado enlace peptídico, el enlace Phe₁₀₅ – Met₁₀₆ (GARNIER, 1968), enlace particularmente lábil en razón a la naturaleza de los aminoácidos implicados, de la presencia de una serina adyacente y a la de radicales hidrofóbicos (Leu e Ile) a cada lado del enlace roto (PAYENS, 1979). La cadena de la caseína κ se encuentra de esta manera cortada en dos segmentos desiguales; el segmento 1 – 105 correspondiente a la paracaseína κ ; el segmento 106 - 169, al caseinomacropéptido. Todas las formas de caseína κ , contengan o no glúcidos, están sujetas a esta hidrólisis, la cual se efectúa a una gran velocidad.

La paracaseína κ , ligada a las caseínas α_{S1} y β , permanece integrada dentro de la micela; posee un carácter básico e hidrofóbico marcado. El caseinomacropéptido, que contiene todos los radicales glucídicos eventualmente presentes, se separa de la micela y pasa al suero. Posee un carácter ácido e hidrófilo.

La molécula de paracaseína κ posee una composición, una estructura y en consecuencia unas características muy diferentes a las de la caseína κ original; en particular, carece de las propiedades estabilizantes frente al Ca⁺⁺ (ECK, 1991).

“La cinética de esta fase está afectada por los mismos factores que todas las reacciones enzimáticas y presentan una cinética que se ajusta al modelo de Michaelis – Menten” (GARCÍA, et al., 1999).

2.3.4.3.2.- Fase de coagulación.

“Se puede destacar que la liberación del caseinomacropéptido y su paso al suero determina una disminución importante de las cargas de las micelas (su movilidad electroforética queda reducida a la mitad y posiblemente también de su grado de hidratación. Los dos factores de estabilidad se ven de esta manera afectados; pudiéndose en esta nueva situación establecer enlaces intermicelares que conducen a la formación del gel.

La agregación no empieza hasta que el 85 – 90% de la caseína κ ha sido hidrolizada. [...] Las características reológicas del coágulo, que dependen de la naturaleza y del número de enlaces intermicelares, están estrechamente ligadas a la velocidad de coagulación.

Actualmente, se carece de datos sobre la naturaleza y el número de enlaces que intervienen en la agregación de micelas del paracaseinato. [...] Ha sido demostrado que el Ca^{++} iónico y el fosfato de calcio micelar juegan un papel determinante en el fenómeno de agregación.

Según Payens (1981), los puntos de agregación de las micelas no están repartidos uniformemente en su superficie, sino que están localizados en determinadas áreas; ello explicaría que la desestabilización de las micelas no conduce a un precipitado denso, sino que da lugar a un retículo proteico laxo y que aprisiona la totalidad de la fase acuosa” (ECK, 1991).

2.3.5.- Factores que intervienen en la coagulación de la leche.

Como en toda actividad enzimática, son variados los factores que pueden interferir en la misma, causando un mal funcionamiento de la enzima sobre el sustrato que deseamos transformar, de ahí la importancia de conocerlos bien a fin de controlarlos en beneficio de la optimización de proceso que se persigue ejecutar.

2.3.5.1.- pH.

Según García, et al (1999), “el pH tiene una fuerte influencia sobre la coagulación. La reducción del pH abajo del normal de la leche trae una aceleración de la actividad enzimática (el pH sobre la caseína es de 5.5). La acidificación favorece además la neutralización de carga y la solubilización del Ca^{++} acelerando así la aglomeración micelar. El efecto global de aceleración de la coagulación con el descenso de pH se debe principalmente a la aceleración de la fase secundaria” o fase de coagulación.

2.3.5.2.- Temperatura.

“La temperatura afecta más la fase secundaria: mientras que la hidrólisis de la caseína κ comienza a ocurrir a temperaturas menores de 10°C , la agregación ocurre a partir de temperaturas mayores (alrededor de 15°C)” (GARCÍA, et al., 1999). Sin embargo, Scott (1991) especifica que la temperatura óptima de coagulación es de 40°C para la renina del cuajo; por debajo de ésta temperatura se observa una disminución en el tiempo de coagulación, sin pérdida de actividad;

y por arriba de la misma la actividad también tiende a disminuir hasta desaparecer por efecto de la desnaturalización de la enzima a causa de una temperatura elevada.

2.3.5.3.- Disponibilidad de Calcio.

“El tiempo de coagulación depende también de los contenidos de Ca^{++} y fosfato coloidales (leches “rápidas”, “normales” o “lentas”). Estos factores pueden corregirse adicionando sales de Ca (CaCl_2) a la leche, lo cual trae como consecuencia un aumento en la velocidad de coagulación. La adición de Ca^{++} puede reestablecer los tiempos normales de coagulación para leches refrigeradas” (GARCÍA, et al., 1999).

2.3.5.4.- Concentración de la enzima.

Storry, et al. (1982) y Carlson, et al. (1987) mencionan que “la concentración de enzima aumenta la velocidad de coagulación y de endurecimiento y altera las propiedades reológicas del gel”. Es de esperar que una mayor disponibilidad de enzima propiciará una mayor y más rápida transformación de sustrato en productos, así como acelerará también la agregación de las caseínas ya insolubles en el lactosuero para conformar la cuajada. En el caso contrario, la actividad se hará más lenta y las propiedades deseadas en el resultado de la fase de coagulación (la cuajada) no serán las adecuadas para obtener las características deseadas en el producto final (el queso).

2.3.5.5.- Concentración del sustrato.

De manera semejante a lo que se refiere en la concentración de la enzima, la concentración del sustrato juega un papel no menos importante, de tal manera que el comportamiento de la velocidad de reacción, es decir, la actividad de la enzima, depende de la concentración de sustrato, según la ecuación de Michaelis-Menten.

Sin embargo, para el caso de que la concentración de sustrato sea mayor que la de la enzima, la actividad aumenta de manera proporcional a la concentración del sustrato en la medida donde éste es menor a la constante de Michaelis (K_m). Al aumentar la concentración hasta valores mayores al de K_m , la actividad ya no depende de la concentración del sustrato.

Es de importancia el conocer las constantes de actividad de la enzima en cuestión para dilucidar que tan similar es ésta comparada con el cuajo animal.

Por otra parte, en cuanto a la aplicación tecnológica, Scott (1991) refiere que “la dilución de la leche con agua influye así mismo sobre la tensión de la cuajada”, lo que nos reafirma que la baja concentración de sustrato en un mismo volumen impedirá la formación de un coagulo firme después de la acción de la enzima.

2.3.6.- Las enzimas de origen vegetal.

Como ya se mencionó, desde tiempos antiguos el hombre descubrió que la savia de algunas plantas es capaz de coagular la leche, Scott (1991) refiere que

“uno de los primeros coagulantes vegetales descubiertos fue el látex de la higuera (*Ficus carica*)” cuya utilización se ha venido dando en aquellas regiones en las que se ha cultivado desde tiempos remotos. El mismo Scott dice en su obra que “muchos extractos de origen vegetal son capaces de coagular la leche pero algunos son excesivamente proteolíticos” y cita como ejemplo la papaína de la *Carica papaya*; la bromelina de la piña (*Ananas sativa*) y la ricina de las semillas del aceite de castor (*Ricinus communis*). El cuadro 1 expone algunas especies vegetales utilizadas como fuente de coagulantes de la leche.

CUADRO 1: Plantas productoras de enzimas útiles para la coagulación de la leche.

Cynara cardunculus L.
Articum minus
Solanum dalcamara
Malva sylvestris
Cirsium and Carlina spp.
Ficus carica
Herculeum spondylum
Centurea spp.
Galum verum
Senecio jacobaea
Ranunculus spp.
Urtica dioica
Dipsacus sylvestris
Achillea millefolium
Winthiana coagulans
Euphorbia lathyrus

SCOTT (1991).

2.3.6.1.- Ventajas del uso de enzimas de origen vegetal.

“Algunos de los extractos de plantas se utilizan en zonas aisladas en las que la adquisición de otro tipo de coagulantes resulta difícil” (SCOTT, 1991).

Es posible la elaboración de un sucedáneo del cuajo animal al hacer uso de un procedimiento adecuado para la extracción y purificación de las enzimas provenientes de una fuente vegetal, con una fuerza de cuajo parecida al de aquel; de hecho, el INIA de España (1998) obtuvo un extracto a partir de la variedad cultivada *ETSIA* de cardo con una fuerza coagulante, o fuerza de cuajo, próxima a 1:9 000. La fuerza coagulante del cuajo es desde 1:10 000 hasta 1:12 000, según la pureza de la enzima, aunque hay extractos comerciales de cuajo animal con una fuerza de 1:6 000, y Veisseyre (1972) refiere que en el comercio se venden extractos con fuerza desde 1:2 500 hasta 1:5 000, y que, sin embargo, existen cuajos en polvo que alcanzan una fuerza coagulante de hasta 1:100 000 o superiores.

La fuerza de cuajo, como sus sinónimos: poder coagulante, fuerza coagulante, título coagulante o actividad coagulante, se refiere a la cantidad de leche en litros que puede ser coagulada por una parte de cuajo, en litros o gramos y sus subunidades, según se exprese. Así, si se dice que la fuerza de cuajo de un extracto enzimático es de 1:9 000, quiere decir que una parte de extracto (gr, Kg, ml o lt) puede coagular 9 000 partes de leche, expresadas de igual forma en gr, Kg, ml o lt, en un tiempo de 40 minutos a una temperatura equivalente a 35° C: es decir, 1 litro de extracto enzimático puede coagular 9 000 litros de leche en 40 minutos a 35° C.

Boavida (2001) observó que los valores de actividad coagulante referidos a gramo de flor utilizados en la producción del queso de Serpa (en Portugal) fueron inferiores a los valores reportados por Martins, et al. (1996), dado que los

productores emplean cardo con muchas impurezas y los métodos de secado, así como los procedimientos de almenaje y conservación son muy deficientes. Sin embargo, no deja de ser una materia vital para el proceso de obtención de este tipo de queso.

Quizá las características de los quesos madurados, sobre todo las referentes al desarrollo de aromas característicos, si sean afectadas por la utilización de coagulantes de origen vegetal; sin embargo, en lo que se refiere a quesos frescos, muchas veces no es deseable un sabor y aroma tan fuertes en el producto final, dicha eliminación de aromas y sabores indeseables podría ser eliminada con la utilización del coagulante de origen vegetal propuesto en la presente.

Por último, aunque la actividad coagulante de la enzima de origen vegetal no sea al mismo nivel de la del cuajo animal (por su especificidad), sí pudiera ser económicamente más rentable producir la primera, dado que su fuente de origen es una maleza, como lo es el cardo, cuyo cultivo no requeriría mayores cuidados comparado con un hato de ganado vacuno, caprino, ovino o porcino. Además, su aplicación podría enfocarse a la producción de quesos de pasta cocida cuyo proceso permitiría la inactivación de la enzima a causa de una desnaturalización por calor, eliminando así los inconvenientes que se presentan en los quesos de pasta fresca donde ocurre una proteólisis posterior a la elaboración, dando lugar a la liberación de péptidos de sabor amargo, así como el desarrollo de defectos en cuanto a textura. Todo ello a partir de una fuente enzimática mucho más barata que los extractos enzimáticos de origen animal o microbiano.

2.3.6.2.- Desventajas del uso de enzimas vegetales.

“Parece ser que algunos de éstos (extractos) elaborados por procesos rudimentarios coagulan por acción ácida y enzimática y se utilizan principalmente para la elaboración de cuajadas blandas” (SCOTT, 1991).

“Estos enzimas tienen una capacidad proteolítica menos específica por lo cual pueden causar sabores amargos en los quesos si no son bien utilizados. Su uso a nivel comercial es limitado, generalmente se utilizan en la elaboración artesanal de determinados tipos de quesos” (UNIVERSIDAD DE ZULIA, 2003).

Scott (1991) menciona que “como sea que existe una gran variedad de coagulantes, es muy importante que el fabricante de queso se de cuenta de que cada uno de ellos posee sus características propias. Por lo tanto, deberán ser tomadas en cuenta las condiciones de utilización, especialmente cuando se cambia de un coagulante a otro o cuando se introduzca algún nuevo extracto en el preparado coagulante”.

2.4.- El cardo (*Cynara cardunculus L.*).

El cardo (*Cynara cardunculus L.*), cuya imagen se muestra en la figura 1, es originario de la parte sur de la Península Ibérica y del Norte de África, la literatura lo cita como una de las plantas que es capaz de provocar la coagulación enzimática de la leche, específicamente sus flores son las que contienen las enzimas proteolíticas responsables de dicha propiedad.



FIGURA 1: El cardo (*Cynara cardunculus* L.).

En México se ha encontrado en forma silvestre, a la entrada de la zona del Bajío Guanajuatense, en el municipio de Apaseo el Grande, desconociéndose su distribución en otras partes del país.

El estudio de clasificación botánica hecha por Villarreal Quintanilla (2003) del Departamento de Botánica (División de Agronomía) de la UAAAN, refiere que es una maleza introducida, es decir, no es nativa de la región donde fue colectada; sin embargo, por las características físicas de la planta se puede deducir que la región donde fue encontrada es apta para su cultivo en gran escala y sin mayores cuidados, ya que, como se ha mencionado, se encontró en forma silvestre.

2.4.1.- Descripción botánica.

La clasificación botánica que refiere la literatura para el caso del cardo es la que se muestra en el cuadro 2.

CUADRO 2: Clasificación botánica del cardo según Merops (2003):

Super reino: *Eukaryota*.
Reino: *Viridiplantae*.
Sub reino: *Streptophyta*.
Phylum: *Embriophyta*.
Sub phylum: *Tracheophyta*.
Super clase: *Magnoliophyta*.
Clase: *Magnoliopsida*.
Sub clase: *Asteridae*.
Orden: *Asterales*.
Familia: *Asteraceae*.
Género: *Cynara*.
Especie: *cardunculus L.*

2.4.2.- Historia y antecedentes de investigación del uso del cardo (*Cynara cardunculus L.*) en la elaboración de queso.

La historia del uso del cardo (*C. Cardunculus L.*) como coagulante de la leche se remonta a la época en que los romanos ocupaban la Península Ibérica donde, a partir de leche de oveja coagulada con las flores de esta planta, se comenzaron a crear algunos tipos de queso de los que se conocen hoy en día en aquella región de Europa, como ejemplos podemos citar. La Torta del Casar, el queso de flor guía, el de la Serena (Islas Canarias) entre otros en España, y en Portugal el queso Serpa y Serra.

Boavida (2001) cita diversas referencias acerca de la historia del uso del cardo (*C. Cardunculus L.*) en la elaboración de diversos tipos de queso: “Es conocido que, los mal llamados, cuajos vegetales, particularmente procedentes de las flores de cardos, se han utilizado con éxito en la elaboración de distintos quesos desde la antigüedad. Así, de acuerdo con la traducción de D. Juan M. Álvarez de

Sotomayor y Rubio hizo en 1824 del tratado de Agricultura de Colmuela, *De re rustica*, se indica que la leche se puede cuajar con cuajo de cordero o de cabrito aunque también puede hacerse con la flor del cardo silvestre.” Refiere también que “en la obra de D. Miguel de Cervantes el “Quijote” dentro de las recomendaciones que el médico hace a Sancho sobre lo que ha de comer un Gobernador para conservar su buena salud se dice en referencia a la técnica de elaboración del queso Manchego lo siguiente “ordeñar las ovejas manchegas a la antigua usanza y agréguesele flor de cardo.”

“[...] El coagulante de las flores del cardo (*C. cardunculus L.*) es utilizado tradicionalmente en Portugal para la manufactura de quesos blandos de leche de oveja. La enzima incrementa su actividad cuando declina el pH y es más proteolítica que la renina (VIEIRA Y BARBOSA, 1970). Esta es superior a la renina en la producción de queso tipo Serra de leche de oveja, pero esa alta actividad proteolítica ocasiona ablandamiento del producto y defectos de sabor y textura cuando se le utiliza en la manufactura de queso Edam y Roquefort (VIEIRA Y BARBOSA, 1972)” (GREEN, 1976).

En México pocas personas conocen esta utilidad de las flores del cardo (*C. Cardunculus L.*), y sólo en algunas regiones es utilizado en procesos artesanales. De aquí el propósito de realizar la presente investigación para difundir este conocimiento, así como para sentar las bases de estudios posteriores que permitan perfeccionar el uso de esta planta en procesos a escala industrial.

En cuanto a los antecedentes de investigación se encontró que “la utilización de la flor de cardo (*C. Cardunculus L.*) como coagulante vegetal empleado en la mayoría de los quesos tradicionales portugueses y en algunos españoles de Extremadura, ha sido comentada por diversos autores, Matos, et al. 1948; Vieira De Sá, et al. 1972; Barbosa, et al. 1976; Figueiredo, 1987; Morbey, 1990; Campos, et al. 1990; Morgado, 1990; Faro, 1991; Roseiro, 1991; Sousa, et al. 1997; Martins, 1999 y otros extranjeros, Christien, et al. 1935; Tsouli, 1974; Marcos, et al. 1978; Sanjuán y Fernández-Salguero, 1994. En estos trabajos se abordan distintos aspectos como influencia de diferentes factores en la actividad coagulante de este cardo en leche en polvo reconstituida y leche de oveja (SANJUÁN y FERNÁNDEZ-SALGUERO, 1994), datos de coagulación de la leche utilizando la especie *Cynara humilis* (MARTÍNEZ, 1979) y la influencia del área geográfica de recolección y de los diferentes estadios de floración [...] sobre la actividad coagulante” (BOAVIDA, 2001).

El cardo, “por su composición, puede emplearse como cuajo vegetal en diversas preparaciones. [...] El cardo es capaz de coagular la leche. Con este fin se emplean sus flores desecadas a modo de cuajo vegetal en diversas aplicaciones culinarias. Se dejan macerar en agua durante varias horas. Posteriormente, esta agua se añade a la leche calentada a 35-40° C y, tras remover la mezcla, se deja en reposo para que tenga lugar la coagulación” (CONSUMER.ES, 2001).

El Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA) de España (1998) refiere que “trabajos de investigación dirigidos a la obtención y caracterización del coagulante de leche normalizado de origen vegetal (*Cynara cardunculus L.*) para

su aplicación comercial en la elaboración de queso de la Serena llegaron a los resultados siguientes:

[...] Se ha desarrollado un método para la obtención de extractos coagulantes concentrados a partir de flores molidas de la especie silvestre y, variedad cultivada *ETSIA* con el título coagulante próximo a 1:9 000, estables en su actividad coagulante al menos un año y, adecuado a la norma microbiológica vigente.”

Sin embargo, el INIA no revela el método desarrollado para la extracción del coagulante de la planta en cuestión. Martins, et al. (1996) reporta también actividad coagulante, referida a un gramo de flor, con valores medios cercanos a 1: 9 000. Prados, et al. (2002), de la Universidad de Córdoba, España, refiere un método de extracción de los extractos coagulantes: “Los extractos acuosos de *C. cardunculus L.* se obtuvieron a partir de aproximadamente 150 g de flores secas que se maceraron en 1 l de agua durante 24 horas, tras lo cual fueron filtrados a través de un paño de algodón y congelados en placas de vidrio de gran diámetro a una temperatura de -32° C. Tras la congelación de los extractos, se liofilizaron a una presión entre 4 y 13 Pa durante aproximadamente 24 h. El polvo así obtenido se almacenó de forma hermética en un envase opaco”.

Faro (1991), describe en su trabajo la acción de la proteasa del cardo (*Cynara cardunculus L.*) en la leche de la siguiente manera: “La proteasa de *C. cardunculus L.* tiene preferencia por ligaduras peptídicas que incluyen aminoácidos hidrofóbicos actuando preferentemente sobre ligaduras de tipo (Phe, Leu, ILe)-(Val, Tyr). Tal como la mayoría de las otras enzimas coagulantes, la

proteasa de *C. cardunculus L.* inicia la coagulación de la leche por el rompimiento de la ligadura Phe105-Met 106 de la κ -caseína”. Este autor menciona también que las proteasas del cardo poseen un peso molecular aparente de entre 16 y 31KDa.

Por otro lado, Macedo (1994) describe algunos efectos de la proteasa aspártica de *C. cardunculus L.*, conocida como “cardosina”, sobre las características sensoriales del queso: “la acción de la cardosina sobre la κ – caseína no parece tener efectos adversos sobre la calidad del queso (de leche de vaca). El sabor amargo y los defectos de textura están probablemente relacionados con la elevada actividad de la cardosina sobre las regiones de la α_{s1} - caseína Ala163-Trp-Tyr-Tyr-Val167 y β - caseína Ala189-Phe-Leu-Leu-Tyr193, respectivamente”.

Boavida (2001) reporta que factores como la calidad de las plantas (flores), el tipo de recolección, la forma de conservación y la manera de preparar el extracto de las flores de cardo (*C. cardunculus L.*) para utilizarlo en la elaboración de queso de leche de oveja (Queijo Serpa), influyen en el poder coagulante del mismo. De igual forma, los tiempos de coagulación empleados son muy distintos entre los productores de este tipo de queso, según se puede observar en el cuadro 3.

CUADRO 3: Condiciones de empleo del coagulante empleado en la producción de los distintos lotes de queso Serpa en Portugal.

CONDICIONES DE UTILIZACIÓN DEL CARDO	Quesería			
	S	A	I	M
Cardo por 100 lt de leche (gr/100lt).	50	20	20	35
Cardo por litro de agua (gr/lt).	200	60	30	105
Remojo de víspera.	+	+	+	-
Molienda y filtrado.	+	-	-	+
Temperatura de cuajado (°C).	30	29	32	31
Título del coagulante (n° de litros de leche/ kg de cardo).	2 000	5 000	5 000	2 800
Duración de coagulación (min).	90	60	50-60	90

(+): se realiza. (-): no se realiza.

Fuente: Boavida (2001).

Los antecedentes de investigación expuestos muestran una clara tendencia hacia la obtención de extractos enzimáticos purificados dirigidos a su aplicación en la industria del queso; sin embargo, también se observa que dicha investigación ha sido desarrollada sólo en la región de origen del cardo (*C. Cardunculus L.*), es decir, en algunas regiones de España y Portugal, sin que en nuestro país se desarrollen actividades similares en la búsqueda de sucedáneos del cuajo animal cada vez más escaso. De ahí la importancia de esta investigación.

En la figura 2 podemos apreciar las útiles, y además hermosas flores del cardo (*C. cardunculus L.*).



FIGURA 2: Capítulos florales del cardo.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

Para la realización del presente estudio se plantearon 5 etapas de trabajo:

- ☺ Recolección y conservación del material biológico.
- ☺ Determinación de la parte de la planta con actividad proteolítica.
- ☺ Extracción y purificación de la fracción con actividad enzimática a partir de la flor.
- ☺ Caracterización cinética del extracto enzimático purificado.
- ☺ Evaluación y aplicación práctica del extracto enzimático en la tecnología quesera.

Para el cumplimiento de los objetivos planteados en cada una de las etapas anteriormente citadas, se utilizaron diversos materiales y técnicas, mismos que se explican en cada etapa.

3.1.- ETAPA 1: Recolección y conservación del material biológico.

El material biológico se recolectó de manera manual, y se separaron las diversas partes de la planta a estudiar: raíz, tallo, hojas y flores. La recolección se llevó a cabo en las inmediaciones del “rancho Celaya”, propiedad privada, al este de la cabecera municipal de Apaseo el Grande, Guanajuato y al oeste de la ciudad de Santiago de Querétaro, capital del estado de Querétaro de Arteaga. Las comunidades más cercanas al lugar de recolección son: Obrajuelo al norte; y

Caleras de Amexhe y Caleras de Obrajuelo al sur. (Ver anexo 7.2). En la figura 3 se muestra el área donde se llevó a cabo la recolección de la planta.

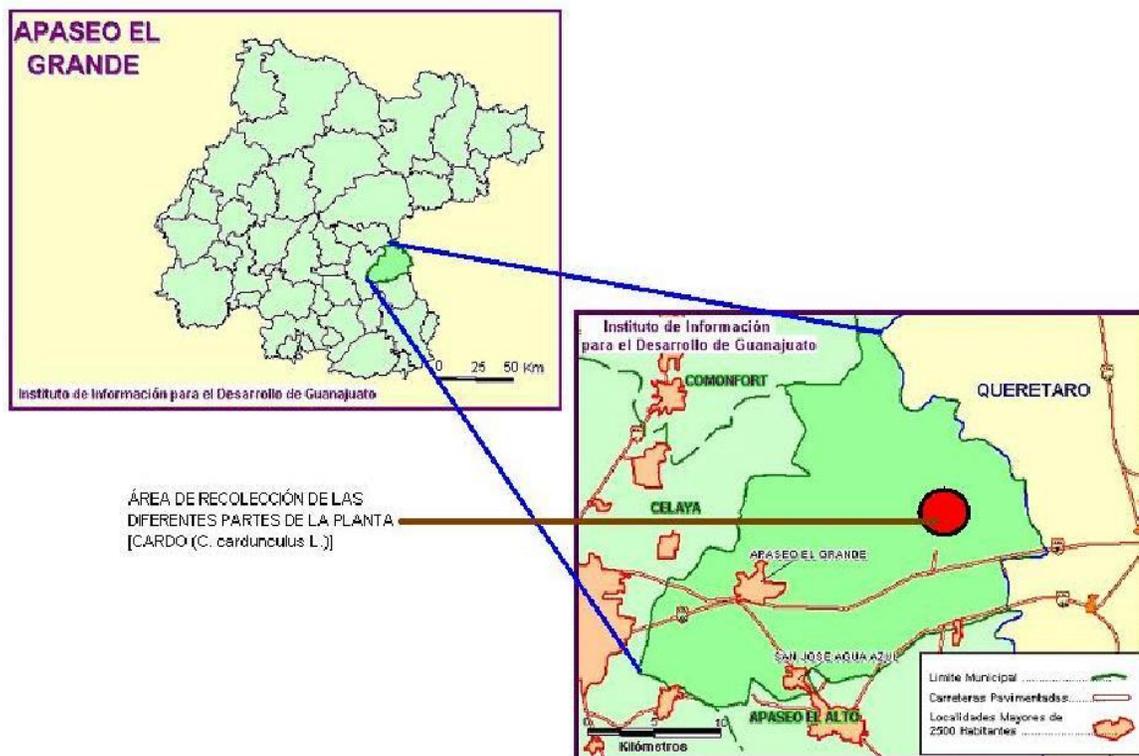


FIGURA 3: Área geográfica de recolección de las diferentes partes de la planta [*C. cardunculus L.*]:

FUENTE: Instituto Nacional para el Federalismo y el Desarrollo Municipal. Enciclopedia de los municipios de México. Guanajuato. Apaseo el Grande. (2002).

Por ser el cardo (*C. cardunculus L.*) una planta de ciclo anual, las muestras de flores, tallo, hojas y raíz se obtuvieron en cantidad suficiente para el desarrollo del estudio. Todas las muestras se recolectaron frescas y se conservaron a -15° C en un congelador marca “American”, a excepción de las flores, que fueron desecadas con el mismo fin para su posterior procesamiento y análisis.

En el caso de las flores, éstas se desecaron a temperatura ambiente y protegidas de la luz solar, a fin de conservar y concentrar la propiedad que se les atribuye, esto por la razón de que la recolección fue realizada en campo donde se carece del equipo para dicho proceso. Posteriormente, al ser identificadas como la parte de la planta con mayor cantidad de proteína y actividad proteolítica, según ensayos de cuantificación de proteína y pruebas de coagulación descritas posteriormente, se procedió a una segunda recolección exclusiva de ésta.

3.2.- ETAPA 2: Determinación de la parte de la planta con actividad proteolítica.

El conocimiento empírico muestra que la parte de la planta con actividad proteolítica es la flor; sin embargo, para corroborar dicha afirmación, se realizaron ensayos con las diferentes partes de la planta a fin de comprobar esta hipótesis.

3.2.1.- Determinación de pH de las diferentes partes de la planta.

A fin de conocer las condiciones de pH en las que se analizaría cada parte de la planta, se procedió a realizar dichas determinaciones, para lo cual se utilizó un potenciómetro digital Coming pHmeter modelo 3D. Lo anterior para realizar las extracciones en las condiciones nativas, y evitar que las alteraciones de pH afectaran el proceso dañando la enzima objeto de este estudio.

En cada ensayo se maceraron en un mortero 5 gramos de muestra en 100 ml de agua destilada, se filtró el líquido obtenido y se registró el pH con el potenciómetro citado, desechando cada una de las muestras una vez realizado el análisis.

3.2.2.- Técnica para la extracción de la enzima.

Una vez conocido el pH de cada una de las partes de la planta, se procesó cada una de ellas.

Las muestras se congelaron y descongelaron a fin de romper las paredes celulares de cada parte de la planta. Se maceraron 5 gramos cada muestra por separado (en tres series de dos repeticiones cada una, es decir, un total de seis repeticiones) con 50 ml de solución búfer de fosfatos 0.1M al pH correspondiente, determinado anteriormente, y preparada según especificaciones de Lynch, et al. (1987).

Una vez solubilizada en el búfer de fosfatos, cada muestra se colocó en un tubo para centrífuga y las muestras se centrifugaron a 3, 500 rpm por 15 minutos en una centrífuga IEC International centrifuge modelo K No. 4410P-1, a temperatura ambiente. Las condiciones anteriormente descritas no son las óptimas, se recurrió a ellas por falta de equipo adecuado; se recomienda trabajar en centrífuga refrigerada a 16,000 g durante 30 minutos, a 4° C (NILO, 1997).

Una vez concluido el tiempo de centrifugado, se descartó el precipitado y el sobrenadante se pasó a una probeta graduada a fin de conocer el volumen

obtenido. Posteriormente éste se transfirió a otro tubo para centrifuga y se agregó a cada muestra 3 volúmenes de acetona a -15° C a fin de precipitar la proteína solubilizada. Se llevó a una segunda centrifugación a la misma velocidad y tiempo, cabe mencionar que las condiciones ideales de trabajo son también las citadas anteriormente. Al finalizar esta operación se descartó el sobrenadante y se conservó el precipitado, el cual contiene las proteínas obtenidas de cada una de las muestras (extractos crudos).

El precipitado obtenido se resuspendió en 30 ml de la solución búfer de fosfatos 0.1M con el pH adecuado, de acuerdo al origen de cada una de las muestras, y se colocó cada una de las repeticiones en tubos de ensaye con rosca y tapón de baquelita. Enseguida se llevaron a temperatura de congelación para su conservación, y posterior evaluación en cuanto a concentración de proteína y ensayos de coagulación en fresco.

3.2.3.- Determinación de la concentración de proteína (método Bradford).

Se filtraron 2 ml de extracto crudo de cada repetición obtenidos de las diversas partes de la planta, solubilizado en búfer de fosfatos al pH adecuado, con papel filtro de poro cerrado (no. 1). Por separado se filtró también un volumen suficiente de reactivo azul de Coomasie (véase preparación en anexo 7.5.3), el cual se colocó en un matraz erlenmeyer forrado de papel aluminio, a fin de protegerlo de cualquier fuente de luz.

Para preparar el blanco, en un tubo de ensaye se colocó 1 ml de búfer fosfatos, medio en que se resuspendió el extracto, y 1 ml de reactivo azul de Coomasie, se mezcló en un agitador Vortex Genie Mixer modelo S8223 y se vació en una celda para espectrofotómetro. La lectura se realizó en un espectrofotómetro digital marca Spectronic, modelo 20 Genesys, a una longitud de onda de 595 nm.

Para la lectura de proteína de cada repetición se siguió el mismo procedimiento, sustituyendo el agua destilada por 1 ml de extracto crudo filtrado. Obtenidos los datos de lectura se procedió a su registro y procesamiento estadístico.

A fin de estimar la cantidad de proteína presente en los extractos enzimáticos crudos, se realizó una curva de calibración utilizando albúmina en concentraciones conocidas; las cuales consistieron en diluciones seriadas utilizando agua destilada en calidad de solvente.

3.2.4.- Pruebas de coagulación en fresco.

Con el objetivo de conocer la actividad proteolítica de cada una de las partes de la planta, se llevaron a cabo pruebas directas de coagulación bajo la siguiente metodología.

En un vidrio de reloj se colocó 1 ml de leche a 40° C y 1 ml de extracto crudo resuspendido en búfer de fosfatos 0.1 M al pH correspondiente a la fracción de la planta. Se realizó la observación visual de la presencia o ausencia de coagulación en un tiempo de hasta 40 minutos. Con esta prueba se descartaron los extractos

de hojas, tallo y raíz, por presentar nula actividad proteolítica, y se conservó el extracto de las flores, donde si se observó actividad.

3.3.- ETAPA 3: Extracción y purificación de la fracción enzimática a partir de la flor.

3.3.1.- Técnica para la extracción y fraccionamiento de las proteínas presentes.

Se maceraron 5 gramos de muestra, flor desecada, con 50 ml de solución búfer de fosfatos 0.1M al pH 5.3. Una vez solubilizada en el búfer de fosfatos, la muestra se colocó en un tubo para centrifuga y se centrifugó a 3, 500 rpm por 15 minutos en una centrifuga IEC International centrifuge modelo K No. 4410P-1, a temperatura ambiente. Las condiciones anteriormente descritas no son las óptimas, como anteriormente se citó en la etapa 2.

Una vez concluido el tiempo de centrifugado, se descartó el precipitado y el sobrenadante se pasó a una probeta graduada a fin de conocer el volumen obtenido. Posteriormente éste se fraccionó en cuatro partes iguales y se transfirió a igual número de tubos para centrifuga agregándose solución de sulfato de amonio en las diferentes concentraciones que se muestran a continuación en el cuadro 4.

CUADRO 4: Concentraciones de sulfato de amonio utilizadas para precipitar proteínas, solubilizadas en búfer fosfatos, de la flor de cardo (*C. cardunculus L.*).

Volumen de muestra solubilizada (ml)	% de saturación en la solución precipitante de sulfato de amonio
10	0
10	40
10	50
10	80

Lo anterior se realizó con el objetivo de fraccionar la proteína presente en el extracto solubilizado obtenido a partir de la flor de la planta, para su posterior análisis y determinación de la fracción con la actividad proteolítica deseada, lo que no hubiera sido posible utilizando acetona como precipitante en lugar de la solución de sulfato de amonio en las concentraciones mencionadas.

La metodología anterior se llevó a cabo bajo el siguiente fundamento: “Una descripción simplificada del mecanismo de insolubilización por salado está basada en el hecho de que la adición de las sales elimina el agua de la proteína hidratada, dejando las regiones hidrofóbicas en libertad de combinarse intermolecularmente” (GLATZ, 1990).

El procedimiento anteriormente citado tuvo como objetivo la purificación parcial del extracto a evaluar.

3.3.2.- Diálisis.

Este proceso se llevó a cabo con el fin de eliminar la sal (sulfato de amonio) utilizada en la etapa de precipitación, ya que ésta puede interferir en la evaluación

del extracto enzimático, así como la de eliminar proteínas con peso molecular inferior a 12 KDa, ya que son capaces de emigrar hacia el exterior de la membrana utilizada en el sistema de diálisis, manteniéndose en el interior proteínas con un peso molecular superior al mencionado. Faro (1991) reporta que las proteasas del cardo poseen un peso molecular aparente entre 16 KDa y 31 KDa.

Una vez obtenido el extracto de la etapa de precipitación, se diluyó en un volumen de 30 ml de agua destilada y se transfirió al interior de un sistema de membrana sintética, con tamaño de poro que permite eliminar partículas de peso molecular menores a 12 KDa.

El sistema de membrana, previamente cerrado, se colocó dentro de un vaso de precipitado con capacidad de un litro, el cual contenía a su vez agua destilada. Se colocó un agitador magnético dentro del vaso de precipitado y todo el sistema de diálisis se colocó dentro de un baño de hielo, el cual se montó en un agitador Thermolyne, modelo Cimarec 2, a fin de mantener agitación constante dentro del sistema, cambiando el agua del mismo cada hora.

Se llevó a cabo la eliminación de sulfato de amonio por ésta técnica durante un tiempo equivalente a 36 horas, momento en que el agua del sistema presentó ausencia cualitativa de sulfatos. La técnica para determinación cualitativa de sulfatos se expone en el anexo 7.5.1.

3.3.3.- Cromatografía de intercambio iónico.

Posteriormente se continuó con la purificación mediante cromatografía líquida de adsorción, la cual emplea adsorbente en el que los solutos a separar presentan diferentes grados de retención. De los subtipos de cromatografía líquida por adsorción, se optó por la de intercambio iónico, que se basa en la interacción electrostática entre los grupos cargados del soluto y los grupos cargados de los adsorbentes utilizados en ésta (TEJEDA, et al, 1995).

La cromatografía por intercambio iónico es una de las más utilizadas a nivel industrial para la purificación de diferentes tipos de compuestos. Las resinas utilizadas son de dos tipos: catiónicas y aniónicas (TEJEDA, et al, 1995).

La razón de utilizar el método mencionado, fue que se disponía del material necesario y de los reactivos correspondientes en la Universidad. A continuación se describe la metodología.

Se preparó el soporte de la columna, el cual consistió de resina catiónica DOWEX – 50W – X2 (forma hidrogenada) SIGMA, disolviéndola en agua destilada dentro de un vaso de precipitado. Se transfirió la suspensión a una columna hasta el nivel deseado (5 cm de la altura total de la misma). Posteriormente se pasaron por ésta 150 ml de ácido clorhídrico (HCl) 1N, enseguida 150 ml de agua destilada (para neutralizar), y se siguió lavando la columna hasta lograr un pH de 6 a 7, con lo que la columna estuvo lista para usarse.

Enseguida se colocaron 30 ml de muestra (extracto precipitado resuspendido en agua destilada, proveniente de la etapa de diálisis). Se agregaron 150 ml de acetona fría (temperatura menor a 20° C), y después 150 ml de agua destilada a fin de retirar los restos del solvente que pudieron quedar en la columna.

Posteriormente, se añadieron 150 ml de NH₄ OH (hidróxido de amonio) 3N, con lo que se llevó a cabo el intercambio iónico en la columna, se recogió esta fracción y se guardó, ya que es la que contiene a la enzima purificada. Por último, se pasaron por la columna 50 ml de agua destilada a fin de retirar los restos de hidróxido de amonio y la enzima restante que pudo haber quedado adsorbida en aquella.

3.4.- ETAPA 4: Caracterización cinética del extracto enzimático purificado.

3.4.1.- Evaluación de la actividad proteolítica del extracto enzimático purificado.

Debido a la imposibilidad de determinar la actividad proteolítica del extracto enzimático en un sustrato natural (leche bronca) por la problemática que este ofrece, se optó por la metodología reportada por Duckjovich y Esquivel (1995), misma que fue modificada para los fines perseguidos en esta investigación.

Se preparó una solución de caseína al 2% ajustando a pH 6.6 con búfer fosfatos.

Se sometieron a reacción 25 mililitros de sustrato con 0.5 ml del extracto

enzimático purificado a temperatura de 40° C con agitación constante en un termobañó NESLAB modelo Rotofix II.

Se tomaron muestras de la reacción cada minuto por un tiempo total de 10 minutos. La reacción se detuvo con ácido tricloroacético al 10% en baño de hielo. Posteriormente las muestras obtenidas se centrifugaron a 14 000 rpm en centrifuga Eppendorf modelo 5415C por cuatro minutos y el sobrenadante obtenido se sometió a lectura espectrofotométrica U. V. a 280 nm en espectrofotómetro marca Spectronic modelo Biomate 3, utilizando como blanco agua pura desionizada.

3.4.2.- Caracterización cinética.

3.4.2.1.- Determinación del coeficiente de extinción molar (ϵ) del sustrato específico (κ -caseína).

Para la caracterización cinética se determinó primero el coeficiente de extinción molar (ϵ) del sustrato para conocer la concentración de la κ caseína por ser ésta la fracción de las caseínas donde se lleva a cabo la hidrólisis que hace posible la coagulación de la leche.

Para conocer el valor de ϵ para la κ caseína, se aplicó la fórmula reportada por la Universidad de Buenos Aires, Argentina (2003), la cual se explica en seguida y

cuya aplicación se propone para cualquier proteína en unidades de $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ a 280 nm:

$$\varepsilon = 5.5 (\mathbf{W}) + 1.49 (\mathbf{Y}) + 0.125 (\mathbf{C})$$

Donde:

ε = coeficiente de extinción molar.

W = n° de triptófanos (**Trp**) en la molécula de la proteína.

Y = n° de tirosinas (**Tyr**) en la molécula de proteína.

C = n° de cistinas (**Cys**) en la molécula de proteína.

En la tabla 17 del anexo 7.6 se muestra el contenido de los aminoácidos necesarios para calcular el coeficiente ε para la κ caseína. De lo anterior, se dedujo el coeficiente de extinción molar (ε) para dicha proteína: $19.16 \text{ mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$.

3.4.2.2.- Determinación de parámetros cinéticos.

Para la caracterización cinética se tomaron las V_0 de las cinéticas de reacción realizadas en el punto 3.4.1 en unidades de absorbancia por minuto ($U_{\text{ABS}}/\text{min.}$)

A fin de deducir los parámetros necesarios para determinar los valores de V_{max} y K_m , se realizaron ensayos con distintas concentraciones de sustrato siguiendo la metodología que se describe a continuación.

Se preparó una solución madre de caseína al 5% en búfer fosfatos de pH 6.6, de las cuales se prepararon diluciones para obtener concentraciones de 1, 2, 3, 4 y 5%, las cuales se leyeron en espectrofotómetro Spectronic Biomate a 280 nm de

manera directa para conocer la absorbancia de cada una de las concentraciones de sustrato.

Conocida la concentración del sustrato, se pudieron calcular entonces los parámetros cinéticos V_{\max} y K_m para la proteasa del cardo (*C. cardunculus* L.), aplicando el arreglo de Lineweaver - Burk para la ecuación de Michaelis – Menten:

$$1/V_0 = [(K_m/V_{\max}) (1/[S]_0)] + (1/V_{\max})$$

La cual se expresa en la gráfica de la figura 4.

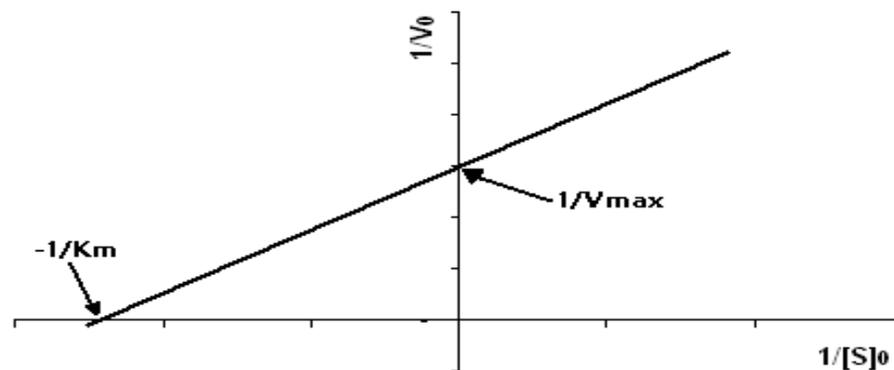


FIGURA 4: Arreglo gráfico de Lineweaver - Burk para la ecuación de Michaelis – Menten.

3.5.- ETAPA 5: Evaluación y aplicación práctica del extracto enzimático en la tecnología quesera.

La parte final del presente trabajo consistió en la evaluación de los extractos obtenidos, además de la enzima purificada, a fin de conocer su funcionalidad. Para lo anterior se llevaron a cabo las pruebas descritas a continuación.

3.5.1.- Determinación de la fuerza de cuajo.

Para esta prueba, se tomó en cuenta la metodología expuesta por Veisseyre (1972):

“Para su empleo racional, los extractos de cuajo comerciales deben tener un poder coagulante cuidadosamente determinado. Este poder, llamado comúnmente fuerza de cuajo, indica el número de litros que puede coagular un litro de extracto de cuajo a la temperatura de 35° C en 40 minutos”.

“Verificar la fuerza de un extracto de cuajo es una operación sencilla. Se calientan 500 ml de leche muy fresca, a 35° C y se le añade un mililitro del extracto de cuajo que se quiere comprobar, o mejor, 10 ml de una dilución 1 / 10 en agua. El tiempo necesario para la formación de una cuajada firme permite determinar la fuerza de coagulación del extracto”:

$$F = \frac{500 \times 2400}{t}$$

Donde:

F: fuerza del cuajo.

t: tiempo (seg.).

500: los ml de leche utilizados.

2400: los segundos equivalentes a 40 minutos.

En este caso, se realizaron tres repeticiones para dos etapas de la purificación (extracto crudo y fracción dializada), utilizando 250 ml de leche recién ordeñada y

500 μ l de extracto diluidos en 5 ml de agua destilada en cada caso. A la fracción purificada no se le sometió a esta prueba debido al elevado nivel de dilución que presentó.

3.5.2.- Aplicación práctica del extracto parcialmente purificado (dializado) en la tecnología quesera.

Después de la determinación de la fuerza de cuajo de las fracciones cruda y parcialmente purificada (dializada), se realizaron dos pruebas de elaboración de queso asadero y queso fresco molido.

En la primera prueba (queso asadero) se utilizaron 20 litros de leche de vaca a 40°Dornic de acidez. Siguiendo la tecnología de elaboración de dicho tipo de queso, mostrada en el anexo 7.5.4, se utilizaron para la coagulación 5 ml de extracto enzimático de flor de cardo (dializado) diluido 2 veces en agua destilada, es decir, un volumen total de 15 ml. Los resultados del seguimiento de la tecnología para el queso asadero se muestran en el apartado correspondiente del capítulo de resultados.

La segunda prueba (queso fresco molido) se realizó con 2 litros de leche fresca de vaca, la cual presentó sólo 16° Dornic de acidez; en el seguimiento de la tecnología de elaboración de este tipo de queso (ver anexo 7.5.5) se utilizó 1 ml de extracto enzimático de flor de cardo (dializado) diluido en 4 partes de agua destilada, es decir, un volumen total de 5 ml. Los resultados obtenidos se exponen en el capítulo correspondiente.

IV.- RESULTADOS

Derivados del seguimiento de la metodología en cada una de las etapas anteriormente expuestas, se obtuvieron los siguientes resultados para cada una en la presente investigación.

4.1.- ETAPA 1: Recolección y conservación del material biológico.

De las fracciones de la planta correspondientes al tallo, hojas y raíz, se recolectaron cantidades suficientes para su evaluación. Estas se conservaron en congelación a partir de su llegada al laboratorio, a fin de preservarlas de alteraciones orgánicas desencadenadas por causas naturales hasta su utilización durante el análisis en busca de agentes (enzimas) con actividad proteolítica.

4.2.- ETAPA 2: Determinación de la parte de la planta con actividad proteolítica.

4.2.1.- Determinación de pH de las diferentes partes de la planta.

A fin de conocer las condiciones de pH en que se debería analizar cada parte de la planta, se procedió a su determinación por medio de la metodología expuesta en el capítulo anterior. Los resultados se muestran en el cuadro 5.

CUADRO 5: Valores de pH de cada parte de la planta.

PARTE DE LA PLANTA	VALOR DE pH
RAÍZ	5.6
TALLO	6.4
HOJAS	6.4
FLORES	5.3

4.2.2.-Técnica para la extracción de las proteínas.

La técnica utilizada para la obtención del extracto proteínico fue seleccionada de acuerdo al rendimiento cualitativo final; aunque que la precipitación con acetona proporcionó rendimientos visiblemente superiores en cuanto a concentración de proteína en el extracto precipitado resuspendido (figura 5), se optó por la precipitación con solución saturada de sulfato de amonio porque, aunque este último presentó un rendimiento cuantitativo inferior en cuanto a concentración de proteína en el precipitado resuspendido una vez eliminada la sal por diálisis, ofreció la ventaja de fraccionar las proteínas presentes en la muestra, con lo que se pudo facilitar la purificación y caracterización de la enzima.

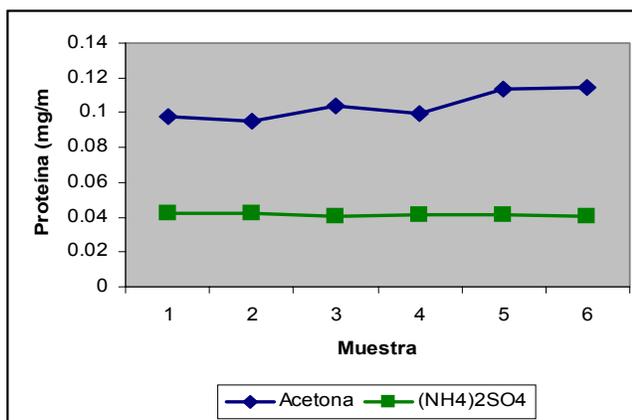


FIGURA 5: Concentración de proteína en extracto precipitado con acetona y con sulfato de amonio, resuspendido en igual volumen de diluyente.

4.2.3.- Determinación de la concentración de proteína (método Bradford).

A fin de conocer la cantidad de proteína presente en los extractos enzimáticos crudos procedentes de las distintas partes analizadas de la planta en estudio, se siguió la técnica de Bradford, expuesta en el capítulo anterior, obteniéndose los resultados mostrados en el cuadro 6.

CUADRO 6: Contenido de proteína en las diversas partes de la planta.

PORCIÓN	CONTENIDO MEDIO DE PROTEÍNA (mg/ml)
RAÍZ	0.0053
TALLO	0.0666
HOJAS	0.0691
FLORES	0.7060

Como se observa, es en la flor donde se encontró la mayor cantidad de proteína, con una concentración media de 0.7060 mg/ml en la solución de extracto crudo. Sin embargo, esto no asegura que sea esta la porción idónea para alcanzar los objetivos planteados, a pesar de que el conocimiento empírico así lo demuestra, ya que no toda la proteína es enzima.

4.2.4.- Pruebas de coagulación en fresco

Las partes de la planta correspondientes al tallo, hojas y raíz presentaron ausencia de coagulación.

El extracto crudo obtenido de las flores desecadas sometido a pruebas de coagulación en fresco mostró una fuerte actividad proteolítica, por lo que se conservó para continuar con la purificación.

Lo anterior se fundamenta en los resultados que se muestran en el cuadro 7.

CUADRO 7: Pruebas de coagulación en fresco.

Parte de la planta	Tiempo de coagulación a $40^{\circ} \pm 1^{\circ} \text{C}$ en minutos			
	10	20	30	40
Raíz	-	-	-	-
Tallo	-	-	-	-
Hojas	-	-	-	-
Flores	+	+	+	+

(+) Resultado positivo. (-) Resultado negativo.

4.3.- ETAPA 3: Extracción y purificación de la fracción con actividad enzimática a partir del la flor.

A fin de obtener un extracto enzimático más puro, una vez conocida la parte a utilizar de la planta, se sometió al extracto muestra (flor) a una purificación parcial primero, materializada en la precipitación con sulfato de amonio y posterior diálisis, hasta lograr una purificación específica, utilizando para este fin el proceso de cromatografía por intercambio iónico.

4.3.1.-Técnica para la extracción de la enzima

La técnica utilizada para la obtención del extracto proteínico fue seleccionada de acuerdo al rendimiento cuantitativo final; dado que la precipitación con acetona proporcionó rendimientos visiblemente inferiores, se optó por la precipitación con solución saturada de sulfato de amonio. Lo anterior se justifica con los resultados del cuadro 8, donde se observa que la fracción protéica obtenida con una saturación al 50% en la solución de sulfato de amonio es óptima para la obtención de la fracción de las proteínas entre las cuales se encuentran las proteasas buscadas.

CUADRO 8: Actividad proteolítica de las diferentes fracciones proteínicas de la flor del cardo (*C. cardunculus* L.).

Fracción (% de saturación)	Proteína (mg/ml)	Actividad [(ΔA/min)/ml E]	Actividad Específica [(ΔA/min)/(mg P)]	Rendimiento (%)	Purificaciones (veces)
Extracto Crudo	0.7060	0.0360	0.0510	100.00	1.0000
40	0.0510	0.0118	0.2313	32.77	4.5353
50	0.0794	0.0220	0.2770	61.11	5.4313
80	0.0350	0.0015	0.0428	4.16	0.8392

4.3.2.- Diálisis

La razón para llevar a cabo el dializado en el extracto enzimático precipitado de flor, es que la presencia de los residuos de sulfato de amonio ocasionan falsas lecturas al realizar la determinación de proteína por el método de Bradford, además, la concentración de sulfato de amonio favorecía también falsos positivos

en las pruebas de coagulación en fresco. Lo anterior se demuestra en los cuadros que se presentan a continuación.

Como puede observarse en el cuadro 9, el error que el sulfato de amonio introduce en las lecturas de proteína del extracto enzimático precipitado de flor es notable. Esta variable fue eliminada en esta etapa de purificación hasta la ausencia cualitativa de sulfato en dicho extracto.

CUADRO 9: Detección espectrofotométrica de sulfato de amonio en solución saturada por la técnica de Bradford.

REPETICIÓN	ABS	ERROR PROVOCADO EN LAS LECTURAS DE PROTEÍNA, EXPRESADO EN mg/ml DE SOLUCIÓN
1	0.3780	0.0285
2	0.4550	0.0401
3	0.4010	0.0320
media	0.4110	0.0335

A continuación (cuadro 10) se muestran los resultados de las lecturas de proteína en el extracto enzimático precipitado de flor antes y después de realizada la diálisis.

CUADRO 10: Determinación de proteína por método de Bradford en extracto enzimático precipitado de flor antes y después de la purificación parcial por diálisis.

REPETICIÓN	Precipitado resuspendido (Proteína en mg/ml)	Precipitado dializado (Proteína en mg/ml)
1	0.5151	0.0816
2	0.4926	0.0752
3	0.4776	0.0813
MEDIA	0.4951	0.0794

Los resultados mostrados en el cuadro anterior (10) revelan el efecto que el sulfato de amonio tiene sobre la detección de proteína por el método empleado, lo anterior acaba por justificar la necesidad de realizar la diálisis a fin de evitar falsas lecturas que afecten los cálculos en la caracterización de la enzima.

En cuanto a los falsos positivos provocados por el sulfato de amonio en las pruebas de coagulación en fresco, en el cuadro 11 se observan los efectos, a la vista, de esta sal sobre las proteínas de la leche. Dicha prueba se realizó a temperatura de $40^{\circ} \pm 1^{\circ} \text{C}$ durante un tiempo de 30 minutos.

CUADRO 11: Pruebas de coagulación en fresco para demostrar el efecto de la concentración del sulfato de amonio en la coagulación de leche fresca.

Agente coagulante	Repeticiones		
	1	2	3
Sol'n saturada de sulfato de amonio	(++)	(++)	(++)
Extracto crudo antes de diálisis	(+)	(+)	(+)
Extracto crudo después de diálisis	(*)	(*)	(*)

(++) Coagulación salina. (+) Coagulación salina-enzimática.

(*) Coagulación enzimática hasta los 40 minutos.

Las características de la coagulación por presencia de altas concentraciones de sal corresponden más a una precipitación que a una coagulación propiamente dicha, ya que las dos principales fases de la leche se separan de forma drástica y total, a diferencia de la coagulación enzimática, donde la fase protéica forma una "red" que atrapa a la fracción acuosa, dando la consistencia de un gel. En el caso de las dos primeras pruebas expuestas en el cuadro 11, las características correspondieron a una coagulación del primer tipo.

4.3.3.- Cromatografía de intercambio iónico

Una vez realizada la purificación por intercambio iónico, se procedió a una determinación de proteína por el método Bradford, cuyos resultados se expresan en el cuadro 12.

CUADRO 12: Contenido de proteína en 1a fracción de purificación por intercambio iónico.

REPETICIÓN	mg/ml
1	0.0546
2	0.0576
3	0.0564
Media	0.0562

A fin de comprobar que la purificación por intercambio iónico había sido efectiva, se realizaron las siguientes lecturas de proteína en la fracción de lavado final de la columna (cuadro 13).

CUADRO 13: Contenido de proteína en 2a fracción de purificación por intercambio iónico (lavado final de columna).

REPETICIÓN	mg/ml
1	0.0044
2	0.0077
3	0.0047
Media	0.0056

Como puede observarse en el cuadro anterior, el contenido residual de proteína en la columna es bajo comparado con el mostrado en el cuadro 12.

4.4.- ETAPA 4: Caracterización cinética del extracto enzimático purificado.

A fin de conocer la actividad proteolítica del extracto enzimático crudo primero, y posteriormente del que presentó una mayor actividad, en el fraccionamiento con sulfato de amonio, se realizaron distintas pruebas de coagulación, cuyos resultados se muestran y explican en los siguientes apartados.

4.4.1.- Evaluación de la actividad proteolítica del extracto enzimático purificado.

Derivadas de las cinéticas de actividad bajo las condiciones expuestas en el apartado de materiales y métodos, las siguientes gráficas (figuras 6 y 7) muestran la formación de caseinomacropéptido durante el tiempo de duración de la reacción con la enzima presente en el extracto dializado y purificado al pH manejado.

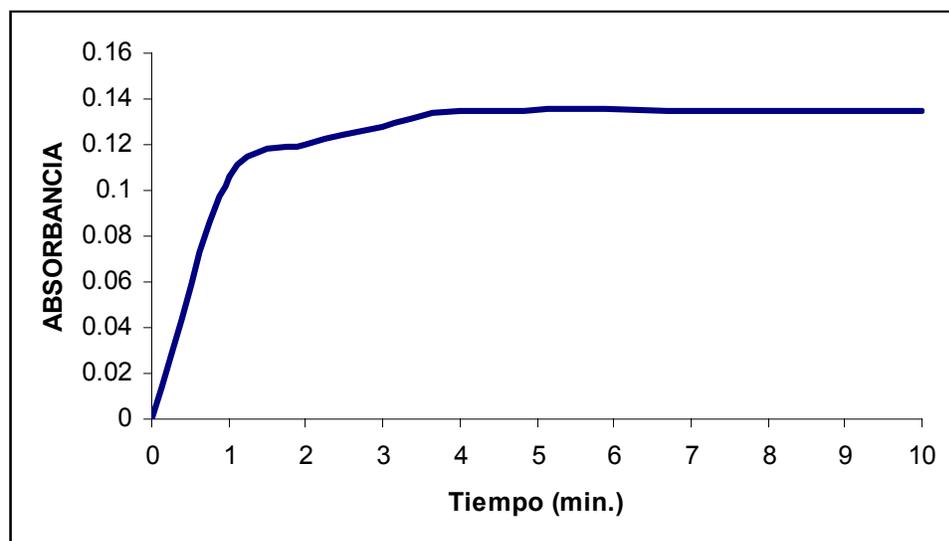


FIGURA 6: Cinética de la formación de caseinomacropéptido durante la reacción con **extracto dializado** a pH 6.6.

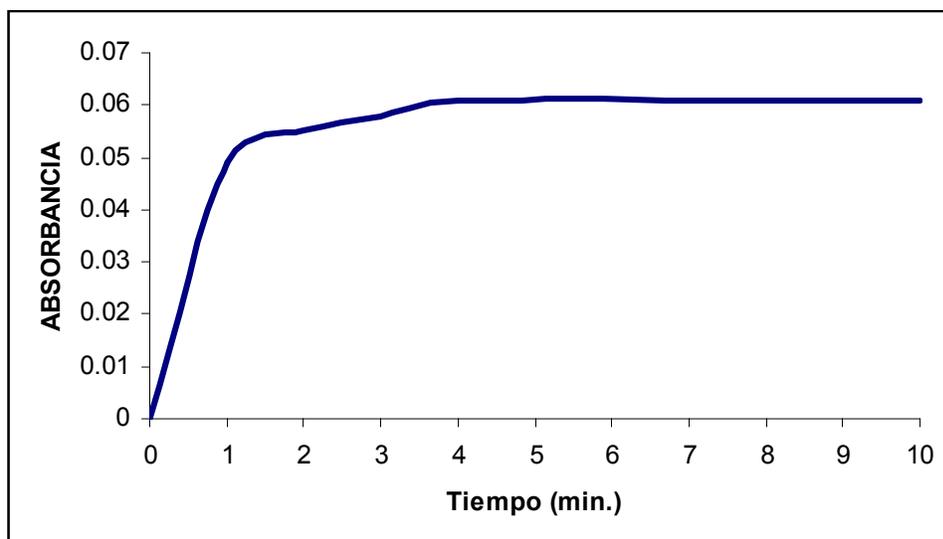


FIG. 7: Cinética de la formación de caseinomacropéptido durante la reacción con **extracto enzimático purificado** a pH 6.6.

A fin de conocer las características del comportamiento de la proteasa de esta planta en la reacción inducida con solución de caseína al 2%, se realizó el análisis de la purificación de las distintas fracciones. En el cuadro 14 se muestran los resultados obtenidos.

CUADRO 14: Evaluación del proceso de purificación de la proteasa del cardo (*C. cardunculus L.*).

Fracción	Volumen (ml)	Proteína (mg/ml)	Actividad $[(\Delta A/\text{min})/\text{ml E}]$	Actividad E total	Actividad Específica $[(\Delta A/\text{min})/(\text{mg P})]$	% Rendimiento	Purificaciones
Cruda	30	0.7060	0.0360	1.0800	0.0510	100.00	1.0000
Dializada	30	0.0794	0.0220	0.6600	0.2770	61.11	5.4313
Purificada	30	0.0562	0.0162	0.4860	0.2882	44.72	5.6521

4.4.2.- Caracterización cinética.

Una vez analizados los datos de V_0 y $[S]_0$ aplicando la ecuación de Michaelis – Menten para el arreglo de Lineweaver - Burk, se pueden conocer los valores de

V_{\max} y K_m para la proteasa del cardo (*C. cardunculus L.*), la gráfica y ecuación lineal resultante se expresa en la figura 8.

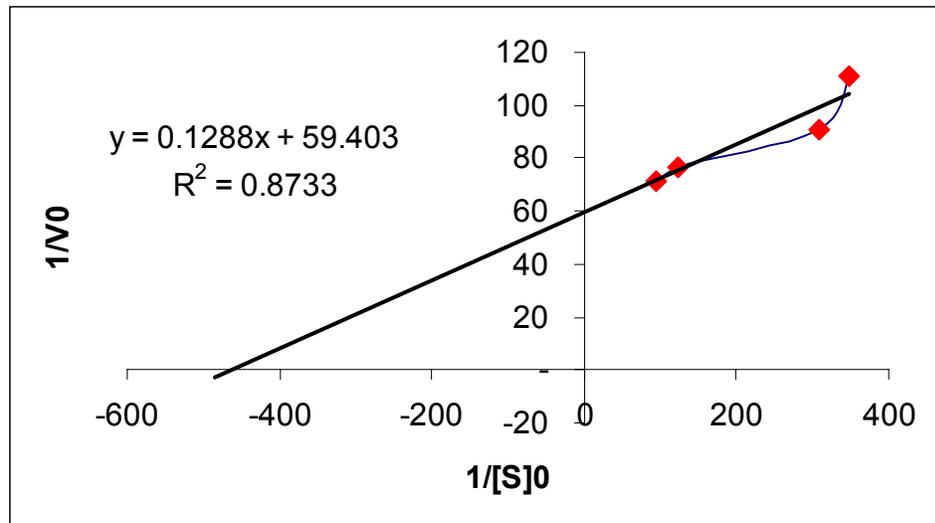


FIGURA 8: Arreglo gráfico de Lineweaver - Burk para la proteasa del cardo.

Arreglada para la expresión de Lineweaver - Burk:

$$1/V_0 = [(0.1288) (1/[S]_0)] + 1/59.403$$

La ecuación proporciona un valor para V_{\max} de $1.6834 \times 10^{-2} \text{ U}_{\text{ABS}}/\text{min}$, mientras que se obtiene un valor para K_m de $2.1682 \times 10^{-3} \text{ mM/ml}$. Con esto, se completó la caracterización cinética de la proteasa del cardo (*Cynara cardunculus L.*).

4.5.- ETAPA 5: Evaluación y aplicación práctica del extracto enzimático en la tecnología quesera.

4.5.1.- Determinación de la fuerza de cuajo.

Derivados de la determinación de la fuerza de cuajo, se obtuvieron los resultados que se muestran en el cuadro 15.

CUADRO 15: Fuerza de cuajo de las fracciones cruda y dializada.

FRACCIÓN	FUERZA DE CUAJO	DILUCIÓN (veces)
Cruda	1:2, 500	10
Dializada	1:1, 740	100

4.5.2.- Aplicación práctica del extracto parcialmente purificado (dializado) en la tecnología quesera.

Para la aplicación de la proteasa obtenida, se eligió al extracto parcialmente purificado, pues el purificado mediante cromatografía de intercambio iónico estaba muy diluido como para ser aplicado en al elaboración de un queso como tal.

Se siguieron dos tecnologías de elaboración que queso. Una para queso molido fresco y otra para queso de pasta hilada, en este caso el tipo asadero.

En la figura 9 se muestra el queso fresco molido elaborado con la aplicación de las proteasas obtenidas de las flores del cardo (*C. cardunculus L.*).

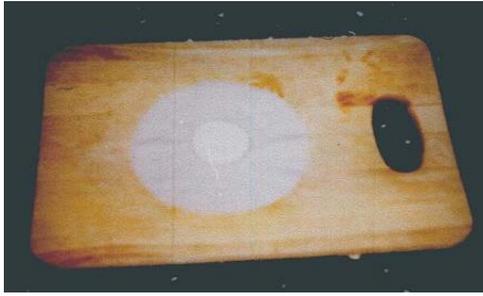


FIGURA 9: Queso fresco molido.

El rendimiento obtenido fue de 10%, es decir, similar al que se obtiene aplicando cuajo animal o coagulante microbiano en la práctica.

El sabor del queso fresco fue normal durante una semana, y alrededor del duodécimo día después de la elaboración comenzó a presentar un ligero sabor amargo.

En la figura 10 se muestra el producto del seguimiento de la tecnología de elaboración de queso asadero.



FIGURA 10: Queso asadero (o de pasta hilada).

Al igual que en el queso fresco, el rendimiento obtenido para este tipo de queso fue similar al que se obtiene con aplicación de coagulantes de origen animal y microbiano, es decir, un 10% del peso total de la materia prima empleada.

No se presentaron defectos en sabor ni en textura en este tipo de queso a 30 días de elaborado, sin embargo, el color que se obtuvo en el producto recién elaborado fue más claro, a simple vista, que el obtenido en productos donde se utiliza el cuajo animal o el coagulante microbiano.

V.- DISCUSIÓN

5.1. Recolección y conservación del material biológico.

En este aspecto, quizá las condiciones no fueron aptas en cuanto a conservación se refiere, pues el equipo de conservación con que se contó no es el adecuado para este tipo de ensayos. Sin embargo, se utilizó lo que se tuvo a la mano a fin de no obstaculizar el desarrollo de las actividades del presente. Esto en cuanto a las partes de la planta analizadas, excepto las flores.

Para estas últimas, la forma de conservación fue distinta aunque con el mismo fin. Sin embargo, Boavida (2001) explica en su obra que la forma de recolección y conservación de las flores del cardo (*C. cardunculus L.*), utilizadas en la elaboración del queso Serpa en Portugal, afecta su fuerza de coagulación, específicamente menciona que se observan mermas en el poder coagulante de hasta un 50% cuando las flores de la planta son desecadas para su conservación, en comparación con el poder coagulante que poseen cuando se encuentran frescas y a lo largo de toda la época de floración (Abril – Junio).

5.2. Determinación del pH de las partes de la planta.

El valor de pH fue igual a 5.3 en las flores, que es la parte de la planta donde se localizó la proteasa, es bajo si se compara con el pH al cual se emplea la planta para efectuar la coagulación en la leche (pH 6.4 – 6.6); aunque Green (1976)

reporta que la actividad de la proteasa del cardo (*C. cardunculus L.*) es directamente proporcional a la baja en el pH del sustrato (leche).

Por lo tanto, el único objetivo que se persiguió al investigar los valores del pH de cada una de las partes de la planta, fue el de conocer las condiciones en las que se realizaría la extracción de proteínas en cada una de las mismas, a fin de lastimar lo menos posible la estructura protéica de la enzima, es decir, evitar su posible desnaturalización.

5.3. Extracción.

Las determinaciones de proteína por el método Bradford muestran un mayor contenido de ésta en las flores (0.7060 mg/ml) comparado con el contenido encontrado en raíz (0.0053 mg/ml), tallo (0.0666 mg/ml) y hojas frescas (0.0691 mg/ml). Sin embargo, la mayor concentración de proteína detectada en las flores no suponía por sí misma que en ella se encontrara una mayor concentración de enzima, aunque el conocimiento empírico así lo indicara.

La presencia de una mayor concentración de enzima en la proteína detectada en flores se ratificó después, con las pruebas de coagulación en fresco, en las cuales, efectivamente, el extracto crudo de las flores fue el único capaz de producir la coagulación por demás notable en el sustrato empleado (leche fresca), según consta en los resultados (cuadro 7, página 47). Es así como fue definida la parte de la planta a utilizar en la siguiente etapa de la investigación.

En cuanto al agente precipitante empleado en la extracción, ya se ha explicado que se eligió por las ventajas de fraccionamiento de proteínas que ofrece una solución saturada de sulfato de amonio sobre el solvente polar (acetona fría), el cual no posee esa cualidad. Además de que trabajos anteriores (Duckjovich y Esquivel, 1995) reportan al sulfato de amonio en solución saturada como un mejor precipitante comparado con la acetona en frío.

5.4. Purificación.

Duckjovich y Esquivel (1995) reportan que después de la precipitación con sulfato de amonio las muestras de proteína de la planta fueron sometidas a un proceso de diálisis para eliminar la presencia de sal en las muestras, así como partículas menores a 12 KDa. Con el mismo objetivo, en el presente trabajo se llevó a cabo un procedimiento similar.

La principal razón por la cual se realizó dicha operación fueron los resultados de la detección de sulfato de amonio en el espectrofotómetro utilizando la técnica Bradford, además de que las partículas con pesos moleculares menores a 12 KDa interferían también en las lecturas reales de concentración de proteína referida a enzima. Con lo anterior se detectaron errores de hasta 0.0335 mg/ml en las lecturas de proteína en el extracto precipitado, lo cual era muy significativo ya que la cantidad real de proteína legible en la solución de extracto obtenido después la eliminación de la sal y de partículas con peso molecular menor a 12 KDa por medio de la diálisis fue de 0.0794 mg/ml. Además, el sulfato de amonio también

interfiere en las pruebas de coagulación en fresco, pues favorece la obtención de falsos positivos en dichas pruebas.

Una vez obtenido el extracto parcialmente purificado y desalado por efecto de la diálisis, la cromatografía líquida de intercambio iónico fue la técnica a seguir para obtener un extracto más puro, aunque también más diluido, que se utilizó en el desarrollo de las reacciones que sirvieron para evaluar la actividad enzimática del extracto sobre el sustrato empleado (caseína al 2%).

5.5. Evaluación del extracto enzimático.

Para conocer el poder coagulante del extracto hasta el primer proceso de dializado, se aplicó la determinación de fuerza de cuajo reportada por Veisseyre (1972).

Los resultados obtenidos de los análisis de actividad proteolítica mostraron un rendimiento apenas satisfactorio comparado con los valores reportados por Boavida (2001).

Para el extracto crudo diluido 10 veces, los resultados fueron muy bajos si se comparan con extractos de cuajo comercial empleados actualmente, que alcanzan fuerzas de cuajo (o valores F) que van desde 1:6 000 hasta 1:10 000, en el caso de extractos líquidos; y hasta de 1:100 000 en el caso de extractos en polvo (fúngicos principalmente y/o recombinantes). Aunque según Veisseyre (1972), se venden extractos con fuerza coagulante desde el orden de 1:2 500.

Sin embargo, como ya se ha mencionado antes, Boavida (2001) reporta que, en el caso del cardo (*C. cardunculus L.*) utilizado en Portugal, la fuerza coagulante varía según varios factores, como la forma de recolección, presencia de impurezas, método de conservación, calidad de las flores y forma de preparación del extracto; y reporta valores F (fuerza de cuajo) que van desde 1:2 000 a 1:5 000 según las condiciones mencionadas.

Martins (1996) y el INIA de España (1998) reportan valores F para el cardo (*C. cardunculus L.*) de hasta 1:9 000, en el caso de la última fuente se trata de una variedad cultivada y mejorada (ETSIA).

En el caso del cardo (*C. cardunculus L.*) encontrado en el Bajío mexicano, se encontraron valores F de alrededor de 1:2 500 para los extractos crudos de flores desecadas en dilución de 1 gr de flor por 10 ml de agua; y valores F de alrededor de 1:1 740 para la fracción parcialmente purificada (hasta primera diálisis), aunque esta última estaba diluida ya 100 veces, por lo que su valor F se estima en 1:17 400, tomando en cuenta que sólo se le sometió a una purificación parcial. Este valor F es superior al del cuajo comercial de origen fúngico, el cual presenta un valor F de 1:10 000.

En cuanto a la fracción purificada por cromatografía de intercambio iónico, los resultados muestran que la enzima del cardo (*C. cardunculus L.*) se ajusta al comportamiento michaeliano, según lo demuestran las curvas de actividad resultantes (figuras 6 y 7), al igual que la renina (BADUI, 1997, anexo 7.1), que es la enzima del cuajo animal.

Por lo que respecta a la caracterización cinética de la enzima, se obtuvo una V_{max} de $1.6834 \times 10^{-2} U_{ABS}/min$ y un valor para K_m de $2.1682 \times 10^{-3} mM/ml$.

El valor de K_m obtenido del procesamiento de los datos de las cinéticas de actividad enzimática y de la determinación de concentración de sustrato indica que la enzima tiene una afinidad aceptable por el sustrato, ya que dicho valor es menor a la unidad. Sin embargo, el mismo valor parece indicar la cierta inespecificidad que reportan autores como Macedo (1994), pues dicho autor menciona que la proteasa del cardo (*C. cardunculus L.*) tiene afinidad por ciertas regiones de la αS_1 – caseína y β – caseína, lo cual puede sugerir que los valores de los parámetros cinéticos pueden ser menores en una reacción entre la enzima y el sustrato de interés, es decir, la κ – caseína.

Con lo anterior se pudieran obtener valores más aceptables para K_m que los obtenidos en este caso, pues en la presente investigación las reacciones de actividad se hicieron con caseína, es decir, la mezcla de caseínas de la leche, donde la κ – caseína representa tan sólo de 11 a 15% de la totalidad del sustrato empleado.

VI.- CONCLUSIONES

1. Las condiciones de recolección y conservación del material biológico posiblemente no fueron las adecuadas, puesto que el valor F encontrado para el extracto crudo (dilución 1/10) sobrepasa apenas a las menores valores F reportados para este tipo de coagulantes en Portugal.
2. Las condiciones de extracción de la enzima tampoco fueron las óptimas, lo cual afectó también la concentración de la enzima en la fracción purificada final.
3. La enzima proteasa del cardo (*C. cardunculus L.*) se ajusta al comportamiento michaeliano, según lo demuestra el seguimiento de actividad proteolítica sobre el sustrato empleado.
4. El valor de Km obtenido es menor a la unidad, con lo que se concluye que la enzima tiene afinidad aceptable por el sustrato; es decir, puede emplearse en la elaboración de queso de manera similar, aunque no en igualdad, con la renina del cuajo animal o la obtenida por ingeniería recombinante, pues la especificidad de ésta última es incomparable con cualquier proteasa que intente sustituirla.
5. El valor F encontrado en las flores de cardo (*C. cardunculus L.*) recolectadas en el Bajío mexicano, en cuanto al extracto crudo, corresponde a los valores reportados por Boavida (2001) en Portugal, de lo

que se concluye que las condiciones geográficas y climatológicas de cada región no afectan el poder coagulante de las flores.

6. En cuanto a la aplicación en la tecnología quesera, el extracto enzimático obtenido de las flores de cardo (*C. cardunculus L.*) puede usarse como alternativa del cuajo animal, dado que el valor F (1:17 400) para el extracto parcialmente purificado sobrepasa el poder coagulante del cuajo líquido comercial con valor F de 1:10 000.
7. Por la acción inespecífica de la proteasa del cardo (*C. cardunculus L.*), se recomienda su uso en quesos de pasta fresca a consumirse en un periodo de tiempo corto (1 a 2 semanas), debidamente conservados; o bien, en quesos de pasta cocida e hilada, cuya conservación se prolonga por la acción que tiene la temperatura del proceso sobre la enzima. No se recomienda su uso en quesos que deban someterse a un proceso de maduración, por muy corto que sea, pues la liberación de péptidos les proporciona sabor amargo y defectos en la textura.
8. Es recomendable realizar un estudio más extenso, y a fondo, de los extractos secos (liofilizados) de cada una de las etapas de purificación y trabajar sobre la inespecificidad de la enzima, con lo cual es posible que se obtengan mejores resultados en el intento de crear un sucedáneo del cuajo animal.

VII.- ANEXOS

7.1. Características de la renina.

“[quimosina]. Enzima de las proteasas ácidas, clasificada como EC 3. 4. 23. 4 que se obtiene del cuarto estómago (obomaso) de becerros, cabritos, corderos y terneras, sin destetar, pues de otra forma se contamina con pepsina; se secreta, en forma activa de cimógeno, como prorrenina (pm 40 000), la cual se convierte a la enzima activa por acción del ácido estomacal; la enzima de pm 31 000, consta de una sola cadena polipeptídica con grupos disulfuros internos, es específica para enlaces peptídicos cuyo carboxilo pertenece a la fenilalanina o a la leucina, pl 4.5, muy sensible a los rayos UV, su temperatura óptima de actividad es de 37° a 43° C, pH óptimo 3.8, aunque en la leche actúa mejor a pH cercano a 5. El producto comercial se presenta en forma de extracto deshidratado (rennet), o como líquido con sabor salino característico; se usa para la fabricación de quesos, ya que, al hidrolizar el enlace de fenilalanina (Phe 105) y metionina (Met 106) de la caseína κ , provoca la inestabilidad y la precipitación del resto de las caseínas por efecto del calcio presente. Cuando una preparación comercial se etiqueta 1:10,000, indica que 1 ml coagula 10 litros de leche a 35° C en 40 minutos, aproximadamente.” (BADUI, 1997)

7.2. Características geográficas del lugar de recolección.

La ubicación del lugar de recolección ya se ha explicado en el apartado de Materiales y Métodos, y las características geográficas del lugar de recolección se exponen a continuación.

7.2.1. Localización.

La ciudad de Apaseo el Grande está situada a los 100° 41' 07'' de longitud al oeste del Meridiano de Greenwich y a los 20° 32' 37'' latitud norte, tomando como base la torre de la iglesia parroquial. Su altura sobre el nivel del mar es de 1 767 metros, en atrio del mismo templo.

7.2.2. Orografía.

La sierra de los Agustinos penetra al municipio por el sur, y la de Codornices por el oeste. Las elevaciones más notables son los cerros: Santa Rosa, Pelón, El Picacho, Peña, Ojo de Agua, El Tejocote, El Cohetero, La Huerta, Jalpa, Galvanes, Mayorazgo, Vicario, y Estancia de las Vacas. La altura promedio de estas elevaciones es de 2 mil metros.

7.2.3. Hidrografía.

Entre los principales cuerpos de agua se encuentra el río Apaseo, afluente del río Laja que se forma en las corrientes de los ríos Querétaro y el Huipal o del Pueblito, provenientes del estado de Querétaro. Entran también al municipio los arroyos del Ixtla y de San Bartolo, así como el río Apaseo el Alto. Existen dos

manantiales de aguas sulfurosas, el del Marroquín, que tiene una temperatura de 92° C, y el de Mandujano, con 12° C. El municipio cuenta también con tres manantiales de aguas alcalinas, que son: El Nacimiento, el de Agua Tibia con 32° C y el de Llanitos con 42° C. Las abundantes aguas de la Cañada de Mandujano, Cedazo y Ojos de Apaseo el Alto, reunidas en arroyos producen una caída de 12 metros; estas aguas se emplean en el riego de las tierras del valle.

7.2.4. Clima.

Es templado y agradable todo el año, con una temperatura máxima de 37.1° C y una mínima de 0.9° C. La precipitación total pluvial anual es de 606.1 milímetros.

7.2.5. Flora y Fauna.

La flora del municipio está constituida por selva baja caducifolia y mezquite, en lo relativo a bosques; pata de gallo, tempranero, tres barbas, navajita filiforme y glandular, búfalo, falsa grama, cola de zorra, lanudo y lobero, con especies forrajeras; y huisaches, nopales y casahuates, en otras especies.

7.2.6. Clasificación y Uso del Suelo.

Los suelos del municipio son de estructura blocoso angular, con una consistencia que va de lo firme a lo muy firme. Su textura es de arcilla limosa a arcillosa, con un pH de 7.4 a 8, de origen aluvial y aluvio coluvial. El 78.82% de la superficie municipal está destinada a la agricultura. De pastizales, 0.83%; de bosques, 0.25%; y de matorrales, 20.10%.

7.3. Algunas condiciones climatológicas de Portugal.

El país ocupa el extremo occidental de la Península Ibérica. Está separado de España por más de mil kilómetros de frontera. Posee en ultramar los archipiélagos de Madeira y Azores.

El clima es fresco y húmedo. Las temperaturas aumentan hacia el sur, donde los inviernos son templados. En verano, el anticiclón de las Azores proporciona un tiempo seco y soleado.

El país está constituido por dos partes: la continental, ibérica y la insular, que comprende los archipiélagos de Azores y Madeira. El Tejo, su mayor río, divide la porción continental en dos regiones diferenciadas. El norte, montañoso, con lluvias abundantes y agricultura intensiva: trigo, maíz, vid, olivos. En el valle del Duero (Douro), la principal región vitivinícola del país, se extienden los viñedos cultivados en terrazas. La ciudad de Porto (Oporto) es el centro de la vida económica del norte. El sur o Alentejo, con mesetas extensas, bajas y clima seco, tiene cultivos de vid, olivo y ganado ovino. Allí se localizan los bosques de alcornoque que hacen del país un gran productor de corcho. La industria pesquera y la construcción naval son importantes en la economía nacional. Posee varios recursos minerales: pirita, tungsteno, carbón y hierro. La erosión tiene mayores efectos por la pobreza natural de los suelos. La contaminación del aire adquiere dimensiones importantes en las zonas urbanas o cercanas a las fábricas de celulosa y de cemento.

7.4. Diferencias morfológicas entre diversos ejemplares caracterizados como *Cynara cardunculus* L.

En la figura 11 se muestran diferentes fotografías de ejemplares clasificados como *Cynara cardunculus* L., y en las cuales se observan diferencias morfológicas entre los mismos. Las fuentes de las imágenes se muestran al final de este inciso.



FIGURA 11: Diferentes ejemplares morfológicamente diferentes clasificados como *Cynara cardunculus* L.



FIGURA 11: ...CONTINUACIÓN.

Fuentes de las imágenes de la figura 11 en orden de aparición:

http://www.podernatural.com/Plantas_%20Medicinales/Plantas_C/p_cardo.htm

<http://www.hoseito.com/FLORES%20SILVESTRES/Cynara%20cardunculus.htm>

<http://www.unex.es/botanica/asteridae/astera10.htm>

<http://www.viarural.com.ar/viarural.com.ar/agricultura/malezas/cynara-cardunculus01.htm>

<http://www.pasoslargos.com/flora/nflora14.htm>

7.5. Técnicas auxiliares utilizadas durante la realización del trabajo experimental.

En el desarrollo de la parte experimental de la presente investigación, se echó mano de algunas técnicas de laboratorio que se describen a continuación.

7.5.1. Preparación de soluciones Búfer.

Amortiguador de fosfato (límites de pH, 5.7 a 8.0) (LYNCH, et al., 1987):

Solución concentrada A: se disuelven 27.6 gr de fosfato sódico monobásico ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) en un litro de agua destilada (0.2 M).

Solución concentrada B: se disuelven 28.39 gr de fosfato sódico dibásico (Na_2HPO_4 ; o 53.62 gr de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) en un litro de agua destilada (solución 0.2 M también). Se mezclan los volúmenes de soluciones concentradas que se mencionan en el cuadro 16, y se afora a 200 ml para obtener los valores correspondientes de pH.

CUADRO 16: Volúmenes de soluciones concentradas A y B y pH que se obtiene.

ml de solución A	ml de solución B	pH final
93.5	6.5	5.7
92.0	8.0	5.8
90.0	10.0	5.9
87.7	12.3	6.0
85.0	15.0	6.1
81.5	18.5	6.2
77.5	22.5	6.3
73.5	26.5	6.4
68.5	31.5	6.5
62.5	37.5	6.6
56.5	43.5	6.7
51.0	49.0	6.8
45.0	55.0	6.9
39.0	61.0	7.0
33.0	67.0	7.1
28.0	72.0	7.2
23.0	77.0	7.3
19.0	81.0	7.4
16.0	84.0	7.5
13.0	87.0	7.6
10.5	90.5	7.7
8.5	91.5	7.8
7.0	93.0	7.9
5.3	94.7	8.0

7.5.2.- Determinación de sulfatos.

Para la determinación de sulfatos durante el proceso de diálisis para desalar las muestras después de la precipitación, se siguió la siguiente metodología.

1. Se tomaron 25 ml del agua del sistema de dializado con pipeta volumétrica.
2. Se colocó la muestra en un matraz erlenmeyer de 125 ml.
3. Se adicionaron a la muestra 2 gotas de anaranjado de metilo y 1 ml de ácido clorhídrico concentrado.
4. La muestra preparada se calentó en una parrilla Termoline ®.
5. Antes de la ebullición se agregaron a la muestra 5 ml de una solución de cloruro de Bario al 10%.
6. Si se observaba precipitación de una sal blanca (sulfato de Bario) la muestra contenía todavía cantidades considerables de sulfato de amonio.
7. Cuando en el procedimiento ya no se observó precipitación de cloruro de Bario, se consideró lista a la muestra para pasar a la etapa de purificación por cromatografía de intercambio iónico.

7.5.3.- Preparación del azul de Coomassie.

Equipo: espectrofotómetro a 595, 465 y 280 nm.

Reactivos: Azul brillante Coomassie G250 (Eastman Kodak) o el comercialmente preparado (Bio – Rad #500-001).

Procedimiento:

1. Disolver 0.06% de Coomassie en 1.9% de ácido perclórico (solución al 60%). (Peso / volumen).
2. Agitar protegiendo de la luz y sin calor.
3. Pasar la solución por papel filtro No. 1 para remover el material no disuelto.

4. La solución debe tener un color café – verdoso. Si ésta es azulada, será porque la solución ha sido contaminada con proteínas.
5. Leer a 465 nm, la lectura debe dar entre 0.6 y 0.7 de absorbancia.
6. Verificar que el matraz, agua y recipiente en que se prepara la solución estén libres de proteínas.
7. Guardar la solución a temperatura fría y protegida de la luz.

7.5.4.- Tecnología de elaboración de queso asadero (o de pasta hilada).

1. Realizar los correspondientes análisis de andén a la materia prima para verificar su aptitud para el proceso.
2. Estandarizar la acidez de la leche hasta alcanzar una acidez de 38° D.
3. Calentar la leche hasta 35° C.
4. Agregar el cuajo (3 ml por cada 10 de leche) previamente diluido en agua fría.
5. Agitar por unos segundos.
6. Dejar que ocurra la coagulación por 15 minutos.
7. Cortar la cuajada y dejar que ocurra la sinéresis por 10 minutos.
8. Desuerar al 80% y agregar 3% en volumen de sal de mesa.
9. Fundir la cuajada a fuego medio hasta que ya no se rompan las hebras al estirar el queso hacia arriba con una pala de madera, mover constantemente para evitar que se queme la pasta.
10. Una vez alcanzado el punto de hilado se saca la pasta del fuego y se deposita sobre la mesa previamente esterilizada para estirar la masa inmediatamente, antes e que se enfríe, hasta obtener una hebra de aproximadamente 3 cm de ancho.
11. Dejar enfriar la pasta ya estirada.
12. Amarrar la pasta enrollando la hebra en forma de bola.
13. Envolver el queso en plástico autoadherible.
14. Pesar el producto final.
15. Calcular el rendimiento, el cual debe oscilar entre un 8 y 10%.

7.5.5.- Tecnología de elaboración de queso fresco molido.

1. Realizar las correspondientes pruebas de andén.
2. Clarificar la leche.
3. Pasteurizar a 72° C por 1 minuto.
4. Enfriar a 38° C.
5. Agregar 0.03% de Cloruro de Calcio. Agitar.
6. Agregar 0.03% de cuajo (diluir en agua). Agitar.
7. Dejar cuajar por 30 minutos.
8. Cortar en cubos pequeños.
9. Permitir sinéresis por 10 minutos.
10. Agitar y calentar a 40° C.
11. Desuerar durante 12 horas por efecto de gravedad.
12. Cortar en cuadros pequeños.
13. Agregar sal de mesa en un 0.3% del volumen total de leche empleada.
14. Moler con cedazo grueso.
15. Moldear.
16. Envolver en plástico autoadherible o papel encerado.
17. Pesar.
18. Calcular rendimiento.
19. Exender en refrigeración.

7.6.- Contenido de aminoácidos en la κ caseína.

Para la determinación del coeficiente de extinción molar de la κ caseína (ϵ) necesario para la deducción de los parámetros cinéticos **Km** y **Vmax**, se localizó bibliográficamente el contenido de aminoácidos de la molécula de dicha proteína. Whitney (1976) reporta el cuadro 17 donde se muestra el contenido aminoacídico de la proteína buscada.

CUADRO 17: Contenido de aminoácidos en la κ caseína (número de aminoácidos en la molécula de proteína).

AMINOÁCIDO (símbolo)	CANTIDAD (n° de a.a.'s en la molécula)
Asp	4
Asn	7
Thr	14
Ser	12
Ser P.	1
Glu	12
Gln	14
Pro	20
Gly	2
Ala	15
Val	11
Met	2
Ile	13
Leu	8
Tyr	9
Phe	4
Lys	9
His	3
Trp	1
Arg	5
Pyroglu	2
1 / 2 Cys	1
TOTAL	169

VIII.- BIBLIOGRAFÍA CONSULTADA

BADUI Dergal, S. 1997. Diccionario de tecnología de los alimentos. Ed. Alhambra Mexicana. México.

BARBOSA, M.; VALLES, E., VASSAL, L.; MOCQUOT, G. 1976. L'utilisation d'extait de *Cynara cardunculus L.* Come agent coagulant en fabrication de fromages à patê cuite. Le lait 56, 1-15. Francia.

BOABIDA Canada, João da Silva. 2001. Caracterización físico – química y sensorial del Queijo Serpa. Tesis de Doctorado en Tecnología de alimentos. Facultad de Veterinaria, Universidad de Extremadura, España.

CAMPOS, R.; GUERRA, R.; AGUILAR M.; VENTURA O.; CAMACHO, L. 1990. Chemical characterization of proteases extracted from wild thistle (*Cynara cardunculus L.*). Food Chem., 89-97.

CARLSON, A., HILL, C. G. y OLSON, N. F. 1987. "Kinetics of Milk Coagulation: IV. The Kinetics of the Gel – Firming Process", Biotechnol. Bioeng., 29, pp. 612 – 624.

CEA: Centro de Estudios Agropecuarios. 2001. Serie agronegocios: Productos Lácteos. Ed. Grupo Editorial Iberoamérica, S. A. De C. V., México.

CHRISTIEN, C.; VIRASORO, E. 1935. Présures végétales. Extraction et propriétés. Le Lait 15 (144), 354-363.

DARLING, D. F. y **DICKSON**, J., 1979, J. Dairy Res., 46, 307 – 311.

DUCKJOVICH, A.; **ESQUIVEL**, G. 1995. Extracción, purificación y caracterización de la proteasa del trompillo (*Solanum elaeagnifolium*) y su posible aplicación en la industria alimentaria. Tesis de maestría en biotecnología de enzimas. Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Coahuila. Saltillo, Coahuila, México.

ECK, André; et al. 1987. El queso. Ed. Omega, S.A., Barcelona, España (1990).

ENCICLOPEDIA® Microsoft® Encarta 2001. © (1993-2000). “Leche”. Microsoft Corporation. Reservados todos los derechos.

FARO, CC. 1991. Purificação e caracterização físico – química da protease de *Cynara cardunculus L.* Tese. Universidad de Coimbra, Portugal.

FIGUEIREDO, AC. 1987. Cultura de células de *Cynara cardunculus L.*, Produção de biomassa e obtenção de proteases. Tese de Doutoramento. Universidad de Lisboa, Portugal.

GARNIER, J., **MOCQUOT**, G., **RIBADEAU-DUMAS**, B. y **MAUBOIS**, J.L., 1968. Ann. Nutr. Alim., 22(2), B 495 – 552.

GLATZ, C. E. 1990. Precipitation. En: Separation Processes in Biotechnology. Asenjo, J. A. (Ed.). Marcel Dekker. New York. 329-356.

GREEN, Margaret L. 1976. Review of the progress of dairy Science: milk coagulants. Journal of Dairy Research. (1997), 44, 159-188.

INSTITUTO Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA) de España. 1998.
“Actividades I + D del INIA; Área de Tecnología de los Alimentos”. Pág. 70.

KANNAN, A. and **JENNESS**, R., 1961. J. Dairy Science, 44, 808.

LYNCH, M. J.; **RAPHAEL**, S. S.; et al. 1987. Métodos de laboratorio, Vol. 2, 2ª edición. Ed. Nueva Editorial Interamericana., México, D. F.

MARCOS, A.; **FERNÁNDEZ – SALGUERO**, J.; **ESTEBAN**, MA. 1978. Influencia anómala de algunos factores en la hidrólisis relativa de las caseínas del queso por cuajos vegetales. (*Cynara sp.*). Anal. Bromat. XXX (3-4), 314-320.

MARTÍNEZ, E. 1979. Actividad coagulante del extracto de cardo (*Cynara humilis*). Tesina de licenciatura. Facultad de veterinaria. Universidad de Córdoba. España.

MARTINS, APL; **PESTANA De Vasconcelos**, MM; **BRUNO De Sousa**, R. 1996. Thistle (*Cynara cardunculus L.*) flower as a coagulant agent for cheese making. Short characterization. Le Lait 76, 473-477. Francia.

MARTINS, APL; **PESTANA De Vasconcelos**, MM; **BRUNO De Sousa**, R. 1996. A flor do Cardo (*C. Cardunculus L.*) como agente coagulante no fabrico do queijo.

Influência de alguns factores ligados à produção. II Jornadas das Industrias Agro-alimentares. ISA. Lisboa. 69-77. Portugal.

MARTINS, APL. 1999. A flor do Cardo (*C. Cardunculus L.*) como agente coagulante na fabricação do queijo. Doutoramento em Engenharia Agro-industrial. UTL. ISA. Lisboa, Portugal.

MATOS, AM; VIEIRA da Sá, F. 1948. Os coagulantes vegetais e animal na fabricação do queijo de ovelha. Boletim Pecuário XVI (1), 25-30. Portugal.

McKENZIE, H. A., 1971. In: Milk proteins, Vol. 2, p. 321, ed. H. A. McKenzie, academic Press, London, U. K.

MERCIER, J.C.; GROSCLAUDE, F. y RIBADEAU-DUMAS, B., 1972. Milchwissenschaft, 27, 402 – 407.

MORBAY, TM. 1990. Projecto cardo. Relatório sucinto da actividade desenvolvida entre 1980 y 1990. INIA, ENTPA, Oeiras. Portugal.

MORGADO, JM. 1990. Estudo comparativo da acção de tres porteases coagulantes do leite sobre as caseínas isoladas e as micelas. Tese de Doutoramento. Universidad de Coimbra. Portugal.

NILO, Rivas R. 1997. Purificación parcial y caracterización cinética de la polifenoloxidasa del Cambur manzano (*Musa [AAB] cy "manzano"*). Facultad de Agronomía. Universidad Central de Venezuela. Macaray (Aroguá).

PAYENS, T.A.J., 1979. J. Dairy Res., 46, 291 – 306.

ROSEIRO, MB. 1991. Ewe's milk cheese making in Portugal using a vegetal rennet (a review). Sheep Dairy News 8, 74.

SANJUÁN, E, FERNÁNDEZ Salguero, J. 1994. Influencia de algunos factores sobre el tiempo de coagulación por cuajo vegetal (*Cynara sp.*). Alimentación Equipos y Tecnología, Jul. – Ago. 69 – 73.

SCOTT, R. 1991. Fabricación de queso. Ed. Acribia, S. A., Zaragoza, España.

SECRETARÍA de Salud. NMX-F-026-1997-SCFI. Leche - denominación, especificaciones comerciales y métodos de prueba. México.

SECRETARÍA de Salud. NOM-121-SSA1-1994, Bienes y servicios. Quesos: frescos, madurados y procesados. Especificaciones sanitarias. México.

SOUSA, MJ.; MALCATA, FX. 1997. Efectos de las condiciones de extracción sobre la actividad caseinolítica de los extractos de *Cynara cardunculus L.* Food Sic. Tech. Int. 2, 255-263.

SOUSA, MJ; MALCATA, FX. 1997. Comparison of plant and animal rennets in terms of microbiological, chemical and proteolysis characteristics of ovine cheese. J. Agric. Food Chemistry 45, 74-81.

STORRY, J.; FORD, G. 1982. "Some Factors Affecting the Post Clotting Development of Coagulum Strength in Renneted Milk", J. Dairy Res., 49, pp. 469-477.

TEJEDA M., Armando; MONTESINOS, R. M.; GUZMÁN, R. 1995. Bioseparaciones. Ed. UNISON (Universidad de Sonora). Hermosillo, Sonora, México.

TSOULI, J. 1974. Etude comparé de l'activité enzymatique de 3 variétés d'artichauts du genre *Cynara cardunculus L.*, sur la coagulation du latí. Le Latí 44 (537), 415-421.

VEISSEYRE, Roger. 1972. Lactología técnica; recogida, tratamiento y transformación de la leche en países templados y calientes. 2ª. Edición del francés (traducción). Ed. Acribia, S. A., Zaragoza, España.

VIEIRA da Sá, F.; BARBOSA, M. 1970. 18th International Dairy Congress. Sydney. 1E, 286.

VIEIRA da Sá, F.; BARBOSA, M. 1972. Cheese making with vegetable rennet from cardo (*Cynara cardunculus*). J. Dairy Res. 39, 335-343.

VIEIRA da Sá, F.; BARBOSA, M. 1972. Journal of Dairy Research. 39, 335.

WHITNEY, R. 1976. Nomenclature of proteins of cow's milk: fourth revision, J: Dairy Sci., 1976, 59, 795 – 815.

VILLARREAL Quintanilla, J. A. 2003. Clasificación taxonómica del cardo. Comunicación personal. Herbario del Depto. de Botánica de la División de Agronomía. UAAAN. Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.

ZITTLE, C. A., THOMPSON, M. P., CUSSTER, J. H. and CERBULIS, J., 1962. J. Dairy Science, 45 (7), 807.

IX.- REFERENCIAS DE INTERNET.

CHEFTEL y **SALINAS**, Rolando. 2003. "El sistema proteínico de la leche".
Disponible en: <http://www.mundohelado.com/materiasprimas/laleche-proteinas.htm>

El 24/08/03; 00:26 hrs.

CONSUMER. ES, Diario del consumidor. 20 de Julio de 2001. "El cardo es capaz de coagular la leche". España. Disponible en: http://www.consumer.es/web/es/nutricion/aprender_a_comer_bien/curiosidades/34995_2.jsp. El 15/08/03; 1:37 hrs.

FARO, Carlos José Fialho da Costa.1991. *Purificação e caracterização Físico-Química da protease de Cynara cardunculus L.* Coimbra, ed. aut., p. 163.
Disponible en: <http://www.uc.pt/sdp/teses/>, el 24/09/03; 23:13 hrs.

INSTITUTO NACIONAL PARA EL FEDERALISMO Y EL DESARROLLO MUNICIPAL; GOBIERNO DEL ESTADO DE GUAJAJUATO. Enciclopedia de los municipios de México. Apaseo el Grande, Guanajuato. Disponible en: <http://www.guanajuato.gob.mx/municipios/apaseoelgrande.htm>, el 24/09/2003; 22:40 hrs.

MACEDO, Maria Isabel Queiroz de.1994. *Especificidade caseinolítica da protease de Cynara cardunculus L.* Coimbra, ed. aut. Disponible en: <http://www.ci.uc.pt/sdp/teses/> el 24/09/03; 23:20 hrs.

MARIÑO, J. R., **VASEK**, O. M. Y **FUSCO**, A. J. V. 2003. "Efectos de la concentración de calcio libre y el pH del agente coagulante en la coagulación

enzimática de la leche”. Disponible en: www.unne.edu.ar/cyt/2001/8-Exactas/E-047.pdf, el 04/09/03; 23:45 hrs.

MEROPS. 2003. Clasificación botánica del Cardo (*C. Cardunculus L.*). Disponible en: <http://merops.sanger.ac.uk/speccards/peptidase/sp000325.htm>, el 17/08/2003 a las 00:29 hrs.

PORTUGAL, CLIMA DE. 2003. Artículos disponibles en <http://www.bizkaiagaztea.com/portugal.htm#clima> y <http://www.eurosur.org/guiadelmundo/paises/portugal/index.htm> el 15/08/03; 02:13 hrs.

PRADOS, F., VIOQUE, M., ZURERA, G., et al. 2002. “Efecto de la congelación sobre la composición química y la proteólisis en queso de leche de oveja madurado, elaborado con un coagulante vegetal en polvo y con renina”. Tecnología de los Alimentos. Universidad de Córdoba. Campus de Rabanales, Edificio Darwin. E-14014. Córdoba. España. Disponible en: <http://cesia2002.udl.es/tc/OB-16.pdf>, el 04/09/03; 23:25 hrs.

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES, Argentina. 2003. Datos de ϵ (coeficiente de extinción molar; $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$) a 280 nm. Disponible en:

<http://www.google.com.mx/search?q=cache:p-4bp5B31I8J:www.q1.fcen.uba.ar/materias/efb/guias/espectroscopia.doc+%22coeficiente+de+extinci%C3%B3n+molar%22&hl=es&ie=UTF-8>, el 27/10/03; 22:22 hrs.

UNIVERSIDAD DE ZULIA, Venezuela. 2003. "Cátedra de ciencia y tecnología de la leche: fundamentos para la elaboración de quesos". Venezuela. Disponible en: <http://members.tripod.com.ve/tecnologia/queso.htm> el 05/10/03; 23:37 hrs.