

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA “ANTONIO NARRO”

DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL



Caracterización de la actividad coagulante de la planta
trompillo (Solanum elaeagnifolium) sobre la leche

Por:

SERGIO AUGUSTO SOLÓRZANO TORALES

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener
el título de:

INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Buenavista Saltillo, Coah, México. Enero del 2004

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
“ANTONIO NARRO”**

DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL

Caracterización de la actividad coagulante de la planta
trompillo (Solanum elaeagnifolium) sobre la leche

Por:

SERGIO AUGUSTO SOLÓRZANO TORALES

TESIS

Que se somete a consideración del H. Jurado examinador como requisito parcial
para obtener el título de:

INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Aprobada por el comité de tesis.

Asesor Principal

Sinodal

M. C. Oscar Noé Reboloso Padilla

M. C. María Hernández González

Sinodal

Sinodal

M. C. Xochitl Ruelas Chacón

Lic. Laura Olivia Fuentes Lara

Coordinador de la División de Ciencia Animal

M. C. Ramón F. García Castillo

Buenavista, Saltillo, Coah. México. Enero del 2004

AGRADECIMIENTOS.

A mi Alma Terra Matter por cobijarme en su seno de sabiduría y hacer de mi una persona de provecho a la sociedad.

Al **M. C. Oscar Noé Reboloso Padilla** por brindarme el apoyo, paciencia y conocimientos en mi trabajo final así como a lo largo de la carrera, que sin estos elementos habría sido imposible mi formación profesional.

Al **M. C. Xochitl Ruedas Chacón, M. C. María Hernández González y Lic. Laura Olivia Fuentes Lara** por su tiempo, esfuerzo y conocimientos que me dedicaron en mi carrera profesional y en este trabajo.

A los demás profesores de la carrera: **Q. F. B. Antonio Aguilera Carbó** así como a la **Dra. Ma. Lourdes Morales Caballero** quienes también dedicaron tiempo para mi formación profesional. Al personal de laboratorio Carlos y Ma. de Jesús “Chacha” que me ayudaron con el aprendizaje práctico. Y todos los maestros que me dieron clase durante la carrera.

Al **COECYT** por el apoyo económico dirigido a la realización del presente trabajo a través de su programa de beca tesis a licenciatura.

A mis amigos Francisco Hernández, Fernando R. Quiñones, Ramiro García, Lupita Salinas, Manuel Valencia por su compañía y los buenos ratos que vivimos juntos y que hicieron más cómoda y grata mi estancia en Saltillo.

En especial a mis Amigos Hermanos **Gil y Edgar** que sin su ayuda, compañía y amistad no hubiera culminado este trabajo.

A la generación XCVI.

Y a las personas que no nombre y que me ayudaron e hicieron amena mi estancia en Saltillo les pido una disculpa.

DEDICATORIAS

A **DIOS** por cuidarme, escucharme, guiarme, y simplemente por dejarme vivir estos momentos inolvidables de mi vida.

A mis padres:

SERGIO SOLÓRZANO VÁZQUEZ.

GLORIA PATRICIA TORALES COSS.

Por todos los sacrificios que hicieron durante su vida, su amor, cariño, consejos; y por darme la mejor herencia que los padres pueden darle a sus hijos que es el ESTUDIO.

A mis hermanos que, desde pequeños, siempre estuvieron conmigo, y que de una u otra manera me ayudaron en este largo camino:

DEMETRIO, CRHISTIAN, MIGUE, ARMANDO y ADRIAN.

A la memoria de mi hermana, ROCIO MIRIAM TORALES, quien me llevo a conocerme a mí mismo, y quien lucho para que consiguiera esta culminación. Que Dios la tenga en su Gloria.

Al Amore de mi vida por su ayuda, compañía, comprensión y amor que me brindo en todos los momentos durante la universidad .

A mi **Abuelita** y tíos por su preocupación y ayuda que siempre me mostraron durante mi estancia en Saltillo:

MARICELA, TARCISIO, MARIA ELENA.

I N D I C E.

Agradecimientos.....	i
Dedicatorias.....	ii
Indice de cuadros.....	v
Indice de figuras.....	vi
Resumen.....	vii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
I.1. Objetivos.....	3
I.2. Justificación.....	4
II. REVISIÓN BIBLIGRÁFICA.....	5
II.1. Generalidades del Trompillo (<i>Solanum elaeagnifolium</i>).....	5
II.1.1. Clasificación del trompillo.....	6
II.1.2. Usos comunes.....	7
II.2. Biotecnología alimentaria.....	7
II.2.1. Tecnología enzimática.....	9
II.2.2. Generalidades de las enzimas.....	10
II.2.3. Enzimas con actividad proteolítica.....	13
II.2.4. Métodos de extracción y purificación de enzimas.....	14
II.3. Elementos de la coagulación.....	15
II.3.1. Leche.....	16
II.3.2. Cuajo.....	19
II.4. Generalidades de los coagulantes.....	20
II.4.1. Requerimientos para coagulantes en la elaboración de quesos..	20

II.4.2.	Tipos de cuajos utilizados en la actualidad.....	22
II.4.3.	Elaboración de quesos con sustitutos de cuajo.....	30
II.5.	Generalidades del queso.....	31
II.5.1.	Clasificación de quesos.....	32
II.5.2.	Producción de queso en México.....	33
II.5.3.	Elaboración del queso.....	33
II.6.	Coagulación.....	35
II.6.1.	Coagulación enzimática.....	35
II.6.2.	Coagulación ácida.....	37
II.6.3.	Factores que intervienen en la coagulación.....	38
III.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	41
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	51
V.	CONCLUSIONES.....	64
VI.	CITAS BIBLIOGRÁFICAS.....	66
VII.	APÉNDICE.....	75

INDICE DE CUADROS.

Cuadro 1. Clasificación sistemática del trompillo.....	6
Cuadro 2. Procesos biológicos involucrados en la biotecnología alimentaria.....	9
Cuadro 3. Clasificación de proteasas.....	14
Cuadro 4. Composición media de la micela de caseína en g/100g.....	17
Cuadro 5. Composición mineral de la fase acuosa de la leche mg/Lt.....	18
Cuadro 6. Orden de sensibilidad de los coagulantes microbianos a diferentes factores.....	27
Cuadro 7. Intensidad de la sensibilidad de los coagulantes microbianos a la caseína.....	28
Cuadro 8. Porcentaje de distribución de las enzimas microbianas entre la cuajada y el lactosuero según el pH.....	28
Cuadro 9. Comparación de la termorresistencia de las enzimas fúngicas.....	28
Cuadro 10. Volumen de producción en México de diferentes tipos de quesos obtenidos de la leche de vaca.....	33
Cuadro 11. Comportamiento del pH de la coagulación durante el proceso.....	39
Cuadro 12. Volúmenes de soluciones concentradas A y B y pH que se obtiene.	43
Cuadro 13. Lectura de proteína del trompillo por espectrofotometría.....	52
Cuadro 14. Resultados de coagulación a 30°C en diferentes etapas del proceso.	54
Cuadro 15. Resultados de coagulación a 35°C en diferentes etapas del proceso.	54
Cuadro 16. Resultados de coagulación a 40°C en diferentes etapas del proceso.	55
Cuadro 17. Resultados de fuerza de cuajo en 20 ml de NaCl a 40 °C.....	56
Cuadro 18. Resultados de fuerza de cuajo en 20 ml de NaCl a 35 °C.....	56
Cuadro 19. Resultados de fuerza de cuajo en 20 ml de NaCl a 30 °C.....	57
Cuadro 20. Resultados de fuerza de cuajo en 10 ml de NaCl a 40 °C.....	57
Cuadro 21. Resultados de fuerza de cuajo en 10 ml de NaCl a 35 °C.....	57
Cuadro 22. Resultados de fuerza de cuajo en 10 ml de NaCl a 30 °C.	58
Cuadro 23. Resultado de fuerza de cuajo en diferentes cantidades de fruto y concentración de NaCl.....	59

INDICE DE FIGURAS.

Figura 1. Diagrama de Venn.....	
Figura 2. Ruptura de la κ -caseína por la acción de la quimiosina.....	
Figura 3. Curva estándar de albúmina.....	
Figura 4. Absorbancia y concentración de proteína del trompillo.....	
Figura 5. Planta trompillo <i>Solanum elaeagnifolium</i>	
Figura 6. Fruto maduro del trompillo.....	
Figura 7. Tallos subterráneos del trompillo.....	
Figura 8. Fruto del trompillo.....	
Figura 9. Etapa inmadura del fruto del trompillo.....	

RESUMEN

El trompillo (*Solanum elaeagnifolium*) es una planta herbácea considerada una maleza que causa daños mecánicos y es tóxica para los animales, sin embargo, se conoce en forma empírica que el fruto de la planta tiene actividad proteolítica sobre la leche, por lo que se utiliza para la elaboración de quesos.

En el presente trabajo se investigarán las partes de ésta planta para confirmar cual tiene mayor actividad coagulante, así como la obtención de un extracto proteico que se considere un posible sustituto viable de la renina (cuajo comercialmente usado).

En el desarrollo del trabajo se evaluaron las concentraciones de proteína de cada parte de la planta, siendo la concentración más alta en la hoja y la más baja en la raíz. Se investigó el poder de las proteasas del fruto a través de las etapas de extracción de proteínas, y se apreció que estas etapas disminuían su poder. El elemento que potencializó la actividad de las proteasas fue la sal común. También se realizaron pruebas de fuerza de cuajo donde se comprobó la función reforzadora de la sal y se elaboraron quesos con los extracto más convenientes.

El fruto del trompillo, aunque no tiene la concentración más alta de proteína, es el que tiene la actividad coagulante. Los extractos crudos del fruto presentaron más actividad proteolítica que los extractos semipurificados. Los quesos elaborados con los extractos seleccionados presentaron características poco favorables.

I. INTRODUCCIÓN

El queso es uno de los productos lácteos más nutritivos para el humano, también es uno de los productos de elaboración que se remontan a tiempos pasados.

El queso es pionero en la utilización de enzimas; ya que estas, son las encargadas de transformar la leche líquida a un estado de gel (cuajada), esto se realiza mediante la especificidad que tienen las enzimas proteolíticas extraídas del tracto gastrointestinal de los mamíferos lactantes, las que tienen la función, dentro del animal, de desdoblar las proteínas de la leche para poderlas asimilar.

La enzima extraída de estos animales es la renina, comúnmente llamada cuajo, constituida por dos importantes enzimas: quimosina y la pepsina (Amiot, Jean 1991). La renina es la enzima comercialmente usada en la elaboración de quesos por lo que se dice que estos quesos son de origen animal.

El cuajo que se pretende utilizar en este trabajo es una enzima, encontrada en el fruto de la planta del trompillo *Solanum elaeagnifolium*; por lo tanto, se trata de un cuajo vegetal, que podría ser una alternativa para la producción quesera de comunidades rurales.

El presente trabajo pretende dar una alternativa viable al campesino, el trompillo es una maleza que se da desde los estados del centro del país hasta el norte de América, y es indeseable para cualquier agricultor, ya que es un competidor potencial en los cultivos; pues tiene la facultad de dar tallos subterráneos, por lo que es difícil de combatir (Villarreal, 1983).

Otro factor dañino, de esta planta, es que produce un alcaloide muy tóxico (solanina) para los animales que lo consumen, principalmente afecta a los pecuarios ya que puede producir la muerte del animal, por lo que genera pérdidas irremediables para el ganadero.

En base a los efectos negativos antes mencionados, es posible decir que el trompillo es una planta rechazada por todos los agricultores y ganaderos, que únicamente produce grandes pérdidas de capital. Sin embargo es también conocida, en forma empírica, que es posible la utilización de ésta, con la finalidad de coagular la leche para la elaboración del queso; dicho empleo es practicado por algunas comunidades rurales del país.

El presente estudio pretende llevar a cabo la comprobación científica y sustentable de la actividad de dicho compuesto en la elaboración del queso. Para dicho propósito, se consultó temas relacionados con la investigación, como son las generalidades de las enzimas, las proteasas, los componentes que intervienen en el desarrollo del queso, los diferentes tipos de coagulantes, métodos de extracción y purificación de enzimas; así como los procedimientos que se llevaran a cabo para la obtención de un extracto proteolítico para la elaboración de queso, evaluando las características del producto final.

I.1. OBJETIVO.

EVALUAR LAS CARACTERÍSTICAS DE EXTRACCIÓN Y RENDIMIENTO DE ENZIMAS PROTEOLÍTICAS DEL TROPILLO COMO POSIBLE ADITIVO VEGETAL PARA LA COAGULACIÓN DE LA LECHE.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- CUANTIFICAR LAS PROTEÍNAS DE LA DIFERENTES PARTES DE LA PLANTA (RAÍZ, TALLO, FLOR, HOJA, FRUTO).
- OBTENER EL EXTRACTO DE LA PLANTA CON LA ACTIVIDAD COAGULANTE SOBRE LA LECHE.
- EVALUAR LA VELOCIDAD ENZIMÁTICA CON DIFERENTE CANTIDADES DE SUSTRATOS Y DE ENZIMA.
- DETERMINAR LA CONCENTRACIÓN DE ENZIMA MÁS APROPIADA PARA LA ELABORACIÓN DEL QUESO.
- DETERMINAR EL MÁXIMO RENDIMIENTO DE QUESO CON DIFERENTES CANTIDADES DE ENZIMA.
- EVALUAR LA PREPARACIÓN DE UN PRODUCTO COMERCIAL A BASE DE UN CUAJO VEGETAL PARA LA ELABORACIÓN DE QUESO.

I.2. JUSTIFICACIÓN.

EL TRABAJO CONSISTE EN EVALUAR LAS ENZIMAS PROTEOLÍTICAS DEL TROMPILLO *Solanum elaeagnifolium* COMO UN POSIBLE ADITIVO DE COAGULANTE VEGETAL PARA LA LECHE. YA QUE ES CONSIDERADO COMO MALEZA, ENCONTRADA ABUNDANTEMENTE EN EL NORTE DE MÉXICO Y PUEDE SER RESPONSABLE DE DAÑOS MECÁNICOS EN LOS CAMPOS DE CULTIVOS E INCLUSO CAUSAR LA MUERTE DE ANIMALES POR EL CONSUMO DE ESTA PLANTA; POR LO QUE SE PRETENDE APROVECHAR DICHO RECURSO Y OBTENER UN BENEFICIO A TRAVES DE LA ELABORACIÓN DE QUESOS, Y QUE NO CAUSE SOLO PERJUICIOS.

II. RECOPIACIÓN BIBLIOGRÁFICA.

II.1. GENERALIDADES DEL TROMPILLO (*Solanum elaeagnifolium*).

Es una planta herbácea erecta, de la familia de las solanáceas, cuyo nombre vulgar más común es trompillo (Duckjovich, 1995), llega a medir hasta 1m de alto, con tallos simples, ramificaciones en la parte superior, cubiertos con finas pubescencias plateadas de pelos estrellados, así como espinitas (aguijones) pequeñas aciculares de color amarillo en toda la superficie; hojas alternas, pecioladas, linear oblonga hasta 15 cm de largo, y 5 a 30 mm de ancho, con el borde ondulado; flores en cima escorpioideas, pedunculares; cáliz con 5 lóbulos; corola violeta, de forma estrellada, de 2 a 3 cm de diámetro; estambres con anteras largas amarillas de poros apicales, agregadas; formando un conjunto central en la flor del cual sobresale el estilo; el fruto es una baya globosa de hasta 15 mm de diámetro, de color amarillo al madurar, y con numerosas semillas en su interior.

Hierba perenne, de verano, con floración durante los meses de abril a noviembre; se reproduce por semilla vegetativa, por tallos subterráneos que dan lugar a otras plantas a partir de una ya establecida, por lo que es una plaga difícil de controlar. Es una especie nativa con extensa distribución en Norteamérica y se presenta como maleza en casi todos los cultivos, áreas de pastoreos, jardines, terrenos inclinados, terrenos baldíos y en lugares húmedos y secos. Es una planta indeseable por los daños mecánicos que causan sus espinas al ganado y al hombre, así como su persistencia en el área, después de establecida. En las hojas y frutos almacena, como todas las solanaceas, una sustancia llamada *solanina*, alcaloide tóxico que en muy baja proporción causa la muerte del ganado (Villarreal, 1983), consumiendo 0.1 a 0.3 % de la planta con respecto al peso del animal, mientras que en el hombre, la dosis tóxica es de 25 mg y la letal más de 400 mg. Es importante señalar que el total de alcaloides presentes en las hojas es de 0.2 % y en el fruto de 3.4 %. Se han detectado, además de la solanina, solasonina, solasodina, solasodieno, diogenina y B-sitosterol.

Los primeros estudios que se realizaron a esta planta, fueron a raíz de que el fruto se ha empleado como sustituto de la renina para la coagulación de la leche

en la elaboración de quesos, y debido a que existe una gran cantidad de proteasas en plantas, se concluyó que algunas de éstas son responsable de dicha coagulación, por lo que estudiando a esta enzima se le dio el nombre de *solanaina* (Duckjovich, 1995).

En Nuevo León el Dr Doroszenko (1997) realizó experimentos de coagulación de leche con la enzima extraída de diferentes partes de la planta *Solanum elaeagnifolium* y recolectada en el estado de Nuevo León, México. 1 ml de la enzima del fruto diluida 1:10, adicionada a 10 ml de leche coaguló leche cruda en 90 segundos y en leche pasteurizada en 100 segundos (en temperaturas de 40 y 50 °C) pero no coaguló leche hervida. A 90 °C 0.5 ml de enzima coagularon 5 ml de leche en 20 seg, siendo el pH óptimo para la coagulación de 5.0. En la enzima se detectaron en papel, los aminoácidos: alanina, glicina, lisina, leucina e isoleucina. El queso preparado con esta enzima fue similar en rendimiento y calidad sensorial al queso realizado con renina, la fuerza coagulante fue de 1:8000.

II.1.1. Clasificación del trompillo

En el cuadro 1 muestra la clasificación sistemática de la planta trompillo con su respectivo significado (Ver figura de la planta en el capítulo de apéndice):

Cuadro 1. Clasificación sistemática del trompillo

Reino	Plantae	Planta
Subreino	Tracheobionta	Vascular
División	Spermatophyta	Con semilla
Subdivisión	Magnoliophyta	Con flores
Clase	Magnoliopsida	Dicotiledónea
Subclase	Asteridae	Grupo de Compuesta
Orden	Solanales	Tamaño medio
Familia	Solanaceae	Compuesto alcaloide
Genero	Solanum	Calma, quietud propiedades de la solanina
Especie	elaeagnifolium	Hojas semejante al grupo de las Eleaegnaceas (USDA.)

II.1.2. Usos comunes

Pese a los datos de toxicidad de la planta se sabe que en el fruto del trompillo (*Solanum elaeagnifolium*) presenta actividad proteolítica, causante de la coagulación de la leche cuando se utiliza el extracto del fruto en la elaboración de quesos.

Se sabe que los indios Pimas en el norte de México (Chihuahua y Durango) utilizan el fruto del trompillo molido para elaborar queso asadero que tiene gran aceptación en nuestro país. Se han realizado algunos experimentos (no científicos) en donde se elaboraron pruebas de coagulación con diferentes partes de la planta, presentando esta característica solamente el fruto, y no importando sus diferentes estados de maduración, ya que estos presentan variaciones irregulares que no pueden ser atribuidas a la estación ni al estado de madurez.

También se conoce que el trompillo es usado de manera empírica (cuya información se ha transmitido de forma oral de terceras personas, por observación directa de personas no calificadas) en la aplicación como antiescabiático (contra la sarna), donde se usan las hojas, como astringente (para producir sequedad en el epitelio y mucosas), y el fruto molido inhalado como estornutativo (para producir estornudo). Los indios Pimas y Kiowas lo usaban como analgésico y contra infecciones gástricas (Duckjovich, 1995).

II.2. BIOTECNOLOGÍA ALIMENTARIA.

El estudio de las enzimas despertó el interés de científicos en los últimos años a través del desarrollo de la biotecnología. Por lo que, el concepto de biotecnología se ajustaba al campo de la ingeniería bioquímica, de manera fundamental en el área de la microbiología industrial y la tecnología enzimática. Sin embargo el término ha adquirido un significado más amplio, e incluso los actuales límites conceptuales de la biotecnología no son muy claros.

La biotecnología es un término que se empezó a utilizar a principios de la década de los setentas para describir toda una serie de procesos naturales biológicos, algunos que datan de 3000 a 6000 a.C., pero caracterizados, en su conjunto, por haber sido desarrollados industrialmente durante este siglo, con

base en un amplio conocimiento de los aspectos bioquímicos y microbiológicos involucrados. Son diversos los sectores tecnológicos sobre los cuales se aplica la biotecnología: alimentos, agricultura, farmacia, diagnóstico y salud, químico, energético, ambiental, minería, etc. (García, 1999).

Es así como se llega a la definición más actual de biotecnología:

Cualquier técnica que utiliza seres vivos o partes de ellos, para hacer productos o modificarlos, para mejorar plantas o animales o para el desarrollo de microorganismos para uso específico. Por lo tanto, la biotecnología es un medio para un fin, un medio para desarrollar nuevos productos y construir nuevos negocios. (Cárdenas, 1991)

En la figura 1 se representa el diagrama de Venn, que constituye la biotecnología, en donde se desprende su carácter multidisciplinario.

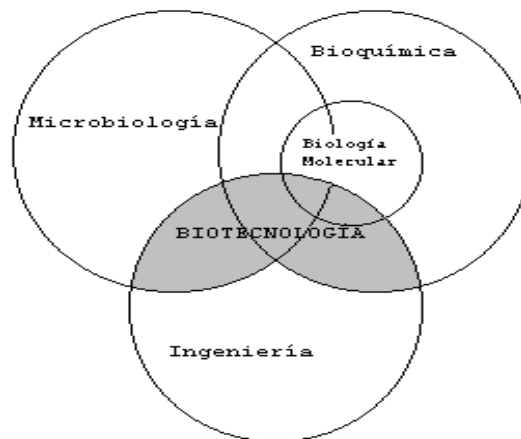


Figura 1. Diagrama de Venn

A partir de la definición anterior es posible emitir el concepto de biotecnología alimentaria:

Es el uso de las tecnologías biológicas para la producción, transformación y/o preservación de alimentos, o bien para la producción de materias primas, aditivos o coadyuvantes empleados en la industria alimentaria. De igual forma, se ve cada vez más involucrada en aspectos analíticos y de control de calidad.

Los ejemplo más comunes de producción de alimentos por rutas biológicas son las bebidas alcohólicas, productos lácteos fermentados (yogurt) y quesos, los hongos comestibles, la col fermentada, la proteína unicelular, etc. En el cuadro 2

se presenta una síntesis de los procesos biológicos involucrados en la biotecnología alimentaria.

Cuadro 2. Proceso biológicos involucrados en la biotecnología alimentaría.

Procesos de fermentación en alimentos: <ul style="list-style-type: none">• Naturales ó espontáneas (cultivos mixtos); por ejemplo, fermentación del cacao, ensilado, pozol.• Inoculadas; por ejemplo, vino, yogurt.
Procesos de fermentación en medios de cultivo: <ul style="list-style-type: none">• Producción de biomasa; por ejemplo, proteína unicelular, levadura de pan y de cerveza.• Obtención de metabolitos primarios; por ejemplo, alcohol, ácidos orgánicos.• Obtención de metabolitos secundarios; por ejemplo, enzimas, polisacáridos.
Cultivos de células vegetales: <ul style="list-style-type: none">• Elaboración de materias primas; por ejemplo, colorantes.• Micropropagación.
Procesos enzimáticos: <ul style="list-style-type: none">• Elaboración de materias primas; por ejemplo, jarabes fructosados, ácido aspártico.• Proceso de transformación; por ejemplo, malteado, coagulación de leche.• Aditivos.

II.2.1. Tecnología enzimática.

La aplicación de las enzimas en la industria alimentaría es, sin duda, una de las áreas de mayor impacto de la biotecnología en este sector.

El descubrimiento de las enzimas y de su papel como agentes catalíticos contribuyó a la consolidación de la bioquímica, y su utilización en la industria de los alimentos no se hizo esperar, como fue el caso del uso de la papaína en la clarificación de la cerveza, probablemente el primer caso de una patente establecida sobre un proceso con enzimas. Procesos muy antiguos como la coagulación de la leche para la elaboración de quesos, la sacarificación del almidón de granos para la elaboración de cerveza, sake y miso, etc., pudieron ser comprendidos y por lo tanto susceptibles a volverse más eficientes y controlables (García, 1999).

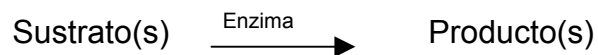
Los aspectos importantes para llevar a cabo el uso de las enzimas a nivel industrial son los siguientes:

- 1) El proceso debe ser simple y aplicable bajo condiciones que minimicen el crecimiento de los microorganismos contaminantes.
- 2) Las enzimas usadas deben ser económicas, realmente disponibles.
- 3) El manejo de los parámetros del proceso: pH, tiempo de acción, temperatura y concentración de los componentes participantes deben ser óptimos (Duckjovich, 1995).

Hoy en día la tecnología enzimática ocupa un lugar preponderante dentro de la biotecnología. Alrededor de un 65 % de las enzimas se producen industrialmente, están de una u otra manera relacionadas con la industria alimentaria (García, 1999).

II.2.2. Generalidades de las enzimas

Las enzimas son proteínas que, debido a su poder de activación específica y de conversión de sustratos en productos, tienen actividad catalítica:



Todos los organismos vivos contienen muchas enzimas, por lo cual las hace esenciales. Las materias vivas (por ejemplo frutas) que son convertidas en alimentos contienen centenares de enzimas diferentes. Estas enzimas son importantes en el crecimiento y maduración de estas materias, las enzimas continúan siendo activas después de la cosecha hasta que se ha consumido todo el sustrato, o hasta que el pH cambia a un valor al que la enzima ya no es activa, o hasta que la enzima es desnaturalizada por un tratamiento aplicado al alimento (pH, calentamiento, adición de compuestos químicos, etc.) (Fenneman, 2000).

Algunas enzimas están compuestas únicamente de aminoácidos unidos covalentemente mediante enlaces peptídicos que dan lugar a proteínas con tamaño entre 12,000 D y cerca de 1'000,000 D (daltons). Otras enzimas contienen componentes adicionales, tales como carbohidratos, fosfatos u otros cofactores. Las enzimas tienen todas las características físico-químicas de las

proteínas. Por lo que respecta a su composición, las enzimas no son diferentes de las demás proteínas en la naturaleza y constituyen una pequeña parte de nuestra ingesta protéica diaria. Sin embargo, al contrario de otros grupos de proteínas, las enzimas son catalizadores altamente específicas de las miles de reacciones químicas que necesitan los organismos vivos.

Las enzimas se encuentran en todos los sistemas vivos y hacen posible la vida, a diferentes temperaturas desde los 0°C, organismos adaptados a crecer a estas temperaturas; los 37°C del hombre, hasta cerca de los 100°C, microorganismos encontrados en algunas fuentes termales. Aceleran las reacciones en un factor de entre 10^3 y 10^{11} veces que las reacciones no catalizadas enzimáticamente. Además, las enzimas son altamente selectivas para un número limitado de sustratos, dado que el (los) sustrato(s) deben unirse estereoespecífica y correctamente al centro activo antes de que la catálisis se produzca. Las enzimas controlan por lo tanto el sentido de las reacciones, dando lugar a productos estereoespecíficos que pueden ser muy valiosos para los alimentos, la nutrición y la salud, o los compuestos esenciales de la vida (Fenneman, 2000).

Especificidad enzimática.

Emil Fischer y estudiantes, sintetizaron muchos carbohidratos, péptidos y otros compuestos de estructura conocida y determinaron a que velocidad eran hidrolizados por carbohidrasas y proteasas, encontrando que pequeños cambios, tales como la eliminación o el cambio de configuración de un solo grupo, podrían tener efectos debido a las velocidades de hidrólisis. Esto llevó a Fischer en 1894 a la hipótesis de la analogía llave-cerradura para la interacción entre enzima y sustrato, en la cual se considera que el centro activo de la enzima era rígido. Este concepto permaneció prácticamente inalterado hasta 1959, cuando Koshland sugirió que la hipótesis del ajuste inducido estaba más respaldada por los datos experimentales obtenidos hasta esa fecha, dado que parecía tener cierta flexibilidad en el acoplamiento entre la enzima y el sustrato cuando formaban un complejo.

Cinética enzimática.

El estudio de la actividad enzimática exige un enfoque cinético y no un estudio al equilibrio. Por lo tanto, el desarrollo de la cinética para estudiar las reacciones fue muy importante. En 1902 Henri y Brown sugirieron independientemente que la relación hiperbólica entre velocidad y concentración de sustrato se debía a la existencia obligatoria de un complejo enzima-sustrato intermediario previo a la conversión del sustrato en producto. Cuando toda la enzima está saturada con el sustrato, ésta funciona a su capacidad máxima y cualquier incremento en la concentración de sustrato no suponen ningún aumento de la velocidad.

Catálisis.

Las enzimas son catalizadores positivos; esto es, incrementan la velocidad de las reacciones por un factor de entre 10^3 y 10^{11} respecto a las reacciones no catalizadas enzimáticamente. Tiene que ocurrir un mínimo de dos sucesos para que se detecte actividad enzimática. Primero, la enzima tiene que unir estereoespecíficamente a un compuesto en el centro activo (no covalentemente). Segundo, tiene que producirse la conversión química del compuesto inicial en un nuevo compuesto. Esto se muestra en la siguiente ecuación, donde E es la enzima libre, S es el sustrato libre, ES es el complejo no covalente de enzima y sustrato y P es el nuevo compuesto (producto) formado.



Regulación de las reacciones enzimáticas.

La actividad enzimática puede ser controlada de distintas maneras que son muy importantes para los científicos en alimentos. La velocidad de una reacción catalizada enzimáticamente es por lo general directamente proporcional a la concentración de enzima activa y dependiente (de una manera compleja) de las concentraciones del sustrato, inhibidor y cofactor, así como la temperatura y el pH. Por ejemplo, es bien conocido que las reacciones catalizadas enzimáticamente ocurren más despacio cuando un alimento es colocado en el refrigerador (4 °C), pero las reacciones no se detienen a 4 °C (o a 0 °C), la mayoría de las reacciones enzimática disminuyen de 1.4 - 2 veces por cada 10 °C de descenso de la temperatura (Fenneman, 2000).

II.2.3. Enzimas con actividad proteolítica.

Todos los materiales biológicos contienen probablemente tanto endo como exoproteasas. Las endoproteasas son las que actúan en el interior de cadenas polipeptídicas, y las exoproteasas actúan en las terminales (Duckjovich, 1995).

Las proteasas hidrolizan enlaces peptídicos específicos en el interior de la cadena protéica para lo que son específicos (Esturo). Estas se ubican como un subgrupo dentro de las hidrolasas (tercer grupo), que rompen proteínas y sus productos de degradación son polipéptidos, péptidos y/o aminoácidos ya que hidrolizan los enlaces peptídicos -CO-NH . Por ejemplo, la clasificación de la quimiosina es: EC 3.4.23.4 (Duckjovich, 1995).

Las enzimas proteolíticas se clasifican en dos grupos fundamentales:

- a) Proteinasas, capaces de atacar moléculas de proteínas enteras.
- b) Peptidasas, que catalizan la degradación de fragmentos relativamente corto (péptidos) (Esturo)

Actualmente las proteasas tiene una amplia aplicación, principalmente en la industria alimenticia. Se emplea para la manufactura de quesos (renina), como ablandadores de carnes (papaína y bromelína), removiendo las proteínas en la clarificación de jugos y bebidas alcohólicas, procesando la proteína de pescado, preparación de hidrolizados proteicos, etc. también tiene otras aplicaciones como, en el curtido de pieles y en la elaboración de detergentes con alta actividad biológica (Duckjovich, 1995).

Las proteasas producen la hidrólisis enzimática de las proteínas especialmente las del sistema digestivo: pepsina, tripsina y quimiotripsina. Cada una de ellas tienen preferencias por las rupturas en determinados enlaces peptídicos, por lo que hace al cuajo una proteasa de alta especificidad.

En el tracto gastrointestinal de los mamíferos se encuentran un buen número de proteasas bien conocidas:

La pepsina, que inicia la degradación digestiva en el estómago a un valor muy bajo de pH (aproximadamente 1).

La tripsina y la quimiotripsina son dos proteasas importantes existentes en la mezcla de enzimas proteolíticas del jugo pancreático (Potter, 1999).

La quimiosina o renina, aunque también la pepsina en menor proporción, son responsables de la acción proteolítica ejercida sobre la κ -caseína (estabilizante de las restantes caseínas en presencia de iones calcio) de la leche (Marino).

En el cuadro 3 se presenta la clasificación de algunas de las proteasas más importantes.

Cuadro 3. Clasificación de proteasas (Santo, 1982).

I.- (EXO) peptidasas	
3.4.11.n	Aminopeptidasas
3.4.11.1	Exo-leusina-aminopeptidasa
3.4.12.n	Carboxipeptidasas
3.4.12.2	Carboxipeptidasa A
3.4.12.3	Carboxipeptidasa B
3.4.13.n	
3.4.14.n	Dipéptido-hidrolasa
3.4.15.n	
II.- Proteineras	
3.4.21.n	Proteineras con grupo OH
3.4.21.1	Quimiotripsina
3.4.21.4	Tripsina
3.4.21.5	Trombina
3.4.21.14	Subtilisina
3.4.22.n	Proteineras con grupos SH
3.4.22.2	Papaína
3.4.22.3	Fisina
3.4.22.4	Bromelína
3.4.23.n	Proteineras ácidas
3.4.23.1	Pepsina A
3.4.23.4	Quimiosina
3.4.24.n	Metalo-proteineras
3.4.24.2	Colagenasa
3.4.24.4	Metalo enzima microbiana
3.4.99.n	Diversas
3.4.99.11	Keratinasa

II.2.4. Métodos de extracción y purificación de enzimas.

Extracción.

La extracción de las enzimas, es un método parcial para la obtención de éstas, es el primer paso que se debe tomar en el estudio de una enzima acerca de su especificidad y caracterización. Existen dos opciones para la obtención de un extracto crudo: una es la ruptura de las células para la extracción y purificación de la enzima, y la otra es efectuar una ruptura parcial de la pared celular (conocida como permeabilización) de modo que la enzima no sea excretada al espacio extracelular y el sustrato y sus productos de hidrólisis puedan difundirse libremente a través de la pared y membranas celulares, sin que pase como transporte activo.

A continuación se mencionan tres métodos para la ruptura y permeabilización de células a gran escala. Estas son consideradas con mayor potencial de implantación industrial.

1. Secado por aspersion.
2. Ruptura mecánica con homogenizador.
3. Lisis celular con agentes químicos.

Purificación.

La obtención de un producto crudo de células completas permeabilizadas, no requiere la purificación de la enzima, sin embargo, cuando se desea obtener un producto más puro y de mayor actividad enzimática es necesario eliminar del extracto celular los componentes biológicos contaminantes como ácido nucleico, fragmento de pared celular y enzimas citoplásmicas “contaminantes”.

Muchos de los métodos de purificación se basan en precipitaciones fraccionadas, por lo que a cualquier precipitación, generalmente le sigue un paso de centrifugación. Por lo tanto, esta operación unitaria es un elemento constante en la purificación de enzimas en general, y deberá ser considerada para la implantación del proceso en cuestión. A continuación se mencionan los métodos de purificación en gran escala que tienen mayor posibilidad de desarrollo.

1. Precipitación con sales. Por ejemplo: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ utilizada en el presente trabajo.
2. Precipitación con solventes.
3. Ultrafiltración (García, 1992).

II.3. ELEMENTOS DE LA COAGULACIÓN.

II.3.1. Leche.

La leche es un líquido opaco, blanquecino o amarillento, segregado por las glándulas mamarias de las hembras de los mamíferos para la alimentación de sus crías. La leche normal no aparece hasta varios días después del alumbramiento; el líquido viscoso segregado desde el momento del parto hasta la aparición de la leche normal recibe el nombre de calostro. 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 calcio, fósforo, cloro, sodio, potasio y azufre. 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 1,018 y 1,045. Los glóbulos de grasa tienen una densidad relativa inferior a la de la fase líquida y, por lo tanto, ascienden a la superficie para formar nata (crema) cuando se deja reposar la leche en un recipiente. También se llama nata a la lactoalbúmina, que es la capa que aparece en la superficie cuando se ha hervido la leche (Encarta, 2000).

La leche más empleada para el consumo humano, es la de rumiantes hembra como la vaca, la cabra y la oveja; También la llama, el reno y el búfalo son importantes productores de leche en muchos lugares del mundo (Anónimo 2).

Proteínas de la leche.

La caseína es la principal proteína que se encuentra en la leche, está en forma de partículas coloidales de fosfocaseinato de calcio. Estas partículas se encuentran en equilibrio en el seno de la leche como micelas dispersas en fase líquida. Este equilibrio es alterable por cambio en la estructura proteica de la caseína, cambio que puede darse por acción de los ácidos o por enzimas específicas (Marino).

La micela de la caseína es una partícula esférica formada por la asociación de caseínas (α_{s1} , α_{s2} , β , κ) y de algunos fragmentos peptídicos (las caseínas γ) que aparecen como consecuencia de la proteólisis de la β -caseína y de

componentes salinos entre los que destacan el calcio y el fosfato. Las proporciones de las diferentes constituyentes de las micelas son presentados en el cuadro 4.

Cuadro 4. Composición media de la micela de caseína en g/100g

Caseínas		Componentes salinos	
α_{s1}	33	Calcio	2.9
C	11	Magnesio	0.2
β	33	Fosfato inorgánico	4.3
κ	11	Citratos	0.5
γ	4		
Total	92	Componentes salinos totales	8.0

El diámetro medio de la micela es del orden de 150 nm, su voluminosidad es de 4.4 ml/g, su grado de hidratación de 3.7 g/g de proteína y su potencial de superficie de 15 a 20 mV las cuales son características físicas que le confieren una gran estabilidad en medio acuoso, no obstante es insoluble en agua en el punto isoelectrico (pH 4.6 para la caseína entera) debido a la elevada proporción de radicales apolares (Eck, 1990).

Composición y estructura química. Las proteínas de la leche poseen un cierto número de caracteres comunes: la presencia de fósforo bajo la forma de grupos fosfoserina, le confieren a las caseínas una gran afinidad frente al Ca, Mg y los oligoelementos. Su aptitud para secuestrar a los metales alcalinotérreos es tanto mayor cuanto más elevada es su fosforilación ($\alpha_{s1} > \alpha_{s2} > \beta > \kappa$)(Anónimo 2).

La caseína κ se diferencia de las otras caseínas por su gran sensibilidad a la quimosina, su gran afinidad al calcio y la presencia de glúcidos en su cadena. La estructura primaria de la cadena peptídica revela la existencia de dos regiones con características contrastadas; la parte NH_2 terminal (1 –105) posee globalmente un carácter básico e hidrofóbico; la parte COOH terminal (106 –169) es ácida e hidrofílica y en esta parte, las cargas negativas, debidas esencialmente a los radicales de ácido glutámico, no están agrupadas en zonas, sino que se localizan en un segmento muy corto (Eck, 1990).

Proteínas del suero.

Las proteínas que aparecen en el sobrenadante de la leche después de la precipitación a pH 4.6 se llaman proteínas del suero colectivamente. Estos proteínas globulares, son más solubles en agua que las caseínas y son objeto de desnaturalización por el calor. Las proteínas del suero nativas tienen buen poder gelificante, la desnaturalización aumenta su capacidad de retención de agua.

Los principales fracciones son β -lactoglobulinas, α -lactoalbúminas, albúmina sérica bovina e inmunoglobulinas. La β -Lactoglobulinas incluyen ocho variantes genéticas, comprende aproximadamente la mitad de las proteínas del suero totales. Tiene dos enlaces disulfuro y un grupo tiol libre. El punto isoeléctrico se encuentra entre pH 3.5 a 5.2, los dímeros se asocian más allá de octámeros pero por pH debajo de 3.4, ellos se disocian a monómeros. Las α -Lactoalbúminas contienen ocho grupos cisteína, todos involucraron enlaces disulfuro, y cuatro residuos de triptófano. La desnaturalización térmica y pH <4.0 dan como resultado la pérdida de calcio (Anónimo 2).

Constituyentes inorgánicos

Los constituyentes salinos que representan el 8 % del peso de la micela, juegan un papel determinante en la formación y en el mantenimiento de la integridad de la micela. El calcio se encuentra en parte (cerca de 1/3) directamente fijado sobre las caseínas, especialmente sobre los ésteres fosfóricos. El fósforo ligado a los radicales serina, denominado fósforo orgánico, representa cerca del 40% del fósforo micelar, y es capaz de quelatar el 30% del calcio micelar. En el cuadro 5 se presenta la composición media de los constituyentes inorgánicos:

Cuadro 5. Composición mineral de la fase acuosa de la leche mg/Lt

Calcio total	440	Citrato	1,600
Calcio iónico	120	Cloruro (Cl)	1,100
Magnesio	90	Sodio	450
Fosfato (Po ₄)	1,100	Potasio	1,500

II.3.2. **Cuajo.**

Es una sustancia presente en el jugo gástrico de los mamíferos lactantes. Contiene una enzima que coagula la leche, llamada renina o quimosina, la cual es el principio activo de las preparaciones de cuajo utilizadas en la fabricación de queso y dulce de leche cuajada. Los preparados comerciales de extractos de cuajo se elaboran a partir de la capa más interna del cuarto estómago de los terneros, también llamado abomaso de 10 a 30 días de edad. La renina coagula la caseína de la leche, convirtiéndola en paracaseína, que precipita en presencia de concentraciones adecuadas de iones de calcio (Encarta, 2000).

El cuajo es una mezcla de quimosina (80%) y de pepsina (20%). La quimosina, enzima dominante, presenta un pH óptimo de acción sobre la caseína cercano a 5, una estabilidad máxima en el intervalo de pH 5-6, rompe preferentemente los enlaces entre aminoácidos hidrofóbicos especialmente los que se dan entre la leucina y la fenilalanina (Potter, 1999).

Al incrementarse la demanda y no ser suficiente la producción de cuajo de ternera se empezaron a usar las enzimas microbianas, siendo la renilasa, que se obtiene del cultivo puro de la cepa *Mucor miehei*, la enzima microbiana mejor conocida (Madrid, 1994).

Extracción de cuajo

Los cuajares de ternero llegan a industrias especializadas desecados, ahí se trozan y se maceran durante algunas horas en una solución salina acidificada con ácido bórico. Durante el proceso de maceración va saliendo la enzima de los cuajares triturados incorporándose a la solución de macerado. Para purificar la enzima se le añade varias veces sal común ó sulfato alumínico ó ácido clorhídrico (hasta pH 5.0), después se procede a neutralizar a pH 5.5 con fosfato bisódico, y se centrifuga para eliminar mucosas precipitadas; la solución enzimática, así purificada, se normaliza con una solución salina a determinada fuerza ó título (1:1,000 ó 1:120,000). La enzima puede purificarse precipitándola por acidificación a pH 5.0 con ácido clorhídrico y saturación de sal. Después se deshidrata al vacío a temperaturas entre 30-37 °C y se pulveriza en un molino de martillos (Witsch, 1976).

El cuajo de ternera se comercializa en forma de polvo, con una fuerza aproximada de 1:100,000 o en forma líquida (extracto de cuajo), con una fuerza de 1:10,000 ó 1:15,000. La renilasa (microbiana) comercial tiene una fuerza aproximada de 1:46,000 (Spreer, 1991).

II.4. GENERALIDADES DE LOS COAGULANTES

Ha existido escasez temporal del cuajo en varios países, pero ha ocurrido una escasez mundial crónica durante los últimos 20 años (F.A.O. 1968). Este interés ha estimulado la búsqueda de los sustitutos más convenientes para el uso como coagulantes en la fabricación de quesos.

Una proporción de coagulante es normalmente incorporado en la cuajada y permanece activo más allá del proceso de elaboración, a través del periodo de maduración (Holmes, 1973). Este coagulante residual contribuye a la proteólisis en la maduración del queso (Lawrence, 1972; Green, 1974). Como las enzimas varían en: actividad, especificidad, proporción y el tipo de proteólisis es así como el desarrollo del cuerpo y sabor depende del coagulante usado (Naudts, 1969).

En el uso de coagulantes, se da una mayor importancia a la etapa relacionada con la maduración que a la coagulación de la leche, debido a que es el primer proceso que se ve afectado por la especificidad de la enzimas de los coagulantes, en mayor magnitud que el segundo. Este esfuerzo ha proporcionado una completa lista de los coagulantes probados como posibles sustitutos para el cuajo. El énfasis es dado, más bien, a los resultados de los ensayos de elaboración de queso, con dichos sustitutos (Green, 1977).

II.4.1. **Requerimientos para coagulantes en la elaboración de quesos.**

Las propiedades requeridas en los coagulantes varían con el tipo de queso (Schulz, 1970). Siendo mas conveniente la definición para maduración corta y quesos moldeados que para los de maduración larga y quesos duros. Estas diferencias surgen, de la importancia del proceso de maduración de los coagulantes, en relación con otros factores. En quesos moldeados, las enzimas de los moldes son dominantes en la producción de aromas (Davis, 1965). Los

quesos hechos con ciertos coagulantes y madurados por periodos cortos, tienen menos tendencia a amargarse que los de largos periodos de maduración (Naudts, 1969). Por consiguiente los sabores amargos surgen de la presencia y características de péptidos (Richardson, 1973; Hamilton, 1974), esto hace posible una presencia proteolítica, en el tiempo de maduración de unas semanas para algunos péptidos y estar produciendo en cantidades significantes. En otras instancias, las características de maduración pueden afectar la magnitud de la actividad coagulante en el queso final (Stadhouders, 1975).

Coagulación y actividad proteolítica.- Un factor importante de un coagulante es la proporción de coagulación de actividades proteolíticas. La mayoría de los sustitutos son más proteolíticos que el cuajo, en relación a la actividad de coagulación (Martens, 1973). Si la actividad proteolítica es excesiva, el rendimiento del queso y la retención de grasa por la cuajada puede ser disminuida (Veringa, 1961; Ritter, 1970). Si la proteólisis es excesiva durante la maduración también tiene efectos indeseables en el cuerpo y sabor del queso terminado (Martens, 1973). La pepsina del cerdo es excepcional, siendo menos proteolítica durante el madurado (Maragoudakis, 1961; Melachouris, 1964), pero esto también tiene efectos negativos en la textura y en el desarrollo de un suave sabor. Sin embargo, el desequilibrio de la coagulación y la actividad proteolítica algunas veces pueden ser corregidas con una ligera alteración en la condiciones de elaboración. La coagulación puede ser ayudada por la adición de CaCl_2 o el uso de leche con bajo pH (Nielsen, 1975), y la maduración puede ser posible, al manipular modificaciones apropiadas en la temperatura y otros factores tecnológicos, durante la maduración o elaboración del queso (Martens, 1973).

Especificidad proteolítica.- Algunos de los productos formados en la proteólisis en queso durante la maduración han sido caracterizados. Sin embargo, la estructura de estos productos debe depender de la especificidad de las proteinasas presentes, así el tipo como la proporción de proteólisis en queso, depende de los coagulantes (Vanderpoorten, 1972). La información disponible indica que las proporciones relativas de la proteólisis α_{s1} y β -caseína por los coagulantes, son importantes en la determinación de sabor y dureza. Por el contrario, la sal controla tanto, la proteólisis de la β -caseína como el desarrollo de

amargor en queso cheddar (Phelan, 1973); por consiguiente los péptidos amargos son derivados de ambas α_{s1} y β -caseína por la acción del cuajo (Pelissier, 1974), puede ser que la hidrólisis de ambas caseínas contribuyan al amargor en el queso.

Propiedades de la cuajada.- Para la elaboración satisfactoria del queso, es esencial que el coagulante y las condiciones usadas, desarrollen una cuajada con propiedades físicas deseables (Veringa, 1961). La firmeza y la sinéresis debe ser similar a cuando se usa (Ritter, 1970; Davis, 1971) la renina y la pérdida de grasa y proteína no debe ser significativa en esta fases (Sardinas, 1972). La evidencia sugiere, que la proporción de la firmeza de la cuajada no es importante al determinar las propiedades de la cuajada. Aunque el aumento en la viscosidad después de la coagulación varía considerablemente con diferentes coagulantes (Richardson, 1971), este factor no afecta directamente a las propiedades finales del queso (Ramet, 1969; Thomasow, 1970).

Enzimas contaminantes.- Ciertos coagulantes contienen otras enzimas además de las proteinasas, esto puede afectar la elaboración del queso o la maduración (lipasas) (Richardson, 1967),

Composición de la proteasas.- La dificultad con la mayoría de los coagulantes, es que pueden contener más de una proteinasa y las proporciones de las diferentes enzimas pueden variar entre ellas. Aunque las variaciones en la composición de las enzimas de sustitutos comerciales no se han reportados, la presencia de más de una proteinasa en diferentes preparaciones sugiere que esto puede ocurrir (Garnot, 1972; Edelsten, 1970).

II.4.2. Tipos de cuajos utilizados en la actualidad.

Debido al aumento registrado en la producción quesera mundial, la renina es insuficiente para atender la demanda existente, por lo que se trata de investigar cuajos procedente de distinto origen.

Algunas propiedades tecnológicas son indispensables y deben respetar las modalidades habituales de la fabricación quesera; esto se puede resumir de la siguiente forma:

- La actividad coagulante debe ser óptima en las condiciones fisicoquímicas de la leche habitualmente empleada en queserías (pH, temperatura, contenido de calcio).
- Las propiedades reológicas de los coágulos deben evolucionar después de la floculación, de forma que permitan el trabajo mecánico del gel en las condiciones habituales.
- La sinéresis del coágulo a lo largo de la fase de desuerado, debe permitir un queso con extracto seco y una composición química, características del queso deseado, en un tiempo similar al del cuajo.
- El rendimiento del queso, expresado en extracto seco, debe ser como mínimo igual al obtenido mediante el empleo de cuajo (Eck, 1990).

Son varios los tipos de cuajo que tienen función proteolítica sobre la leche: de origen animal, vegetal, microbiana y procedentes de la ingeniería genética:

Cuajos de origen animal.

Entre ellos se encuentran los siguientes:

- Cuajo de terneras lactantes cuyo principio activo es la renina.
- Cuajo bovino (animales no lactantes), cuyo principio activo es la pepsina.
- Cuajo porcino, principio activo: pepsina.
- Cuajos de animales combinados en diversas proporciones (50/50 cuajo de ternera y cuajo de bovino, 50/50 cuajo de ternera y cuajo de porcino, etc,) (Madrid, 1994).

El cuajo de ternero se considera el más importante para la fabricación del queso y en algunos casos el estándar para la medida de la actividad de otros cuajos. El extracto obtenido a partir de terneros alimentados con leche, está constituido por un 88-94 % de quimosina y un 6-12 % de pepsina, mientras que la composición de los obtenidos a partir de bovinos que consumen forraje es casi inversa, es decir, 90-94 % de pepsina y solamente 6-10 % de quimosina (Scott, 1991).

El cuajo del ternero se ha usado durante años por extensas áreas geográficas, el cuajo en el queso da sabor, consistencia y textura tradicionales que los sustitutos de renina deben reunir (Merker, 1919) .

La pepsina, como ya se ha dicho, proviene del jugo gástrico de diversos animales. La relación entre la capacidad coagulante y la actividad proteolítica de las pepsinas de bovinos, de cerdos y de ovinos, es diferente de la quimosina de ternero.

También se ha difundido mucho el cuajo de oveja y cabra; ya que estos, le confieren al queso un aroma más intenso que los de ternero, por la alta concentración de lipasas que tiene.

Los cuajos de cerdo, que contienen pepsina (pepsina porcina), se utilizan para la coagulación de la leche conjuntamente con el cuajo de ternero (a partes iguales). Se ha publicado que la pepsina de cerdo posee poca o ninguna actividad coagulante a valores de pH superiores a 6.68 y que esta pérdida de actividad también se registra a temperatura superiores a los 44 °C (Scott, 1991).

La pepsina bovina es muy parecida al cuajo y su actividad es menos dependiente del pH que la pepsina porcina.

La pepsina de pollo ha sido igualmente experimentada con éxito en Israel para la fabricación de quesos locales (Eck, 1990).

En quesos tradicionales, es posible que adviertan que el tiempo de coagulación (hasta el corte de la cuajada) es más largo con cuajos con pepsina que con los de ternero, aunque la firmeza en aquella tarda más en alcanzarse. La pepsina presente en el suero se destruye por un tratamiento térmico moderado, por lo que el suero se puede utilizar, después de un tratamiento térmico, para la elaboración de otros productos (Scott, 1991).

Cuajos de origen vegetal.

Los jugos de varias plantas contienen enzimas que coagulan la leche (Burnett, 1976), pero la mayoría de las plantas coagulantes han demostrado también, propiedades proteolíticas para el uso en la elaboración de queso, generando productos excesivamente amargos (Davis, 1971). Sin embargo, existen excepciones causadas por la influencia de prácticas culturales en ciertos países. El extracto de *Withania coagulans* ha sido utilizada en la India. Esto es satisfactorio para cottage y la elaboración de queso suave pero ha resultado defectuoso en la elaboración de queso cheddar, a pesar de las modificaciones en la técnicas de elaboración (Kothavalla, 1940; Sing, 1973). El coagulante de las

flores del cardo (*Cynara cardunculus*) es usado tradicionalmente en Portugal para la fabricación de queso suave de leche de oveja. La enzima aumenta su actividad cuando disminuye el pH y es más proteolítica que el cuajo (Vieira, 1970). Esto es superior al cuajo en la producción del queso Sierra de leche de oveja, su elevada actividad proteolítica genera una pérdida de rendimiento y defectos en el sabor y textura cuando es usado para la fabricación de Eddam y queso Roquefort (Vieira, 1972).

Desde tiempos pasado, los fabricantes de queso han utilizado plantas como “cuajaleche” (*Galium verum*), picando ortiga, melón y el cardo salvaje, para la coagulación de la leche (Anónimo 3). Se ha reportado que las proteasas en plantas son más abundante durante el verano y decrecen en el invierno (Duckjovich, 1995).

Alais, (1986), menciona que existen cuajos vegetales de diversas especies: *Cyanara* (Cardos, alcachofas), *Galium* (Galio ó cuajaleche), *Pinguicula* (hierva de mantequilla), *Whitania* (granos de W. coagulans), *Ficus*, etc. Todas estas plantas tiene la propiedad de coagular la leche con diferente fuerza, pero ninguna se comercializa industrialmente.

Sin embargo, se ha comprobado que los cuajos de origen vegetal presentan algunos inconvenientes:

- Son muy proteolíticos.
- Dan un sabor amargo durante la maduración (Madrid, 1994).

Es preciso señalar que el costo de la recolección de la materia prima y el de la purificación son elevados y no permiten en la actualidad el difundir en el mercado preparados coagulantes comercializables a precios razonables. Las preparaciones coagulantes de origen vegetal se presentan más como curiosidades que como productos de sustitución del cuajo utilizado industrialmente. A este comentario hay que añadir que no es así en determinados quesos en los que, tradicionalmente se ha usado una enzima de origen vegetal para su elaboración (Eck, 1990).

Cuajos microbianos.

El reemplazo del cuajo de ternero por microbianos como coagulantes lácteos ha mejorado rápidamente. Los cuajo microbianos son enzimas

proteolíticas producidas por microorganismos. Ellos pueden inducir a la coagulación de leche, en cierto modo similar a los cuajo animales (Christensen, 1974).

Las enzimas aisladas de microorganismos tienen la ventaja de que presentan mayor especificidad en las reacciones químicas necesarias para producir un insumo deseado, con un máximo de control sobre la calidad y los rendimientos y un mínimo de subproductos indeseables (Duckjovich, 1995).

Se ha investigado la capacidad proteolítica y la utilidad potencial, como coagulantes lácteos, de centenares de cultivos bacterianos y fúngicos (Scott, 1991).

Las enzimas coagulantes de origen microbiano poseen, en relación a otros sustitutos, numerosas ventajas inherentes a su sistema de fabricación:

- Pueden ser producidos en cantidad prácticamente ilimitada, ya que el ciclo de desarrollo del microorganismo es rápido, generalmente de 2 a 5 días.
- Al final del ciclo de desarrollo del microorganismo, las enzimas coagulantes son extraídas del medio de cultivo y purificado a través de precipitaciones y filtraciones sucesivas.
- La técnica de cultivo y el proceso de extracción son relativamente simples y determinan un precio de venta competitivo.
- Estas preparaciones coagulantes pueden ser utilizadas en países en donde por razones filosóficas o religiosas se prohíbe el uso de enzimas procedentes de determinados animales (Eck, 1990).

El Código de Regulaciones Federales (CFR) 21, bajo la sección 173 y 150, han aceptado los coagulantes lácteos de los siguientes microorganismos que producen enzimas a través de fermentación para el uso en la producción de queso: (1) *Endothia parasitica*, (2) *Bacillus cereus*, (3) *Mucor pusillus* y (4) *Mucor miehei*. Ya que estos organismos no son patógenos ni tóxicos para el hombre u otros animales.

Los cuajos microbianos son clasificados por la FDA como aditivos para alimentos y son regulados según su fabricación, cantidad usada, tipos de alimentos en que se emplean y efectos técnicos intencionales en los que serán usados (Weiss, 1983-88).

Los coagulantes bacterianos que han sido más estudiados son los del género *Bacillus* y *Pseudomonas*, pero los resultados han sido por lo general desalentadores debido a la muy elevada actividad proteolítica de las enzimas producidas con relación a la del cuajo.

Las enzimas de origen fúngico, por el contrario, han dado mejores resultados, con frecuencia comparables y algunas veces superiores a los obtenidos con el cuajo. Muchas preparaciones provenientes de tres géneros de mohos: *Endothia parasitica*, *Mucor pusillus* y *Mucor miehei*, ya se comercializan y utilizan en el mercado internacional (Eck, 1990). Las proteasas de estos mohos hicieron su aparición como sustitutos de cuajo de ternera, en el comienzo de la década de los 70's, ya eran usados para la fabricación del 60% de los quesos hechos en Estados Unidos. La mezcla de cuajo con pepsina de cerdo ocuparon el 25% y al extracto de cuajo le pertenecía el 15%. Considerando que las enzimas de origen animal han sido utilizadas por siglos, se ha hecho costumbre el sabor de muchas variedades de queso, la rápida aceptación de cuajos microbianos como sustitutos es un logro notable para la ciencia y la industria (Christensen, 1974).

La aptitud quesera y las propiedades bioquímicas de estos coagulantes microbianos han sido estudiadas y comparadas a las del cuajo. Estos resultados han mostrado diferente comportamiento más o menos marcadas según las enzimas consideradas, en lo que concierne a:

- La sensibilidad a las variaciones de diferentes factores del medio: pH, temperatura, concentración de iones calcio de la leche. Como se muestra en el Cuadro 6.

Cuadro 6. Orden de sensibilidad a diferentes factores.

Orden de sensibilidad	Temperatura	pH	Ca
1 (la más sensible)	<i>M. miehei</i>	<i>M. pusillus</i>	<i>M. pusillus</i>
2	<i>M. pusillus</i>	<i>M. miehei</i> , Cuajo	<i>M. miehei</i>
3	Cuajo		Cuajo
4 (la menos sensible)	<i>E. parasitica</i>	<i>E. parasitica</i>	<i>E. parasitica</i>

- La actividad proteolítica que es de intensidad y de especificidad variable según la enzima considerada (cuadro 7).

Cuadro 7. Intensidad de la sensibilidad de la caseína.

Caseína	α	β	κ
<i>E. parasitica</i>	+++	++	+
<i>M. pusillus</i>	++	++	++
<i>M. miehei</i>	++	+	++
Cuajo	++	+	++

- La distribución de la enzima entre la cuajada y el lactosuero evoluciona específicamente según el pH considerado. El cuadro 8 da la actividad encontrada (en % de la actividad inicial) en el coágulo después de la acidificación a diferentes valores de pH.

Cuadro 8. Porcentaje de distribución de la enzima entre la cuajada y el lactosuero según el pH.

pH	5.2	6.0	6.4	6.6
Cuajo	83	70	47	30
<i>M. pusillus</i>	11	12	13	14
<i>M. miehei</i>	190	19	18	19

- La termorresistencia es más elevada en las enzimas de *Mucor miehei* y *Mucor pusillus*; La enzima de *E. parasitica* es más termolábil como se muestra en el Cuadro 9.

Cuadro 9. Comparación de la termorresistencia de las enzimas fúngicas.

pH	5.2	5.6	6.0	6.2	6.6	7.0
Cuajo	10	4	0	0	0	0
<i>M. pusillus</i>	33	8	0	0	0	0
<i>M. miehei</i>	99	80	60	24	3	0
<i>E. parasitica</i>	3	2	1	0	0	0

Actividad residual en porcentaje de la actividad inicial después de un tratamiento a 68.3 °C – 1 min (Eck, 1990).

Estas características se traducen por modalidades de evolución particulares en diferentes fases de fabricación del queso:

- Los coágulos formados son más blandos en los primeros minutos posteriores a la floculación, posteriormente, se endurecen de forma comparable y algunas veces más rápida que los coágulos obtenidos por cuajo.
- El desuerado del queso es mejor que con cuajo.
- La acidificación es más rápida y más acentuada.
- La composición media del suero al igual que el rendimiento quesero, expresado en peso seco de queso, son parecidos a los obtenidos con el empleo del cuajo.
- El afinado es generalmente un poco más rápido, debido a una actividad proteolítica propia de cada enzima que puede ser algo superior a la del cuajo (Eck, 1990).

Las mezclas de coagulantes usadas en los experimentos de elaboración de quesos han contenido algo de renina. La razón ha sido tanto para conservar el cuajo como evitar algunos de los problemas que surgen al usar los sustitutos solos. Este acercamiento ha sido exitoso al utilizar mezclas de 50:50 de renina y pepsina de cerdo, que es la más conveniente como coagulante en la producción de quesos (Martens, 1973).

Cuajos recombinantes

Otra estrategia para la sustitución de la renina, y que permite también la obtención de cuajos con 100 % de quimosina, es la producción con microorganismos recombinantes, ya que la quimosina es la proteasa ideal para la elaboración de quesos.

En la actualidad, se comercializan quimosinas recombinantes producida por tres distintos organismos diseñados por la ingeniería genética: Maxiren producida en *Kluyveromyces lactis*, Chymogen producida en *Aspergillus awamori*, y Chi-Max producida en *Escherichia coli* (García, 1999). La quimosina recombinante fue el primer ingrediente alimenticio derivado de la Biotecnología reconocido como inocuo por la FDA. Distintos factores fueron importantes para su reconocimiento como inocuo: el gen introducido codifica una proteína que tiene la misma estructura y función que la quimosina derivada del cuajo de ternero, el proceso de manufactura remueve todas las impurezas, los organismos

productores son destruidos o removidos en el proceso de elaboración tanto los no patógenos como los no tóxicos y los genes marcados con resistencia a los antibióticos (ejemplo la ampicilina) son destruidos durante el proceso de la manufactura (F. D. A.,1995).

K. lactis se usa para la producción de beta-galactosidasa en la tecnología láctea y sus propiedades de fermentación se entienden bien. Se descubrió que la quimosina puede producirse en este organismo y se lograron en este medio buenos niveles de secreción. El gen de la quimosina se insertó en el cromosoma de *K. lactis* y la levadura crece a través de fermentación del lote alimentado. Después de la fermentación, la levadura es destruida por la adición de ácido benzóico y la quimosina es aislada por filtración.

Se tiene evidencia pública que el cuajo recombinante tiene los atributos necesarios para la producción del sabor y textura de los quesos tradicionales e incluso con periodos largos de maduración y puede usarse en todas las variedades de queso (Anónimo 4).

II.4.3. **Elaboración de queso con sustitutos del cuajo.**

Fueron estudiados resultados iniciales de ensayos en la elaboración de quesos con los más convenientes sustitutos (Naudts, 1969) y han hecho las recomendaciones para el plan de ensayos. Se ha descrito un método para comparar rendimientos entre quesos. Han sido también emprendidas las comparación de sabor y textura y la información obtenida sobre el comportamiento de coagulantes bajo ciertas condiciones comerciales. Este dato es vital para la evaluación definitiva y la tecnología conveniente de los coagulantes al elaborar quesos (Emmons, 1976).

Coagulantes de estómagos de animales. Aunque el uso de pepsina de cerdo sólo como un coagulante, presenta dificultades (Nelson, 1972), la mezcla de cuajo: pepsina de cerdo 50:50 es considerada generalmente conveniente para la elaboración comercial de queso y es usado por cerca del 40% de la producción de queso en U.S (Sardinas, 1972).

En el cuajo usado para la elaboración comercial de queso, al menos el 20% es de pepsina de bovino (Martín, 1975), mientras que los extractos de estómago

de bovino maduro consiste en una mezcla de renina : pepsina bovina que contiene 50-80% de pepsina bovina (Emmons, 1976). El extracto de estómagos bovinos maduros promete ser coagulante para la elaboración de queso Cheddar en un experimento piloto a escala (Phelan, 1973).

Coagulantes de hongos. En ensayos iniciales han elaborado diferentes tipos de quesos con *E. parasítica* considerado como aceptable igual que los elaborados con renina. Los coagulantes de *Mucor* han tenido gran aceptación, aunque se han hecho ligeras modificaciones en la técnica de elaboración del queso, que algunas veces han sido necesarias (Shovers, 1967).

II.5. GENERALIDADES DEL QUESO

Desde tiempos inmemoriales el hombre se sirve de los productos derivados de la leche para enriquecer su dieta y mejorar su estado nutricional, a tal grado que el microbiólogo Ilya Metchikoff del siglo XIX llegó a creer que las leches fermentadas eran la fuente de la eterna juventud. Sin embargo, recientemente se han aclarado los principios de la transformación de la leche en todos esos productos que consumimos desde hace varios milenios, ejemplo claro es el queso un derivado lácteo.

El queso es un producto alimenticio sólido o semisólido que se obtiene separando los componentes sólidos de la leche (la *cuajada*), de los líquidos (el *suero*). Cuanto más suero se extrae más compacto es el queso. El queso se elabora desde tiempos prehistóricos a partir de la leche de diferentes mamíferos, incluidos los camellos y los alces. Hoy en día, sin embargo, la mayoría de los quesos son de leche de vaca, a pesar del incremento que ha experimentado en los últimos años la producción de quesos de cabra y oveja. Es un elemento importante en la dieta de casi todas las sociedades porque es nutritivo, natural, fácil de producir en cualquier entorno, y permite el consumo de leche en momentos en que no se puede obtener (Encarta, 2000).

El cuajo de ternero, es el agente coagulante históricamente usado para la coagulación de la leche atendiendo al proceso tradicional de fabricación de la mayoría de los quesos (Encarta, 2000).

II.5.1. Clasificación de quesos.

Existe una gran variedad de quesos (cerca de 2000 tipos registrados), sin embargo, las diferencias existentes dentro de cada variedad con respecto al tamaño, forma, presentación, recubrimiento, tipo de leche, sistema de fabricación, etc., hace que su clasificación resulte extremadamente complicada.

Las características de cada queso vienen definidas por su tamaño, forma, peso, color, y aspecto externo así como algunos datos analíticos, como son: porcentaje de grasa, de sal, de humedad, de extracto seco, etc (Scott, 1991).

Una clasificación muy general de los diferentes tipos de quesos, la podemos definir como sigue:

Quesos duros. Este grupo de quesos se caracteriza por un bajo contenido de humedad y grasa, se elabora con leche parcialmente descremada y madura por largos períodos de tiempo para conseguir su desecación. Ejemplo de este grupo de quesos son: Parmesano, Cheddar y Emmental.

Quesos blandos o semiblandos. Son quesos con un porcentaje de humedad intermedio, que va desde 40 a 60 % y maduran con una combinación de enzimas y microorganismos que actúan dentro de la masa ó superficialmente. Ejemplo de este grupo de quesos son: Chihuahua, Eddam y Manchego (Compaire, 1976).

Quesos frescos. Este tipo de queso es a base de coagulación larga de la leche, por acción combinada de la acidificación y una pequeña cantidad de cuajo, y el tiempo de maduración es nula. Ejemplo de este grupo de quesos son: Panela, Queso Fresco, Botanero, Quark (Eck, 1990).

Queso de coagulación ácida. Son productos obtenidos a partir de la cuajada de la leche ácida, con adición de sustancias auxiliares (ácidos orgánicos) y se comercializan con distintos grados de maduración. Ejemplo de este grupo de quesos son: Queso Blanco y Cottage (Spreer, 1991).

Quesos de suero. Son quesos elaborados a partir de suero, que se le puede añadir ó no ciertas proporciones de leche, nata ó leche en polvo. Este queso es dulce y de sabor cocido. Ejemplo de este grupo de quesos son: Requesón, Ricota y Ziger (Scott, 1991).

Quesos fundidos ó de pasta hilada. Se denomina queso fundido a los productos obtenidos por fusión de un queso ó una mezcla de quesos, a los que se le añade eventualmente otros productos lácteos (nata, mantequilla, caseína). Ejemplo de este grupo de quesos son: Oaxaca y Mozzarella (Luquet, 1993).

II.5.2. Producción de queso en México

La producción de queso en México es importante, por lo que da una idea de la cantidad de leche que se destina a éste producto. Otra cosa importante es, que se da un aproximado de cuánta enzima de origen animal se emplea en la elaboración del queso así como su importancia, por lo que esta la tesis ofrecerá una alternativa para sustituir parte de esa cantidad de enzima, y así disminuir el sacrificio de animales con el fin de extraerles la enzima. Los valores de producción de diferentes tipos de quesos que se elaboran en México se encuentran en el cuadro 10.

Cuadro 10. Volumen de Producción en México de diferentes tipos quesos obtenidos de Leche de Vaca

PERIODO	Amarillo	Chihuahua	Doble crema	Fresco	Manchego	Oaxaca	Panela
	Volumen (Ton)	Volumen (Ton)	Volumen (Ton)	Volumen (Ton)	Volumen (Ton)	Volumen (Ton)	Volumen (Ton)
1994	1,179	1,025	1,195	3,326	1,442	771	673
1995	1,405	752	1,095	3,740	1,329	970	682
1996	1,341	730	879	3,046	1,427	968	680
1997	1,311	873	765	2,937	1,452	948	676
1998	1,500	946	969	2,941	765	945	882
1999	1,564	882	1,098	3,142	812	948	735
2000	1,736	863	1,373	3,525	823	1,224	780
2001	1,789	913	1,737	3,601	642	1,320	937
2002	1,945	925	1,752	3,790	707	1,398	1,007
2003/01 p/	1,744	849	1,536	3,834	459	1,267	1,101
2003/07	1,586	846	1,598	3,773	509	1,221	1,254

p/ Cifras preliminares a partir de la fecha que se indica
FUENTE: INEGI. Encuesta Industrial Mensual.

II.5.3. Elaboración del queso

Para iniciar la elaboración del queso se debe tener la leche pasteurizada con los métodos apropiados. La transformación de la leche en queso esta integrada por todo un proceso, que consta de varias etapas:

La coagulación.- Es la etapa fundamental del proceso de queso, se interpreta como modificaciones fisicoquímicas de las micelas de caseína bajo la acción de enzimas proteolíticas y/o ácidos orgánicos que determinan la formación de una red proteica denominada coágulo o gel, dando lugar a los productos siguientes:

Cuajada.- (Caseína coagulada por acción del cuajo), que después de sucesivas operaciones de moldeo, prensado, salado y maduración, se convertirá en queso.

Suero.- (compuesto por lactosa y sales principalmente), subproducto de la fabricación del queso.

Hasta que se separan estos dos productos (cuajada y suero) hay que realizar las siguientes operaciones:

1. Corte de la cuajada en granos o porciones de diversos tamaños según el tipo de queso a fabricar.
2. Agitación del conjunto para permitir la separación de la cuajada y el suero.
3. Drenaje del suero por medio de tamices.
4. Calentamiento de la cuajada para facilitar la salida del suero.
5. Agitación final para facilitar la sinéresis (contracción del coágulo y expulsión del suero)
6. Salado del queso que se puede hacer de diferentes formas: Salado en suero, salado en la masa del suero, salado sobre la superficie del queso y salado en salmuera.
7. Moldeado con el fin de darle al queso la forma deseada. Se deben emplear una tela entre la cuajada y el molde con agujeros por donde saldrá suero durante el prensado.
8. Prensado permite la eliminación de suero y darle al queso la consistencia final deseada.

9. Maduración en un periodo que va de unos días a varios meses e incluso un año o más; en el cual los quesos permanecen almacenados bajo ciertas condiciones de temperatura y humedad según el tipo de queso, con el fin de permitir el desarrollo de productos provenientes del metabolismo de la grasa, proteínas y azúcares por la acción de las enzimas microbianas, naturales o añadidas y que le confieren al queso el sabor y aroma característico.

II.6. COAGULACIÓN.

La coagulación de la leche es resultado de las modificaciones fisicoquímicas que intervienen a nivel de las micelas de caseína; los mecanismos que intervienen en la formación del coágulo difieren totalmente, según si las modificaciones son inducidas por la acción de enzimas coagulantes (coagulación enzimática) o bien por la acidificación (coagulación ácida) (Anónimo 5).

II.6.1. Coagulación enzimática

Un gran número de enzimas proteolíticas, de origen animal, vegetal o microbiano, poseen la propiedad de coagular el complejo caseínico. El cuajo, mezcla de quimosina y pepsina excretada en el estómago de los rumiantes lactantes, es la enzima coagulante mejor conocida y su mecanismo de actuación a sido bien estudiado.

Hammarsten distingue dos etapas en el proceso de la coagulación de la leche; la primera corresponde a una acción específica de la enzima, que provoca la proteólisis limitada de la caseína con liberación de la proteasa (5% de caseína) y la formación de la proparacaseína, la segunda corresponde a la insolubilización de la caseína en medio cálcico.

Linderstrom-Lang y Holter desarrollaron hacia el año 1930 una teoría la cuál el complejo caseínico de la leche es estable gracias a la presencia de un compuesto que juega el papel de estabilizante.

Los trabajos de Nitschmann, Alais y Garnier han confirmado que la coagulación de la leche por la acción del cuajo se da según las siguientes fases:

- Fase primaria: enzimática, durante la cuál el cuajo ataca al componente estabilizante de la micela K, con liberación de un péptido y caseinomacropéptido.
- Fase secundaria: coagulación que corresponde a la formación de un gel por asociación de las micelas caseínas modificadas bajo la acción de la enzima.

Fase primaria ó enzimática:

Corresponde a la hidrólisis de la caseína K a nivel de un enlace peptídico PHE (105)-MET (106) (como se muestra en la figura 2), 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 (Leusina e Isoleucina) a cada lado del enlace roto. La cadena de la caseína K se encuentra de esta manera cortada en dos segmentos desiguales: el segmento 1-105 corresponde a la paracaseína K y el segmento 106-169 al caseinomacropéptido. Todas las formas de caseína K, contenga o no glúcidos, están sujetas a esta hidrólisis, la cuál se efectúa a una gran velocidad.

La paracaseína K, sujeta a las caseínas α y β , permanecen integradas 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 suelo. Posee un carácter ácido e hidrófilo.

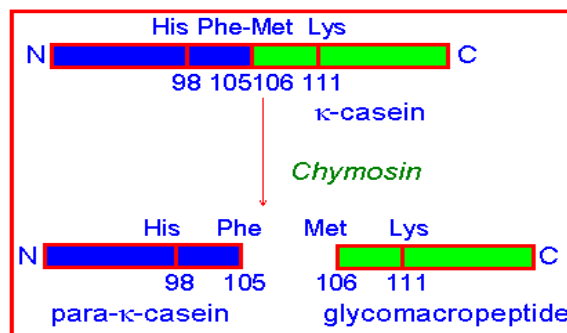


Figura 2. Ruptura de la K-caseína por acción de la quimosina.

La molécula de paracaseína K posee una composición, una estructura y en consecuencia unas características muy diferentes a las de la caseína K original; en particular carece de las propiedades estabilizantes frente al calcio.

Fase secundaria ó de coagulación:

La fase secundaria fácilmente observable en la leche coagulada y mantenida a una temperatura conveniente, presenta un mecanismo todavía mal conocido.

Se puede destacar que la liberación del caseinomacropéptido y su paso al suero, determina una disminución importante de la carga 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 de un gel; la caseína K ejerce una influencia estabilizadora sobre las micelas de caseína. Una vez formada la para-K-caseína y existiendo en el medio iones de calcio, esta influencia desaparece y las micelas se combinan entre sí, por medio de puentes salinos, dando lugar a la formación de un coágulo que engloba el resto de los componentes de la leche. Si este coágulo está incompleto, la cuajada que se forma no alcanza el grado de firmeza requerido en la receta. Algunos del resto de los componentes (grasa, proteína, productos de degradación, etc.) se pierden en el suero.

La agregación no empieza hasta que el 85-90% de la caseína K ha sido hidrolizada. La constante de la velocidad de la reacción de agregación KS es proporcional a la velocidad máxima de la reacción enzimática y en consecuencia a la concentración de la enzima. El proceso de agregación se continúa después de la formación del coágulo, pero con una constante de velocidad más baja.

Esta es una de las etapas claves del proceso y la base de la conversión de la leche en queso. Esta transformación se produce por la coagulación de la caseína, que engloba parte de la grasa y otros de los componentes de la leche.

La fase terciaria del cuajado se inicia una vez que se ha producido el coágulo de la leche y consiste en una acción proteolítica de la caseína α y β que constituyen también parte del proceso de maduración; alrededor del 6% de la renina añadida a la leche mantiene todavía su actividad en la cuajada.

El suero procedente de la coagulación enzimática de la leche cruda es aún más rico en proteínas séricas con lo que se producen mayores rendimientos en la elaboración de requesón (Eck, 1990).

II.6.2. **Coagulación ácida.**

Debido a la adición de un ácido débil o a la producción de ácido láctico resultante de la fermentación de la lactosa se produce una disminución del pH natural de la leche (pH 6,7) a un pH aproximado de 4,6. Según la teoría en vigor, a pH 6.7 la mayor parte de los grupos funcionales de las micelas proteicas están cargados negativamente lo que ocasiona fuerzas de repulsión entre ellas que ayudan a mantenerlas dispersas. Conforme baja el pH se eleva la concentración de iones hidrónios y una mayor parte de los grupos funcionales de las micelas empiezan a protonarse y por tanto a adquirir una carga positiva. A un determinado valor de pH, cercano a 4.6, la micela de la proteína tiene los mismos grupos funcionales con carga neta positiva que negativa, la micela en su conjunto es neutra con lo que ya no experimenta repulsión con las otras micelas y esto permite que intervengan otro tipo de atracciones (puentes de hidrógeno, hidrofóbicas, de Van der Waals, etc.) que antes no podían actuar. Esta serie de atracciones desestabilizan la dispersión coloidal y coagulan la leche. A pH aún más bajos la desestabilización de la dispersión es total.

Así la coagulación ácida carece de calcio y por lo tanto no es comparable con la coagulación enzimática que sí contiene calcio (Spreer, 1991).

II.6.3. **Factores que intervienen en la coagulación.**

Para que se produzca la coagulación de la caseína en la leche por la acción del cuajo es necesario tener las mejores condiciones en los factores esenciales como:

Temperatura.

La temperatura juega un papel muy importante en el tiempo que tarda la leche en cuajar. Las temperaturas de 21-27 °C suelen dar lugar a la formación de cuajadas blandas y gelatinosas. A 30 °C éstas son más firmes y no se desmenuzan en pequeñas partículas al cortarlas, mientras que a 33-36 °C suelen producirse cuajadas firmes y gomosas que desueran lentamente. Por debajo de 20 °C y por encima de 50 °C el cuajo muestra muy poca actividad. En la practica

se suele trabajar a unos 30 – 32°C, ya que entonces es necesario aumentar la dosis del cuajo, lo cual tiene ciertas ventajas:

- Una dosis más alta de cuajo hace que el coágulo sea menos duro.
- Se estimula el desarrollo bacteriano.
- Se favorece la maduración (Scott, 1991).

La velocidad máxima de coagulación se observa a 60°C produciéndose una rápida disminución de la misma a temperaturas superiores. Esta influencia de la temperatura es consecuencia de la conjugación de dos efectos, uno sobre la reacción enzimática y el otro sobre la fase de coagulación. Los dos efectos son muy diferentes (Madrid, 1994).

pH

La influencia del pH sobre el tiempo de coagulación y la dureza del gel es muy elevada. El tiempo de coagulación es más corto y el gel más duro en la medida que el pH desciende por debajo del pH normal de la leche. Contrariamente, a pH elevado, superior a 7, no se produce la coagulación, la enzima es inactivada rápidamente. Los valores óptimos de pH oscilan entre 6.2 y 6.5 (Eck, 1990).

Se produce debido a una acidificación de la leche por diversos motivos siendo el principal la producción de ácido láctico resultante de la fermentación de las bacterias lácticas que crecen en la leche. La coagulación se produce en un rango de valores de pH 4 - 6, aunque la mayor intensidad de coagulación se produce en el rango de pH 4 - 5.

Suele considerarse que existe una coagulación eminentemente ácida en el rango de pH 4 -5 y una coagulación eminentemente enzimática en el rango de pH 5.5 - 6, aun cuando podría inducirse una coagulación enzimática incluso al pH natural de la leche (pH 6.67).

La disminución del pH en el molde de prensado se debe a los procesos de fermentación de la lactosa. El incremento del pH al final de la maduración, como se observa en el cuadro 11, tiene lugar por los procesos de descarboxilación de ácidos y formación de amoníaco por la desamonificación de proteínas y aminoácidos (Anónimo 1).

Cuadro 11. Comportamiento del pH de la coagulación durante el proceso.

	Coagulación enzimática	Coagulación ácida
Leche	6.67	6.67
Molde prensado	6.4 – 6.5	4.6
Salmuera	5.3 – 5.5	4.0
Final de maduración	5.7 – 5.8	Hasta 5

Naturaleza y concentración de la enzima

La velocidad de coagulación y, en cierta medida, las características reológicas del gel (como son su dureza máxima, su elasticidad y su velocidad de endurecimiento) varían según la naturaleza del enzima (Eck, 1990).

En lo que concierne a la influencia de la concentración se conoce que el tiempo de coagulación es inversamente proporcional a la cantidad de la enzima.

La Cantidad a añadir de enzima coagulante a una leche de quesería depende del valor del pH de ésta y del poder o fuerza coagulante de la enzima. El poder ó fuerza del cuajo se define de la siguiente manera:

El poder coagulante indica la cantidad de partes de leche con un índice de SH (Soxleth Henkel) de 7 que se pueden cuajar, en 40 minutos y a una temperatura de 35°C, con una parte de cuajo (Spreer, 1991).

Concentraciones de iones calcio.

Adicionando cloruro de calcio a la leche aumenta la concentración de iones de calcio, facilitando la actuación de los diferentes tipos de cuajo.

Concentraciones de iones sodio.

Al igual que el calcio, los iones sodio también afectan a la actividad de los cuajos, pero en una proporción diez veces menor.

Tratamientos previos de la leche.

Una leche que ha permanecido a bajas temperaturas durante varios días antes de destinarse a la elaboración de quesos coagula más que una leche fresca.

Composición de la leche.

Se debe procurar utilizar leche de composición constante para que la coagulación sea similar día tras día (Madrid, 1994).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES.

Biológico:

Planta trompillo.

Leche.

Cuajo de ternero 1:100000

No biológico:

Tijeras

Material de laboratorio de vidrio de uso común.

Filtros de poro abierto y No. 5

Termómetro.

Membrana para diálisis de poro 12,000 Da.

Micropipetas.

Material de uso común para la elaboración de queso.

Reactivos

Reactivos de laboratorio de uso común.

Agua destilada.

Amortiguador buffer a diferentes pH.

(NH₄)₂SO₄ saturado.

Equipo.

Balanza analítica AND HR-200. Serie: 12310970.

Potenciómetro Corning pH meter 3D. Modelo: 1774.

Centrifugadora. International centrifuge. Serie: 2. Modelo: K. No: 4410P-1

Espectrofotómetro Spectronic 20 Genesys. Modelo: 4001/4

Agitador Cimarec 2 Barnstead/thermolyne. Modelo: SP46925. Serie: 1069011197010.

Baño María Termo Baño Felisa. Modelo: 373. Serie: 89003.

Vortex. Genie Mixer. Modelo: 58223

METODOLOGÍA

Recolección y separación de las partes de la planta.

Se recolectaron diferentes partes de la planta (raíz, tallo, hoja, flor y fruto), para la verificación del poder coagulante de cada una de ellas. Esto se llevó a cabo en forma manual en los terrenos de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro ubicada en Buenavista, Saltillo, Coahuila.

Se prosiguió a la medición del pH de cada parte de la planta a fin de realizar la extracción de la enzima en las condiciones nativas y no dañarla.

Técnica de medición del pH:

- ⇒ Macerar en un mortero una cantidad (5 a 20 gr dependiendo de la densidad de la muestra) hasta reducir notablemente su tamaño de partícula.
- ⇒ Adicionar 50 a 100 ml de agua destilada y agitar hasta diluir muy bien.
- ⇒ Filtrar con papel de poro abierto para desechar los sólidos.
- ⇒ Tomar la temperatura a la que se encuentre la solución muestra.
- ⇒ Ajustar el potenciómetro con la solución buffer de calibración (pH 7.0) y a la temperatura con que cuente la solución muestra.
- ⇒ Medir el pH de la solución muestra y registrarlo.

Una vez que se determinó el pH de cada parte de la planta, se prepararon las soluciones buffer al pH de cada una de ellas. La preparación de buffer se realizó de la siguiente forma:

Preparación de soluciones Buffer fosfato (límites de pH, 5.7 a 8.0) (LYNCH, et al., 1987).

- ⇒ Elaborar la solución A disolviendo 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).
- ⇒ Elaborar la solución B disolviendo 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).

⇒ Mezclar los volúmenes de soluciones concentradas que se mencionan en el cuadro 12, y afora a 200 ml para obtener los valores correspondientes de pH.

Cuadro 12. Volúmenes de soluciones concentradas A y B y pH que se obtiene.

ml de solución A	ml de la 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

Para obtener del pH del fruto se le añadió unas gotas de HCL 0.1N hasta alcanzar su valor.

Técnica de coagulación de la leche.

1. Calentar la leche cruda a 40°C.
2. Adición de extracto proteico.
3. Esperar 30 min.
4. registrar resultados.

Una vez obtenidas las soluciones se elaboró una prueba cualitativa de coagulación de la leche con las partes de la planta solubilizadas en buffer fosfato a pH correspondiente. La prueba anterior se realizó tomando 0.5 ml de cada una de las partes solubilizadas en 1 ml de leche.

Una vez medido el pH a cada parte de la planta se prosigue, después de la prueba cualitativa de coagulación, a la técnica de solubilización de proteína, primer paso de la extracción, para obtenerla en un medio líquido.

Aislamiento de las proteínas

Técnica de solubilización de las proteínas:

- ⇒ Determinar el pH de cada una de las partes de la planta.
- ⇒ Tomar una cantidad homogénea (el peso variará de acuerdo con la densidad de cada parte de la planta), de igual forma las repeticiones que deberán ser 3 (tres) como mínimo para cada parte de la planta.
- ⇒ Congelar si la muestra es fresca, con la finalidad de romper las paredes y membranas celulares para mayor facilidad en el paso siguiente; pero, si se trata de muestra seca, la congelación es innecesaria.
- ⇒ Macerar en licuadora o mortero (según la densidad de cada parte de la planta) ayudándose con la adición de algunos mililitros de buffer fosfato al pH correspondiente a cada parte de la planta; después completar, con la misma solución, hasta 3 partes de solución por unidad de peso inicial de muestra.
- ⇒ Centrifugar a 3500 rpm por 15 minutos.
- ⇒ Filtrar y desechar el precipitado.
- ⇒ Conservar el líquido filtrado, pues es en donde se encuentran las proteínas de la muestra ya solubilizadas.

Ya teniendo la proteína solubilizada en un medio líquido que no afecta a las proteínas, se realiza la técnica de precipitación.

Técnica de precipitación de la proteína (precipitación en solvente orgánico frío ó con sales):

- ⇒ Adicionar al líquido obtenido de la técnica anterior acetona a -20°C ó solución de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, a razón de 3 partes de solución por cada unidad de volumen de solución proteínica.
- ⇒ Centrifugar a 3500 rpm por 15 minutos.
- ⇒ Decantar el líquido sobrenadante y conservar el precipitado (proteínas).
- ⇒ Resuspender el precipitado en 30 ml de solución buffer fosfato al pH correspondiente a la parte de la planta de donde se aislaron las proteínas, dicha resuspensión tiene como finalidad conservar el extracto enzimático para su uso posterior.

Se procedió a la cuantificación de proteína de cada parte de la planta mediante la técnica de cuantificación por el método Bradford.

Técnica de lectura de proteínas por el método Bradford:

- ⇒ Filtrar el extracto a evaluar con en papel filtro No. 5.
- ⇒ Filtrar la solución de azul de Coomasié en un volumen suficiente para realizar las lecturas, protegiéndolo de la luz.
- ⇒ Colocar en un tubo de ensaye 1 ml de proteína filtrada y 1 ml de solución de azul de Coomasié para cada una de las dos sub-repeticiones de cada repetición; y para el blanco sólo se sustituye la solución proteínica por 1 ml de buffer fosfatos ya que fue el medio en que los extractos proteicos fueron resuspendidos.
- ⇒ Mezclar con Vortex cada una de las muestras y dejar reposar por 3 minutos.
- ⇒ Leer en espectrofotómetro a 595 nm, haciéndolo primero con el blanco a 0 en absorbancia para ajustar y, posteriormente obteniendo la lectura a cada una de las muestras preparadas.
- ⇒ Obtener e interpretar los datos según la curva estandar de la albúmina
$$y = 6.6684 x + 0.1875$$
Donde: y = Unidades de absorbancia.
$$X = \text{Concentración de la proteína (mg/ml)}.$$
- ⇒ Registrar datos.

Se realizó otra prueba de coagulación de leche utilizando ahora extractos proteicos. Al igual que la prueba de coagulación anterior, se tomaron 0.5 ml del extracto proteico de cada parte de la planta y 1 ml de leche. La técnica fué la misma.

Se obtuvo más extracto proteico del fruto y se empleó nuevamente las técnicas de solubilizado y precipitación de proteínas con sales de sulfato de amonio, ya que esta tuvo mejores resultados que la precipitación en frío con acetona.

Como se observó una gran cantidad de sal procedente de sulfato de amonio, en la técnica de precipitación de proteínas, se realizó una diálisis para su posterior extracción.

Técnica de diálisis (extracción de sales):

- ⇒ Obtener unos mililitros de precipitado de proteína, del fruto, ya solubilizado en buffer fosfato, como se indican en técnicas anteriores.*
- ⇒ Colocar el precipitado en la membrana para diálisis.
- ⇒ Mantener la membrana en agua fría, cambiando el agua cada media hr y con agitación durante 12 horas.
- ⇒ Suspender la muestra diálizada en dos extractos diferentes:

Los extractos (a) están suspendidas en 20 ml de la solución de sal (NaCl) al 5 %

Los extractos (b) están suspendidas en 20 ml de la solución de sal (NaCl) al 10%

* Cada extracto se elaboró a partir de 5 gr de fruto.

Con el extracto protéico parcialmente purificado y suspendidas con sal común, se elaboró una prueba de coagulación en las diferentes etapas del proceso de extracción de la proteína, para conocer cualitativamente bajo que condiciones se concentra más la actividad enzimática. Quedando los extractos de la siguiente forma:

Extracto 1: Extracto fresco del fruto.

Extracto 2: Extracto congelado del fruto.

Extracto 3: Extracto solubilizado con pH del fruto.

Extracto 4: Extracto con proteína precipitada del fruto.

Extracto 5: Extracto dializado del fruto.

Pruebas de coagulación en diferentes etapas de la extracción.

⇒ Calentar 10 ml de leche cruda a diferentes temperaturas (30, 35 y 40 °C.)

⇒ Adicionar 1% (0.1ml.) de los diferentes extractos proteicos.

⇒ Tomar muestras a diferentes tiempos (20, 25, 30, 35, 40 min.)

⇒ Registrar los resultados.

Se hizo una prueba de comparación con la renina comercial respetando los mismos parámetros de las otras pruebas. Se diluyó 1 ml en 20 ml de agua destilada y se tomo el 1 % como agente coagulante.

Una vez realizada la prueba de coagulación en diferentes etapas del proceso, se obtuvieron otra vez más extractos, para realizarr la prueba de fuerza de cuajo, y así conocer su poder coagulante.

Técnica de fuerza de cuajo:

La prueba se realizó con cada uno de los extractos (a y b), y estos a su vez con tres variables de temperatura que fueron: 40°C, 35°C y 30°C.

Esta prueba consiste en determinar la fuerza de cuajo mediante una formula recomendada por Santos (1982).

$$F = \frac{(v)(2400)}{t}$$

F = fuerza del cuajo.

v = volumen de leche (ml)

t = tiempo de cuajado (seg)

Se entiende como fuerza de cuajo al poder coagulante que indica la cantidad de leche en litros que puede ser cuajada por una parte de extracto enzimático, bajo ciertas condiciones de tiempo y temperatura. La metodología se describe a continuación:

- ⇒ Calentar 50 ml de leche cruda en baño maría según temperatura (40°C, 35°C ó 30°C).
- ⇒ Estabilizar la temperatura.
- ⇒ Adicionar (1.1 ml) de extracto proteico.
- ⇒ Observar y analizar cada minuto la formación inicial de la cuajada.
- ⇒ registrar el tiempo de cuajado en segundos.
- ⇒ Esperar a que repose la cuajada.
- ⇒ Observar y registrar resultados.

Esta prueba se realizó en dos repeticiones: la primera consistió en extractos suspendidos en 20 ml de NaCl y la segunda en 10 ml de NaCl.

También esta prueba fue comparada con la renina como patrón, y su preparación siguió el mismo procedimiento en el que se suspendieron los extractos.

Prueba de fuerza de coagulación en diferentes cantidades de extractos.

Se extrajeron diferentes extractos del fruto del trompillo con la finalidad de realizar la prueba de fuerza de cuajo y confirmar la relación entre cantidad de fruto y concentración de sal, así como verificar una buena combinación de estos dos elementos.

La metodología fue la siguiente:

Se optó por ensayar con el fruto congelado ya que este obtuvo mayor eficiencia en las pruebas anteriores de fuerza de cuajo, por lo tanto se realizaron los siguientes pasos:

- ⇒ Triturar el fruto congelado en las siguientes cantidades:
 - 4 repeticiones de 5 gr
 - 4 repeticiones de 10 gr
 - 4 repeticiones de 15 gr
 - 4 repeticiones de 20 gr.
- ⇒ Preparar soluciones de 20 ml de NaCl con las siguientes concentraciones:
 - 4 repeticiones al 5%

- 4 repeticiones al 10%
 - 4 repeticiones al 15%
 - 4 repeticiones al 20%
- ⇒ Mezclar las diferentes cantidades de fruto congelado en las soluciones de NaCl, como se muestra a continuación:
- Una de las diferentes repeticiones de cantidad de fruto mezclarlo con cada una de las soluciones con concentración de NaCl al 5%.
 - Otra de las diferentes repeticiones de cantidad de fruto mezclarlo con cada una de las soluciones con concentraciones de NaCl al 10%,
 - Otra de las diferentes repeticiones de cantidad de fruto mezclarlo con cada una de las soluciones con concentraciones de NaCl al 15%.
 - Y las últimas cantidades de fruto mezclarlo con cada una de las soluciones con concentraciones de NaCl al 20%.
- ⇒ Filtrar cada una de las mezclas con papel filtro de poro abierto.
- ⇒ Obtener el filtrado para la prueba de fuerza de cuajo según metodología antes mencionada.

Esta prueba se realizó con la temperatura de 35°C, la cual es la recomendada, además de que es una prueba de verificación.

En total obtuvimos 16 mezclas diferentes de extractos, los cuales son los siguientes:

Extracto A	5 gr de fruto en solución de NaCl al 5 %
Extracto B	10 gr de fruto en solución de NaCl al 5 %
Extracto C	15 gr de fruto en solución de NaCl al 5 %
Extracto D	20 gr de fruto en solución de NaCl al 5 %
Extracto E	5 gr de fruto en solución de NaCl al 10 %
Extracto F	10 gr de fruto en solución de NaCl al 10 %
Extracto G	15 gr de fruto en solución de NaCl al 10 %
Extracto H	20 gr de fruto en solución de NaCl al 10 %
Extracto I	5 gr de fruto en solución de NaCl al 15 %
Extracto J	10 gr de fruto en solución de NaCl al 15 %

Extracto K	15 gr de fruto en solución de NaCl al 15 %
Extracto L	20 gr de fruto en solución de NaCl al 15 %
Extracto M	5 gr de fruto en solución de NaCl al 20 %
Extracto N	10 gr de fruto en solución de NaCl al 20 %
Extracto O	15 gr de fruto en solución de NaCl al 20 %
Extracto P	20 gr de fruto en solución de NaCl al 20 %

En base a los resultados obtenidos que se obtuvieron de la prueba de fuerza de cuajo se determinó el extracto óptimo para la última prueba de coagulación que es la elaboración del queso.

Para el desarrollo de esta última prueba se siguieron los pasos que normalmente se usan para la elaboración del queso panela que se describen a continuación:

- ⇒ Tomar 10 lt de leche fresca y clarificar
- ⇒ Pasteurizar a 72 °C / 1 min y enfriar a temperatura óptima para el extracto
- ⇒ Agregar: a) 3 ml de CaCl₂
b) 0.03% de extracto coagulante *
- ⇒ Agitar y permitir coagular de 30 a 40 min
- ⇒ Cortar
- ⇒ Reposar 5 min con movimiento suave
- ⇒ Calentar a 40 °C por 5 min.
- ⇒ Reposar de 5 a 10 min.
- ⇒ Desuerar totalmente.
- ⇒ Agregar 30 gr de sal.
- ⇒ Moldear.
- ⇒ Prensar suavemente por 4 hr.
- ⇒ Calcular rendimiento.
- ⇒ Anotar resultados y observaciones.

* esta cantidad de enzima corresponde a las que se utilizan normalmente en la elaboración de queso, es decir, a la renina.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES.

Recolección de la planta.

Al momento de la recolección se tuvieron algunos problemas, ya que esta planta tiene pequeñas espinas que hacen difícil la operación, en cuanto al fruto, se recolectó en diferentes estados de maduración, debido a que la maduración no influye en la actividad coagulante; pero hay que verificar que el fruto no este dañado o infectada con plaga (gusano) al momento de su recolección; ya que se encontró que estos frutos no presentan actividad coagulante en la leche.

Obtención del pH.

Se determinaron los diferentes pH's de cada una de las partes de la planta, que son los siguientes:

Flor. 6.5 Tallo. 6.8 Hojas. 6.5 Raíz. 6.6 Fruto. 5.4

El pH de las diferentes partes de la planta fueron muy semejante entre si, a excepción del fruto que su valor es más bajo. Este valor ayuda a bajar la acidez de la leche por lo que ayuda a la coagulación.

Prueba de coagulación con las diferentes partes de la planta.

Prueba cualitativa de precipitación de la leche con las diferentes partes de la planta, solubilizado en el buffer con sus diferentes concentraciones. Los resultados fueron los siguientes:

- Tallo: **Coagulación negativo**
- Flor: **Coagulación negativo.**
- Hoja: **Coagulación negativo.**
- Raíz: **Coagulación negativo.**
- Fruto: **Coagulación positivo con pequeños grumos.**

Se realizó esta prueba para conocer el poder coagulante del fruto sin ningún tratamiento de extracción y purificación, y también para conocer si alguna otra parte de la planta tiene una actividad semejante.

El fruto presentó una ligera actividad de coagulación, y las otras partes de la planta no presentaron dicha actividad. Pero como la prueba es muy empírica, se llevó a cabo la extracción de la proteína con cada una de las partes de la planta, con la finalidad de conocer sus concentraciones.

Técnica de cuantificación de proteínas.

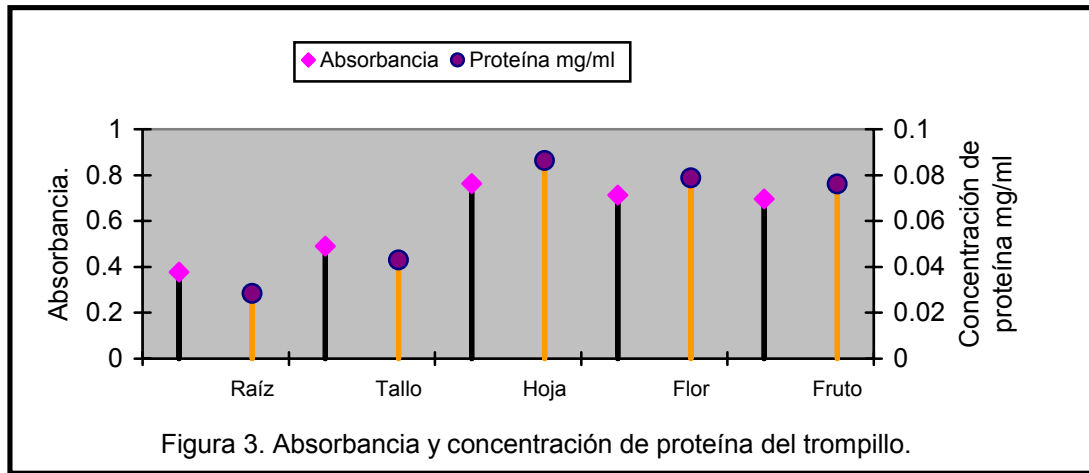
En el cuadro 13 se muestra la lectura de la proteína en la planta por medio de espectrofotometría a una absorbancia de 595 nm

Cuadro 13. Lectura de proteína del trompillo por espectrofotometría.

TROMPILLO (<i>Solanum elaeagnifolium</i>)	HOJA*	1ra. Repetición	0.730
			0.744
		2da Repetición	0.762
			0.770
		3ra Repetición	0.753
			0.823
	TALLO*	1ra. Repetición	0.502
			0.520
		2da Repetición	0.484
			0.516
		3ra Repetición	0.445
			0.476
	FLOR **	1ra. Repetición	0.711
			0.703
		2da Repetición	0.686
			0.721
		3ra Repetición	0.732
			0.725
FRUTO***	1ra. Repetición	0.730	
		0.723	
	2da. Repetición	0.668	
		0.661	
	3ra. Repetición	0.714	
		0.685	
RAIZ***	1ra. Repetición	0.421	
		0.368	
	2da. Repetición	0.371	
			0.350

* Blanco 0.613 ** Blanco 0.614 *** Blanco 0.610

Los resultados promedio de la lectura de absorbancia y de concentración de proteína de cada parte de la planta, se muestran en la figura 3.



Las lecturas de absorbancia que presentaron cada parte de la planta no fue uniforme ya se obtuvo rangos desde 0.350 hasta 0.823, siendo la hoja la parte con mayor absorbancia y por lo tanto mayor concentración de proteína. No siendo así el fruto, quien tiene las enzimas proteolíticas que actúan en la leche.

Prueba de coagulación con extractos proteicos de diferentes partes de la planta.

Los resultado de esta prueba fueron los siguientes:

- Tallo: **Pequeños grumos.**
- Flor: **Coagulación negativo.**
- Hoja: **Coagulación negativo.**
- Raíz: **Coagulación negativo.**
- Fruto: **Coagulación positivo con formación de un gel no estable.**

Como se puede observar en los resultados obtenidos, demuestra la presencia de un componente proteolítico en el fruto de la planta.

No obstante de los resultados arrojados en la cuantificación de proteínas, que no favorecieron al fruto, se elaboró esta prueba de coagulación con extractos protéicos para verificar si estábamos precipitando las proteínas y así ver con

mayor precisión si realmente es el fruto quien coagula la leche. Como se observó el fruto dio positivo en estos resultados y, el tallo presento pequeños grumos, pero el coágulo del fruto fue más consistente. Decidiendo con esto seguir la investigación solamente con el fruto.

Prueba de coagulación cualitativa a diferentes temperaturas.

Los resultados de las pruebas de coagulación, con extracto de fruto en diferentes etapas del proceso de extracción de proteína se muestran en los cuadros 14, 15 y 16.

Cuadro 14. Resultados de coagulación a 30 °C en diferentes etapas del proceso.

Solución	MINUTOS				
	20	25	30	35	40
Extracto 1a	+	+	+	+	+
Extracto 1b	+	+	+	+	+
Extracto 2a	+	+	+	+	+
Extracto 2b	+	+	+	+	+
Extracto 3a	+o-	+	+	+o-	+
Extracto 3b	-	+o-	+	+	+
Extracto 4a	-	-	-	-	+o-
Extracto 4b	+o-	+	+	+	+
Extracto 5a	-	-	+o-	+o-	+o-
Extracto 5b	-	+o-	+o-	+	+
Renina	+	+	+	+	+

Cuadro 15. Resultados de coagulación a 35°C en diferentes etapas del proceso.

Solución	MINUTOS				
	20	25	30	35	40
Extracto 1a	+	+	+	+	+
Extracto 1b	+	+	+	+	+
Extracto 2a	+	+	+	+	+
Extracto 2b	+	+	+	+	+
Extracto 3a	-	+	+	+	+
Extracto 3b	-	-	-	+o-	+
Extracto 4a	-	-	-	-	-
Extracto 4b	-	+	+	+	+
Extracto 5a	-	-	-	-	-
Extracto 5b	-	-	-	-	-
Renina	+	+	+	+	+

Cuadro 16. Resultados de coagulación a 40°C en diferentes etapas del proceso.

Solución	MINUTOS				
	20	25	30	35	40
Extracto 1a	-	+o-	+o-	+	+
Extracto 1b	+o-	+	+	+	+
Extracto 2a	+	+	+	+o-	+o-
Extracto 2b	+	+o-	+	+o-	+o-
Extracto 3a	+	+	+	+	+
Extracto 3b	+	+	+	+	+
Extracto 4a	+	+	+	+	+
Extracto 4b	+	+	+	+	+
Extracto 5a	-	+o-	+o-	+o-	+o-
Extracto 5b	+o-	+o-	+o-	+o-	+
Renina	+	+	+	+	+

+ = Si cuajo
 +o- = Cuajo pero no tuvo firmeza
 - = No cuajo

Una vez decidido que parte del trompillo tiene actividad coagulante, se hizo ésta prueba cualitativa en todas las etapas del proceso, añadiéndole a este la diálisis, para saber si la extracción estaba funcionando, expresando con más fuerza, ó si disminuía su fuerza. También se le agregó a todos los extractos, dos soluciones de sal, de manera que sirva como agente purificador.

Esta prueba se realizó a diferentes temperaturas para darnos una idea si esta enzima actúa de manera semejante a la renina.

Como se puede observar en el cuadro 14, a 30 °C la enzima actuó bien con los extractos fresco y congelado, variando su actividad en los demás extractos.

En el cuadro 15 a temperatura de 35 °C, la enzima también funcionó muy bien en fresco y congelado, variando aún más en los extractos solubilizados y precipitados, y en el extracto dializado no obtuvimos la actividad coagulante.

Al observar el cuadro 16 a la temperatura de 40°C, tenemos mayor firmeza en las cuajadas de los extractos solubilizado y precipitado, pero el fresco y el congelado disminuyó su actividad y el extracto dializado siguió débil.

Con el agente purificador (sal común) se vieron las cuajadas mucho más firmes que en las pruebas anteriores en las que no se les agregó.

Por lo tanto, de todas estas pruebas se observó que los extractos dializados no funcionaron muy bien por lo que se excluyó éste extracto de los siguientes estudios. Sin embargo, las cuajadas de los extractos fresco y congelado tenían mejor consistencia que los solubilizados y precipitados, pero no fue significativamente.

Así que se midió el poder coagulante de cada uno de los extractos por la técnica de fuerza de cuajo.

Prueba de fuerza de cuajo.

- Con una dilución suspendida en **20 ml de NaCl** se obtuvieron los siguientes resultados, que se muestran en los cuadros 17, 18 y 19.

Cuadro 17. Resultados de fuerza de cuajo en 20 ml de NaCl a 40 °C.

Solución	Tiempo de cuajado Seg.	Fuerza de cuajo
Extracto 1^a	450	533.33
Extracto 1b	310	774.19
Extracto 2a	600	400
Extracto 2b	495	484.84
Extracto 3a	1320	181.81
Extracto 3b	1500	160
Extracto 4a	630	380.95
Extracto 4b	720	333.33
Patrón	180	1333.33

Cuadro 18. Resultados de fuerza de cuajo en 20 ml de NaCl a 35 °C.

Solución	Tiempo de cuajado Seg.	Fuerza de cuajo
Extracto 1a	420	571.42
Extracto 1b	360	666.66
Extracto 2a	360	666.66
Extracto 2b	540	444.44
Extracto 3a	1740	137.93
Extracto 3b	No cuajo	-
Extracto 4a	780	307.69
Extracto 4b	1050	228.57
Patrón	240	1000

Cuadro 19. Resultados de fuerza de cuajo en 20 ml de NaCl a 30 °C.

Solución	Tiempo de cuajado Seg.	Fuerza de cuajo
Extracto 1a	1110	218.18
Extracto 1b	960	250
Extracto 2a	1080	222.22
Extracto 2b	600	400
Extracto 3a	No cuajo	-
Extracto 3b	No cuajo	-
Extracto 4a	1560	153.84
Extracto 4b	No cuajo	-
Patrón	360	666.66

- Con una dilución suspendida de **10 ml de NaCl** se obtuvieron los siguientes resultados, que se muestran en los cuadros 20, 21 y 22.

Cuadro 20. Resultados de fuerza de cuajo en 10 ml de NaCl a 40 °C.

Solución	Tiempo de cuajado Seg.	Fuerza de cuajo
Extracto 1a	240	500
Extracto 1b	210	571.42
Extracto 2a	130	923.07
Extracto 2b	130	923.07
Extracto 3a	270	444.44
Extracto 3b	240	500
Extracto 4a	180	666.66
Extracto 4b	150	800
Patrón	120	1000

Cuadro 21. Resultados de fuerza de cuajo en 10 ml de NaCl a 35 °C.

Solución	Tiempo de cuajado Seg.	Fuerza de cuajo
Extracto 1a	360	333.33
Extracto 1b	330	363.63
Extracto 2a	210	571.42
Extracto 2b	150	800
Extracto 3a	390	307.61
Extracto 3b	360	333.33
Extracto 4a	240	500
Extracto 4b	240	500
Patrón	120	1000

Cuadro 22. Resultados de fuerza de cuajo en 10 ml de NaCl a 30 °C.

Solución	Tiempo de cuajado Seg.	Fuerza de cuajo
Extracto 1a	540	222.22
Extracto 1b	780	153.84
Extracto 2a	420	285.71
Extracto 2b	240	500
Extracto 3a	<900	>133.33
Extracto 3b	<900	>133.33
Extracto 4a	660	181.81
Extracto 4b	840	142.85
Patrón	180	666.66

*Cabe hacer mención que estas pruebas se dejaron por más de 30 minutos y no hubo presencia de coágulos.

Las diluciones con 20 ml NaCl tuvieron, en general, baja fuerza de cuajo. A 40 °C el extracto 1b (fresco con 10 % de NaCl) fue el que tuvo mayor fuerza de cuajo superando a todos los extractos con esa dilución a diferentes temperaturas, incluso a los que extracto que tenían un proceso de extracción de proteína, lo que nos da una idea que hay un factor durante el proceso, que esta interrumpiendo la actividad de la enzima (salanina).

Las diluciones con 10 ml de NaCl tuvieron un poco más de fuerza, puede parecer lógico ya que la enzima esta menos diluida, pero es necesario no concentrarla tanto pues siendo una enzima vegetal, y como se citó en la revisión bibliográfica, estas enzimas son muy proteolíticas, por lo que su concentración afecta en gran medida a la calidad sensorial del queso.

A pesar de que tuvieron más fuerza esta última dilución, aún sigue siendo baja a comparación del patrón utilizado (renina). En estas pruebas hay dos extractos que se escogieron para usarlos en la elaboración del queso (2a y 2b del cuadro 20), dichos extractos provienen de fruto congelado y con la temperatura de 40 °C es bien sabido que los extractos congelados tienen más fuerza, ya que durante el descongelamiento se rompen las células.

Prueba de fuerza de coagulación en diferentes cantidades de extractos.

En el cuadro 23 se muestran los resultados obtenidos de la fuerza de cuajo con diferentes cantidades de fruto y concentración de NaCl.

Cuadro 23. Resultado de fuerza de cuajo en diferentes cantidades de fruto y concentración de NaCl.

Extracto	Tiempo de cuajado Seg.	Fuerza de cuajo
A	360	666.66
B	240	1000
C	240	1000
D	240	1000
E	420	571.42
F	540	444.44
G	420	571.42
H	480	500
I	840	285.71
J	420	571.42
K	300	800
L	540	444.44
M	600	400
N	360	666.66
O	150	1600
P	No cuajo	-

Esta prueba se llevo a cabo para verificar la combinación entre la cantidad de extracto del fruto y la concentración de sal, esto nos da una idea estamos utilizando las cantidades y concentraciones con mejor actividad coagulante.

También esta prueba se realizó con el mismo criterio que la prueba anterior de fuerza de cuajo, en esta prueba se observa que los resultados de los extractos B, C y D son más altos que la pruebas anteriores, pero en cantidades mayores de fruto, por lo cual pueden ser muy proteolíticas.

El resultado del extracto con la letra O sobresale entre las demás, pero fue de los extractos que usó más cantidad de fruto y más concentración de sal, por lo que son derroches de estos recursos y puede afectar la calidad sensorial del queso final.

También se observó que entre más sal se le adicione más fuerza coagulante tiene, esto es hasta la concentración al 15 % por que a concentración mayor baja su actividad.

Elaboración del queso.

Los diferentes extractos que se tomaron para la elaboración de queso en base a su fuerza de cuajo son las siguientes:

Extracto 1b de los resultados del cuadro 17, con un poder coagulante de 774.19

Extracto 2a de los resultados del cuadro 20, con un poder coagulante de 923.07

Extracto 2b de los resultados del cuadro 20, con un poder coagulante de 923.07

Los resultados de la elaboración de los quesos son los siguientes:

En la primera prueba que se realizó fue con el extracto 1b y se siguió exactamente como la metodología lo marca.

El resultado fué: Negativo en cuajada, negativo en queso.

En la segunda prueba fue con el mismo extracto pero ahora se le agregó 25 ml.

El resultado fué:

Positivo en cuajada, negativo en queso.

En la tercera prueba se realizó con el mismo extracto pero varió la cantidad (40 ml) y la cantidad de CaCl_2 (6 ml).

El resultado de esta prueba fué:

Positivo en cuajada, positivo en queso.

El queso que se obtuvo tenía las siguientes características:

Rendimiento: 1.450 Kg (10.45%)

Textura: No firme, para untar, quebradizo, aguado, suave.

Color: Blanco y en la superficie amarillo tenue.

Consistencia: Masuda.

Sabor: Poco característico, con un resabio amargo.

Aroma: A queso fresco artesanal (como a queso ranchero)

En la cuarta prueba se realizó con 58 ml del mismo extracto y con 8 ml de CaCl_2 con la finalidad de probar si le da una mayor fuerza de cuajado.

El resultado de esta prueba fué:

Positivo en cuajada, Negativo en queso.

La quinta prueba se realizó para confirmar la tercera prueba y verificar así que la cantidad de extracto sea la que más convenga, así que fue del mismo extracto (1b) en cantidad de 38 ml y 6 ml de CaCl_2 .

El resultado de este queso fué:

Positivo en cuajada, positivo en queso.

El queso que se logró tuvo las siguientes características:

Rendimiento: 1.300 Kg (10.3 %)

Textura: Suave, no firme, como para untar.

Color: Blanco.

Sabor: Un poco a queso pero dejaba el resabio amargo.

Consistencia: Masuda.

Aroma: Queso ranchero.

La sexta prueba se llevó a cabo con el extracto 2a en cantidad de 40 ml y 6 ml de CaCl_2 , semejante a la anterior.

El resultado de esta prueba fué:

Positivo en cuajada, positivo en queso.

Características del queso:

Las mismas que las anteriores pero esta dejaba menos el resabio amargo, y tenía mejor sabor a queso.

El rendimiento de este queso fué de 1.350 Kg (10.35 %)

La séptima prueba se realizó con 40 ml de extracto 2b y 6 ml de CaCl_2 .

El resultado de esta prueba fué:

Positivo en cuajada, Positivo en queso.

Características del queso:

Rendimiento: 1.250 Kg (10.25 %)

Textura: Poco característica al queso panela, es decir, no quedo muy suave

Sabor. A queso, con un poco de resabio amargo.

Consistencia: Masuda.

Aroma: A queso ranchero.

De las pruebas anteriores se observó lo siguiente:

En la primera prueba no hubo presencia de cuajada por lo que se concluyó que la cantidad de enzima del extracto fue insuficiente para tal cantidad de leche.

En la segunda prueba hubo presencia de cuajada pero muy débil, tanto que no se pudo desuerar totalmente así que fue imposible su moldeado.

En la tercera prueba hubo presencia de cuajada, la cual tenía mayor firmeza y fuerza, y el desuerado fue mejor, por lo que se pudo moldear y formar el queso. También el calentamiento durante el desuerado influye a la firmeza de la cuajada por lo que se alcanzaba temperaturas de hasta 50 °C para separar el suero de la cuajada. El prensado de este queso no fue posible durante el tiempo que marca el procedimiento, ya que este queso no estaba desuerado totalmente, así que el tiempo se prolongó hasta más de 6 hr, y aun seguía estando flácido y sin la firmeza correcta.

En la cuarta prueba la formación de la cuajada se observó que la velocidad fue más rápida con respecto a las anteriores, ya que en 10 min aproximadamente cuajo, pero se le dejó los 30 min de coagulación. Al momento de calentar la cuajada se elevó hasta 55 °C que facilitó el desuerado, pero no se pudo obtener una buena cantidad de suero, por lo que se moldeó y se prensó pero no logró formarse el queso.

Otra observación fue que entre más tiempo duraba el tratamiento después de la cuajada, el suero se volvía cada vez más blanco, es decir, que los grumos de la cuajada se hacía cada vez más pequeña y se solubilizaban con el suero.

En la quinta prueba la leche coaguló más lento, y se observó que era más consistente la cuajada que en la prueba anterior. También en ésta prueba influyó mucho la temperatura al momento de la coagulación y el desuerado. En esta prueba se logró prensar pero como en la tercera prueba, se dejó más de 6 hr para que tomara la forma de queso. Aún así, después del prensado se llevó al cuarto frío para que se deshidratara un poco y tuviera mayor firmeza.

En la sexta prueba la coagulación fue mejor que las anteriores y se pudo desuerar más fácilmente, por lo que se prensó aproximadamente 18 hr. y se volvió a dejar en el cuarto frío un día para su firmeza.

En la séptima prueba al igual que la anterior se formó mejor la cuajada y se logró un mejor desuerado. La prensada del queso duró 18 hr y se dejó en el cuarto frío; al momento de sacarlo presentó una mejor dureza que las anteriores. Por lo que éste queso resultó ser el mejor elaborado.

V. CONCLUSIONES.

El pH bajo del fruto ayuda a disminuir la acidez de la leche, aunque no drásticamente, sin embargo este efecto favorece la coagulación de la leche.

La actividad proteolítica del trompillo funcionó en la coagulación de la leche. La parte de la planta que demostró esta actividad fue el fruto, además que se combinó con la acción de la acidez de la leche.

Se observó en la lectura de proteína que la hoja y la flor del trompillo tienen más concentración de proteína, éstas dos no son las que presentan la actividad proteolítica en la leche, por lo que se comprobó que el fruto tiene menos cantidad de proteína, pero no toda la proteína es enzima.

En la precipitación de las proteínas del trompillo, se obtuvo mejores resultados con la solución de sulfato de amonio concentrado, que con el uso de acetona en frío.

La sal común (NaCl) tuvo un efecto purificador, como lo tiene en la extracción del cuajo de ternero, dicha propiedad aumentó la actividad coagulante del trompillo.

El extracto de proteína aún dializado contenía sales de sulfato por lo que su actividad en la leche no fue favorable.

La coagulación se vio favorecida en temperaturas de 30°C para los extractos frescos y congelados, por el contrario para los extractos solubilizados en buffer y precipitados con sulfato de amonio la mejor temperatura fue a los 40 °C. Sin embargo, los extractos frescos y congelados también actuaban a esta temperatura.

Los extractos del fruto fresco y congelado expresaron la misma, y en ocasiones mayor actividad coagulante que los extractos solubilizados en buffer y

los precipitados con la sal de sulfato de amonio, así que se prefirieron los primeros extractos, ya que eran fácil de obtener y no era necesario prepararlos en un laboratorio (ventaja para los que viven en las zonas rurales) además de que el tiempo de elaboración es mínimo.

Los tiempos de determinación de las pruebas de fuerza de cuajo no fueron muy exactos, por ser una observación visual, y por lo tanto subjetiva, sin embargo todas estas pruebas se elaboraron bajo el mismo criterio. Los resultados de estas pruebas se vieron favorecidas cuando estaban menos diluidas, ya que así mostraron, en general, mayor fuerza de cuajo. También en estas pruebas los extractos frescos y congelados funcionaron mejor.

La mejor combinación de cantidad de extracto del fruto y concentración de sal fue 5 gr de fruto en 5 ó 10 % de sal, ya que se reafirmó la alta fuerza coagulante en la leche. Aunque los extractos B, C, D y O del cuadro 23 tenían más fuerza, tienen una desventaja ya que se necesitaba una elevada concentración de sal y más cantidad fruto, lo que puede afecta la calidad sensorial del queso final.

La cantidad de extracto que se adicionó a la leche para la elaboración de los quesos, no fue la misma que se le adiciona cuando se usa el cuajo comercial. También influyó la cantidad de CaCl_2 , ya que se utilizó mas de la recomendada.

La temperatura en la elaboración del queso fue un factor importante, ya que la temperatura empleada en el momento de coagulación fue la óptima, en el desuerado tenía que ser más alta para que se favoreciera este proceso y los coágulos fueran más firmes.

Por los resultados obtenidos en la elaboración del queso, el proceso de pasteurización de la leche influyó notablemente en la actividad de los extractos.

VI. CITAS BIBLIOGRÁFICAS.

ALAIS, C. (1986) Ciencia de la leche. 6ª Impresión. Ed. C.E.C.S.A. México D.F.

AMIOT, J. (1991) Ciencia y tecnología de la leche. 1a edición. Ed. Acribia. Zaragoza, España.

ANÓNIMO 1. Fabricación de queso.

<http://www.geocities.com/CapeCanaveral/Lab/7522/cocina.htm> (20 de Agosto 2003).

ANÓNIMO 2. Fisico-química de la leche.

<http://www.fortunecity.com/littleitaly/siena/600/fisiclec.htm> (20 de Agosto 2003)

ANÓNIMO 3. Improved industrial enzymes in unlimited quantity. Recombinant chymosin to overcome supply problems.

http://www.efbweb.org/topics/genetic/menu4_4.htm (14 de Enero 2004).

ANÓNIMO 4. Recombinant chymosin fs 560.

<http://www.food.rdg.ac.uk/online/fs560/topic1/t1g/t1g.htm> (14 de Enero 2004)

ANÓNIMO 5. Vinos y quesos. Tan antiguos como el vino.

<http://www.quepasa.cl/sitios/especiales/vinos2/reportajes/rep12.htm> (20 de Agosto 2003).

BURNETT, J.(1976) Dairy Industries International 41, 158. In: GREEN, M. L. 1977. Review of the progress of Dairy Science: milk coagulants. Journal of Dairy Research. No. 44

CARDENAS, y E. R. (1991) Hechos en biotecnología. 1ª edición. Ed. A.G.T. editor. México D. F.

CHRISTENSEN, V. W. (1974) Natl. Meet., Am. Inst. Chem. Eng. June, 1974. In: STERNBERG, M. 1976. Advances In Applied Microbiology vol. 20

COMPAIRE F. C. (1976) Queso. 2ª edición Ed. Publicaciones de extensión agraria. Madrid, España.

DAVIS, J. G. (1965) Chesse, vol. 1. London: Churchill. In: GREEN, M. L. 1977. Review of the progress of Dairy Science: milk coagulants. Journal of Dairy Research. No. 44

DAVIS, J. G. (1971) Dairy Industries 36, 135. In: GREEN, M. L. 1977. Review of the progress of Dairy Science: milk coagulants. Journal of Dairy Research. No. 44.

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, A. et al. (1990) El queso. 1a edición. Ed. Omega. Barcelona, España.

EDELSTEN, D.; **JENSEN**, J. S. (1970) 18th International Dairy Congress, Sydney, 1E, 280. In: GREEN, M. L. 1977. Review of the progress of Dairy Science: milk coagulants. Journal of Dairy Research. No. 44

EMMONS, D. B.; et al (1976) Canadian Institute of Food Science and Technology Journal (Inthe press). In: GREEN, M. L. 1977. Review of the progress of Dairy Science: milk coagulants. Journal of Dairy Research. No. 44

ENCARTA. (2000) Enciclopedia Microsoft®. © 1993-1999 Microsoft Corporation. Reservados todos los derechos.

ESTURO, R. M. La maceración escalonada.

<http://www.cerveceroscaseros.com.ar/infdecoction.htm> (20 de Agosto 2003).

F.A.O. (1968) Meeting report An 1968/3. In: GREEN, M. L. 1977. Review of the progress of Dairy Science: milk coagulants. Journal of Dairy Research. No. 44

F. D. A. (1995) Center for food safety and applied nutrition. F.D.A.'s policy for foods developed by biotechnology.

<http://vm.cfsan.fda.gov/~lrd/biopolcy.html> (14 de Enero 2004)

FENNEMAN, O. (2000) Química de los alimentos. 2ª edición. Ed. Acribia. Zaragoza, España.

FOX, P. F. (1969) Journal of Dairy Research 36, 427. In: GREEN, M. L. 1977. Review of the progress of Dairy Science: milk coagulants. Journal of Dairy Research. No. 44

GARCÍA, G. M. (1992) Recuperación de enzimas intracelulares de interés comercial. Ciencia. Revista académica de investigación científica. Vol. 43 No 1

GARCÍA, G. M.; **QUINTERO** R. R; **LÓPEZ** M. A. (1999) Biotecnología alimentaría. 2a reimpresión. Ed. Limusa Noriega. México, D.F.

GARNOT, P.; et al. (1972) Journal of dairy Science 55, 1641. In: GREEN, M. L. 1977. Review of the progress of Dairy Science: milk coagulants. Journal of Dairy Research. No. 44

GREEN, M. L.; **FOSTER**, P. M. D. (1974) Journal of Dairy of Science 41, 269. In: GREEN, M. L. 1977. Review of the progress of Dairy Science: milk coagulants. Journal of Dairy Research. No. 44

HAMILTON, J. S.; **HILL**, R. D.; **VAN LEEUWEN**, H. (1974) Agricultural and Biological Chemistry 38, 375. In: GREEN, M. L. 1977. Review of the progress of Dairy Science: milk coagulants. Journal of Dairy Research. No. 44

HOLMES, D. G.; **ERNSTROM**, C. A. (1973) Journal Dairy Science 56, 622. In: **GREEN**, M. L. 1977. Review of the progress of Dairy Science: milk coagulants. Journal of Dairy Research. No. 44

INEGI. (2003) Producción de diferentes tipos de quesos en México.
<http://dgcnesyp.inegi.gob.mx/BDINE/C10/C102643.htm> (15 Noviembre 2003).

KATHAVALLA, Z. R.; **KHUBCHANDANI**, P. G. (1940) Indian Journal of Veterinary Science 10, 284. In: **GREEN**, M. L. 1977. Review of the progress of Dairy Science: milk coagulants. Journal of Dairy Research. No. 44

LAWRENCE, R. C; **CREAMER**. L. K.; et al (1972) New Zealand Journal of Dairy Science and Technology 7, 32. In: **GREEN**, M. L. 1977. Review of the progress of Dairy Science: milk coagulants. Journal of Dairy Research. No. 44

LUQUET, F. M. et al. (1993) Leche y productos lácteos. Tomo 2. 2a edición. Ed. ACRIBIA. Zaragoza, España.

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

MADRID. A. V. (1994) Nuevo manual de tecnología quesera. 1ª edición Ed. AMV, Ediciones. Madrid Esp.

MARAGOUDAKIS, M. E.; **YOUNG**, J. O.; **STEIN**, R. W. (1961) Journal of Dairy Science 44, 2339. In: **GREEN**, M. L. 1977. Review of the progress of Dairy Science: milk coagulants. Journal of Dairy Research. No. 44

MARINO, J. R.; **VASEK**, O. M.; **FUSCO**, A. J. A. El efecto de la concentración del calcio libre y el pH del agente coagulante en la coagulación enzimática de la leche. <http://www.unne.edu.ar/cyt/2001/8-Exactas/E-047.pdf> (20 de Agosto del 2003).

MARTENS, R.; NAUDTS, M. (1973) Annual Bulletin, International Dairy Federation 74, 1. In: GREEN, M. L. 1977. Review of the progress of Dairy Science: milk coagulants. Journal of Dairy Research. No. 44

MARTIN, P.; Et al. (1975) Revue Laitiere Francaise 336, 727. In: GREEN, M. L. 1977. Review of the progress of Dairy Science: milk coagulants. Journal of Dairy Research. No. 44

MELACHOURIS, N. P.; TUCKEY, S. L. (1964) Journal of Dairy Science 47, 1. In: GREEN, M. L. 1977. Review of the progress of Dairy Science: milk coagulants. Journal of Dairy Research. No. 44

METHUR, M. P.; Et al (1973) Indian Journal of Animal Science 43, 242. In: GREEN, M. L. 1977. Review of the progress of Dairy Science: milk coagulants. Journal of Dairy Research. No. 44

MERKER, H. M. (1975) Journal of Dairy Science 2, 282-286. In: STERNBERG, M. 1976. Advances In Applied Microbiology vol. 20

NAUDTS, M. (1969) Annual Bulletin, International Dairy Federation 7, 1. In: GREEN, M. L. 1977. Review of the progress of Dairy Science: milk coagulants. Journal of Dairy Research. No. 44

NELSON, J. H. (1972) American Dairy Review 34 (10), 37. In: GREEN, M. L. 1977. Review of the progress of Dairy Science: milk coagulants. Journal of Dairy Research. No. 44

NIELSEN, V. H. (1975) American Dairy Review 37 (7), 14. In: GREEN, M. L. 1977. Review of the progress of Dairy Science: milk coagulants. Journal of Dairy Research. No. 44

O'LEARY, P. A.; FOX, P. F. (1975) Journal of Dairy Research 42, 445. In: GREEN, M. L. 1977. Review of the progress of Dairy Science: milk coagulants. Journal of Dairy Research. No. 44

PELISSIER, J. P.; **MERCIER**, J. C.; et al. (1974) *Annales de Biologie Animale, Biochimie, Biophysique* 14, 343. In: **GREEN**, M. L. 1977. Review of the progress of Dairy Science: milk coagulants. *Journal of Dairy Research*. No. 44

PHELAN, J. A. (1973) *Dairy Industries* 38, 418. In: **GREEN**, M. L. 1977. Review of the progress of Dairy Science: milk coagulants. *Journal of Dairy Research*. No. 44

PHELAN, J. A.; **GUINEY**, J.; **FOX**, P. F. (1973) *Journal of Dairy Research* 40, 105. In: **GREEN**, M. L. 1977. Review of the progress of Dairy Science: milk coagulants. *Journal of Dairy Research*. No. 44

POTTER, N. N.; **HOTCHKISS**, J. H. (1999) *Ciencia de los alimentos*. 5ª Edición. Ed. ACRIBIA. Zaragoza, España,

RAMET, J. P.; **ALAIS**, C.; **WEBER**, F. (1969) *Latí* 49, 40. Citado por: **GREEN**, M. L. 1977. Review of the progress of Dairy Science: milk coagulants. *Journal of Dairy Research*. No. 44

RICHARDSON, G. H.; et al. (1967) *Journal of Dairy Science* 50, 1066. In: **GREEN**, M. L. 1977. Review of the progress of Dairy Science: milk coagulants. *Journal of Dairy Research*. No. 44

RICHARDSON, G. H. Et al. (1971) *Journal of Dairy Science* 54, 182. In: **GREEN**, M. L. 1977. Review of the progress of Dairy Science: milk coagulants. *Journal of Dairy Research*. No. 44

RICHARDSON, B. C.; **CREAMER**, L. K. (1973) *New Zealand Journal of Dairy Science and Technology* 8, 46. In: **GREEN**, M. L. 1977. Review of the progress of Dairy Science: milk coagulants. *Journal of Dairy Research*. No. 44

RITTER, W. (1970) *Deutsche Molkerei-Zeitung* 91, 2222. In: **GREEN**, M. L. 1977. Review of the progress of Dairy Science: milk coagulants. *Journal of Dairy Research*. No. 44

SANTOS, M. A. (1982) Bioquímica de la leche y sus productos. Ed Universidad Autónoma Chapingo. México.

SARDINAS, J. L.. (1972) Advances in Applied Microbiology 15, 39. In: GREEN, M. L. 1977. Review of the progress of Dairy Science: milk coagulants. Journal of Dairy Research. No. 44

SCHULZ, M. E.; THOMASOW, J. (1970) 18th International Dairy Congress, Sydney 1E, 321. In: GREEN, M. L. 1977. Review of the progress of Dairy Science: milk coagulants. Journal of Dairy Research. No. 44

SCOTT, R. (1991) Fabricación de queso. 2ª edición Ed. Acribia Zaragoza, España.

SPREER, E. (1991). Lactología industrial. 6ª edición. Ed. Acribia. Zaragoza, España.

SHOVERS, J.; BAVISOTTO, V. S. (1967) Journal of Dairy of Science 50, 942. In: GREEN, M. L. 1977. Review of the progress of Dairy Science: milk coagulants. Journal of Dairy Research. No. 44

SING, J.; et al. (1973) Journal of Food Science and Technology, Mysore 10, 16. In: GREEN, M. L. 1977. Review of the progress of Dairy Science: milk coagulants. Journal of Dairy Research. No. 44

STADHOUDERS, J.; HUP, G. (1975) Netherlands Milk and Dairy Journal 29, 335. In: GREEN, M. L. 1977. Review of the progress of Dairy Science: milk coagulants. Journal of Dairy Research. No. 44

THOMASOW, J.; MROWETS, G.; SCHMANKE, E. (1970) Milchwissenschaft 25, 211. In: GREEN, M. L. 1977. Review of the progress of Dairy Science: milk coagulants. Journal of Dairy Research. No. 44

VANDERPOORTEN, R.; **WECKX**, M. (1972) Netherlands Milk and Dairy Journal 26, 47. In: **GREEN**, M. L. 1977. Review of the progress of Dairy Science: milk coagulants. Journal of Dairy Research. No. 44

VERINGA, H. A. (1969) Dairy Science Abstracts 23, 197. In: **GREEN**, M. L. 1977. Review of the progress of Dairy Science: milk coagulants. Journal of Dairy Research. No. 44

VIEIRA DE SÁ, F.; **BARBOSA**, M. (1970) 18th International Dairy Congress, Sydney, 1E, 286. In: **GREEN**, M. L. 1977. Review of the progress of Dairy Science: milk coagulants. Journal of Dairy Research. No. 44

VIEIRA DE SÁ, F.; **BARBOSA**, M. (1972) Journal of Dairy Research 39, 335. In: **GREEN**, M. L. 1977. Review of the progress of Dairy Science: milk coagulants. Journal of Dairy Research. No. 44

VILLARREAL, Q. J. A. (1983) Malezas de Buenavista Coahuila. 2ª edición. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Buenavista, Saltillo, Coahuila
USDA. Plants classification.

http://plants.usda.gov/classification/output_report.cgi?3%7CS%7CPlantae%7Cu%7C140%7C+63 (5 de Noviembre 2004).

WEISS, R. 1983-8. Evolution of rennet in cheese making.

http://www.marschall.com/marschall/proceed/pdf/83_08.pdf (14 de Enero 2004)

WITSCH, S. (1976) Fundamentos de la elaboración del queso. 1a edición. Ed. ACRIBIA. Zaragoza, España