

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA**

**"ANTONIO NARRO"**

**DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL.**



**Determinación del pH óptimo para la proteasa obtenida del cardo  
(*Cynara cardunculus L.*) Aplicable en la tecnología quesera.**

**Por:**

**LUIS ARMANDO TONCHE LUNA**

**TESIS**

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

**INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA  
DE ALIMENTOS.**

**GENERACIÓN XCVIII**

**Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.**

**JUNIO DEL 2005**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA "ANTONIO NARRO"  
DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL  
DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN Y ALIMENTOS**

**Determinación del pH óptimo para la proteasa obtenida del cardo  
(*Cynara cardunculus L.*) Aplicable en la tecnología quesera.**

**Por:**

**LUIS ARMANDO TONCHE LUNA**

**TESIS**

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

**Ingeniero en Ciencia y Tecnología de Alimentos.**

Aprobada por:

---

M. C. María Hernández González.  
**Presidente del jurado**

---

Lic. Laura Olivia Fuentes Lara  
**Sinodal**

---

Q.F.B: Carmen Pérez Martínez  
**Sinodal**

---

M. C. Xóchitl Ruelas Chacón.  
**Sinodal**

**COORDINADOR DE LA DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL**

---

Dr. Ramón F. García Castillo.

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.

Junio del 2005:

## INDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS.....	I
DEDICATORIAS.....	III
INDICE GENERAL	
ÍNDICE DE CUADROS	
ÍNDICE DE GRAFICAS Y FIGURAS	
INTRODUCCIÓN.....	IV
<b>OBJETIVOS</b>	<b>CAPITULO 1</b>
1.1 Objetivo general.....	1
1.2 Objetivos específicos.....	1
<b>MARCO TEÓRICO</b>	<b>CAPITULO 2</b>
2.1 El cardo ( <i>Cynara cardunculus L.</i> ).....	2
2.1.1 Descripción botánica.....	3
2.1.2 Distribución de la planta en el mundo y en México.....	3
2.1.3 Historia y antecedentes de investigación del uso del cardo ( <i>Cynara cardunculus L.</i> ).....	4
2.1.4. Comparación morfológica de algunas variedades de cardo.....	6
2.2 <i>Definición de cuajo</i> .....	6
2.2.1. La velocidad de formación de cuajada.....	7
2.2.2. Fuerza de cuajo.....	7
2.3. Las enzimas:.....	8
2.3.1 Las enzimas de origen vegetal.....	9
2.3.2 Ventajas del uso de las enzimas vegetales.....	10
2.3.3 Desventajas del uso de enzimas vegetales.....	11
2.3.4. Definición de actividad enzimática.....	12
2.3.4.1 Factores que intervienen en la actividad enzimática para lograr la coagulación de la leche.....	12
2.3.4.1.1. Efecto del pH sobre la actividad enzimática.....	12
2.3.4.1.2. Efecto del pH sobre el sustrato o el producto.....	13
2.3.4.1.3. Efecto del pH sobre la Enzima o el complejo Enzima- Sustrato.....	13
2.3.4.1.4. Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática.....	14
2.3.4.1.5. Efecto por concentración de la enzima.....	15
2.3.4.1.6. Efecto de los cofactores sobre la actividad enzimática.....	15

2.4. Definición de leche.....	16
2.4.1. Propiedades Físico – químicas de la leche.....	17
2.4.2. Papel de los diferentes componentes de la leche en el queso	17
2.5 Las proteínas de la leche.....	18
2.5.1. Las caseínas.....	18
2.6. Proceso de transformación de la leche en queso.....	19
2.6.1 Tipos de coagulación de la leche.....	20
2.6.1.1 <i>Coagulación por altas concentraciones de sales</i> .....	20
2.6.1.2 <i>Coagulación Ácida</i> .....	21
2.6.1.3 Coagulación por acción enzimática.....	21
2.6.1.3.1 Fase enzimática.....	22
2.6.1.3.2 Fase de coagulación.....	22
2.6.1.3.3 Rendimiento Quesero.....	23

## MATERIALES Y METODOS

## CAPITULO 3

### ETAPA 1

3.1 Extracción y dializado de la fracción enzimática a partir de la flor, tallo y hoja del cardo.....	24
3.1.1 Técnica para la extracción y fraccionamiento de las proteínas.....	24
3.1.3 Diálisis.....	25

### ETAPA 2

3.2.Realización de pruebas en fresco utilizando las fracciones, en diferentes pH's. a partir de flor, hoja y tallo del cardo.....	26
3.2.1. Evaluación de pruebas en fresco.....	26
3.2.2. Detección de actividad enzimática en las diferentes partes de la planta de la flor, tallo y hoja del cardo.....	26

### ETAPA 3

3.3.1. Evaluación de la fuerza de cuajo en hoja, tallo y flor variando pH de (5.0 – 6.6) para las diferentes fracciones del extracto parcialmente purificado.....	27
---	----

### ETAPA 4

3.4.1. Estudio cinético de la actividad de las diferentes fracciones de los extractos parcialmente purificados en función al pH para flor.	28
3.4.1.1. Evaluación de la actividad proteolítica del extracto enzimático dializado bajo diferentes pH's en (espectrofotometría).....	28

## **ETAPA 5**

3.5.1. Análisis comparativo de la actividad de las diferentes partes de la planta Flor, tallo y hoja. Con cada una de sus fracciones de los extractos parcialmente purificados en función al pH 6.3..... 29

## **RESULTADOS Y DISCUSIONES.**

## **CAPITULO 4**

La Etapa 1 no se presenta en este apartado ya que solo fue la obtención y el dializado del extracto enzimático material fundamental de las siguientes etapas.

## **ETAPA 2**

4.2. Pruebas en fresco utilizando las fracciones, en diferentes pH's. a partir de flor, hoja y tallo del cardo..... 30

## **ETAPA 3**

4.3.1. Evaluación de la fuerza de cuajo en hoja, tallo y flor variando pH de (5.0 – 6.6) para las diferentes fracciones del extracto parcialmente purificado..... 32

## **ETAPA 4**

4.4.1. Estudio cinético de la actividad de las diferentes fracciones de los extractos parcialmente purificados en función al pH para flor. 35

## **ETAPA 5**

4.5.1. Análisis comparativo de la actividad de las diferentes partes de la planta Flor, tallo y hoja. Con cada una de sus fracciones de los extractos parcialmente purificados en función al pH 6.3..... 37

## **CONCLUSIONES**

## **CAPITULO 5**

Conclusiones..... 40

**ANEXOS****CAPITULO 6**

6.1. Técnicas auxiliares utilizadas durante la realización del trabajo experimental.....	42
6.1.1. Preparación de soluciones Buffer.....	42
6.1.2. Determinación de sulfatos.....	43
6.1.3. Preparación del azul de Coomassie.....	43
6.1.4 Tecnología de elaboración de queso asadero (o de pasta hilada).	44
6.1.5. Tecnología de elaboración de queso fresco molido.....	45

**BIBLIOGRAFÍA****CAPITULO 7**

Bibliografía.....	46
Apéndice.....	51

## INDICE DE CUADROS

Pág.

Cuadro 1: Clasificación botánica del cardo según Merops (2003).....	3
Cuadro 2: Principales enzimas coagulantes que actualmente se utilizan en industria quesera.....	9
Cuadro 3: Pruebas en fresco para tallo variando pH en las diferentes fracciones del extracto enzimático parcialmente purificado.....	30
Cuadro 4: Pruebas en fresco para Hoja variando pH en las diferentes fracciones del extracto enzimático parcialmente purificado.....	30
Cuadro 5: Pruebas en fresco para Flor variando pH en las diferentes fracciones del extracto enzimático parcialmente purificado.....	31
Cuadro 6: Evaluación del comportamiento de las fracciones obtenidas con relación a la fuerza de cuajo y el pH del extracto parcialmente purificado.....	32
Cuadro 7: Análisis comparativo de las cinéticas de actividad (Vo) a diferentes pH de las fracciones del extracto de la flor.....	35
Cuadro 8: Comparación de actividad proteolítica de las diferentes partes de la planta (hoja, tallo y flor) a pH 6.3.....	38

## INDICE DE FIGURAS

Pág.

Figura 1: <i>Cynara cardunculus</i> L.....	2
Figura 2: El cardo ( <i>Cynara cardunculus</i> L.) estudiado. ....	4
Figura 3: Ejemplares morfológicamente diferentes clasificados como ( <i>Cynara cardunculus</i> L.).....	6

## ÍNDICE DE GRAFICAS

Figura 1: Relación del pH y % la velocidad Máxima.....	14
Figura 2: Efecto de la temperatura sobre la velocidad de reacción.....	14
Grafica 3: Muestra el comportamiento de las fracciones obtenidas con relación a la fuerza de cuajo y el pH.....	33
Grafica 4: Fuerza de cuajo en función al pH del extracto parcialmente purificado para la flor.....	34
Grafica 5: Estudio de cinéticas de la actividad de las diferentes fracciones del extracto flor parcialmente purificado.....	36
Grafica 6 : Comparativo de actividad de las diferentes partes de la planta flor, tallo y hoja a pH 6.3.....	38



**1.1. Objetivo general.**

- Determinar el pH óptimo para la proteasa obtenida del cardo (*Cynara cardunculus L.*).

**1. 2. Objetivos específicos.**

- Obtener la proteasa presente en las diferentes partes de la planta.
- Evaluar en fresco la actividad proteolítica de los compuestos obtenidos variando pH.
- Medir la fuerza de cuajo de los extractos obtenidos variando el pH.
- Monitorear cinéticamente la actividad de los extractos con actividad proteolítica probada variando el pH.
- Determinar el pH óptimo de acción del extracto enzimático, obtenido.

**2.1 El cardo (*Cynara cardunculus L.*).**

El cardo (*Cynara cardunculus L.*), cuya imagen se muestra en la figura 1. La literatura lo cita como una de las plantas que es capaz de provocar la coagulación enzimática de la leche, específicamente se menciona solo a la flor como la poseedora de dicha propiedad, además se le atribuye que es una planta comestible en las regiones de España y Portugal. (Sousa M, 2002).



**FIGURA 1:** *Cynara cardunculus L.*

En México se ha encontrado en forma silvestre, a la entrada de la zona del Bajío Guanajuatense, en el municipio de Apaseo el Grande, así como en Santiago de Querétaro según (Hernández C, 2004).

El estudio de clasificación botánica realizado por Villarreal Quintanilla (2003) del Departamento de Botánica (División de Agronomía) de la UAAAN, refiere que es una maleza introducida, es decir, no es nativa de la región donde fue colectada; sin embargo, por las características físicas se puede deducir que la región es apta para su cultivo en gran escala y sin mayores cuidados, cabe mencionar que esta planta pudo fácilmente adaptarse al clima de la región norte del país ya que algunas

plantas fueron sembradas y cultivadas en las instalaciones de la UAAAN (Saltillo Coah.) en condiciones no controladas es decir al medio ambiente solo garantizándole el suministro de agua requerida (Villarreal Q, 2003).

### 2.1.1 Descripción botánica

La clasificación botánica que refiere la literatura para el caso del cardo es la que se muestra en el cuadro 1:

**CUADRO 1:** Clasificación botánica del cardo según (Merops, 2003).

<b>Súper reino:</b> Eukaryota.	<b>Reino:</b> Viridiplantae.
<b>Sub. Reino:</b> Streptophyta.	<b>Phylum:</b> Embriophyta.
<b>Sub. Phylum:</b> Tracheophyta.	<b>Súper clase:</b> Magnoliophyta.
<b>Clase:</b> Magnoliopsida.	<b>Sub. Clase:</b> Asteridae.
<b>Orden:</b> Asterales.	<b>Familia:</b> Asteraceae.
<b>Género:</b> Cynara.	<b>Especie:</b> cardunculus L.

### 2.1.2 Distribución de la planta en el mundo y en México.

El cardo (*Cynara cardunculus L.*) es una especie herbácea vivaz (perenne), con un ciclo anual de producción de biomasa aérea, muy bien adaptada a las condiciones del clima mediterráneo de veranos secos y calurosos. En años con pluviométrica adecuada del orden de los 350 a 450 mm/ anual, cuando el cultivo está bien establecido, puede llegar a dar producciones totales de biomasa de hasta 15 toneladas de materia seca/ha al año.

Como se menciona anteriormente esta se localiza principalmente en la región del bajío de la república Mexicana, sin embargo esta es originaria de la parte sur de la península ibérica y del Norte de África, al igual se puede encontrar en otros países cercanos como lo es Portugal. No siendo muy explotada, ya que es considerada

como una maleza, aunque estudios en el área de la quesería indican que esta posee una actividad proteolítica que puede ser de utilidad como un sucedáneo del cuajo de origen animal o un auxiliar en la elaboración de algunos quesos que requieren tratamiento térmico posterior, o cocción de la pasta donde la enzima utilizada puede ser inactivada o destruida a temperaturas por encima de los 60 – 65°C (Wolfgang, 1997).

En la figura. 2. se muestra la planta del género (*Cynara cardunculus L.*) estudiada en el presente trabajo.



**Figura 2:** El cardo (*Cynara cardunculus L.*) estudiado.

### **2.1.3 Historia y antecedentes de investigación del uso del cardo (*Cynara cardunculus L.*).**

Vioque y col (2000) compararon quesos fabricados a partir de extractos de *Cynara cardunculus L.* y mediante el uso de *Cynara humilis*, otra variedad de este género, encontrando que no se presentó ningún efecto apreciable en el contenido de humedad, grasa, proteína y NaCl del queso, así como tampoco en su actividad de agua, sabor, y aroma. Posteriormente a través de la maduración, las dos especies

fueron probadas, encontrándose que el uso de *Cynara humilis* da lugar a un cierto grado de formación de ácido láctico reducido.

Por otra parte Sousa M, et al (2002) citan que los extractos de las flores secas del *Cynara cardunculus L.* se han empleado con éxito por muchos siglos en Portugal y algunas regiones de España para la fabricación de quesos tradicionales. Varios estudios se han realizado *in Vitro* y en los quesos reales que se centraban en la actividad y especificidad de las proteinasas de *C. Cardunculus L.* , a fin de caracterizar este coagulante de la planta (Sousa M, 2002).

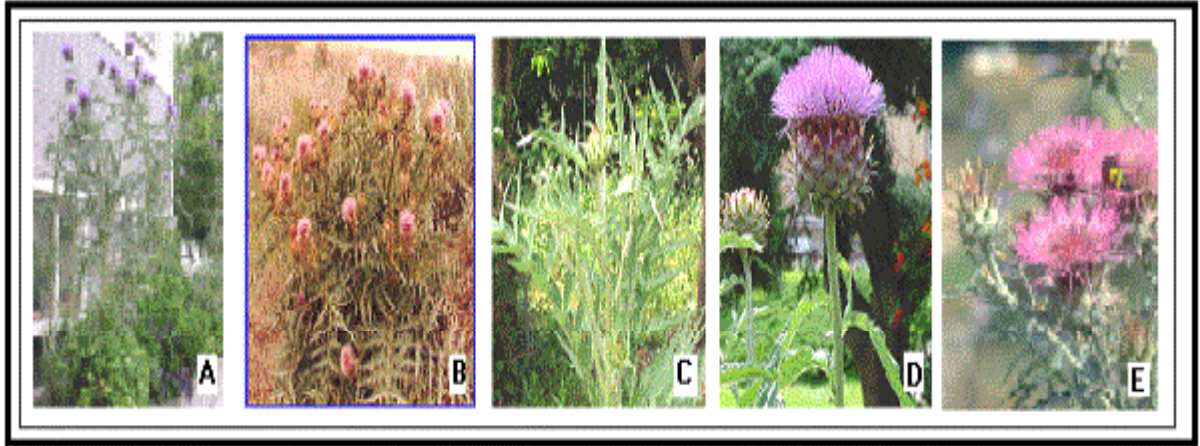
Un coagulante vegetal pulverizado obtenido de las flores del cardo *Cynara cardunculus l.* fue comparado con el cuajo de becerro en queso, determinando diversos parámetros químicos, bioquímicos, microbiológicos y sensoriales, los cuáles fueron supervisados sobre 3 meses de maduración. Tanto para la mayoría de los datos químicos obtenidos (humedad, grasa, proteína, ácido láctico, NaCl y pH), como de los principales grupos de microorganismo (viable total, Enterobacteriaceae, coliformes, E. coli, bacterias del ácido láctico, y levaduras) en los estudiados, no se observaron diferencias significativas entre los dos tipos de coagulantes (Silva, 2002).

Como se cita anteriormente el área mas prometedor para el uso de esta planta es la elaboración de quesos en la industria láctea, al ser utilizada como fuente de proteasas, responsables directas de la fabricación de este tipo de productos.

A fin de entender y aplicar correctamente estos procesos teniendo como sucedáneo proteasas vegetales es importante conocer las características básicas de los procesos tradicionales los cuales se mencionan mas adelante.

#### 2.1.4. Comparación morfológica de algunas variedades de cardo.

En la figura 3. se muestran diferentes ejemplares clasificados como *Cynara cardunculus l.*



**Figura 3:** Ejemplares morfológicamente diferentes clasificados como *Cynara cardunculus l.*

Las diferencia son las siguientes:

- A. su altura es aproximada a 2.30 mts. flores moradas, sin espinas.
- B. Su altura es de 1.20 mts, flores color ladrillo hojas plegadas.
- C. Su altura es de 50 cm, con espinas, plata muy compacta y rígida.
- D. Su altura es de 1.50 mts, con espinas flores moradas,
- E. Su altura es de 1.20mts, con espinas, flores color rosa.

Son las características mas relevantes que se destacan de cada una de ellas.  
(Anónimo).

#### 2.2 Definición de cuajo.

El cuajo es una enzima proteolítica que no sólo interviene en la formación del coágulo, sino también en su evolución posterior. Su participación dependerá de la tecnología de elaboración de cada variedad de queso , según los diferentes tipos de cuajo utilizados (González V, 2002).

### **2.2.1. La velocidad de formación de cuajada.**

La velocidad y la capacidad de un cuajo se ven influenciadas por los siguientes factores:

- Acidez de la leche: el cuajo actúa en un medio ligeramente ácido.
- Cantidad de cuajo: la cantidad de leche puede oscilar entre 2.000 a 15.000 veces respecto al volumen del cuajo comercial.
- Temperatura de la leche: los rangos óptimos oscilan entre 35 a 43 ° C. Si se disminuye a valores de 20° C se conserva su actividad aunque sumamente reducida y se inactiva por debajo de los 5° C y por encima de los 60° C.
- Presencia de calcio: las sales solubles de calcio ayudan a la actividad del cuajo.
- Cantidad de nitratos solubles en la leche, estos actúan protegiendo a las partículas de caseína evitando el cuajado. Esto explica porqué el calostro no se puede utilizar para la elaboración de quesos por su elevada concentración en estas sales
- Para pasteurizar la leche que se emplea para la elaboración de quesos debe seguir una de los siguientes tiempos y temperatura.
  - Calentar a 62°C durante 30 minutos.
  - Calentar a 72°C durante 16 seg. (Gentile, 2002).

### **2.2.2. Fuerza de cuajo.**

Antes de utilizar cualquier enzima coagulante debe conocerse su fuerza lo cual permite utilizar las dosis necesarias sin caer en los errores que conlleva emplear

dosis bajas o muy altas. Esta se define como la cantidad de leche en mililitros, que cuaja a 35 °C en 40 minutos, cuando se le adiciona un gramo o mililitro de cuajo. (Codex Stan, 1999).

Se puede calcular mediante la siguiente formula:

Donde:

$$F = \frac{V \times 2400}{C \times t}$$

F: Fuerza del Cuajo

V: cantidad de leche

C: cantidad de cuajo

t: tiempo

Cuando se conoce la fuerza, se puede calcular la cantidad necesaria a utilizar por medio de la siguiente formula.

Donde:

$$C = \frac{L \times 35 \times 40}{F \times T \times M}$$

F: Fuerza del Cuajo.

L: cantidad de leche.

C: cantidad de cuajo.

T: Temperatura en °C.

M: duración en minutos.

### **2.3. Las enzimas:**

Casi todas las transformaciones de las sustancias de las células vivas dependen de enzimas, estas son sintetizadas por las células y están ligadas a un lugar



determinado de la célula o disueltos en el citoplasma. Las enzimas constituyen catalizadores orgánicos que son sustancias capaces de desencadenar una reacción química en un breve espacio de tiempo necesario para el correcto funcionamiento del metabolismo sin ser consumidos o sin entrar en los productos finales.

Las cantidades de sustancias transformadas en las reacciones metabólicas gobernadas enzimáticamente alcanzan proporciones superiores en miles a la cantidad existente de la enzima correspondiente. De ahí la gran actividad que poseen.

Cada enzima actúa específicamente, es decir afecta solo a determinadas sustancias y debe ser apropiada al compuesto que se trate, como la llave a su cerradura. Además la actividad enzimática depende mucho de la temperatura y el pH, ya que las enzimas se inactivan o se descomponen por la acción de ácidos y álcalis fuertes, ciertos tóxicos y por el calor (Demeter, 1971).

### **2.3.1 Las enzimas de origen vegetal.**

Las enzimas coagulantes en los quesos elaborados mediante coagulación enzimática o mixta, constituyen un elemento esencial. Tradicionalmente se utiliza la quimosina o renina, extraída del cuarto estómago (cuajar) de los becerros lactantes. Pero debido al aumento en la demanda de cuajos se han desarrollado técnicas para la utilización de enzimas provenientes de microorganismos y vegetales. En el cuadro 2 se señalan las principales enzimas coagulantes de uso en quesería (Fepale, 2003).

**Cuadro 2.** Principales enzimas coagulantes que actualmente se utilizan en industria quesera.

GRUPO		EJEMPLO DE NOMBRES	COMPONENTE ENZIMÁTICO ACTIVO
Animal	Estómago bovino	Cuajo Bovino, cuajo de ternero,	Quimosina A y B, Pepsina (A) y Gastricina
	Estómago Ovino	Cuajo de cordero, oveja	Quimosina y Pepsina
	Estómago Caprino	Cuajo de cabrito, cabra	Quimosina y Pepsina
	Estómago Porcino	Cuajo de porcino	Pepsina A y B, Gastricina
Microbiano	Rhizomucor miehei	Hannilase	Proteasa aspártica de R. miehei
	Rhizomucor pusillus	Coag. Pusillus	Proteasa aspártica de R. pusillus
	Cryphonectria parasitica	Coagulante de parasitica	Proteasa aspártica de C. parasitica
FPC Quimosina producida por fermentación	Aspergillus niger	Chymax	Quimosina B
	Kluyveromyces lactis	-	Quimosina B
Vegetal	Cynara cardunculus l.	Cardoon	Cyprosina 1,2,y3 y/o Cardosina A y B

Tomado del Foro Electrónico sobre Enzimas Coagulantes ( Fepale, 2003).

### 2.3.2 Ventajas del uso de las enzimas vegetales.

- Algunos de los extractos de plantas se utilizan en zonas aisladas en las que la adquisición de otro tipo de coagulantes resulta difícil por lo que se genera la

necesidad de buscar nuevas fuentes de obtención de estas enzimas coagulantes (Scott, 1991).

- Se desarrollan procedimientos cada vez más adecuados para la extracción y purificación de las enzimas provenientes de una fuente vegetal (Hernández C, 2004).
- Es posible elaborar un sucedáneo del cuajo animal al hacer uso de estas, para ciertos tipos de quesos, siempre y cuando poseen una fuerza coagulante aceptable (Hernández C, 2004).
- Enzimas de origen vegetal pudieran ser económicamente más rentables para producir sucedáneos del cuajo, dado que algunas fuentes de origen son malezas, como lo es el cardo, cuyo cultivo no requeriría mayores cuidados comparados con un hato de ganado vacuno, caprino, ovino (Hernández C, 2004).

### **2.3.3 Desventajas del uso de enzimas vegetales.**

- Las características de los quesos madurados se pueden ver afectadas, sobre todo en lo referente al desarrollo de aromas y sabores indeseados por la utilización de coagulantes de origen vegetal. (Hernández C, 2004).
- Defectos en cuanto a textura en quesos frescos que no son consumidos luego de elaborarlos. O bien en quesos madurados donde se produce un ablandamiento y un aspecto de masa en la parte interna del queso (Hernández C, 2004).
- La utilización de estos extractos enzimáticos estará limitada a determinados tipos de quesos (Hernández C, 2004).

#### **2.3.4. Definición de actividad enzimática**

Se define como la cantidad de enzima que cataliza la conversión de 1  $\mu\text{mol}$  de sustrato en un minuto. La actividad específica es el número de unidades de enzima por miligramo de proteína (U/mg Prot.) o mililitro de disolución (U/ml) (González M, 2002).

##### **2.3.4.1. Factores que intervienen en la actividad enzimática para lograr la coagulación de la leche.**

Los factores que influyen de manera directa sobre la actividad de las enzimas proteolíticas en la elaboración de quesos son:

- 1) pH
- 2) Temperatura
- 3) Concentración de la enzima.
- 4) Concentraciones de iones de calcio.
- 5) Cofactores.

##### **2.3.4.1.1. Efecto del pH sobre la actividad enzimática.**

Los enzimas poseen grupos químicos ionizables (carboxilos  $-\text{COOH}$ ; amino  $-\text{NH}_2$ ; tiol  $-\text{SH}$ ; imidazol, etc.) en las cadenas laterales de sus aminoácidos. Según el pH del medio, estos grupos pueden tener carga eléctrica positiva, negativa o neutra. Como la conformación de las proteínas depende, en parte, de sus cargas eléctricas, habrá un pH en el cual la conformación será la más adecuada para la actividad catalítica. Este es el llamado pH óptimo.

La mayoría de los enzimas son muy sensibles a los cambios de pH. Desviaciones de pocas décimas por encima o por debajo del pH óptimo pueden afectar drásticamente su actividad. Así, la pepsina gástrica tiene un pH óptimo de 2, la ureasa lo tiene a pH 7 y la arginasa lo tiene a pH 10.

Como cambios del pH pueden provocar la desnaturalización de la proteína, los seres vivos han desarrollado sistemas más o menos complejos para mantener estable el pH intracelular llamados amortiguadores fisiológicos (González M, 2002).

Existen muchas variables tales como: temperatura, tipo de amortiguador, concentración de sustratos, presencia u ausencia de inhibidores o activadores, fuerza iónica de la solución, etc. que pueden afectar el pH al que la enzima actúa en mejores condiciones (Heijands, 1995).

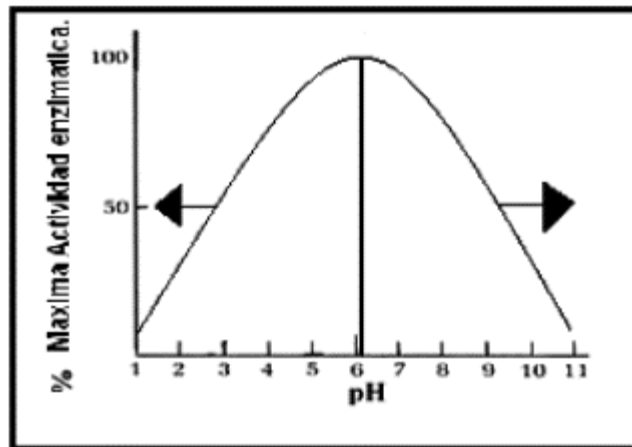
#### **2.3.4.1.2. Efecto del pH sobre el sustrato o el producto.**

Al tratar el efecto del pH sobre las reacciones catalizadas por enzimas uno de los primeros puntos a considerar es el de las ionizaciones del sustrato o del producto. Tales ionizaciones hacen que la constante de equilibrio sea dependiente del pH (Heijands, 1995).

#### **2.3.4.1.3. Efecto del pH sobre la Enzima o el complejo Enzima-Sustrato.**

En 1911 Michaelis y Davidsohn Explicaron la curva en forma de campana considerando que la proteína isoelectrica era la forma activa de la enzima. Su homologo (Haldane) propuso a su vez que la actividad dependía de la ionización de ciertos grupos del centro activo.

La curva típica del comportamiento de la enzima en su forma activa se presenta en la grafica 1 (Heijands, 1995).

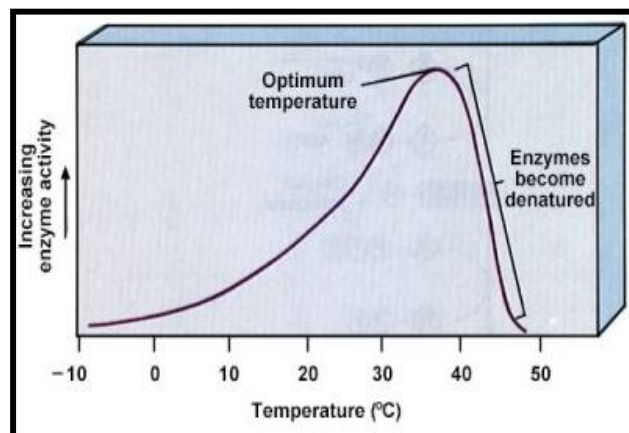


**Grafica 1:** Relación del pH y % la velocidad Máxima.

#### 2.3.4.1.4. Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática.

En general, los aumentos de temperatura aceleran las reacciones químicas: por cada 10°C de incremento, la velocidad de reacción se duplica. Las reacciones catalizadas por enzimas siguen esta ley general. Sin embargo, al ser proteínas, a partir de cierta temperatura, se empiezan a desnaturalizar por el calor.

La temperatura a la cual la actividad catalítica es máxima se llama temperatura óptima; la grafica 2 muestra el comportamiento de la velocidad de reacción con respecto a la temperatura.



**Grafica 2:** Efecto de la temperatura sobre la velocidad de reacción.

El aumento de velocidad de la reacción debido a la temperatura es contrarrestado por la pérdida de actividad catalítica a causa de la desnaturalización térmica, y la actividad enzimática decrece rápidamente hasta anularse (González M, 2002).

En el caso de las reacciones enzimáticas del proceso de fabricación de quesos, mediadas para cuajar, la temperatura óptima de reacción oscila entre los 40 y 42°C en el caso de la renina (Villegas, 2004).

#### **2.3.4.1.5. Efecto por concentración de la enzima.**

En lo concerniente a la influencia de la concentración de la enzima se conoce que el tiempo de coagulación ( $t_c$ ) es inversamente proporcional a la cantidad de enzima.

Esta regla de Storch y Segelke válida representada por la ecuación de Holter.

$$t_c = t_o + K/C.$$

Donde:

$t_o$  = tiempo transcurrido entre el final de la reacción enzimática y el momento de la coagulación,  $K$  = Constante catalítica,  $C$  = Cantidad de enzima.

Esta expresión continúa siendo la base de la determinación de las preparaciones comerciales de cuajo.

La concentración de la enzima influye fuertemente en las características reológicas del gel. Y especialmente en su velocidad de endurecimiento, dureza máxima y elasticidad. (Heijands, 1995).

#### **2.3.4.1.6. Efecto de los cofactores sobre la actividad enzimática.**

A veces, una enzima requiere para su función la presencia de sustancias no proteicas que colaboren en la catálisis. Los cuales son conocidos como cofactores.

Los cofactores pueden ser iones inorgánicos como el  $Fe^{++}$ ,  $Mg^{++}$ ,  $Mn^{++}$ ,  $Zn^{++}$  etc. Casi un tercio de las enzimas conocidas requieren cofactores. Cuando el cofactor es una

molécula orgánica se llama coenzima. Muchas de estas coenzimas se sintetizan a partir de vitaminas. Cuando los cofactores y las coenzimas se encuentran unidos a la enzima se llaman grupos prostéticos. (González M, 2002).

Por ejemplo, el papel del calcio es primordial en la presentación del queso, ya que su función es la de actuar como factor cementante respecto a los conjuntos de proteínas de la leche o caseínas. La cantidad de cloruro de sodio utilizada es una proporción aproximada de 0.03% de la leche total a utilizar según (Villegas, 2004).

El fosfato cálcico agrupa a las micelas de proteínas y por lo tanto su cantidad se relaciona directamente con la firmeza y el cuerpo del queso. Durante la fermentación láctica el ácido láctico producido disuelve los enlaces de fosfato cálcico y este se elimina durante el desuerado. Esto explica porqué los quesos tienen diferentes formas y tamaños según su elaboración. Los pequeños pertenecen al grupo de la fermentación láctica y los grandes a la producida por el cuajo (Gentile, 2002).

#### **2.4. Definición de leche:**

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



#### **2.4.1 Propiedades físico – químicas de la leche.**

La leche es un líquido blanco, opaco, de sabor ligeramente dulce. Su densidad, o peso específico, tiene un valor promedio casi constante, a 15°C que es entre 1,020 y 1,033 gr/ml. La composición de la leche compleja contiene alrededor del 87% de agua y un 3,5% de grasas finamente subdivididas en gotitas de 1 a 10 micrones de diámetro que le confiere opacidad. Cuando la leche queda en reposo por largo tiempo, parte de la grasa se acumula en la superficie constituyendo la nata. Casi el 4% corresponde a los prótidos (sustancias orgánicas nitrogenadas) entre los que predomina la caseína. Menos importantes son la lacto-albúmina (albúmina de la leche) y la lacto-globulina, las cuales son proteínas sericas que no participan en ningún momento para la formación del queso. Un 4.5% de lactosa que comunica un sabor ligeramente dulce. Son escasas las sales Inorgánicas representan un 0.5%, y finalmente, en baja proporción pero cumpliendo funciones biológicas, se encuentran las vitaminas A y D, esta última decisiva para la fijación del fosfato de calcio en dientes y huesos (Gentile, 2002).

#### **2.4.2. Papel de los diferentes componentes de la leche en el queso. Según el codex en 1999. tenemos que el:**

- Agua: favorece el crecimiento microbiano y por lo tanto la maduración, afecta la textura, el rendimiento e influye en la vida comercial.
- Grasa: influye en la textura, sabor, rendimiento y color de los quesos.
- Lactosa: influye en el desuerado, textura, sabor y maduración.
- Caseína: influye en el rendimiento, sabor y olor de los quesos.

- Proteínas del suero: contribuyen con el valor nutritivo y la maduración. Estas pueden afectar la coagulación.
- Minerales: participan en la coagulación, influyen en el desuerado y textura de la cuajada

## **2.5. Las proteínas de la leche.**

Las proteínas de la leche son: La caseína, albúmina, globulina, y enzimas. Estas constituyen alrededor del 95% del nitrógeno presente. Y el nitrógeno restante es nitrógeno no proteico.

Las proteínas contienen alrededor de 20 aminoácidos y otras sustancias como azufre, fósforo y calcio. Según el sistema de fabricación los quesos contienen entre el 10% y el 30% de proteína. Los quesos son muy ricos en proteínas en especial los quesos de pasta prensada cuyo contenido de proteínas es de 30% estas proteínas proceden de las caseínas modificada a lo largo del afinado.

De hecho como consecuencia de esta proteolisis las proteínas del queso son más fácilmente digeribles por lo que es muy interesante a nivel nutricional por su alto valor biológico. El desdoblamiento químico de las proteínas de la leche se da por. calor, ácidos, enzimas, alcohol y otros agentes, algunas de estas sustancias son producidas en la leche por la acción de los microorganismos. La desnaturalización de las proteínas y su coagulación o cuajado es lo que caracteriza las primeras etapas de la modificación de las proteínas (Robinson, 1991).

### **2.5.1. Las caseínas.**

De todos los componentes proteicos de la leche son probablemente las caseínas las que más se estudian dado su papel determinante en el estado y estabilidad del sistema del que forma parte.

Las caseínas son aquellas fosfoproteínas y estas se dividen en:  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ , así como la caseína  $\kappa$ , las caseínas  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ , son sensibles al calcio, esto quiere decir que dichos componentes principales reaccionan en presencia de este elemento, con el que forman compuestos que precipitan, provocando la coagulación de la leche (Wolfgang, 1997).

Estas fracciones varían por factores como la especie, raza y etapa de crianza. La caseína se encuentra presente en parte solubilizada y otra parte en forma de micelas suspendidas, estas normalmente están combinadas con calcio, fosfato inorgánico, magnesio y citratos. En el proceso de coagulación enzimática la acción de una enzima sobre la caseína tarda un cierto tiempo e inicialmente no ocurre separación del cuajo y el suero, la separación acontece más adelante (Whitney, 1976).

## **2.6. Proceso de transformación de la leche en queso.**

La transformación de la leche en queso consta fundamentalmente de dos procesos: la obtención de la cuajada y su maduración. Estos procesos a su vez se pueden dividir en tres fases esenciales:

- 1.- Fase enzimática: en esta fase la enzima separa la caseína  $\kappa$  tiene una duración desde la adición del cuajo hasta el inicio de la formación de los puentes calcio-salinos.
- 2.- Fase reticular: se forman los puentes salinos, y a continuación una estructura reticular tridimensional.
- 3.- Fase de sinéresis: la retracción de los puentes calcio salinos y el consecuente desuerado.

En el caso de los quesos frescos, la fabricación termina con el desuerado (Amiot, 1991).

### **2.6.1 Tipos de coagulación de la leche.**

La coagulación de la leche que se traduce por la formación de un gel. Es el resultado de las modificaciones físico-químicas que intervienen a nivel de las micelas de caseína, los mecanismos que intervienen en la formación del coágulo difieren totalmente según el mecanismo utilizado (Tejeda, 1915).

#### ***2.6.1.1 Coagulación por altas concentraciones de sales***

El equilibrio salino de la leche tiene enorme importancia en tecnología lechera, el equilibrio entre los iones positivos polivalentes (Ca. y Mg.) y los iones negativos polivalentes fosfatos y citratos que afectan la estabilidad de las proteínas, principalmente el principio de las cargas eléctricas.

Las proteínas coloidales de la leche están cargadas negativamente, cualquier incremento de iones negativos (fosfatos y citratos) tienen como efecto aumentar la estabilidad de las proteínas en la mayor parte de la leche, mientras que el aumento de los iones de calcio divalentes neutraliza las cargas negativas y en consecuencia, tienen un efecto desestabilizante sobre las proteínas.

Este principio se aplica en la fabricación de leche evaporada. Es decir aquellas proteínas que presentan mayor número de regiones hidrofóbicas sobre su superficie forman agregados y precipitan rápidamente que aquellos que presentan pocas regiones hidrofóbicas (Tejeda, 1915).

### **2.6.1.2 Coagulación Ácida.**

Son diversos los ácidos orgánicos (láctico, cítrico) o minerales que dan una cuajada conveniente. El punto más importante de la aplicación de estos es la regulación precisa del pH entre 4.5 y 4.7. El descenso del pH tiene por efecto hacer disminuir la ionización provocando una reducción del potencial de superficie y tiene como consecuencia la disminución secuestrante de las caseínas  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  el aumento de la solubilidad de las sales cálcicas en el suero.

Esta serie de atracciones desestabilizan la dispersión coloidal y coagulan la leche. Así que esta coagulación carece de calcio y por lo tanto no es comparable a la coagulación enzimática que sí tiene calcio. Ej. El Queso cottage es elaborado por coagulación ácida (Spreer, 1991).

### **2.6.1.3 Coagulación por acción enzimática.**

Un gran número de enzimas proteolíticas de origen animal, vegetal o microbiano poseen la propiedad de coagular el complejo de caseínas de la leche.

Nitschman, Alais y Garnier. han confirmado que la coagulación de la leche por acción del cuajo se dan según estas dos fases.

**La fase primaria:** durante la cual el cuajo ataca al componente estabilizante de la micela, que es la caseína  $\kappa$  cortándola en dos segmentos desiguales 1-105 corresponde a la paracaseína  $\kappa$  y el segmento 106-169 al péptido llamado macro péptido. Todas las formas de caseína  $\kappa$ , contengan o no glucidos, están sujetas a esta hidrólisis, la cual se efectúa a una gran velocidad.

**La fase secundaria:** fase de coagulación que corresponde a la formación del gel por asociación de las micelas modificadas bajo la acción del enzima a una

temperatura conveniente, esta agregación no empieza hasta que el 85-90% de caseína  $\kappa$  ha sido hidrolizada.

Existe una fase terciaria que es el cuajado se inicia una vez que se ha producido el coágulo de la leche y consiste en una acción proteolítica de la  $\alpha$  y  $\beta$  que constituyen también parte del proceso de maduración.

#### **2.6.1.3.1 Fase enzimática.**

Es importante resaltar que la cuajada obtenida enzimáticamente no está desmineralizada como la ácida, ésta es la diferencia fundamental entre estos tipos de cuajado. Tanto el calcio como el fósforo desempeñan un papel fundamental en el mecanismo de coagulación y forman parte del gel de caseína, proporcionando un cuajo con propiedades particulares para que el queso sea compacto, flexible, elástico e impermeable (Eck, 1991).

#### **2.6.1.3.2 Fase de coagulación.**

Las características reológicas del coágulo, que dependen de la naturaleza y del número de enlaces intermicelares, están estrechamente ligadas a la velocidad de coagulación. Actualmente, se carece de datos sobre la naturaleza y el número de enlaces que intervienen en la agregación de micelas del paracaseinato. Ha sido demostrado que el calcio y el fosfato de calcio micelar juegan un papel determinante en el fenómeno de agregación.

Según Payens (1981), los puntos de agregación de las micelas no están repartidos uniformemente en su superficie, sino que están localizados en determinadas áreas; ello explicaría que la desestabilización de las micelas no conduce a un precipitado

denso, sino que da lugar a un retículo proteico y que aprisiona la totalidad de la fase acuosa (Eck, 1991).

#### **2.6.1.3.3. Rendimiento quesero.**

Un punto de gran importancia en la industria quesera, así como en cualquier otra, es el control del rendimiento. Se puede expresar de diferentes maneras pero la más común es relacionando los kilos de queso obtenido con los litros de leche empleada.

Varios factores afectan el rendimiento a saber:

- La composición de la leche: una leche rica en sólidos totales ofrecerá un mayor rendimiento al igual que un mayor contenido de caseínas.
- Composición del queso: los quesos blandos ofrecen mayor rendimiento que los quesos semiduros y duros.
- Técnicas de fabricación: un exacto control del tiempo de coagulación y los trabajos de la cuajada permite reducir las pérdidas de caseína y grasa en el suero las cuales están estimadas en 0.1 y 0.3% respectivamente; con lo cual se mantiene un buen rendimiento (Alais, 1984).

Técnicas aplicadas en el trabajo de investigación.

**ETAPA 1****3.1 Extracción y dializado de la fracción enzimática a partir de la flor, tallo y hoja del cardo.****3.1.1 Técnica para la extracción y fraccionamiento de las proteínas**

Se maceraron 5 gramos de muestra, con 50 ml de solución buffer de fosfatos 0.1M al pH correspondiente determinado anteriormente, y preparada según especificaciones de (Lynch, 1987).

Una vez solubilizada en el buffer de fosfatos, la muestra se colocó en un tubo y se centrifugó a 3,500 rpm por 15 minutos en una centrífuga IEC Internacional centrifugue modelo K No. 4410P-1, a temperatura ambiente. Las condiciones anteriores descritas no son las óptimas, ya que no se cuenta con equipo adecuado se recomienda trabajar en centrífuga con refrigeración a 16,000 rpm durante 30 minutos a 4°C (Nilo,1997).

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

Posteriormente éste se fraccionó en seis partes iguales y se transfirió a igual número de tubos para centrífuga agregándose solución saturada de sulfato de amonio  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  en las diferentes concentraciones (8.33%, 16.66, 33.33%, 50.00%, 66.66%, 83.33%).

Lo anterior se realizó con el objetivo de precipitar la enzima presente en el extracto obtenido de la flor, como del tallo y hoja de la planta, para su posterior análisis y



determinación de la fracción con la mayor actividad proteolítica. La metodología anterior se llevo a cabo bajo el siguiente fundamento: “Una descripción simplificada del mecanismo de insolubilización por salado, está basada en el hecho de que la adición de las sales elimina el agua de la proteína hidratada, dejando las regiones hidrofílicas en libertad de combinarse intermolecularmente” (Glatz, 1990).

### **3.1.3 Diálisis.**

Este proceso se llevó a cabo con el fin de eliminar la sal  $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$  (sulfato de amonio) utilizado en esta etapa de extracción de la enzima, ya que ésta interfiere en la evaluación del extracto enzimático en sus diferentes pruebas a las que sean sometidos, así como la de eliminar proteínas con peso molecular menor a 12 KDa, ya que son capaces de emigrar hacia el exterior de la membrana utilizada en el sistema de diálisis, manteniéndose en el interior proteínas con un peso molecular superior al mencionado. Faro (1991) reporta que las proteasas del cardo poseen un peso molecular aparente entre 16 KDa y 31 KDa. Una vez obtenido el extracto crudo de la etapa de extracción por precipitado, se diluyó en un volumen de 30 ml de agua destilada y se transfirió al interior de un sistema de membrana sintética, con tamaño de poro que permite eliminar partículas de peso molecular menores a 12 Kdalton.

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

Se llevó a cabo la eliminación de sulfato de amonio por ésta técnica durante un tiempo equivalente a 36 horas, momento en que el agua del sistema presentó ausencia cualitativa de sulfatos. La técnica para determinación cualitativa de sulfatos se expone en el capítulo anexos 6.5.1

## **ETAPA 2**

### **3.2. Pruebas en fresco utilizando las fracciones, en diferentes pH's a partir de flor, hoja y tallo del cardo.**

#### **3.2.1. Evaluación de Pruebas en fresco.**

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

En un vidrio de reloj se colocó 1 ml de leche a 40° C y 1 ml de extracto crudo resuspendido en 1 ml de buffer fosfatos 0.1 M a los siguientes pH's 5.0, 5.4 , 5.7, 6.0, 6.3, 6.6 , aplicados en las diferentes fracciones que se tenían de cada una de las partes de la planta (flor, tallo y hoja).

Esta es una prueba relativamente sencilla donde se detecta si existe o no algún tipo de coagulación ya sea de tipo ácida o enzimática en la diferentes partes de la planta. (Hernández C, 2004).

#### **3.2.2. Detección de actividad enzimática en las diferentes partes de la planta de la flor, tallo y hoja del cardo.**

Se realiza una observación y monitoreo cuidadoso a la solución y se verifica si se a llevado algún tipo de coagulación y si es así estas es selecciona para ser sometida a otras pruebas más precisas que proporcione más información en cuanto a la

actividad que esta realizando ese complejo enzimático sobre su sustrato. Sin embargo, las que no coagulan en esta etapa deberán ser igualmente analizadas para evaluar correctamente el extracto previamente dializado que se obtuvo de las diferentes partes de la planta de cardo.

Las pruebas en fresco se puede decir que se utilizan como prueba preliminar para la selección de aquellas fracciones que presentaban dicha característica visual de coagulación de preferencia, para posteriormente evaluarla por medio de espectrofotometría en espectro uv de longitud de onda de 280 nm.

### **ETAPA 3:**

#### **3.3.1. Evaluación de la fuerza de cuajo en hoja, tallo y flor variando pH de (5.0 – 6.6) para las diferentes fracciones del extracto parcialmente purificado.**

El procedimiento a seguir para llevar acabo esta operación requiere de leche fresca recién ordeñada, buffer fosfatos 0.1 M a los pH's correspondientes de trabajo pH (5.0, 5.4 , 5.7 , 6.0, 6.3, 6.6), extracto enzima y un baño maría a 40°C.

En esta etapa se colocaron, 100 µl de extracto enzimático diluidos en 1 ml de buffer frío al pH que se quiera analizar, se agita y se agrega a 10 ml de leche, es decir una relación de 1:10, se toma el tiempo de coagulación para cada una de las fracciones al igual se recomienda hacerlo por duplicado. Para esta prueba, se tomo en cuenta la metodología expuesta por (Veisseyre, 1972).

## **ETAPA 4:**

### **3.4.1. Estudio cinético de la actividad de las diferentes fracciones de los extractos parcialmente purificados en función al pH para flor.**

#### **3.4.1.1. Evaluación, de la actividad proteolítica del extracto enzimático dializado bajo diferentes pH's.**

Para esta prueba, se optó por la metodología reportada por Duckjovich y Esquivel (1995), misma que fue modificada para los fines perseguidos en esta investigación.

Se prepara una solución de caseína al 2% ajustado a los pH's de trabajo correspondientes buffer fosfatos. Se sometieron a reacción 25 ml de sustrato con 0.5 ml del extracto enzimático parcialmente purificado a temperatura de 40°C con agitación constante en un termobañó NESLAB Modelo Rotofix II. Se tomaron muestras de la reacción cada minuto empezando de tiempo cero por un tiempo total de 10 minutos. La reacción se detuvo con ácido tricloroacético al 10% en baño de hielo .posteriormente las muestras de las reacciones obtenidas se centrifugaron a 14.000 rpm en centrífuga Eppendorf modelo 5415C por cuatro minutos y del sobrenadante obtenido se determinaron lecturas espectrofotométricas U. V, a una longitud de onda a 280 nm en un espectrofotómetro marca Spectronic modelo biomate 3, utilizando como blanco agua destilada.

## **ETAPA 5**

### **3.5.1. Análisis comparativo de la actividad de las diferentes partes de la planta Flor, tallo y hoja. Con cada una de sus fracciones de los extractos parcialmente purificados en función al pH 6.3.**

Este análisis consiste en evaluar el comportamiento cinético de las diferentes partes de la planta (tallo, hoja y flor) a un solo pH, Que en este caso fue el pH 6.3.

La metodología utilizada en esta etapa fue exactamente la misma que se aplicó en la etapa 4.

Se prepara una solución de caseína al 2% ajustado a pH 6.3 con buffer fosfatos. La cual se sometió a reacción 25 ml de sustrato con 0.5 ml del extracto enzimático parcialmente purificado a temperatura de 40°C con agitación constante en un termobañero NESLAB Modelo Rotofix II. Se tomaron muestras de la reacción cada minuto empezando de tiempo cero por un tiempo total de 10 minutos. La reacción se detuvo con ácido tricloroacético al 10% en baño de hielo .posteriormente las muestras de las reacciones obtenidas se centrifugaron a 14.000 rpm en centrifuga Eppendorf modelo 5415C por cuatro minutos y del sobrenadante obtenido se determinaron lecturas espectrofotométricas U. V, a una longitud de onda a 280 nm en un espectrofotómetro marca Spectronic modelo biomate 3, utilizando como blanco agua destilada.

La etapa 1 no se presenta en este apartado ya que solo comprendió la obtención y el dializado del extracto enzimático material fundamental para realizar las siguientes etapas.

**ETAPA 2:**

**4.2.1 Pruebas de coagulación en fresco para tallo, hoja y flor, variando pH en los extractos parcialmente purificados.**

A continuación se presentan las tablas que muestran los resultados de las pruebas de coagulación en fresco para las diferentes partes de la planta (tallo, hoja y flor) las cuales fueron extraídas con diferentes concentraciones de  $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$  (8.33%, 16.66%, 33.33%, 50.00%, 66.66% y 83.33), variando el pH (5.0, 5.4, 5.7, 6.0, 6.3, 6.6).

**Cuadro 3:** Pruebas en fresco para tallo variando pH en las diferentes fracciones del extracto enzimático parcialmente purificado.

PH. / Fracción	8.33% $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ MINUTOS				16.66% $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ MINUTOS				33.33% $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ MINUTOS				50% $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ MINUTOS				66.66% $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ MINUTOS				83.33% $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ MINUTOS			
	10	20	30	40	10	20	30	40	10	20	30	40	10	20	30	40	10	20	30	40	10	20	30	40
PH 5.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PH 5.4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PH 5.7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PH 6.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PH 6.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PH 6.6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Como se puede observar en el cuadro 3 no se presentó coagulación al utilizar el (tallo), al variar el pH (5.0, 5.4, 5.7, 6.0, 6.3, 6.6) para ninguna de las diferentes fracciones obtenidas mediante la adición del  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ .

Las condiciones de coagulación son las recomendadas por Villegas, en el (2004) a temperatura de 40° C en un tiempo aproximada a los 40 minutos.

**Cuadro 4:** Pruebas en fresco para hoja variando pH en las diferentes fracciones del extracto enzimático parcialmente purificados.

PH. / Fracción	8.33% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ MINUTOS				16.66% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ MINUTOS				33.33% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ MINUTOS				50% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ MINUTOS				66.66% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ MINUTOS				83.33% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ MINUTOS			
	10	20	30	40	10	20	30	40	10	20	30	40	10	20	30	40	10	20	30	40	10	20	30	40
PH 5.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PH 5.4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PH 5.7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PH 6.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PH 6.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PH 6.6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Para el caso de la hoja, se obtuvo un comportamiento similar a la del tallo, como se demuestra en el cuadro 4: no presentando signos de coagulación evidente bajo las mismas condiciones de temperatura, tiempo y variación de pH (5.0, 5.4, 5.7, 6.0, 6.3, 6.6) para las diversas fracciones obtenidas.

**Cuadro 5:** Pruebas en fresco para flor variando pH en las diferentes fracciones del extracto enzimático parcialmente purificado.

PH. / Fracción	8.33% (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> MINUTOS				16.66% (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> MINUTOS				33.33% (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> MINUTOS				50% (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> MINUTOS				66.66% (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> MINUTOS				83.33% (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> MINUTOS			
	10	20	30	40	10	20	30	40	10	20	30	40	10	20	30	40	10	20	30	40	10	20	30	40
PH 5.0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
PH 5.4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
PH 5.7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
PH 6.0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
PH 6.3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
PH 6.6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

A diferencia de los primeros extractos de las partes de la planta, hoja y tallo, los de flor demostraron actividad coagulante positiva en todos los casos, según se observa en el cuadro 5: Lo anterior para todas las fracciones bajo las mismas condiciones de temperatura, tiempo y variación de pH.

Cabe mencionar que los resultados presentados en los cuadros 3,4,5 son solo cualitativos pero aun así permiten observar que los extractos de flor son los que poseen la mayor actividad coagulante lo cual será evidenciado con datos de tipo cuantitativo obtenidos en los ensayos posteriores.

### ETAPA 3:

#### 4.3.1. Evaluación de la fuerza de cuajo en hoja, tallo y flor variando pH de (5.0 – 6.6) para las diferentes fracciones del extracto parcialmente purificado.

Para fines de aplicación se evaluó la fuerza de cuajo mediante la metodología propuesta por CODEX STAN, en 1999 la cual demuestra el poder coagulante de los extractos parcialmente purificados. Los resultados para el extracto de flor son presentados en cuadro 6: y para los extractos de hoja y tallo no fue posible obtener



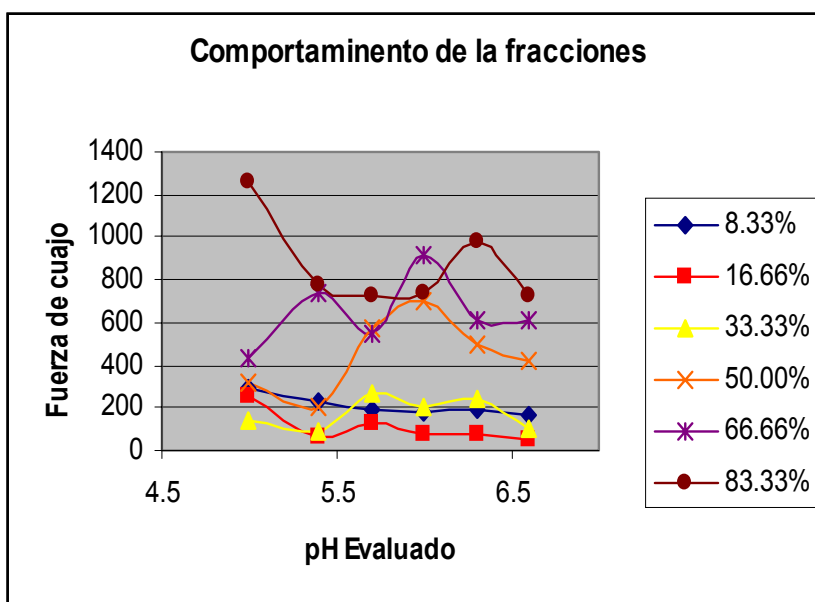
resultados debido a que no se presentó coagulación alguna a pesar de haber variado el pH.

**Cuadro 6.** Evaluación del comportamiento de las fracciones obtenidas con relación a la fuerza de cuajo y el pH del extracto parcialmente purificado.

Fracción	pH					
	pH5	pH5,4	pH5,7	pH6,0	pH6,3	pH6,6
<b>8,33</b>	291,67	229,09	196,82	173,29	197,05	159,84
<b>16,66</b>	250,00	57,97	132,56	76,07	71,08	53,32
<b>33,33</b>	139,53	84,91	262,37	197,31	246,04	101,16
<b>50,00</b>	320,49	199,74	568,67	693,64	498,07	421,05
<b>66,66</b>	434,76	844,44	551,72	916,98	611,44	612,26
<b>83,33</b>	1256,54	775,00	727,27	742,40	978,09	721,85

Fuerza de cuajo: Unidades ml / min.

A continuación se presenta de forma gráfica dichos resultados permitiendo que sean analizados de manera que se pueda emitir una discusión y conclusión de los mismos.

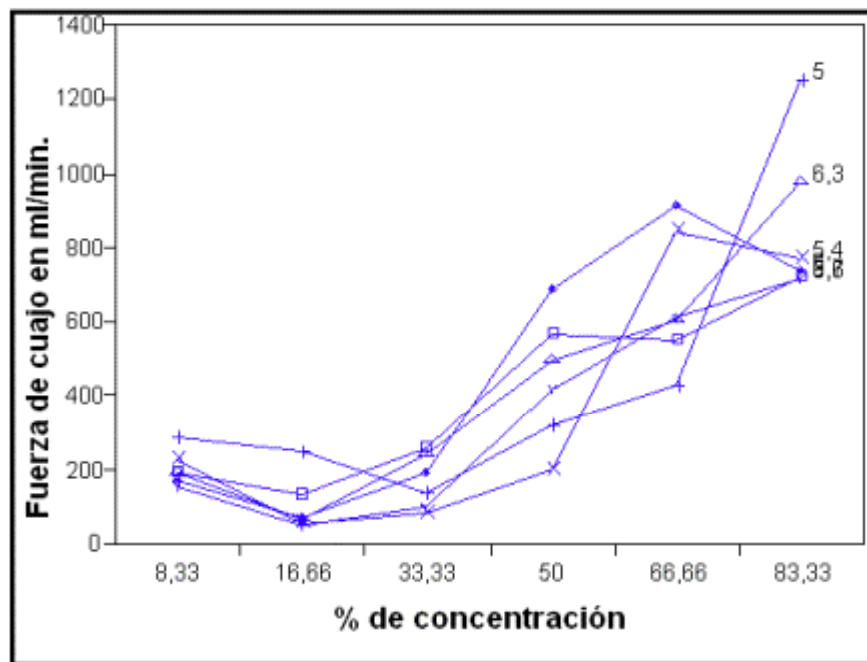


**Grafica 3:** se muestra el comportamiento de las fracciones

Obtenida con relación a la fuerza de cuajo y el pH.

Como se puede ver en la gráfica las mejores actividades observadas se presentan en las fracciones 83.33% y 66.66% las cuales se recomiendan para el establecimiento de condiciones tecnológicas prácticas, con las mayores fuerzas de cuajo a pH 6.3, 6.6, y 6.0, que son cercanos al pH de la leche fresca. Aunque el pH 5.0 tiene una mayor fuerza de cuajo no se recomienda ya que en este existe una interacción sinergista entre ácido-enzimática. Por lo que no es solo la acción propia de la enzima.

Para tener aun más información sobre el comportamiento de las fracciones del extracto flor con respecto a la variación de pH. Los resultados que se presentan en el cuadro 6, son las medias del análisis realizado, estos mismos fueron grafica como se puede apreciar en la siguiente figura 4, Lo cual se realiza con el fin de seguir proporcionando más información sobre el efecto que se tiene al variar el pH con respecto a la actividad proteolítica que realiza cada una de las fracciones.



**Grafica 4:** Fuerza de cuajo en función al pH del extracto parcialmente purificado para la flor.

Del análisis estadístico efectuado a los datos presentados en el cuadro 6, es posible determinar con el análisis de varianza y la comparación entre las medias mediante la prueba de t student ( $p \leq 0.05$ ), el mejor tratamiento fue el de pH 5.0, que fue diferente a todos los demás, seguido del pH 6.3 y 6.0 que estadísticamente son iguales entre si, pero diferentes al resto de los demás tratamiento. Los resultados del método estadístico para la fuerza de cuajo son presentado en el apéndice 1.

De tal manera, como se puede observar en la grafica 4, los pH's mas sobresalientes son: pH 5.0, 6.3 que en esta prueba aun muestran actividad ascendente y sin embargo el pH 6.0 se observa que a llegado a un punto máximo y su descenso es inminente al igual que el resto de los pH's.

En el caso del pH 5.0 que estadísticamente fue el mejor, se puede interpretar como un comportamiento sinergista entre la acción de la enzima y el nivel de acidez presente en el sustrato.

#### **ETAPA 4:**

##### **4.4.1. Estudio cinético de la actividad de las diferentes fracciones de los extractos parcialmente purificados en función al pH para la flor.**

**Cuadro 7:** Análisis comparativo de las cinéticas de actividad ( $V_0$ ) a diferente pH, de las fracciones del extracto de la flor.

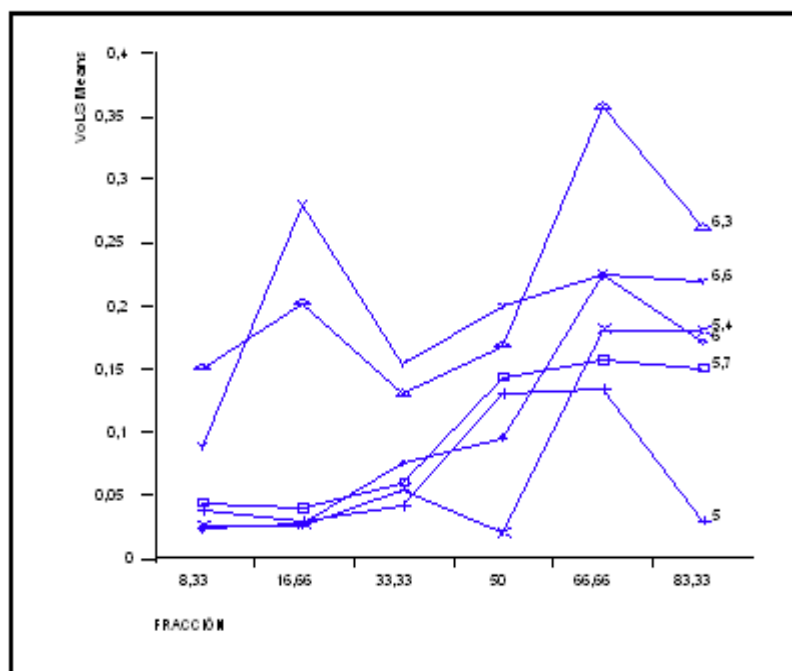
PH/ fracción.	8,33%	16,6%	33,33%	50 %	66,66 %	83,33%
5	0,039	0,032	0,043	0,132	0,135	0,031
5,4	0,026	0,027	0,56	0,021	0,182	0,181
5,7	0,045	0,04	0,061	0,144	0,157	0,152
6	0,024	0,028	0,077	0,097	0,226	0,173
6,3	0,152	0,203	0,132	0,169	0,358	0,262
6,6	0,09	0,282	0,156	0,201	0,226	0,22

Unidades de Abs/min.

A fin de conocer la actividad que existe dentro de cada una de las fracciones de extracto de la flor en los diferentes pH's, se procedió al tratamiento estadístico de los datos de las velocidades iniciales obtenidas en esta etapa mediante la prueba de t student ( $p \leq 0.05$ ) para demostrar cual de los tratamientos es el más apto para el establecimiento de condiciones tecnológicas prácticas.

Cabe mencionar que en esta etapa no se estudiaron los extractos obtenidos a partir de hoja y tallo debido a su nula actividad que presentaron en los estudios anteriores.

El cuadro anterior los datos se presentan como las medias de las cinéticas de actividad ( $V_0$ ) a diferentes pH's es graficado para una mejor apreciación del el comportamiento del extracto de la flor.



**Grafica 5:** Estudio de cinéticas de la actividad de las diferentes fracciones del extracto flor parcialmente purificado.

De acuerdo a los resultados estadísticos arrojados con el análisis de varianza y la aplicación de la prueba de t student ( $p \leq 0.05$ ), se encontró que si existen diferencias

entre las medias y los resultados fueron que los mejores pH's son 6.3 y 6.6 con respecto al resto, dentro de ellos el mejor es el pH 6.3 fracción 66.66% diferente a todos los demás. Seguido del pH 6.6 (16.66%) y 6.3 (83.33%) los cuales estadísticamente son iguales; es decir no existen diferencias significativas entre ellos. De los resultados anteriores es posible observar que efectivamente hay dos pH's que se comportan diferente al resto y en las fracciones donde existe mayor actividad se presenta en las fracciones 66.66% y 16.66%. La evaluación cinética de las fracciones variando pH, demuestran la presencia de un complejo enzimático más que la actividad de una sola enzima. Los resultados del estadístico aplicado para las cinéticas aplicadas se encuentran en el apéndice 2.

#### **ETAPA 5:**

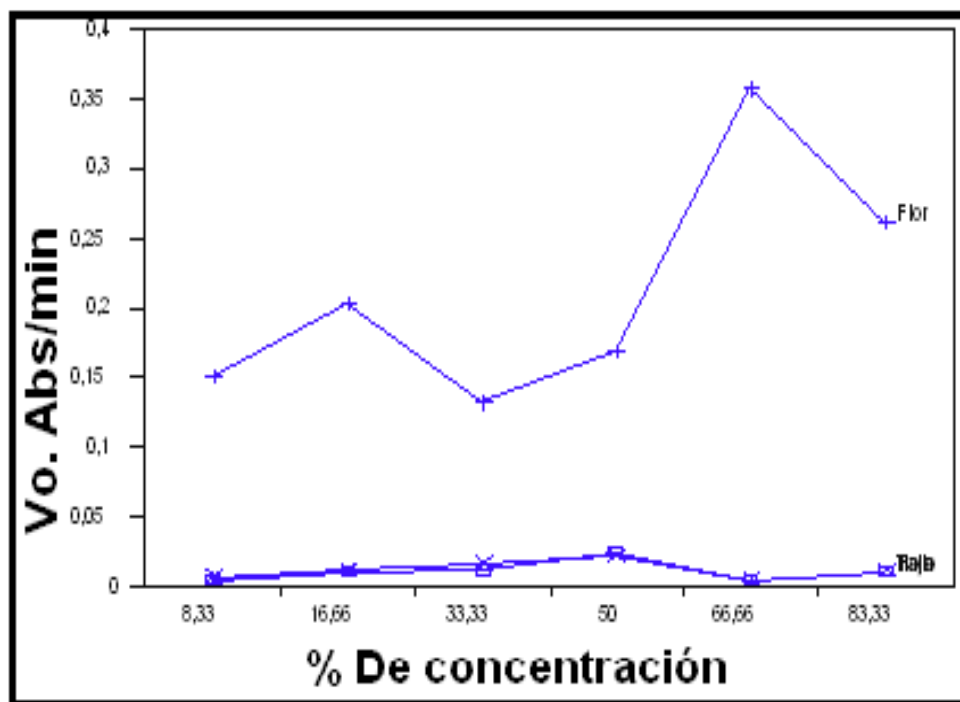
##### **4.5.1. Análisis comparativo de la actividad de las diferentes partes de la planta con cada una de sus fracciones de los extractos parcialmente purificados en función al pH 6.3.**

Después de observar los resultados del análisis estadístico en las etapas 3 y 4 se decidió correr una cinética para cada una de las partes de la planta estudiadas tallo, hoja y flor bajo las mismas condiciones que resultaron ser las más idóneas para ambos casos, es decir se trabajó a pH 6.3, ya que en este se presentó la mejor actividad coagulante en lo concerniente tanto a la fuerza de cuajo como a las cinéticas de actividad expresada como  $(V_0)$ . En el cuadro 8 puede observarse claramente la diferencia en cuanto a actividad ya que los valores para la flor son 17 veces más que para tallo y hoja, que muestra una actividad similar, sin duda la flor supera ampliamente a las partes, tallo y hoja, en cuanto a actividad proteolítica bajo las condiciones que se estuvieron trabajando en esta investigación.

**Cuadro 8:** comparación de actividad proteolítica de las diferentes partes de la planta (flor, tallo y hoja) a pH 6.3.

Fraccion (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> %	PH 6.3		
	Tallo ΔAbs/min	Hoja ΔAbs/min	Flor ΔAbs/min
8.33	0.0092	0.0111	0.2040
16.66	0.0104	0.0121	0.2105
33.33	0.0111	0.0130	0.1968
50.00	0.0137	0.0140	0.2020
66.66	0.0112	0.0117	0.2324
83.33	0.0118	0.0124	0.2187

Los datos fueron graficados y analizados en el estadístico con el análisis de varianza y la prueba de t student ( $p \leq 0.05$ ), para la comparación de medias de los datos mostrados en el Cuadro 8.



**Grafica 6:** Comparativo de actividad de las diferentes partes de la planta flor tallo y hoja a pH 6.3.

Los resultados estadísticos arrojados aplicando el análisis de varianza y la prueba de t student ( $p \leq 0.05$ ), muestran diferencias significativas entre las diferentes partes de la planta, siendo la flor la de mayor actividad con respecto a hoja y tallo, que son estadísticamente iguales, y sumamente bajos si se comparan con la flor. En la flor se puede apreciar de igual forma que las fracciones precipitadas al 66.66 y 83.33 % son las que presentan mayor actividad como anteriormente se había reportado. Los resultados estadísticos del comparativo de actividad para las diferentes partes de la planta a pH 6.3 que se encuentran en el apéndice 3.

El presente trabajo de investigación permite establecer las siguientes conclusiones.

En las pruebas de coagulación en fresco al variar el pH es posible apreciar que la única parte de la planta que presentó dicha actividad es la flor la cual fue positiva en todos los tratamientos a diferentes pH's desde el minuto 10, y que tanto para hoja como para tallo es negativa para todos los pH's (5.0, 5.4, 5.7, 6.0, 6.3 y 6.6), hasta el minuto 40.

En cuanto a el estudio de la fuerza de cuajo es posible concluir que el efecto del pH es determinante y que los mejores resultados se presentaron en el pH 5.0 no siendo este el óptimo de trabajo de la enzima, como se comprobará en los estudios posteriores sino que se presenta una coagulación sinérgica ácido-enzimática, seguido por el pH de 6.3 y 6.0 los cuales se presentan como óptimos en etapas posteriores.

Para los resultados obtenidos de las cinéticas de actividad efectuadas se observa que los pH's sobresalientes son los de 6.3 y 6.6 para las fracciones 83.33 y 16.66 respectivamente, lo que deja evidencia de la presencia no de una sola cardosina sino de un complejo de estas, como se lo había reportado por Fepale, en 2003 las cuales precipitan al 16.66 y 83.33% en presencia de sulfato de amonio, con pH's de trabajo similares a 6.3 y 6.6

Sin embargo el pH de 6.3 es el que tecnológicamente se propone ya que la proporción de la cardosina en la fracción 66.66% es mayor en cantidad y se ve reflejado en que en las pruebas de fuerza de cuajo de da mayor actividad.



Finalmente del estudio cinético realizado a las diferentes partes de la planta flor, tallo y hojas es posible concluir que existe una proporción muy baja de cardosinas en tallo y hoja, las cuales no son significativas tecnológicamente hablando, ya que no se expresaron en ninguna de las pruebas de coagulación realizadas y de que en las pruebas de cinéticas presentan una actividad muy por debajo de las reportadas para la flor.

Por ultimo es posible decir, que las flores son una buena fuente de coagulante a pH de entre 6.3 y 6.0. Y que pueden ser empleadas en la tecnología quesera ya que el pH de la leche se encuentre dentro de estos rangos.

### 6.1. Técnicas auxiliares utilizadas durante la realización del trabajo experimental.

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

#### 6.1.1. Preparación de soluciones Buffer.

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

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

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

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

ml de solución A	ml de solución B	pH final	Mezclar
14.8	35.2	5.0	Aforar a 100 ml.
10.5	39.5	5.4	
93.5	6.5	5.7	Aforar a 200 ml.
87.7	12.3	6.0	
77.5	22.5	6.3	
62.5	37.5	6.6	

### **6.1.2. Determinación de sulfatos.**

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

Se tomaron 25 ml del agua del sistema de dializado con pipeta volumétrica.

Se colocó la muestra en un matraz erlenmeyer de 125 ml.

Se adicionaron a la muestra 2 gotas de anaranjado de metilo y 1 ml de ácido clorhídrico concentrado.

La muestra preparada se calentó en una parrilla Termoline

Antes de la ebullición se agregaron a la muestra 5 ml de una solución de cloruro de Bario al 10%.

Si se observaba precipitación de una sal blanca (sulfato de Bario) la muestra contenía todavía cantidades considerables de sulfato de amonio.

Cuando en el procedimiento ya no se observó precipitación de cloruro de Bario, se consideró lista a la muestra para pasar a la etapa de purificación por cromatografía de intercambio iónico.

### **6.1.3. Preparación del azul de Coomassie.**

**Equipo:** espectrofotómetro con lámpara uv y vis. en las siguientes longitudes de onda 595, 465 y 280 nm.

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

#### **Procedimiento:**

1. Disolver 0.06% de Coomassie en 1.9% de ácido perclórico (solución al 60%). (P / V).
2. Agitar protegiendo de la luz y sin calor.
3. Pasar la solución por papel filtro No. 1 para remover el material no disuelto.
4. La solución debe tener un color café – verdoso. Si ésta es azulada, será porque la solución ha sido contaminada con proteínas.
5. Leer a 465 nm, la lectura debe dar entre 0.6 y 0.7 de absorbancia.

6. Verificar que el matraz, agua y recipiente en que se prepara la solución estén libres de proteínas.
7. Guardar la solución a temperatura fría y protegida de la luz.

#### **6.1.4- Tecnología de elaboración de queso asadero (o de pasta hilada).**

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

### **6.1.5 Tecnología de elaboración de queso fresco molido.**

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

## BIBLIOGRAFÍA CONSULTADA:

## CAPITULO 7

**ACQUADRO** Alberto, MSc. 200-2003 Development and application of molecular markers in *Cynara cardunculus* L. disponible en:

<http://www.waterpicture.it/dottorato/Acquadro%20Alberto%20PhD%20Thesis%202000-2004%20CENS.pdf> 11:00 a.m

**ALAIS CHARLES**, Ciencia de la Leche CIA. Editorial Continental S. A de C.V Paris (Francia). 1981

**ANÓNIMO 1** Disponible en: imagines del cardo estudiado, sin año,

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

Pág. donde se obtuvieron algunas imagines del cardo estudiado en este trabajo.

**AMITO** Jean Ph. D, Ciencia y tecnología de la leche. Editorial Acribia S. A Zaragoza, España. 1991

**BYONG H. LEE.** Fundamentos de Biotecnología de los Alimentos. Editorial Acribia S.A. Zaragoza,(España). 2000

**CODEX STAN A-6-1978**, Rev. 1-1999 Morphological comparison of wild and cultivated cardoon and some varietals types of globe artichoke. Disponible en google:

<http://members.tripod.com.ve/tecnologia/queso.htm> Consulta: 11:00 a.m 28/01/2005

Norma General del Codex para el Queso.

**DELLACECCA**, V. 1990. Origen del Cardo. En: V.V. Bianco, F. Pimpini (ed.). Horticultura. Patrón Editore, Bologna, Italia

**DUCKJOVICH, A.;** ESQUIVEL, G: 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. 1995.

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

**ESTRELLA** Martín Alternativas a cultivos tradicionales (II): Cardo (*Cynara Cardunculus* L) <http://www.eumedia.es/articulos/vr/otros/147cardo.html> Disponible en: google 6:03 PM. 2005

**GENTILE** Agostina 2002: disponible en google: 2:26 PM. Composición química de la leche de vaca. <http://www.monografias.com/trabajos6/lacte/lacte.shtml>

**GONZÁLEZ** Mañas: Juan Manuel *Bioquímica y Biología Molecular* disponible en: google 8:00 AM. <http://www.ehu.es/biomoleculas/ENZ/ENZ2-2.htm#ph>

**GONZÁLEZ** Villarreal Manuel: 2002 Tecnología para la Elaboración de Queso Blanco, Soná, Veraguas Republica de Panamá disponible en: google. [http://www.senacyt.gob.pa/g\\_innovacion/facitec/docs/ft-12.pdf](http://www.senacyt.gob.pa/g_innovacion/facitec/docs/ft-12.pdf)

**HERNÁNDEZ** Centeno Francisco: Enero 2004. Obtención y Caracterización de proteasas con aplicación en la industria quesera a partir del cardo. (*Cynara cardunculus* L.) Tesis de Licenciatura; U.A.A.A.N Buenavista Saltillo Coahuila México

**JAMES M.** Stephens: 1994 University of Florida, Institute of Food and Agricultural Sciences (UF/IFAS) [http://edis.ifas.ufl.edu/MV041#FOOTNOTE\\_2\\_1994](http://edis.ifas.ufl.edu/MV041#FOOTNOTE_2_1994).

**NEILANDS J.B.** y col. 1967 *Principios de Enzimología*. Segunda Edición Madrid (España) Pág. 134,135

**MOUZALL. I** y col, CARDOON (*CYNARA CARDUNCULUS L.*) Utilizado como cuajo vegetal en una producción de queso Disponible en: <http://www.dipbot.unict.it/orto/0504-1.html> Pág. donde se obtuvieron algunas imagines del cardo estudiado en este trabajo.

**MOUZALI**, y col: Cardoon (*Cynara cardunculus L.*) utilizado como cuajo vegetal en una producción de queso tradicional en argelina.

Disponible en: [http://www.actahort.org/books/660/660\\_27.htm](http://www.actahort.org/books/660/660_27.htm)

10:00 am. 27/01/2005.

**REMETER K. J. Y H. ELBERTZ**: Elementos de Microbiología lactológica editorial Acribia Zaragoza, España. 1971. Pág. 44-45.

**PEREIRA**, Mrs. Helena: 1998. Instituto Sup. Agronomía. *Cynara cardunculus* cultivación y condiciones climáticas de la región en Portugal. Disponible en: <http://www.eeci.net/archive/biobase/B10210.html> 10:50 am. 27/01/2005

**PÉREZ GAVILÁN**, Jorge Y José Pablo: Bioquímica Y Microbiología de la leche editorial Yimusa. Primera Edición. México D.F. 1984.

**SILVA S.V**, Hidrólisis de caseínas por los extractos del *Cynara cardunculus* precipitados por el sulfato del amonio RM, Malcata FX J FOOD SCI 67 (5): 1746-1751 JUN-JUL., 2003

**SILVA S. V**, 2003, El comparativo estudia en las características de gelificación de los cardosins extraídos del *cardunculus* y del chimo sin de *cynara* en la leche desnatada de la vaca LECHERÍA INTERNA J 13 (7): 559-564



**SOLÓRZANO** Torales Sergio Augusto, Caracterización de la actividad coagulante de la planta Trompillo (*solanum elaeagnifolium L.*) sobre la leche. Tesis de Licenciatura; U.A.A.A.N Buenavista Saltillo, Coahuila, México. 2004.

**SOUSA** MJ, Avances en el papel de un coagulante de la planta (*Cynara cardunculus*) *in Vitro* y durante la maduración de quesos de varias especies de la leche LAIT 82 (2): 151-170 MAR-APR 2002.

**SOUSA<sup>A</sup>** Maria José y col: Advances in the role of a plant coagulant (*Cynara cardunculus*) in vitro and during ripening of cheeses from several milk species Madrid, Spain published online 19 June 2003).

**ROBINSÓN S.** David: Bioquímica y valor nutritivo de los alimentos. España editorial Acribia S.A Zaragoza (España). 1991

**TEJEDA** M., Armando; y col, Bioseparaciones. Ed. UNISON (Universidad de Sonora). Hermosillo, Sonora, México. 1995.

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

**VILLEGAS** de Gante Abraham, Tecnología Quesera – México: Trillas; Primera edición. Universidad Autónoma de Chapingo. 2004

**VIOQUE M**, et al. Características químicas y microbiológicas del queso de la leche de las ovejas fabricado con los extractos de las flores del cardunculus de Cynara y de los humilis de Cynara como coagulantes ALIMENTO De J AGR CHEM 48 (2): 451-456 FEBRERO de 2000.

**WARNEJAMES N. R.** Principios de la tecnología de lácteos. AGT Editor, S.A México  
D.F. 1989.

## Apéndice 1: Resultados de Fuerza de cuajo.

Análisis de varianza.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Ratio
Model	35	6797977,4	194228	74,0570
Error	36	94416,5	2623	Prob > F
C. Total	71	6892393,9		< .0001

Tabla de comparación de medias por el método de t student .

Level	Least Sq Mean
5,83,33 A	1256,5400
6,3,83,33 B	978,0900
6,66,66 B C	916,9750
5,4,66,66 C D	844,4400
5,4,83,33 D E	775,0000
6,83,33 D E	742,3950
5,7,83,33 E	727,2700
6,6,83,33 E	721,8450
6,50 E F	693,6400
6,6,66,66 F G	612,2600
6,3,66,66 F G	611,4350
5,7,50 G H	568,6700
5,7,66,66 G H	551,7200
6,3,50 H I	498,0650
5,66,66 I	434,7550
6,6,50 I J	421,0500
5,50 J K	320,4850
5,8,33 K L	291,6650
5,7,33,33 K L M	262,3650
5,16,66 K L M	250,0000
6,3,33,33 K L M	246,0400
5,4,8,33 K L M N	229,0900
5,4,50 L M N O	199,7400
6,33,33 L M N O	197,3100
6,3,8,33 L M N O	197,0450
5,7,8,33 L M N O	196,8150
6,8,33 M N O P	173,2900
6,6,8,33 M N O P Q	159,8400
5,33,33 N O P Q R	139,5300
5,7,16,66 N O P Q R	132,5600
6,6,33,33 O P Q R	101,1600
5,4,33,33 P Q R	84,9050
6,16,66 P Q R	76,0700
6,3,16,66 P Q R	71,0800
5,4,16,66 Q R	57,9700
6,6,16,66 R	53,3200

**Apéndice 2:** Resultados del estudio de cinéticas de la actividad de las diferentes fracciones del extracto flor parcialmente purificado.

Análisis de varianza.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Ratio
Model	35	0,52342511	0,014955	36,8905
Error	36	0,01459400	0,000405	Prob > F
C. Total	71	0,53801911		< .0001

Tabla de comparación de medias por el método de t student .

Level	Least Sq Mean
6,3,66,66 A	0,35800000
6,6,16,66 B	0,28150000
6,3,83,33 B C	0,26200000
6,6,66,66 C D	0,22600000
6,66,66 C D	0,22550000
6,6,83,33 D E	0,22000000
6,3,16,66 D E F	0,20300000
6,6,50 D E F	0,20100000
5,4,66,66 E F G	0,18200000
5,4,83,33 E F G	0,18100000
6,83,33 F G H	0,17300000
6,3,50 F G H I	0,16900000
5,7,66,66 G H I	0,15700000
6,6,33,33 G H I	0,15550000
5,7,83,33 G H I	0,15200000
6,3,8,33 G H I	0,15150000
5,7,50 G H I	0,14400000
5,66,66 H I J	0,13500000
5,50 I J	0,13200000
6,3,33,33 I J	0,13200000
6,50 J K	0,09700000
6,6,8,33 K L	0,09000000
6,33,33 K L M	0,07700000
5,7,33,33 K L M N	0,06050000
5,4,33,33 L M N	0,05600000
5,7,8,33 M N	0,04450000
5,33,33 M N	0,04300000
5,7,16,66 M N	0,04000000
5,8,33 M N	0,03900000
5,16,66 N	0,03150000
5,83,33 N	0,03100000
6,16,66 N	0,02800000
5,4,16,66 N	0,02650000
5,4,8,33 N	0,02600000
6,8,33 N	0,02400000
5,4,50 N	0,02100000

### Apéndice 3: Comparativo entre flor, tallo y hoja.

Análisis de varianza.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Ratio
Model	17	0,39575725	0,023280	165,6600
Error	18	0,00252950	0,000141	Prob > F
C. Total	35	0,39828675		< 0001

Tabla de comparación de medias por el método de t student .

<b>Level</b>	<b>Least Sq Mean</b>
Flor,66,66 A	0,35800000
Flor,83,33 B	0,26200000
Flor,16,66 C	0,20300000
Flor,50 D	0,16900000
Flor,8,33 D E	0,15150000
Flor,33,33 E	0,13200000
Tallo,50 F	0,02450000
Hoja,50 F	0,02150000
Hoja,33,33 F	0,01700000
Hoja,16,66 F	0,01250000
Tallo,33,33 F	0,01200000
Hoja,83,33 F	0,01100000
Tallo,83,33 F	0,01000000
Tallo,16,66 F	0,01000000
Hoja,8,33 F	0,00650000
Tallo,8,33 F	0,00500000
Hoja,66,66 F	0,00450000
Tallo,66,66 F	0,00450000