

UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
ESCUELA DE INGENIERIA EN ALIMENTOS

**Concentración de Extracto Enzimático Obtenido de
Hojas de Maqui (*Aristotelia chilensis* Mol.) para su
Utilización en Quesería**

Tesis presentada como parte de los
requisitos para optar al grado de
Licenciado en Ingeniería de los Alimentos.

Andrea Karina Leal Mora

VALDIVIA -CHILE
2006

PROFESOR PATROCINANTE

Sra. Luz Haydée Molina C.

Prof. Biología y Química

Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos

PROFESOR INFORMANTE

Sra. Carmen Brito C.

Ingeniero en Alimentos, M. Sc. Food Science

Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos

Sra. Marcia Costa L.

Ingeniero Civil Bioquímico, Diploma en Ing. Industrial

Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos

AGRADECIMIENTOS

A mi profesora patrocinante, Sra. Luz Haydée Molina Carrasco, por su apoyo incondicional durante la realización de este trabajo.

A mis profesoras informantes, Sras. Carmen Brito Contreras y Marcia Costa Lobo, por su valiosa ayuda y colaboración.

Al personal de los Laboratorios de Química y Microbiología y auxiliares del Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, quienes a través de su enorme colaboración, hicieron posible la realización de la etapa experimental de esta Tesis.

A mis Padres, por su confianza puesta en mí y por todo su apoyo durante mi etapa universitaria.

A mis compañeros y amigos, por estar conmigo y entregarme el apoyo necesario para seguir adelante.

INDICE DE MATERIAS

Capítulo		Página
1	INTRODUCCIÓN	1
2	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	3
2.1	Antecedentes generales del maqui	3
2.1.1	Morfología de la planta	4
2.1.2	Distribución geográfica	4
2.1.3	Hábitat natural	5
2.1.4	Usos de la planta	5
2.2	Enzimas coagulantes	6
2.2.1	Enzimas de origen animal	7
2.2.2	Enzimas de origen vegetal	9
2.2.3	Enzimas de origen microbiano	13
2.2.4	Enzimas de origen genético	16
2.3	Coagulación enzimática de la leche	18
2.3.1	Influencia del pH	20
2.3.2	Influencia de la temperatura de la leche	23
2.3.3	Influencia de la concentración de iones calcio	25
2.3.4	Concentración de la enzima y sustancias nitrogenadas	26
2.4	Calidad bacteriológica de enzimas coagulantes	26
2.5	Ultrafiltración	29
2.6	Quesos elaborados con coagulantes vegetales	31
3	MATERIAL Y METODO	33
3.1	Obtención de muestras	33

3.2	Ubicación de los ensayos	33
3.3	Diseño experimental	33
3.4	Pruebas preliminares de extracción de proteínas a la planta nativa maqui	35
3.4.1	Extracción según AÑON Y MARTINEZ (1996)	35
3.4.2	Extracción según GUPTA Y ESKIN (1977)	36
3.4.3	Análisis de los extractos obtenidos	37
3.5	Métodos de análisis	37
3.5.1	Análisis de la planta	37
3.5.1.1	Determinación del contenido de proteína Kjeldahl	37
3.5.1.2	Determinación del contenido de humedad	38
3.5.2	Análisis del extracto vegetal	38
3.5.2.1	Determinación del contenido de proteínas del extracto enzimático vegetal	38
3.5.2.2	Medición de la fuerza del cuajo	38
3.5.2.3	Tiempo de coagulación	38
3.5.2.4	Determinación de la sinéresis del gel	39
3.5.2.5	Determinación de la fuerza del gel obtenido	39
3.5.2.6	Electroforesis discontinua en geles PAA-SDS	39
3.5.2.7	Cromatografía en columna DEAE celulosa	39
3.5.2.8	Ultrafiltración en equipo Millipore	40
3.5.2.9	Recuento total de bacterias mesófilas	40
3.5.2.10	Recuento de Enterobacterias	40
3.5.2.11	Recuento de Staphylococcus aureus	40
4	PRESENTACION Y DISCUSION DE RESULTADOS	41
4.1	Resultados de extracción de enzimas vegetales	41
4.2	Determinación de la temperatura y pH óptimo de actividad coagulante del extracto enzimático de origen vegetal	42

4.3	Contenido de proteínas y humedad de la hoja de maqui (<i>Aristotelia chilensis</i> Mol.)	44
4.4	Caracterización del extracto enzimático de maqui ultrafiltrado	45
4.4.1	Contenido de proteínas del extracto enzimático de maqui ultrafiltrado	45
4.4.2	Fuerza del cuajo del extracto enzimático de maqui ultrafiltrado	47
4.4.3	Tiempo de coagulación del extracto enzimático de maqui ultrafiltrado	48
4.4.4	Sinéresis del gel con extracto enzimático de maqui ultrafiltrado	50
4.4.5	Fuerza del gel del extracto enzimático de maqui ultrafiltrado	52
4.4.6	Electroforesis discontinua en geles PAA-SDS	53
4.4.7	Cromatografía en columna DEAE celulosa	55
4.5	Estudio de estabilidad del extracto enzimático de maqui ultrafiltrado	57
4.5.1	Efecto de la adición de sorbato de potasio sobre la actividad coagulante del extracto enzimático de maqui ultrafiltrado	57
4.5.2	Efecto de la adición de sorbato de potasio sobre la calidad microbiológica del extracto enzimático de maqui ultrafiltrado	60
5	CONCLUSIONES	63
6	RESUMEN	64
	SUMMARY	65

7	BIBLIOGRAFIA	66
	ANEXOS	75

INDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Fuente de enzimas coagulantes	6
2	Proteinasas utilizadas en tecnología de alimentos	23
3	Especificaciones microbiológicas para enzimas coagulantes	27
4	Lugar y fecha de los muestreos de hojas de maqui	33
5	Diseño experimental	34
6	Estabilidad del extracto enzimático vegetal ultrafiltrado	34
7	Fuerza del cuajo obtenida de la extracción según GUPTA Y ESKIN (1977) ultrafiltrado	41
8	Contenido de proteína y humedad en hojas de maqui (<i>Aristotelia chilensis</i> Mol.)	44
9	Contenido de proteínas del extracto enzimático de maqui ultrafiltrado	46
10	Fuerza del cuajo del extracto enzimático de maqui ultrafiltrado	47
11	Tiempo de coagulación del extracto enzimático de maqui ultrafiltrado	49
12	Sinéresis del gel del extracto enzimático de maqui ultrafiltrado	51
13	Fuerza del gel con extracto enzimático de maqui ultrafiltrado	52
14	Fuerza del cuajo de los principales picos de absorbancia del extracto enzimático de maqui ultrafiltrado	57

15 Efecto de la adición de sorbato de potasio sobre la actividad coagulante del extracto enzimático de maqui concentrado

57

INDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Árbol, hojas y fruto del maqui (<i>Aristotelia chilensis</i> Mol.).	3
2	Características de enzimas coagulantes de origen animal	8
3	Perfil de elución de HPLC de cardosina A y B extraídas de <i>Cynara cardunculus</i>	11
4	pH y temperatura de estabilidad óptima de enzimas extraídas de <i>Mucor miehei</i>	14
5	Formación de fracciones de nitrógeno soluble (NS) y nitrógeno aminoacídico (NA), durante la maduración de queso Gouda elaborado con cuajo de origen animal y cuajo de origen genético	17
6	Coagulación enzimática de la leche	19
7	Relación entre el grado de producción de acidez hasta la etapa de desuerado y la estructura básica del queso	21
8	Esquema del Proceso de Ultrafiltración	30
9	Quesos elaborados con coagulante vegetal	32
10	Extracción de proteínas según AÑON Y MARTINEZ (1996)	35
11	Extracción de proteínas según GUPTA Y ESKIN (1977)	36
12	Temperatura óptima del extracto enzimático de maqui ultrafiltrado	42
13	pH óptimo del extracto enzimático de maqui ultrafiltrado	43
14	Electroforesis PAA-SDS del extracto enzimático de maqui y estándares de peso molecular	54
15	Gráfico de movilidad relativa (Rf) v/s peso molecular	55

16	Perfil de elución del extracto enzimático de maqui (muestreo 1) y del cuajo estándar	56
17	Efecto de la adición de sorbato de potasio sobre la fuerza del cuajo del extracto enzimático de maqui ultrafiltrado	58
18	Efecto de la adición de sorbato de potasio sobre el tiempo de coagulación del extracto enzimático de maqui ultrafiltrado	59
19	Recuento total de bacterias aerobias mesófilas en el extracto enzimático de maqui ultrafiltrado	61

INDICE DE ANEXOS

Anexo		Página
1	Figura de filtros Centriplus de Millipore de concentración y recuperación	76
2	Determinación del contenido de nitrógeno según STEUBING <i>et al.</i> (2002).	77
3	Determinación del contenido de proteínas, de acuerdo al método de LOWRY <i>et al.</i> (1951)	78
4	Determinación de la fuerza del cuajo de acuerdo al método descrito por ALAIS (1985), modificado en la temperatura y contenido de calcio	80
5	Electroforesis en geles de PAA-SDS. Método de LAEMMLI (1970) modificado en placa	81
6	Análisis estadístico del contenido de humedad en hojas de maqui	83
7	Información meteorológica para los días de muestreo	84
8	Análisis estadísticos para proteína total en base seca en hojas de maqui	85
9	Análisis estadísticos para contenido de proteínas del extracto enzimático vegetal	86
10	Resultados de análisis realizados a la hoja y extracto de maqui	87
11	Análisis estadísticos para fuerza del cuajo del extracto enzimático vegetal	89
12	Análisis estadísticos para tiempo de coagulación del extracto enzimático vegetal	90

13	Análisis estadísticos para sinéresis del gel del extracto enzimático vegetal	91
14	Análisis estadísticos para fuerza del gel del extracto enzimático vegetal	92
15	Imagen de cuajo vegetal y cuajo estándar HALA	93
16	Obtención de pesos moleculares de proteínas del extracto enzimático vegetal encontradas utilizando electroforesis en geles de PAA-SDS	94

1. INTRODUCCION

En la industria quesera, se utilizan enzimas coagulantes de diferentes orígenes tales como animal, microbiano y genético, las cuales pueden encontrarse en forma líquida, en pasta o en polvo, pero también se han utilizado extractos vegetales que contienen enzimas proteolíticas obtenidas de la trituración o pulverización de los pistilos de la flor de varias especies de cardo silvestre.

Las enzimas de origen vegetal tienen como desventaja que presentan una actividad proteolítica intensa en relación a su actividad coagulante. Por este motivo, se ha mencionado que se producen problemas en la elaboración de queso, debido a que los productos presentan defectos de textura y a veces un amargor pronunciado. Así, el uso de las enzimas vegetales a nivel comercial es limitado y generalmente se utilizan en la elaboración artesanal de determinados tipos de quesos, en países como España y Portugal.

Estudios preliminares de extracción de proteasas de las hojas de este maqui han dado resultados menores de actividad coagulante y se postula que al concentrar los extractos por ultrafiltración, la actividad coagulante de las enzimas debería mejorar.

En la presente investigación se plantea la siguiente hipótesis: el extracto enzimático de maqui (*Aristotelia chilensis* Mol.) ultrafiltrado, presentará una actividad coagulante de la leche similar al cuajo estándar.

Objetivo general: Concentrar el extracto enzimático de hojas de maqui (*Aristotelia chilensis* Mol.) por ultrafiltración y determinar su actividad coagulante y estabilidad en el tiempo.

Objetivos específicos:

- Concentrar la enzima por ultrafiltración para incrementar su actividad.
- Caracterizar el extracto concentrado por ultrafiltración según pH y temperatura óptima de actividad coagulante.
- Determinar el contenido proteico de los extractos concentrados en comparación al cuajo estándar.
- Comparar fuerza del cuajo, tiempo de coagulación, fuerza del gel y sinéresis de la cuajada del extracto enzimático vegetal con respecto al cuajo estándar.
- Determinar el peso molecular de las proteínas de la preparación enzimática por medio de electroforesis discontinua en geles PAA-SDS.
- Determinar la estabilidad del extracto enzimático durante 3 meses, midiendo fuerza del cuajo y recuento bacteriano de las preparaciones.

2. REVISION BIBLIOGRAFICA

2.1 Antecedentes generales del maqui

El maqui (*Aristotelia chilensis* Mol.) es un árbol que pertenece a la familia de las Eleocarpaceas. Esta familia consta de 10 géneros y alrededor de 400 especies, distribuidas en las regiones tropicales, subtropicales y templadas del mundo (con excepción del continente africano). En Chile se encuentran 2 géneros (*Aristotelia* y *Crinodendron*) con tres especies, siendo el más abundante el maqui, el cual se encuentra ubicado en la zona central y sur del país y en el suroeste de Argentina, donde se conoce con el nombre de koelon (HOFFMANN, 1997).

En la FIGURA 1, se presenta el arbusto del maqui (*Aristotelia chilensis* Mol.).



FIGURA 1. Árbol, hojas y fruto del Maqui (*Aristotelia chilensis* Mol.).

FUENTE: HOFFMAN (1997).

2.1.1 Morfología de la planta. La familia de las Eleocarpaceas presenta árboles de hojas enteras, alternas u opuestas, con estípulas (MATTHEI, 1995).

La morfología del maqui corresponde a un arbusto de 4 a 5 metros de altura, de tronco dividido en ramas delgadas y flexibles, cuya corteza es lisa y clara, blanda y desprendible fácilmente en tiras. Es una especie dioica, con flores femeninas y masculinas en plantas distintas. Las flores unisexuales forman umbelas de 2 a 3 unidades que nacen de las axilas de las hojas donde cada flor está provista de 5 sépalos lanceolados, algo pilosos, encontrándose en forma alterna a éstas los pétalos amarillentos, que son mas largos que los sépalos y de forma ovalada (HOFFMANN, 1997).

El mismo autor, señala que las flores son hermafroditas o unisexuales con el sexo atrofiado, las flores femeninas tienen un ovario grueso, verdoso, que sostiene un estigma dividido en 3 partes y sus estambres están reducidos a estaminodios, mientras que las flores masculinas, de conformación muy similar a la femenina están provistas de un pistilo rudimentario rodeado de gran cantidad de estambres fértiles.

2.1.2 Distribución geográfica. El maqui es una especie endémica de los bosques subantárticos y prospera en la zona comprendida entre los paralelos 31 y 40, lo que corresponde a la zona entre Illapel y Chiloé (CHILE, MINISTERIO DE VIVIENDA Y URBANISMO, 2005).

El mismo autor, sostiene que esta planta se distribuye desde el Río Limarí (IV región) hasta la provincia de Aysén (XI región), tanto en el valle central como en ambas cordilleras, desde cerca del nivel del mar hasta los 2500 metros sobre el nivel de éste. También se le encuentra en el Archipiélago de Juan Fernández.

2.1.3 Hábitat natural. Esta especie se desarrolla en lugares húmedos que posean luz, pero además se puede encontrar en las laderas de los cerros y bordes de bosques (HOFFMANN, 1997).

El mismo autor, señala que en el Archipiélago de Juan Fernández crece formando extensos matorrales en los valles y penetrando en el bosque para así alcanzar alturas considerables.

2.1.4 Usos de la planta. El maqui se utiliza principalmente en medicina popular, su fruto sirve para curar diarreas crónicas y disentería, sus hojas frescas en infusión se utilizan para las enfermedades de la garganta, tumores intestinales, fiebre y las hojas secas y en polvo son usadas para curar heridas y cicatrices (CHILE, MINISTERIO DE VIVIENDA Y URBANISMO, 2005).

Según MONTENEGRO (2000), la madera es muy blanda por lo que no presenta aplicaciones técnicas de importancia; sin embargo, es utilizada en artesanía popular y en la fabricación de varas, molduras, entre otros.

Por su parte HOFFMANN (1997), agrega que esta planta es muy conocida en la zona central y sur del país, por el consumo del fruto y el uso de éste en la preparación de una bebida alcohólica.

El mismo autor, señala que los principios activos que han sido aislados de sus hojas y tallos son alcaloides y taninos, los cuales otorgan al maqui las propiedades medicinales que posee, principalmente antiinflamatorias, antiespasmódicas y cicatrizantes.

2.2 Enzimas coagulantes

Las enzimas coagulantes utilizadas en la industria quesera pueden tener un origen animal, vegetal, microbiano y genético (VALBUENA, 2003). En el CUADRO 1 se señalan las principales enzimas coagulantes utilizadas en quesería.

CUADRO 1. Fuente de enzimas coagulantes.

Origen	Fuente	Componente enzimático activo
Animal	Estómago bovino	Quimosina A y B, Pepsina (A) y Gastricina.
	Estómago ovino	Quimosina y Pepsina.
	Estómago caprino	Quimosina y Pepsina.
	Estómago porcino	Pepsina A, B y Gastricina.
Vegetal	<i>Cynara cardunculus</i>	Cyprosina 1, 2 y 3 y/o Cardosina A y B.
Microbiano	<i>Mucor miehei</i>	Proteasa aspártica de <i>Mucor miehei</i> .
	<i>Mucor pusillus</i>	Proteasa aspártica de <i>Mucor pusillus</i> .
	<i>Endothia parasitica</i>	Proteasa aspártica de <i>Endothia parasitica</i> .
Genéticos	<i>Aspergillus niger</i>	Quimosina B
	<i>Kluyveromices lactis</i>	Quimosina B

FUENTE: VALBUENA (2003).

Las preparaciones enzimáticas deben cumplir ciertos requerimientos para ser utilizadas en la elaboración de quesos, entre los más importantes se encuentran

no causar reducciones en el rendimiento del queso y no ser tóxicos (RAMÍREZ, 2003).

2.2.1 Enzimas de origen animal. Estas enzimas son secretadas por la mucosa gástrica del cuarto estómago (cuajar) de los terneros (también cabritos y corderos) (AMIOT, 1991).

Según ALAIS (1985), se han identificado tres tipos de enzimas gástricas de importancia para la industria quesera, estas son: *quimosina*, *pepsina* y *gastricsina*. El mismo autor, señala que la quimosina predomina en el estómago de los rumiantes jóvenes no destetados, mientras que la pepsina predomina en los rumiantes destetados y es casi única en los bóvidos. En cuanto a la gastricsina, sostiene que es una enzima menor con cualidades intermedias.

La molécula de quimosina bovina está formada por 323 aminoácidos y es segregada en forma de zimógeno inactivo, la proquimosina, de peso molecular aproximado 35.600 dalton, que se activa mediante proteólisis limitada y por la liberación de cuarenta y dos residuos a partir del extremo amino terminal del zimógeno (BELITZ y GROSH, 1997).

La pepsina, por su parte, se encuentra presente en forma natural en todos los preparados de cuajo animal. Es sintetizada en forma de un precursor, el pepsinógeno, el cual por medio de una reacción autocatalítica sufre la pérdida de la porción aminoterminal que contiene todos los residuos básicos (ALAIS, 1985).

En la FIGURA 2, se presenta las características de las enzimas coagulantes de origen animal.

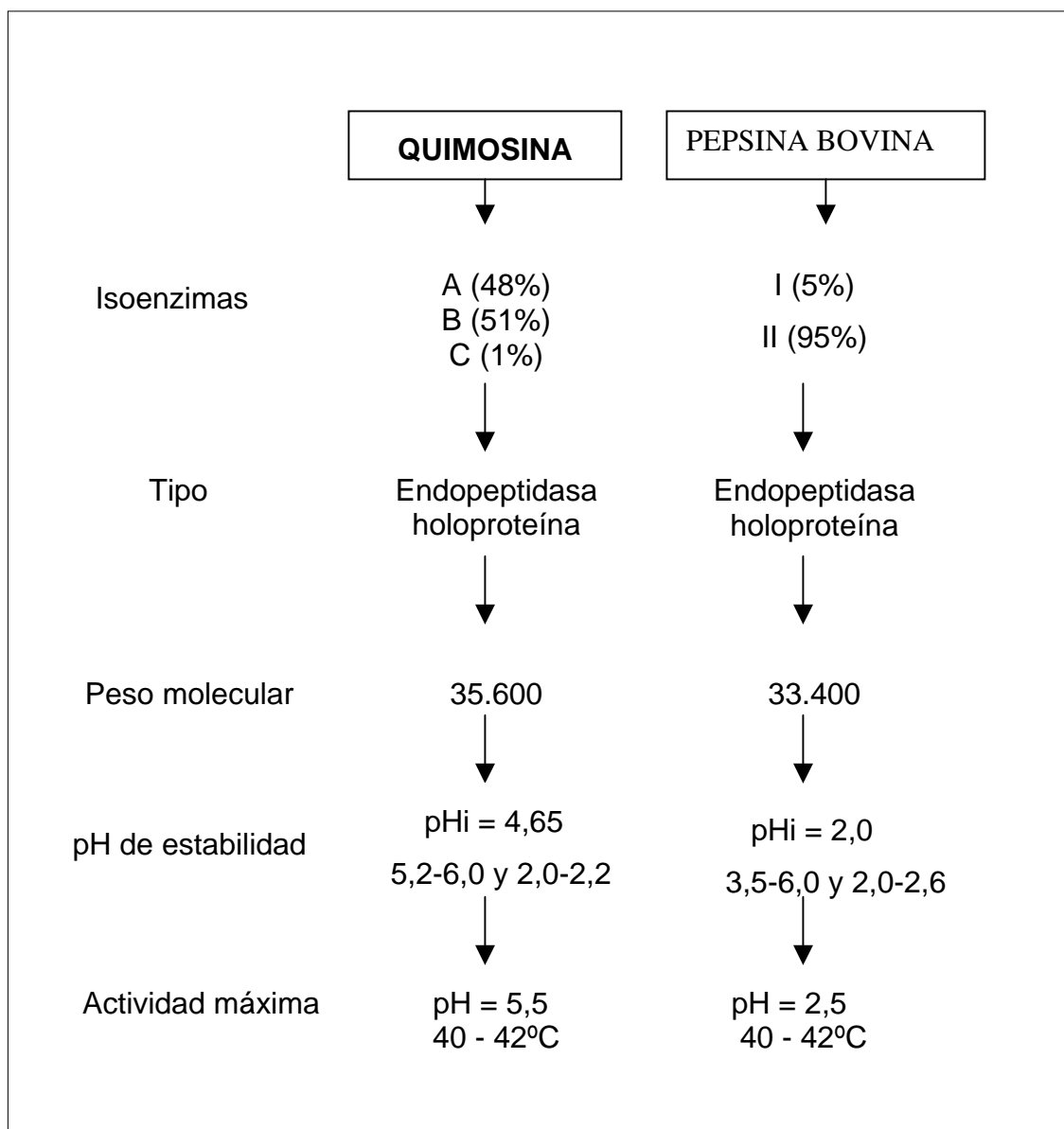


FIGURA 2. Características de enzimas coagulantes de origen animal.

FUENTE: RAMIREZ (2003).

La quimosina A y B de origen animal, son enzimas separables por cromatografía en columna, que se distinguen por su actividad específica. La quimosina A es más activa que la quimosina B de la que sólo se distingue por una sustitución Asp/Gli en la posición 290 de su cadena peptídica;

probablemente son dos variantes genéticas, aunque la forma B es siempre predominante. La tercera forma C es un componente menor (ALAIS, 1985).

Por su parte, la pepsina es la enzima más parecida a la quimosina, pero tiene una actividad proteolítica no específica y mucho mayor en relación a la actividad coagulante de la quimosina (ZHANG *et al.*, 2005).

El mismo autor, señala que cuando se habla de pepsina bovina, sin otra precisión, se trata de la pepsina II o A. La pepsina bovina I o B es minoritaria, en los extractos de cuajares de bóvidos adultos puede representar hasta el 15% de la actividad coagulante total.

AMIOT (1991), sostiene que las pepsinas A y B de origen animal se distinguen por la velocidad de inactivación en presencia de urea, pero no se dispone de un medio fácil para determinar su proporción. Cuando se eleva el pH, estas enzimas son inactivadas progresivamente pero no en las mismas condiciones. La pepsina bovina II es estable a un pH más elevado que la pepsina de cerdo.

Las pepsinas contienen fósforo en su estructura, mientras que la quimosina carece de él, lo cual le da el polimorfismo a las pepsinas. Se pueden encontrar de 1 a 3 átomos de fósforo en la pepsina II y de 0 a 2 en la pepsina I.

2.2.2 Enzimas de origen vegetal. Las enzimas vegetales, son obtenidas por la trituración o pulverización de los pistilos de la flor de varias especies de cardo silvestre, principalmente *Cynara cardunculus* y *Cynara humilis* siendo la primera la más utilizada (RAMÍREZ, 2003).

El extracto de muchas especies vegetales produce coagulación de la leche, pero las enzimas que se extraen tienen una actividad proteolítica bastante

intensa en relación a su actividad coagulante (ORTIZ DE APODACA *et al.*, 1994)

El mismo autor, señaló en un estudio el efecto de cuatro coagulantes sobre la leche de vaca a través de electroforesis discontinua en geles PAA-SDS. Los resultados demostraron que el coagulante vegetal presentó una alta actividad proteolítica degradando la α -lactoalbúmina y seroalbúmina del suero, además menciona una actividad proteolítica tres veces mayor a la de los cuajos tradicionales por la elevada degradación de β y α 1-caseína. La actividad proteolítica fue determinada mediante la medición de los grupos aminos libres en la fracción soluble al 12% TCA con ácido sulfónico trinitrobenzeno.

Las flores de la especie *Cynara cardunculus* contienen dos enzimas proteolíticas capaces de producir la coagulación de la leche, estas enzimas son llamadas cardosina A y cardosina B. Estas dos proteasas fueron purificadas y caracterizadas en términos de su actividad, son proteinasas aspárticas con un pH óptimo de 5,1.

En la FIGURA 3, se muestra el perfil de elución obtenido mediante HPLC para ambas enzimas en la cual se observa que la cardosina A eluye antes que la cardosina B presentando un pico más alto, por lo cual se señala que son similares a la quimosina y pepsina respectivamente y al igual que otras enzimas coagulantes, el mayor sitio de ruptura sobre la k-caseína bovina y ovina por proteinasas de *cynara cardunculus* es el enlace Phe₁₀₅ -Met₁₀₆, aunque la hidrólisis inicial de la α 1-caseína bovina se realiza en el enlace Phe₂₃ -Phe₂₄ (O`MAHONY *et al.*, 2003).

Según Pires *et al.*, citado por VIOQUE *et al.* (2000), las proteasas encontradas en especies de *Cynara cardunculus* son diferentes a las proteasas de *Cynara humilis*, conteniendo esta última sólo cardosina A, y también son diferentes en

términos de actividad de coagulación de la leche (Fernández – Salguero y Gómez citado por VIOQUE *et al.*, 2000).

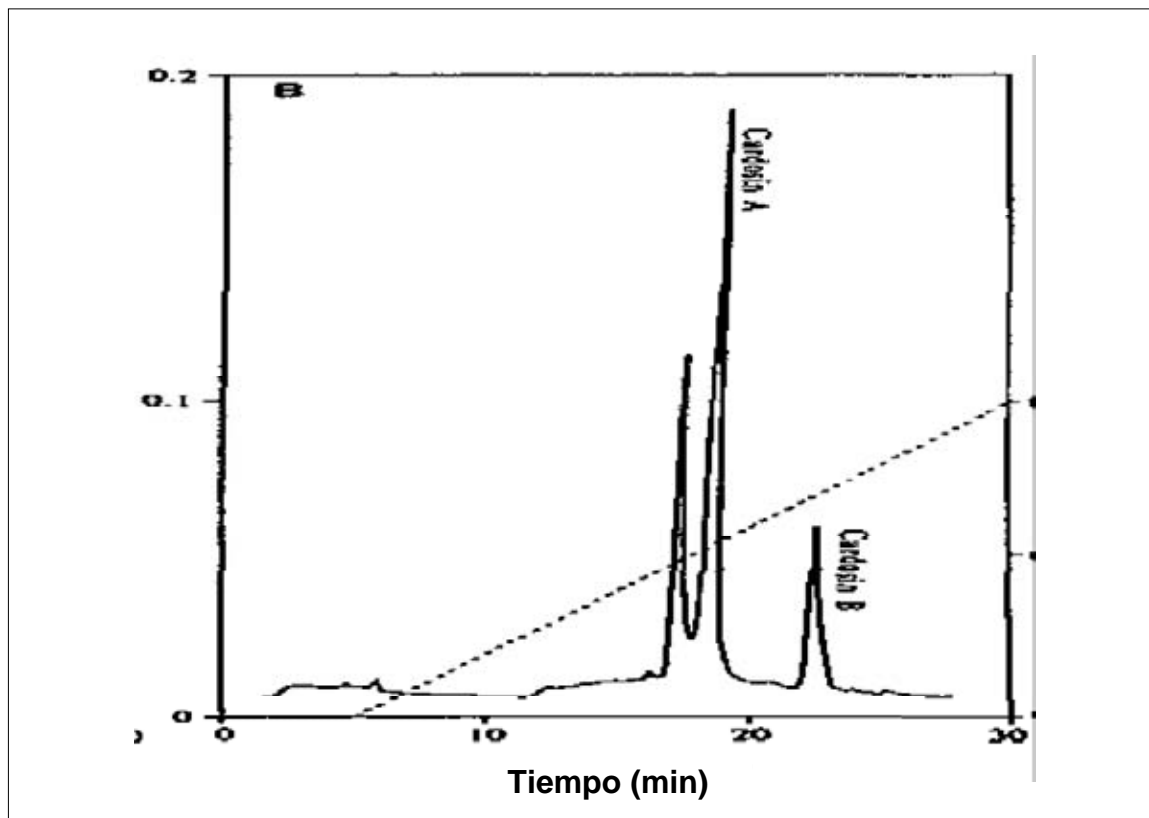


FIGURA 3. Perfil de elución de HPLC de cardosina A y B extraídas de *Cynara cardunculus*.

FUENTE: VERISSIMO *et al.* (1996).

El mismo autor, señaló que los pesos moleculares de cardosina A y cardosina B corresponden a 31KDa y 34KDa respectivamente.

Por otra parte, Veríssimo *et al.*, citado por VIOQUE *et al.* (2000), señalan que en el extracto de flores de *Cynara cardunculus* (parte violeta de la flor cuando está en estado de senescencia), también se han aislado otras tres proteasas, las cuales fueron purificadas y caracterizadas en términos de actividad. Son

proteasas del grupo aspárticas llamadas cynarasas o cyprosinas presentando una máxima actividad a pH 5.1

Las proteasas de *Cynara cardunculus* se utilizan para elaborar quesos típicos de Portugal como el 'Serra', La 'Serena' de España y otros de Italia y Francia. La variedad del queso Serra es la más importante en quesos tradicionales elaborados en Portugal, por las características organolépticas que posee (MACEDO *et al.*, 1993).

Aparentemente los extracto de las flores del cardo no son buenos sustitutos de los coagulantes de origen animal, particularmente en quesos elaborados con leche de vaca, debido a la textura y sabor defectuoso causado por la elevada actividad proteolítica de estas enzimas. Sin embargo, este efecto no se presenta en quesos fabricados con leche de oveja (CARBONELL *et al.*, 2002).

BIVAR *et al.* (2003), postulan que en algunos estudios los coagulantes vegetales presentan una mejor afinidad con la leche de oveja en comparación a la leche bovina, debido a la especificidad de las enzimas que es diferente para ambos tipos de leches, por ejemplo, la actividad del extracto obtenido de *Cynara cardunculus* es mayor en las α_s y β -caseínas de leche de oveja que en leche de vaca.

Por su parte BARBOSA *et al.* (1976), postulan que la especificidad de las cynarasas sobre las caseínas de leche ovina y de vaca explicarían las diferencias en la producción de péptidos amargos y proteólisis, puesto que la caseína de leche de oveja es un sustrato no favorable para la formación de péptidos hidrofóbicos en comparación a la caseína de leche de vaca.

En cuanto a enzimas coagulantes extraídas de frutos, VALBUENA (2003), señala que entre las más conocidas se encuentran: la *bromelina*, extraída de

los tallos de piña (*Ananacis comosus*), la *papaína* extraída de la papaya (*Carica papaya*) y la *ficina*, extraída de la higuera (*Ficus*).

La actividad proteolítica de estas enzimas es excesiva y por sobre su poder coagulante, lo que afecta las características sensoriales como son la textura y un amargor pronunciado de los productos (GUPTA y ESKIN, 1977; BROOME y LIMSOWTIN, 1998; ALAIS, 1985).

2.2.3 Enzimas de origen microbiano. Son extraídas a partir de cultivos de mohos de diferentes especies (TUBESHA, 2003).

Para producir las enzimas coagulantes se utilizan tres especies de mohos *Endothia parasitica* (moho parásito del castaño), *Mucor pusillus* (moho banal mesófilo del suelo) y *Mucor miehei* (moho banal termófilo del suelo) (ALAIS, 1985).

El mismo autor, señala que estas enzimas son aspartato proteinasas que presentan una actividad proteolítica menor que las enzimas de origen vegetal y las obtenidas por microorganismos genéticamente modificados.

Para la coagulación de la leche, también se han utilizado bacterias esporuladas aerobias del género *Bacillus*, entre ellas, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus mesentericus* y *Bacillus polymyxa*; los cuales, se cultivan industrialmente para la producción de diversas enzimas: amilasas, proteasas, sacarasas, entre otras. Del medio de cultivo se pueden extraer enzimas coagulantes de la leche. Sin embargo, su aptitud quesera es mejor que las enzimas de origen vegetal pero sensiblemente peor que la de las enzimas producidas por los mohos, puesto a que las cuajadas obtenidas carecen de cohesión y la actividad proteolítica es bastante elevada (ALAIS, 1985).

En un estudio de estabilidad de enzimas coagulantes del *Mucor miehei* frente al pH y la temperatura, se observó que éstas permanecen estables en un rango de pH de 3,5-4,0 y a una temperatura de 30°C, como se observa en la FIGURA 4, por lo que fuera de este rango de pH el tiempo de coagulación decrece. El sustrato utilizado fue leche en polvo descremada al cual se le adicionó cloruro de calcio 0,01M, se agregó 0,5 ml de extracto enzimático a tubos con 5 ml de sustrato y calentados a 30°C por 10 minutos (TUBESHA, 2003).

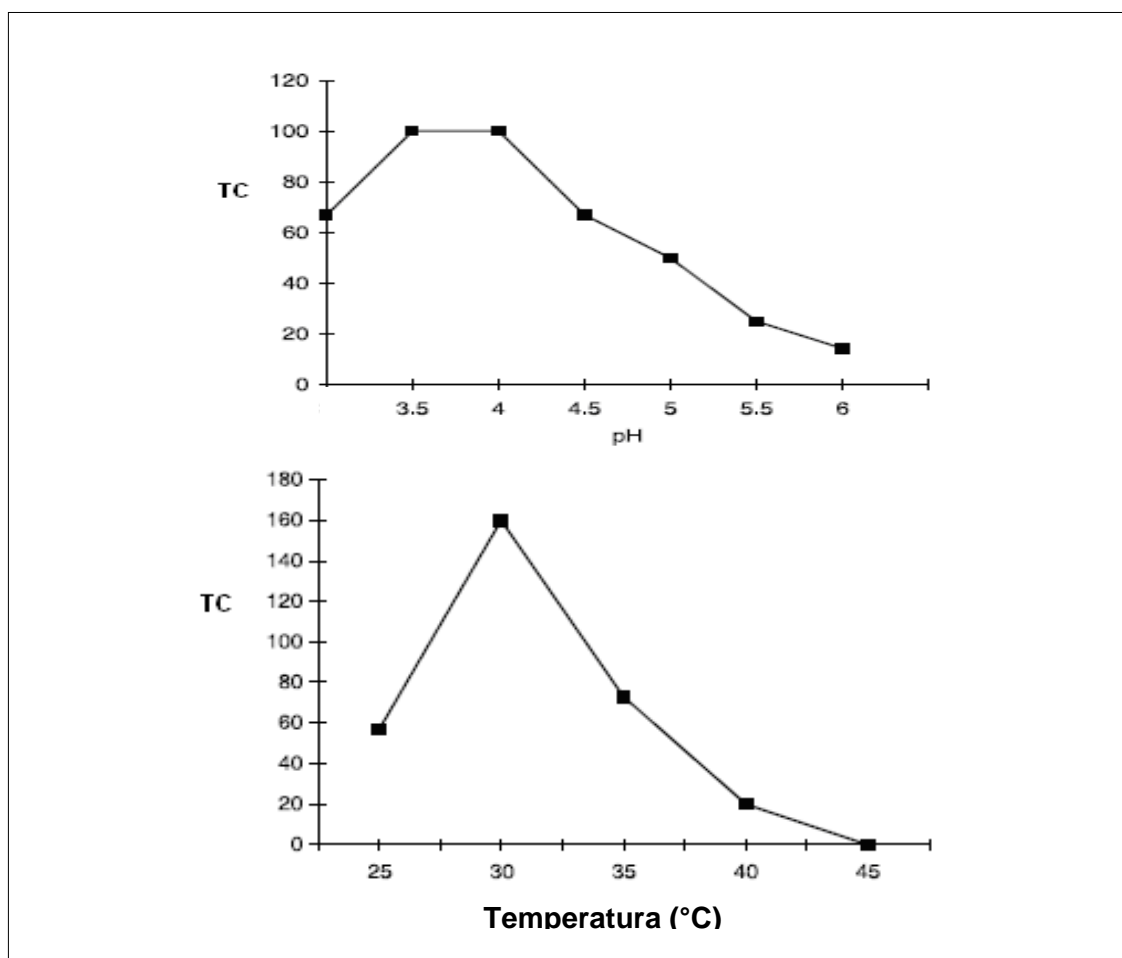


FIGURA 4. pH y temperatura de estabilidad óptima de enzimas extraídas de *Mucor miehei*.

FUENTE: TUBESHA (2003).

Según FERNANDEZ *et al.* (1999), las enzimas extraídas del *Mucor pusillus* son más proteolíticas que la quimosina bovina, por lo cual forman péptidos amargos y por lo tanto, producen menor rendimiento en la elaboración de queso.

Sin duda, las proteasas más utilizadas en la elaboración de quesos son las extraídas del *Mucor miehei* por los buenos resultados que se han obtenido, por el contrario, la proteasa aspártica de *Endothia parasitica* llamada *endothiapepsina*, debido a la termorresistencia que poseen, solamente se pueden utilizar en la elaboración de quesos que logran elevadas temperaturas durante su fabricación como es el caso de los quesos suizos (KIM *et al.*, 2004).

Se ha investigado que estas proteasas sólo pueden ser usadas en algunos tipos de quesos, pero también se ha informado la aparición de sabores amargos en quesos de maduración larga y en quesos duros (Koning *et al.* citado por BROOME Y LIMSOWTIN, 1998).

En un estudio realizado sobre proteólisis de queso Mozzarella elaborado con proteasas extraídas de *Mucor miehei*, *Endothia parasitica* y quimosina, almacenado a 4°C durante 50 días, se encontró que las enzimas de *Endothia parasitica* fueron más proteolíticas que las enzimas del *mucor miehei* y quimosina pero la especificidad del sustrato de la caseína fue diferente dependiendo del tipo de coagulante. En el queso elaborado con proteasas de *Endothia parasitica* durante el almacenamiento a 4°C, se observó proteólisis de α_s -caseína y β -caseína. Sin embargo, las α_s -caseínas fueron hidrolizadas preferentemente en quesos hechos con quimosina y con enzimas del *mucor miehei*, por lo cual el queso elaborado con enzimas de *endothia parasitica* presentó una textura más suave, más untable. Las diferencias podrían estar relacionadas con la proteólisis causada por el tipo de coagulante (YUN *et al.*, 1993).

2.2.4 Enzimas de origen genético. Estas enzimas son obtenidas por vía fermentativa a partir de microorganismos genéticamente modificados, los microorganismos más importantes en la producción de enzimas son *Aspergillus niger*, *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis*. (RAMÍREZ, 2003).

De acuerdo a VALBUENA (2003), la ingeniería genética, puede diseñar un determinado organismo aislando el material genético que codifica la síntesis de una enzima, e introduciéndolo a otro microorganismo más manejable.

En la actualidad el cuajo genético es el más utilizado, debido a que contiene enzimas similares a las encontradas en el cuajo de ternera. Entre ellos se encuentran Chymax el cual utiliza como microorganismo productor una cepa muy conocida no patogénica y no toxigenética, *Escherichia coli* K12. Esta cepa fue manipulada genéticamente introduciendo un plásmido de expresión de proquimosina en la cepa huésped. Luego esta proquimosina es extraída por fermentación de la cepa y tratándose posteriormente igual que la obtenida por la extracción de estómagos de ternera, es decir, se mantiene durante un período de tiempo a un pH ácido para obtener la quimosina activa (CHYMAX, 1990).

La enzima producida bajo este método es quimosina, con lo cual se obtiene una enzima bastante similar a la de origen animal; el extracto comercial contiene quimosina 100% a diferencia del producido por maceración del estómago, el cual puede contener 90-95% de quimosina y 10-15% de pepsina (VALBUENA, 2003).

Según BADUI (1997), las enzimas deben cumplir con determinadas especificaciones de calidad, sobre todo en cuanto a su toxicidad, o la del microorganismo que la produce, en caso de que sea de origen microbiano.

Un estudio realizado en tres cuajos comerciales de origen genético (maxiren, chymax y chimogen), consistió en determinar el progreso de la proteólisis en queso Gouda medido a través de fracciones de nitrógeno soluble y nitrógeno aminoacídico, expresado como porcentaje de nitrógeno total. Estos cuajos de origen genético fueron comparados con cuajo de ternera de origen animal. La FIGURA 5, indica que tanto los cuajos de origen genético como el de origen animal presentaron una proteólisis similar durante la maduración del queso y por consiguiente similar calidad en el queso Gouda obtenido (VAN DEN BERG, 1992).

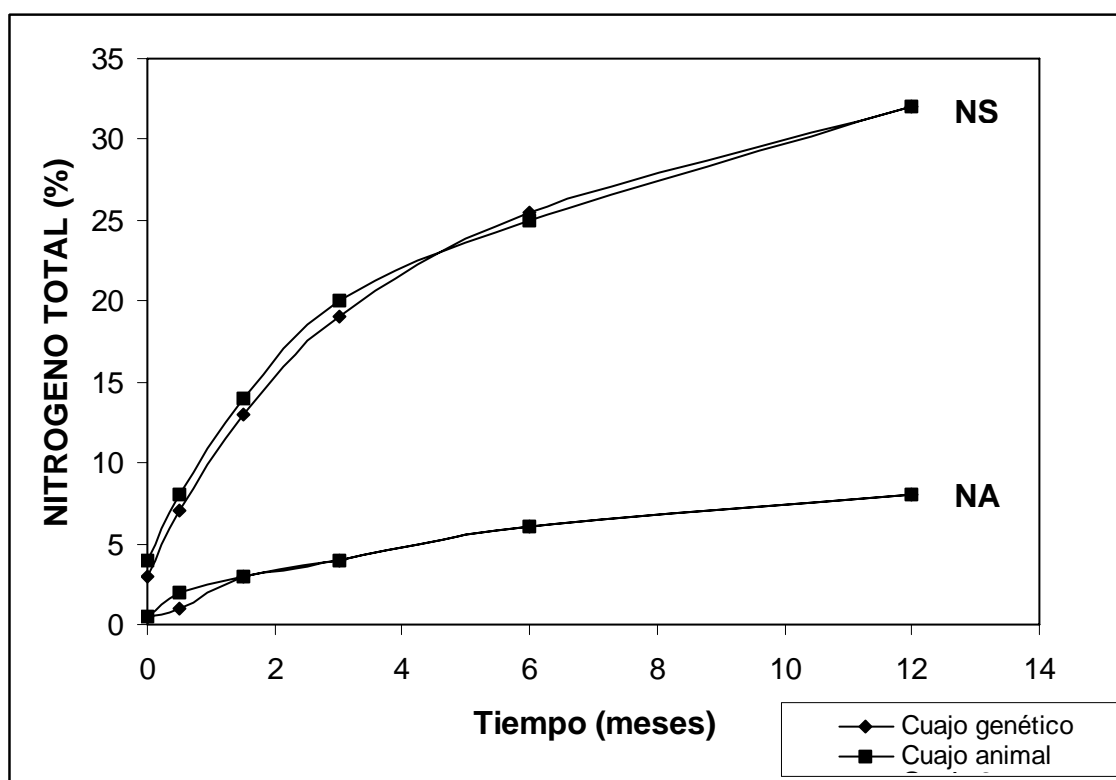


FIGURA 5. Formación de fracciones de nitrógeno soluble (NS) y nitrógeno aminoacídico (NA), durante la maduración de queso Gouda, elaborado con cuajo de origen animal y cuajo de origen genético.

FUENTE: VAN DEN BERG (1992).

Por otra parte, en un estudio realizado por la empresa Chymax, se determinó que la proporción de quimosina A y quimosina B puede variar entre distintas preparaciones incluso la enzima rotulada como Chymax puede contener sólo quimosina A (CHYMAX, 1990).

Según MORRIS y ANDERSON (1991), la quimosina obtenida por fermentación de *Kluyveromyces lactis* también manipulada genéticamente es utilizada actualmente en países europeos. En una investigación realizada en queso Cheddar elaborado con enzima de *Kluyveromyces lactis* y con cuajo estándar, se encontró que el cuajo producido por fermentación de la cepa mencionada, no se diferenció del cuajo de ternera estándar en la elaboración y fermentación del queso, puesto a que las características de composición, rendimiento y tasa de maduración del queso fueron similares.

2.3 Coagulación enzimática de la leche

La actividad proteolítica de las enzimas tiene lugar en tres etapas; en la primera, la k-caseína, que estabiliza las micelas de caseína, es hidrolizada muy específicamente por el cuajo, de modo que se rompe el enlace peptídico PHE₁₀₅ – MET₁₀₆ liberando paracaseína y macropéptido C- terminal original (residuos 106-109) de la k-caseína, que está cargado negativamente y corresponde a un glicomacropéptido (GMP); y en la segunda etapa, cuando se ha hidrolizado el 85% de la k-caseína, se produce la agregación y precipitación de las micelas en presencia de calcio, provocando la coagulación de la leche como se muestra en la FIGURA 6 (ROBINSON, 1991).

Según AMIOT (1991), en la k-caseína hay 164 enlaces peptídicos diferentes, que pueden ser atacados, además de los que hay en las otras fracciones de la micela, sin embargo, la fuerza del cuajo se mide por su eficacia al romper específicamente el enlace peptídico PHE₁₀₅ – MET₁₀₆, acción que produce la coagulación de la leche.

ALAIS (1985), sostiene que la tercera etapa de la coagulación enzimática comienza en la cuajada y continúa su acción durante la maduración de los quesos. Como parte de la quimosina permanece activa en la cuajada, degrada la caseína α_{s-1} liberando péptidos, los cuales posteriormente son hidrolizados por los cultivos lácticos, lo que contribuye al desarrollo de ciertas características de sabor y textura del queso.

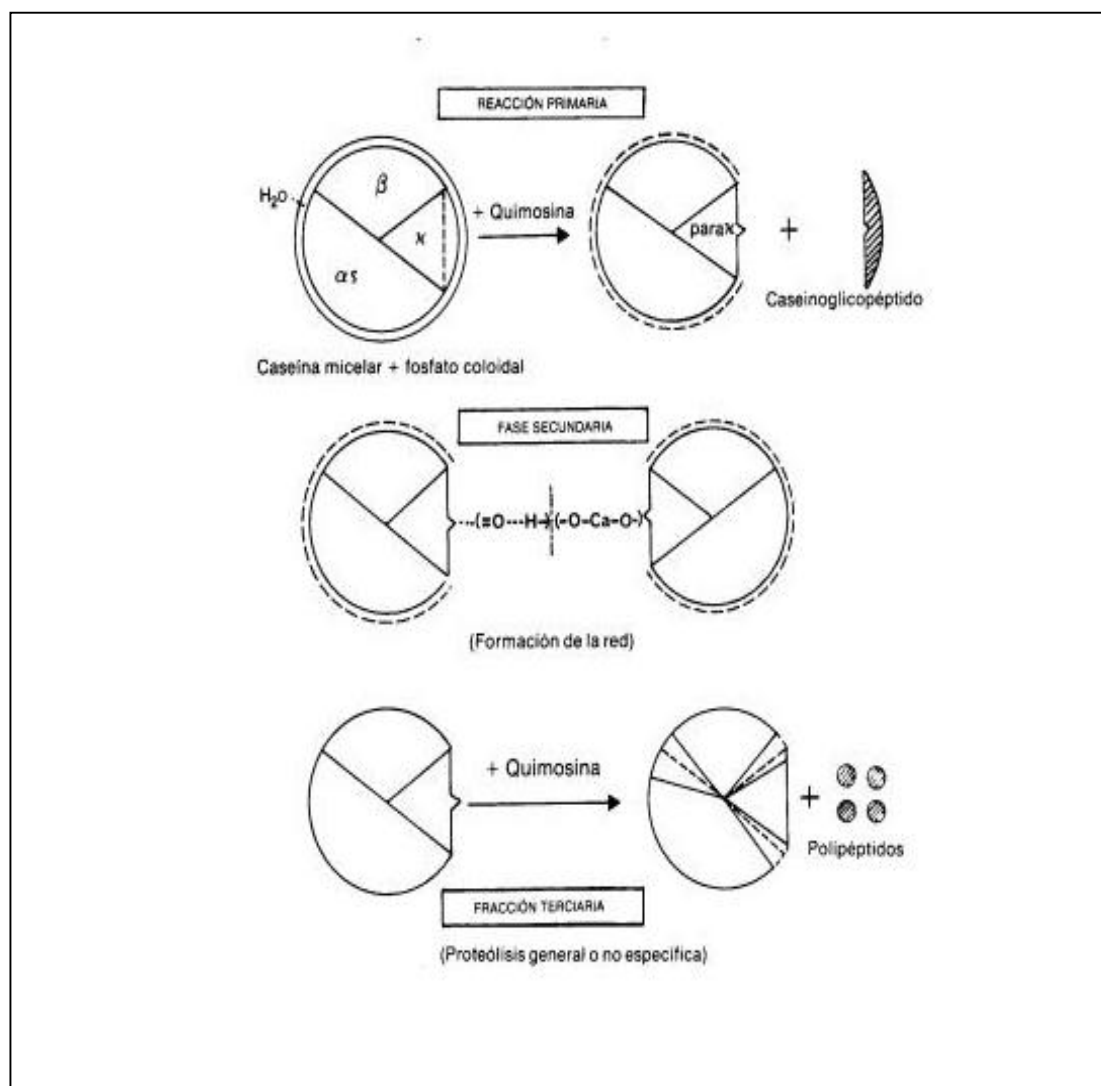


FIGURA 6. Coagulación enzimática de la leche.

FUENTE: ALAIS (1985).

Otro fenómeno producido por la acción enzimática es la sinéresis del coágulo. La acidificación del gel enzimático produce una disminución del agua de deshidratación de las micelas, solubiliza una parte de las sales de calcio aumentando con ello la permeabilidad del coágulo y favorece la formación de los enlaces secundarios necesarios para la contracción. Todas estas acciones facilitan y aceleran la expulsión del lactosuero (ALAIS, 1985).

La sinéresis es un fenómeno que se produce luego de la coagulación de la leche. Por la acción del cuajo se forman nuevos enlaces y muchas micelas se unen entre sí para formar grandes redes. Las mallas formadas, retienen mecánicamente una gran parte del agua, se reestructuran y se contraen haciendo posible la expulsión del suero (AMIOT, 1991).

Existen diversos factores que influyen sobre la coagulación enzimática de la leche, estos son: pH, temperatura, concentración en iones Ca^{++} , concentración de la enzima y sustancias nitrogenadas.

2.3.1 Influencia del pH. El pH influye principalmente sobre la velocidad de coagulación y la consistencia de la cuajada. En un medio alcalino, el cuajo se inactiva y la leche no coagula. Por el contrario, un descenso del pH facilita la acción del cuajo sobre la caseína porque la acidez reduce su carga eléctrica, disminuyendo su estabilidad (AMIOT, 1991).

De acuerdo a ARIAS (2002), la acidez en la leche favorece la acción del cuajo, mientras más alta sea la acidez, más rápidamente se forma la cuajada y más consistente se vuelve ésta.

INDA (2000), señala que el grado en que se retiene la estructura de las micelas de caseína en su forma original depende en gran medida de la pérdida de fosfato de calcio y ésta a su vez depende del pH en el momento en que se retira

el lactosuero de la cuajada. Por eso, tratándose de quesos en general y ciertamente de quesos madurados, una de las formas más importantes para eliminar el suero consiste en disminuir el pH de la cuajada, como se muestra en la FIGURA 7.

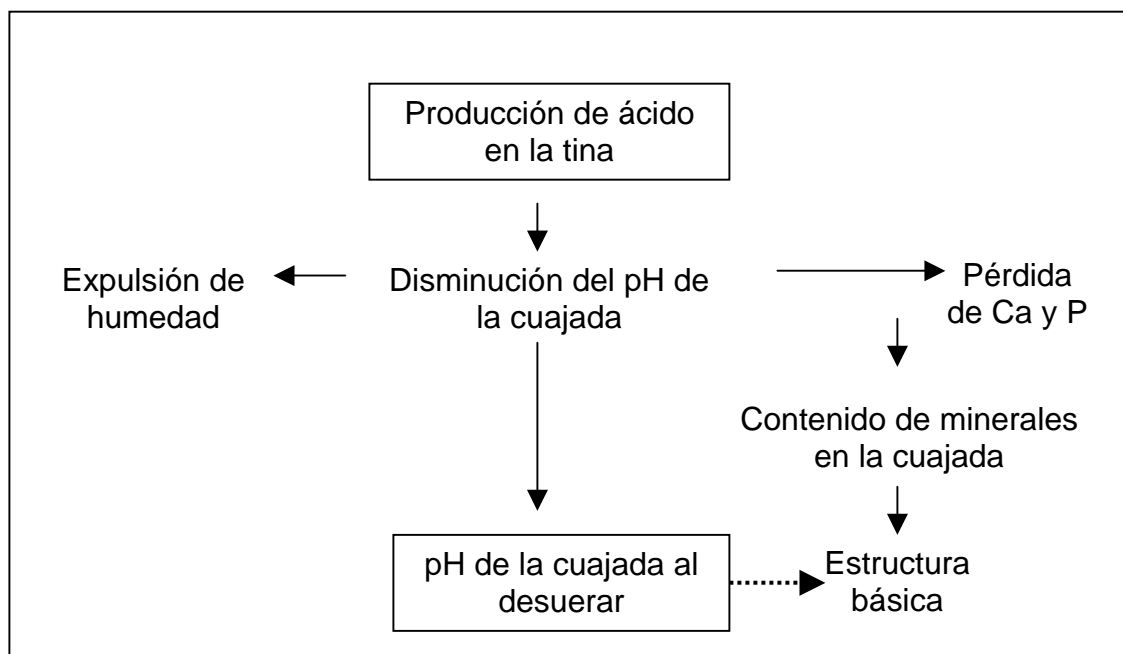


FIGURA 7. Relación entre el grado de producción de acidez hasta la etapa de desuerado y la estructura básica del queso.

FUENTE: (INDA, 2000).

AMIOT (1991), señala que el pH óptimo para la actividad del cuajo animal es 5,5. En idénticas condiciones la duración media de la coagulación es de unos 200 segundos a pH 6,6 – 6,7, de 50 segundos a pH 6,1 y de 30 segundos a pH 5,7.

Según ALAIS (1985), alrededor de pH 3,5, la quimosina de origen animal es muy inestable, la mayor estabilidad la presenta a pH 5,3 - 6,3 decreciendo rápidamente por sobre pH 6,5.

El mismo autor, afirma que a pH 7,3 el cuajo animal tiene su actividad coagulante reducida en un 15% en relación con el pH 6,6. Sin embargo, a pH 8,4 el cuajo animal se inactiva.

Por su parte AMIOT (1991), sostiene que la pepsina es la enzima menos estable en medio neutro, la cual se inactiva totalmente a pH 6,95.

El mismo autor, señala que la actividad coagulante se anula cuando el pH de la leche sobrepasa un determinado valor, como es el caso de la pepsina porcina, la cual coagula difícilmente o no coagula la leche fresca cuyo pH es superior a 6,6, mientras que las enzimas microbianas pueden ser aún activas a pH cercano a 7,0 o más elevado, donde el cuajo animal se vuelve inactivo.

En cuanto a las enzimas de origen vegetal, ALAIS (1985), señala que presentan un rango de pH de estabilidad óptima de 4,5 a 6,5.

El mismo autor, sostiene que para el caso de las enzimas microbianas de *Bacillus subtilis*, son más estables en medio alcalino debido a que presentan un rango de pH de estabilidad óptima de 7,5 a 9,5.

Por otra parte, AMIOT (1991), señala que a pH 8,4 la enzima de *Endothia parasítica* se inactiva, mientras que las enzimas de los *Mucor* conservan del 20 al 50% de su actividad.

El mismo autor, señala que la retención en la cuajada fresca de la enzima del *Mucor* es de 15 a 20% y depende poco del pH. Por consiguiente pasa mucha enzima al suero; esto, añadido a su mayor termoestabilidad, puede plantear problemas cuando el suero desecado se utiliza como lactosustituto, en mezclas con la leche.

En el CUADRO 2, se presenta el pH óptimo de las enzimas utilizadas en la tecnología de alimentos.

CUADRO 2. Proteinasaas utilizadas en tecnología de alimentos.

GRUPO	ENZIMA	pH ÓPTIMO
ANIMAL	Proteinasa pancreática	9,0
	Quimosina	4,0 -4,5
	Pepsina	2,0
VEGETAL	Papaína	7 - 8
	Bromelina	7 - 8
	Ficina	7 - 8
	<i>Cynarasas</i>	5,1
GENETICO	Proteinasaas alcalinas (proveniente de <i>Bacillus subtilis</i>)	7-11
	Proteinasaas neutras (proveniente de <i>Bac. thermoproteolyticus</i>)	6 - 9
MICROBIANO	Proteinasa (proveniente de <i>Mucor pusillus</i>)	4,7
	Proteinasa neutra (proveniente de <i>Aspergillus oryzae</i>)	5,5 - 7,5
	Proteinasa alcalina (proveniente de <i>Aspergillus oryzae</i>)	6,0 - 9,5

FUENTE: ALAIS (1985).

2.3.2 Influencia de la temperatura de la leche. Las condiciones óptimas para la acción del cuajo son entre 40 y 42°C, mientras que a temperaturas inferiores a 10°C y superiores a 65°C, no se produce la coagulación (AMIOT, 1991).

El mismo autor, señala que la fase primaria de acción enzimática sobre la κ -caseína, se produce incluso a temperaturas inferiores a 10°C, mientras que en

la fase secundaria, más sensible, se necesitan temperaturas superiores para que produzca la coagulación. Esta diferencia en el comportamiento permite llevar a cabo la fase primaria añadiendo el cuajo a la leche fría a menos de 10°C, sin que se produzca la coagulación; después de algunas horas, se puede coagular instantáneamente la leche calentándola rápidamente a menos de 20°C.

VALBUENA (2003), afirma que al coagular la leche a 21-25°C se obtiene una cuajada blanda, a 30°C se obtiene una cuajada firme y a 32-34°C una cuajada consistente y elástica, al utilizar enzimas de origen animal.

En solución, el cuajo animal es muy inestable; cuando la temperatura se eleva por encima de 50°C, se produce la desnaturalización; mientras que las enzimas microbianas son más resistentes al calor, lo que explica que la temperatura óptima de coagulación sea más elevada (BENITEZ, 2000),

Según ALAIS (1985), el máximo de temperatura para la enzima de *Mucor miehei* se sitúa a 65°C. Cuando la temperatura de coagulación se aumenta, tales enzimas se ven favorecidas, mientras que bajas temperaturas son menos favorables para la coagulación de la leche.

El mismo autor, señala que la termoestabilidad de las enzimas del *Mucor miehei* está considerada como una desventaja, ya que las proteínas del suero son degradadas por estas enzimas de origen microbiano y no se inactivan por completo a temperaturas de pasteurización pudiendo causar coagulación en leches o proteólisis.

2.3.3 Influencia de la concentración de iones calcio. Este factor no interviene en la fase enzimática sino que afecta solamente a la fase secundaria. Cuando el contenido en calcio es anormalmente bajo, la coagulación es lenta y se

obtiene una cuajada muy blanda, por lo tanto, para corregir este defecto se añade a la leche cloruro cálcico (AMIOT,1991).

ALAIS (1985), afirma que se observan diferencias notables entre las enzimas con respecto a este factor; tal es el caso de las enzimas del *Mucor*, las cuales son más sensibles a la variación del contenido en calcio, mientras que el de *Endothia parasitica* lo es relativamente poco.

Según RAMÍREZ (2003), el contenido en fosfato cálcico coloidal también es importante en el proceso de coagulación, especialmente en lo que se refiere a la tensión del gel.

BENITEZ (2000), afirma que el calcio y el fósforo desempeñan un papel fundamental en el mecanismo de coagulación y forman parte del gel de caseína, lo que confiere al coágulo propiedades especiales: es compacto, flexible, elástico, impermeable y contráctil. Estas características tienen una gran influencia en el desuerado y endurecimiento de la cuajada porque le permiten soportar las intervenciones mecánicas durante el proceso de la fabricación.

El mismo autor, señala que durante la coagulación, las micelas de caseína conservan su estructura y la cuajada retiene la mayor parte del calcio y del fósforo, los cuales dan rigidez, cohesión e impermeabilidad. Por la acción del cuajo se forman nuevos enlaces y muchas micelas se unen entre sí para formar grandes redes. Las mallas formadas, como un tejido esponjoso, retienen mecánicamente una buena parte del agua. Como resultado de la interacción de todos estos fenómenos la red formada se reestructura y se contrae, haciendo posible la expulsión del suero.

2.3.4 Concentración de la enzima y sustancias nitrogenadas. VALBUENA (2003), menciona como otros factores que afectan la coagulación enzimática a

la dosis del cuajo y el contenido de materias nitrogenadas solubles en la leche. El contenido de cuajo afecta mediante el empleo de dosis altas, lo cual acelera el tiempo de coagulación, pero puede traer consecuencias en las características de la cuajada, se tornaría dura y quebradiza y en la aparición de sabores amargos, por proteólisis excesiva. En cuanto al contenido de materias nitrogenadas en la leche, por lo general, un aumento en la cantidad de proteínas del suero provocará una disminución de caseínas. Por otro lado, puede afectar la estabilidad de las micelas, aumentándolas y por lo tanto prolongando el tiempo de coagulación.

ALAIS (1985), menciona que la riqueza de calcio expresada por la relación Ca/N tiene gran importancia en la variación de la aptitud para la coagulación de la leche, puesto a que en leches que presentan buena aptitud de coagulación esta relación es mayor que en leches con aptitud de coagulación defectuosa. Asimismo, la relación P/N es más débil en leches con baja aptitud de coagulación.

2.4 Calidad bacteriológica de enzimas coagulantes

El cuajo animal es difícil de suministrar exento de bacterias, alguna de las cuales puede ser peligrosa desde el punto de vista técnico e higiénico (ALAIS, 1985).

El mismo autor, señala que se ha demostrado que los defectos organolépticos apreciados en quesos son consecuencia de existir bacterias perjudiciales en los cuajos mal filtrados. En estos cuajos se han encontrado lactobacilos resistentes a la sal, la cual se agrega al cuajo como conservante, que serían la causa de estos sabores defectuosos.

En el CUADRO 3, se presentan las exigencias de calidad para enzimas coagulantes de la leche, según (ESPAÑA, MINISTERIO DE LA PRESIDENCIA, 1996).

CUADRO 3. Especificaciones microbiológicas para enzimas coagulantes.

Determinaciones (unidades)	Máximo especificado
Gérmenes aerobios mesófilos	10 ⁵ u.f.c. /g o ml
Enterobacterias	10 u.f.c./g o ml
Escherichia coli.	1/g o ml
Salmonella /Shigella	Ausencia en 25 g o ml
Staphylococcus aureus enterotoxigénico	Ausencia en 1/g o ml
Clostridium sulfito reductores	1/g o ml
Mohos y levaduras	10/g o ml

FUENTE: ESPAÑA, MINISTERIO DE LA PRESIDENCIA (1996).

Para evitar la contaminación microbiológica de las enzimas coagulantes se utilizan diferentes conservantes o preservantes. De acuerdo al Reglamento Sanitario de los Alimentos, se consideran preservantes aquellas sustancias de carácter inocuo, de composición química conocida y que se incorporan a los alimentos, generalmente en cantidades pequeñas, para mejorar sus características organolépticas o su conservación (CHILE, MINISTERIO DE SALUD, 2003). En las enzimas coagulantes se han utilizado:

- **Sorbato de potasio.** MISTRY y KOSIKOWSKY (1985), señalan que el sorbato de potasio no es tóxico y puede ser metabolizado similarmente como ocurre en forma natural con los ácidos grasos. Además, Liewen y Marth citados por SOFOS *et al.* (1979), señalan que el principal uso del sorbato, es como una agente fungistático, aunque también presenta efectividad contra algunas bacterias, siendo efectivo en el rango de pH ácido 4,5 a 6,5.

En Chile las disposiciones indican que el sorbato de potasio puede utilizarse como sustancia conservadora y en concentraciones no mayores en el producto terminado de 2 g/kg (CHILE, MINISTERIO DE SALUD, 2003).

- **Benzoato de sodio.** El ácido benzoico, ha sido muy usado como un aditivo antimicrobiano para alimentos. La sal de sodio es preferida debido a la solubilidad acuosa del ácido libre. El benzoato de sodio es generalmente considerado por ser el más activo contra levaduras y bacterias y menos activo contra hongos (EL- SHENAWY y MARTH, 1988).

Según el Artículo N° 154 del Reglamento Sanitario de los Alimentos, los niveles de uso práctico del benzoato de sodio corresponden a concentraciones no mayores que 1 g/kg en el producto terminado (CHILE, MINISTERIO DE SALUD, 2003).

LENHINGER (2001), señala que la cantidad que puede ser ingerida por el ser humano es de 10 mg/kg de peso corporal.

El mismo autor sostiene que el ácido benzoico es usado principalmente en alimentos y bebidas con valores de pH cerca o por debajo de 4,0 a 4,5. El ácido benzoico no causa efectos deletéreos en humanos cuando es consumido en pequeñas cantidades y se encuentra naturalmente en ciruelas, canela, arándanos y clavo de olor.

- **NaCl.** Esta sal, es utilizada como preservante de alimentos, debilitando o previniendo el crecimiento de microorganismos. Es usada ya sea como salmuera o aplicada directamente a algunos alimentos (HERNÁNDEZ, 1995).

LEHNINGER (2001), señala que el efecto del cloruro de sodio sobre los microorganismos, se debe a la reducción de la actividad de agua (a_w), provocando una disminución en el crecimiento de las bacterias patógenas.

2.5 Ultrafiltración

Según DOMÍNGUEZ (2004), la ultrafiltración tiene como principio la permeabilidad selectiva de uno o más componentes de una mezcla líquida de diferente composición, a través de una membrana que actúa como barrera, con el objetivo de concentrar una solución enzimática sin alterarla.

El mismo autor, señala que el agua y solutos de bajo peso molecular pasan, influenciados por la presión, a través de la membrana, mientras que las proteínas son retenidas por la membrana y se van concentrando junto con glóbulos grasos, bacterias y suspensiones de sólidos para formar el concentrado.

De acuerdo a INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION, IDF/FIL (1991), el éxito del proceso de ultrafiltración dependerá de los tamaños moleculares de los compuestos de interés y de cómo estos interactúan en solución, dado que es una filtración molecular.

Los filtros eliminan las partículas por exclusión de tamaños mediante un medio poroso ó membrana. La elección del tipo de filtro más adecuado depende de muchos factores diferentes: de la cantidad y tamaño de partículas a separar, del volumen y temperatura del medio a filtrar, así como del método de filtración y de la precisión requerida (DOMÍNGUEZ ,2004).

En cuanto a las características de las membranas de ultrafiltración, éstas son anisotrópicas en morfología, es decir poseen una fina capa provista de poros que estaría determinando en base al tamaño y densidad de los poros el peso

molecular de separación que la membrana es capaz de retener. Sin embargo, es importante señalar que esta retención no es del 100%, puesto que la distribución de poros no es completamente homogénea y además se debe considerar la forma de la molécula a retener. Esta delgada película está colocada sobre un soporte poroso (CHERYAN, 1998).

El material más utilizado para la ultrafiltración son los polímeros relativamente inertes de polisulfona, estas membranas tienen un rango de pH amplio, una alta resistencia térmica, gran estabilidad hidrolítica y habilidad para retener las propiedades mecánicas en altas temperaturas y en ambientes húmedos (KIM *et al.*, 2005).

Durante la ultrafiltración, las partículas quedan retenidas sobre la membrana, lo que determina un aumento de la presión osmótica en las proximidades de la membrana (CHERYAN, 1998).

En la FIGURA 8, se esquematiza el proceso de ultrafiltración.

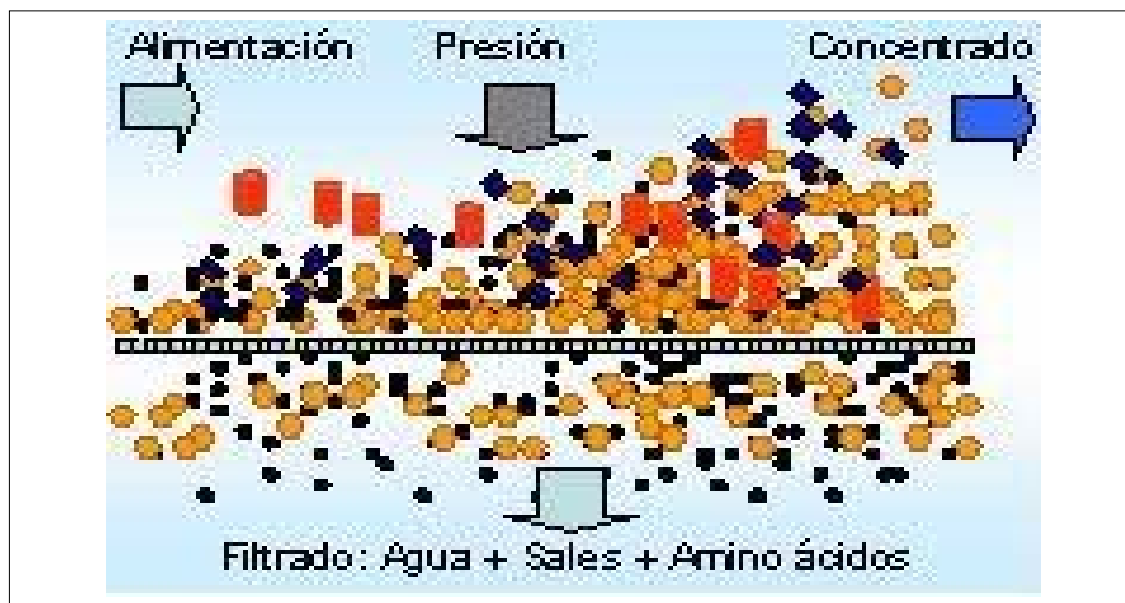


FIGURA 8. Esquema del proceso de Ultrafiltración.

FUENTE: DOMÍNGUEZ (2004).

En la actualidad y debido a los rápidos resultados que ofrecen se han utilizado unidades de filtración Centriplus de Millipore para concentrar hasta 15ml de soluciones macromoleculares. Estos dispositivos están diseñados para ser usados en centrifugas que adapten tubos de centrifugación de 50 ml, incluyendo tanto los rotores de ángulo fijo como los de cabezal basculante. La concentración se logra ultrafiltrando la solución a través de una membrana anisotrópica, mediante centrifugación, la cual permite que solutos de bajo peso molecular pasen a través de la membrana y los de mayor peso molecular queden concentrados sobre ella, siendo 3000 g, la máxima fuerza de centrifuga utilizada por estos filtros. Estas unidades de filtración separan las soluciones de acuerdo al peso molecular y tiene la propiedad de recuperar el concentrado invirtiendo el vial de retenido sobre un vial de recogida limpio para centrifugarlo nuevamente. Este método minimiza las pérdidas de películas que se puedan formar en la membrana y las paredes del depósito (ANEXO 1)¹.

2.6 Quesos elaborados con coagulantes vegetales

Los quesos fabricados con coagulantes vegetales se encuentran principalmente en el Mediterráneo, oeste de África y en países del sur de Europa. España y Portugal poseen una gran variedad y producción de quesos utilizando *Cynara cardunculus* como coagulante vegetal, estos quesos tienen el grado de denominación de origen como es el caso del queso Serpa de Portugal y La Serena de España (BIVAR *et al.*, 2003).

Tradicionalmente los extractos frescos acuosos de las flores del cardo (*Cynara cardunculus*) son usados como coagulantes crudos para la elaboración de quesos, utilizando leche de oveja principalmente y en menor grado leche de vaca y cabra, entre los cuales se encuentra el queso Pedroches de Andalucía y el queso Torta del Casar de Extremadura (O`MAHONY *et al.*, 2003).

¹ <http://www.millipore.com/catalogue.nsf/docs/C3040>.

El mismo autor, señala que algunas de las características típicas de los quesos elaborados con coagulante vegetal le otorgan el grado de “denominación de origen”. Las características de pasta dura, una masa compacta o cerrada y de larga maduración son típicas de quesos tales como Serrat elaborado con leche de vaca y Pedroches de España elaborado con leche de oveja cruda. Por otro lado, la obtención de una pasta blanda, textura cremosa, corta maduración y sabor fuerte como es el caso de quesos tales como La Serena y Torta del Casar, elaborados con leche de oveja. En la FIGURA 9, se muestran algunos quesos elaborados con coagulante vegetal.



FIGURA 9. Quesos elaborados con coagulante vegetal.

FUENTE: <http://www.quesos.com/enciclopedia.asp?P=Region>.

3. MATERIAL Y METODO

3.1 Obtención de muestras

Se realizaron tres muestreos de hojas de maqui durante el periodo invierno-primavera, correspondiendo a los meses de julio, agosto y septiembre 2005, con tres repeticiones cada uno, los cuales fueron recolectados en tres áreas de la provincia de Valdivia. Las muestras consistían en hojas de maqui verdes y sanas, evitando la extracción de hojas manchadas, afectadas por insectos, decoloradas y secas.

En el CUADRO 4, se presenta el lugar y fecha de los muestreos realizados.

CUADRO 4. Lugar y fecha de los muestreos de hojas de maqui.

Muestreo	Lugar	Fecha
1	Jardín Botánico UACH Valdivia	12 de julio 2005
2	Salida norte La Unión	02 de agosto 2005
3	Salida sur Valdivia	13 de septiembre 2005

3.2 Ubicación de los ensayos

Los análisis fueron realizados en los Laboratorios de Química y Microbiología del Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos (ICYTAL), perteneciente a la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Austral de Chile.

3.3 Diseño experimental

En el CUADRO 5, se presenta el diseño experimental del estudio.

CUADRO 5. Diseño experimental.

Especie	Repeticiones Sector de Muestreo	Variables	
		Planta	Extracto enzimático
Maqui (<i>Aristotelia chilensis</i>)	- Jardín Botánico UACH Valdivia. - Salida norte La Unión. -Salida sur Valdivia.	Humedad	Ultrafiltración
		Proteína total	pH y T° óptimos
			Proteína
			Fuerza de cuajo
			Tiempo de coagulación
			Sinéresis del gel
			Fuerza del gel
			Electroforesis PAA-SDS
	Cromatografía DEAE celulosa (sector Jardín Botánico)		

Para determinar la estabilidad del extracto enzimático vegetal concentrado se realizaron 2 tratamientos, con el fin de encontrar las mejores condiciones de conservación en un período de 3 meses. Para ello se agregó como conservante sorbato de potasio y se almacenaron bajo congelación. Los tratamientos se presentan en el CUADRO 6.

CUADRO 6. Estabilidad del extracto enzimático vegetal ultrafiltrado.

TRATAMIENTO	FACTOR	VARIABLE
Enzima UF sin sorbato de potasio	Tiempo (meses) 1	Fuerza del cuajo
Enzima UF con 2,5% (p/v) sorbato de potasio	2	Tiempo coagulación
		Recuento total de bacterias mesófilas, enterobacterias y <i>Staphylococcus aureus</i> .
	3	

3.4 Pruebas preliminares de extracción de proteínas a la planta nativa Maqui

Antes de comenzar con los primeros análisis, se probaron 2 metodologías de extracción de proteínas, para así determinar la más eficiente.

3.4.1 Extracción según AÑÓN y MARTINEZ (1996). Se procedió a realizar la extracción con agua destilada como lo indica la FIGURA 10.

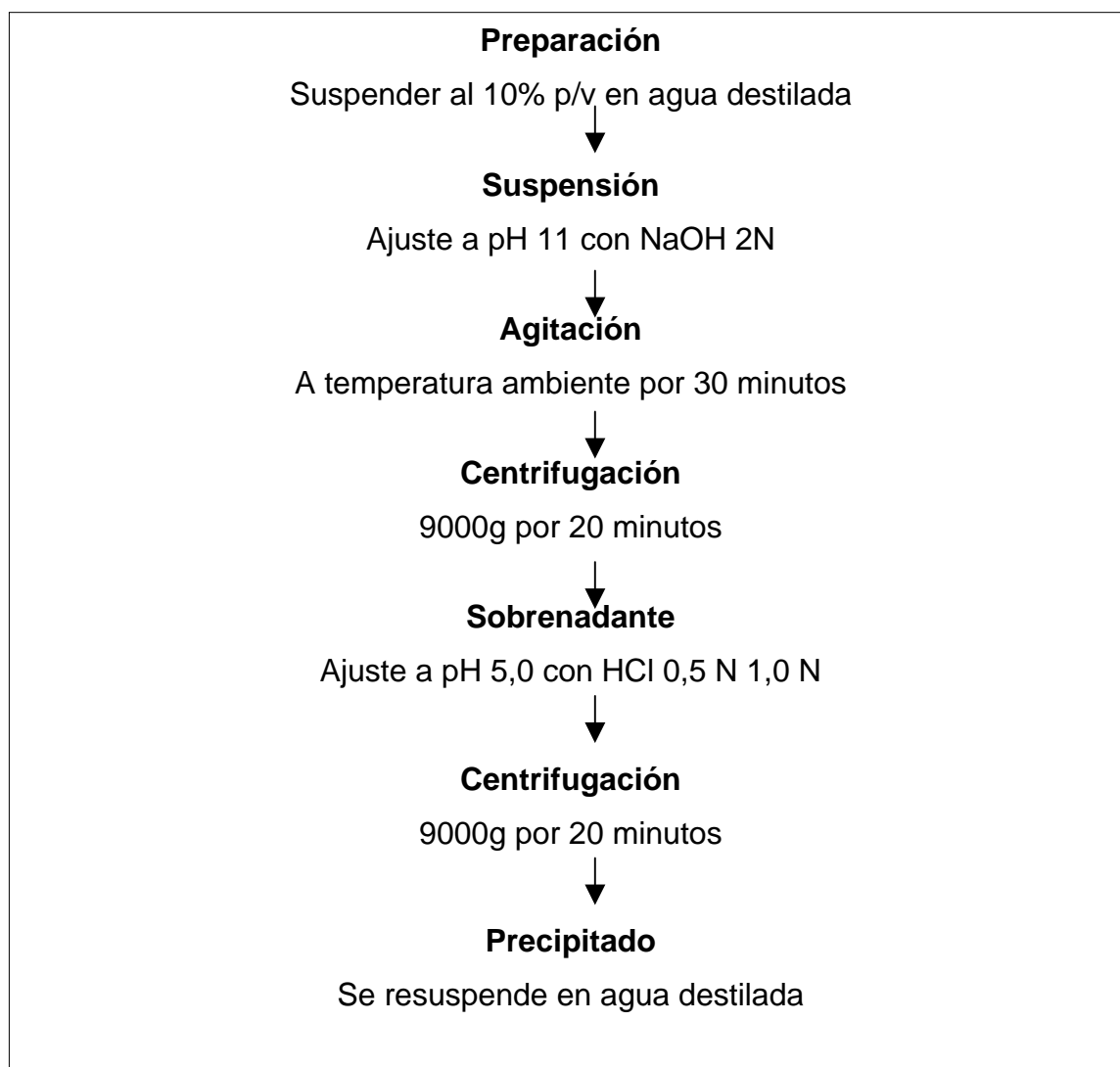


FIGURA 10. Extracción de proteínas según AÑÓN y MARTINEZ (1996).

3.4.2 Extracción según GUPTA y ESKIN (1977). Esta extracción como se indica en la FIGURA 11 consistió en suspender al 10% p/v las hojas de maqui previamente picadas en moledora eléctrica, en buffer acetato 0,01M (pH 5,5).

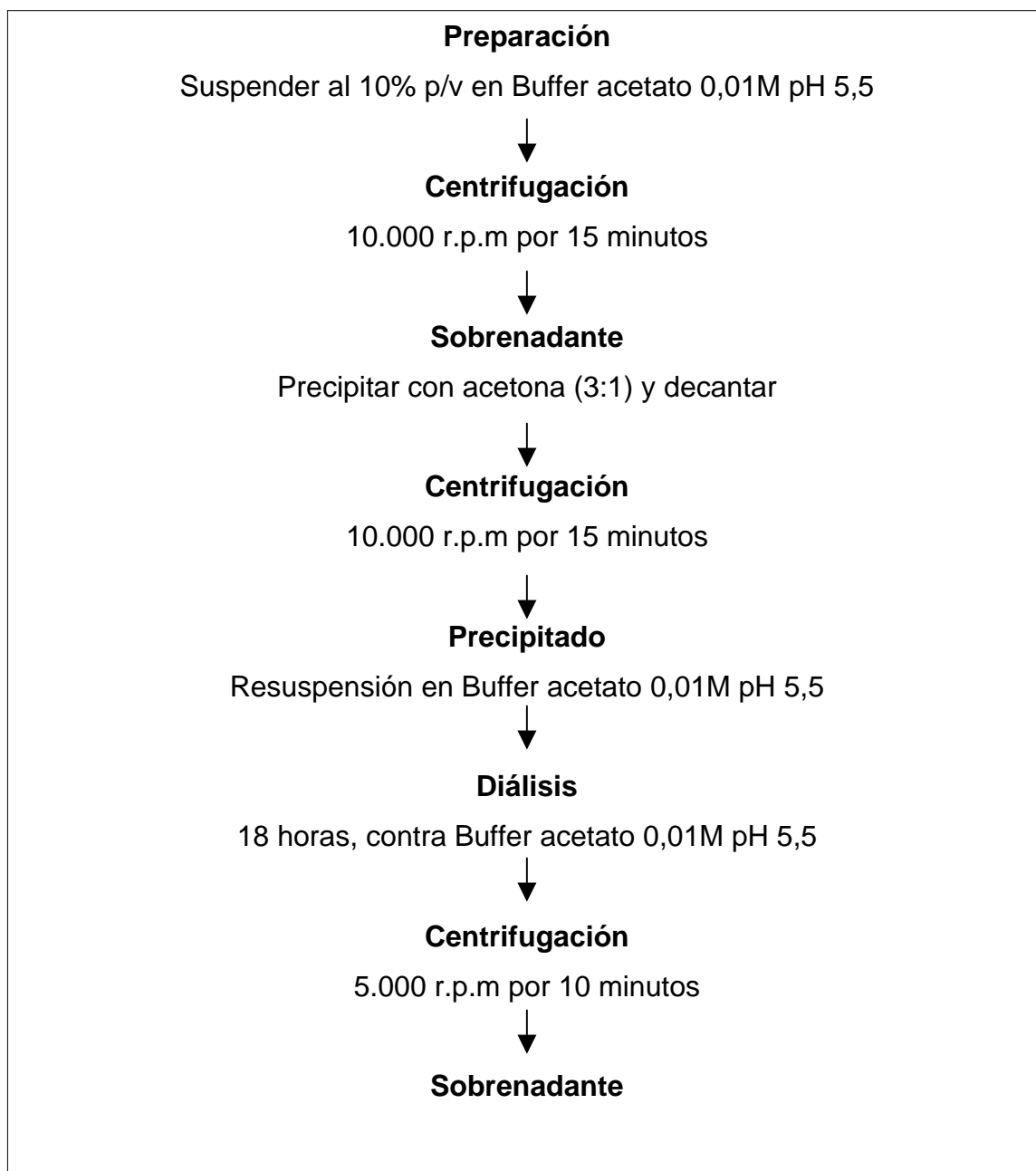


FIGURA 11. Extracción de proteínas según GUPTA y ESKIN (1977).

3.4.3 Análisis de los extractos obtenidos. Los extractos preparados anteriormente fueron sometidos a ensayos de fuerza del cuajo, con el fin de encontrar el método que otorgue los mejores resultados de actividad coagulante de la leche. La determinación de temperatura y pH óptimo para el extracto enzimático vegetal se realizó probando la fuerza del cuajo a diferentes temperaturas del sustrato (leche cruda) a 20, 25, 30, 35 y 40°C, mediante el uso de un baño María y a diferentes pH de la leche, estos son 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5. Los pH fueron ajustados mediante la aplicación de HCL 1N y NaOH 0,5N a la muestra de leche cruda utilizada como sustrato.

En este ensayo se aumentó la cantidad de calcio adicionado a la leche 3 veces el cual normalmente es de 0,1g para 500ml de leche cruda, y fue reemplazado por 0,3 g, con el fin de favorecer la coagulación de la leche.

3.5 Métodos de análisis

3.5.1 Análisis de la planta. Se realizaron análisis de humedad y proteínas a las hojas de maqui.

3.5.1.1 Determinación del contenido de proteína Kjeldahl. Se realizó de acuerdo al método de STEUBING *et al.* (2002), el cual tiene como principio la digestión de una porción de muestra usando un equipo de digestión en bloques, con una mezcla de sulfato de potasio y ácido sulfúrico, junto a un catalizador para convertir el nitrógeno orgánico en sulfato de amonio. Luego se adiciona un exceso de NaOH al digerido enfriado, a fin de liberar amonio. Posteriormente, el amonio se recolecta en un exceso de ácido bórico y se titula con ácido sulfúrico. El contenido de nitrógeno se multiplica por el factor 6,25 para expresar como porcentaje de proteínas (ANEXO 2).

3.5.1.2 Determinación del contenido de humedad. Según ASSOCIATION OF ANALYTICAL CHEMISTS, AOAC (1995). Se basa en la pérdida de humedad de la muestra en horno a temperatura constante. Para ello se pesan 2 gramos de hojas previamente picadas manualmente y se seca por 5 horas a 100°C hasta peso constante.

3.5.2 Análisis del extracto vegetal. Los análisis realizados al extracto fueron los siguientes.

3.5.2.1 Determinación del contenido de proteínas del extracto enzimático vegetal. Se realizó de acuerdo al método de LOWRY *et al.* (1951), el cual tiene como principio el desarrollo del color debido a la reacción de los enlaces peptídicos de los aminoácidos aromáticos de las proteínas y del cobre alcalino de uno de los reactivos y a la reducción del fosfomolibdato-fosfotungsteno del reactivo Folin-Ciocalteu. Para la determinación se realiza una curva estándar con seroalbumina de bovino (BSA) y se lee la absorbancia a 750 nm (ANEXO 3).

3.5.2.2 Medición de la fuerza del cuajo. Se determinó de acuerdo al método descrito por ALAIS (1985) y modificado en la temperatura (30°C), el contenido de calcio el cual fue aumentado hasta 0,3 g y el pH el cual fue 5,5 con el fin de favorecer la coagulación de la leche (ANEXO 4). Este método se define como los litros de leche que es capaz de coagular un gramo de cuajo en un tiempo de 40 minutos (2400 s) a una temperatura dada.

3.5.2.3 Tiempo de coagulación. Se aplicó el método descrito por INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION, IDF/FIL 110, Appendix A (1987), modificado del método de Berridge, el cual se basa en el tiempo que transcurre en aparecer los primeros flóculos, desde el momento que se agrega la enzima coagulante en las paredes de una tubo que contiene sustrato Berridge (leche en

polvo descremada de bajo tratamiento térmico disuelta en cloruro de calcio 0,01M).

3.5.2.4 Determinación de la sinéresis del gel. Se utilizó el método propuesto por MARSHALL (1981) y modificado por CORTEZ (2002), que consiste en medir cuantitativamente el volumen de suero en una alícuota de 100 ml de leche a 30°C en baño María, a la cual se le adiciona 5 ml de enzima coagulante con agitación por 30 segundos. Después de 30 minutos se corta la cuajada en forma de cruz y luego de 10 minutos se cuantifica el suero liberado por medio de una probeta.

3.5.2.5 Determinación de la fuerza del gel obtenido. Se realizó según el método descrito por STORRY y GRAEME (1981), modificado por CORTEZ (2002), el cual tiene como principio medir la resistencia de la cuajada ante la presión mecánica, para así determinar su firmeza. Para ello se utilizó el equipo INSTRON 1011 con una fuerza de 50 N.

La cuajada fue preparada con 100 ml de leche cruda, a una temperatura de 35°C, adicionándole 0,03 g de cloruro de calcio, y utilizando 5 ml de extracto enzimático vegetal.

3.5.2.6 Electroforesis discontinua en geles PAA-SDS. Se realizó en placas, de acuerdo al método propuesto por LAEMLI (1970). Este método se basa en el uso de sistemas discontinuos en geles en presencia de SDS, y además que la separación de proteínas es independiente de la carga y depende sólo del tamaño. Para ello se utilizó el equipo Mini Protean 3 (ANEXO 5).

3.5.2.7 Cromatografía en columna DEAE celulosa. Se aplicó el método descrito por INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION, IDF/FIL 110 A (1987), el cual se basa en la separación de enzimas previamente dializadas, presentes en una muestra de cuajo, por medio de sucesivos lavados con dos tipos diferentes

de buffer en una columna de DEAE celulosa, para luego realizar pruebas de fuerza del cuajo a las fracciones obtenidas. Este procedimiento sólo se aplicó a la muestra obtenida del Jardín Botánico de la Universidad Austral de Chile.

3.5.2.8 Ultrafiltración en equipo Millipore. Se utilizaron celdas de 45 x 19 cm², provisto de agitación y membranas de polisulfona de 10 kDa y presión de 40psi, a fin de concentrar la preparación enzimática, para los tres muestreos y estabilidad del extracto vegetal.

3.5.2.9 Recuento total de bacterias mesófilas. Se realizó de acuerdo a (APHA, 1992), para lo cual se utilizó Agar Plate Count procediéndose a sembrar la muestra en profundidad y posteriormente incubando a 32°C por 48 horas a fin de estimar la inocuidad de la preparación enzimática.

3.5.2.10 Recuento de Enterobacterias. Se realizó de acuerdo a (APHA, 1992), en el cual se utilizó para este método agar bilis rojo neutro cristal violeta con glucosa (1%), la muestra se sembró en profundidad y la incubación se realizó a 35°C por 48 horas.

3.5.2.11 Recuento de Staphylococcus aureus. Se realizó de acuerdo a (APHA, 1992), en el cual se utilizó agar Baird Parker, al cual se le agregó previamente telurito de potasio y yema de huevo la muestra se sembró en superficie y la incubación se realizó a 35°C por 36 horas.

4. PRESENTACION Y DISCUSION DE RESULTADOS

4.1 Resultados de extracción de enzimas vegetales

En la extracción propuesta por AÑÓN y MARTINEZ (1996), en la cual se suspendieron las hojas en agua destilada previamente picadas en moledora eléctrica, no se obtuvieron buenos resultados para la fuerza del cuajo, debido a que el extracto vegetal obtenido mediante este método no fue capaz de coagular la leche. Con el método propuesto por GUPTA y ESKIN (1977), se obtuvo una fuerza del cuajo mejor. En el CUADRO 7 se presentan los resultados obtenidos para la fuerza del cuajo, suspendiendo las hojas en buffer acetato 0,01M (pH 5,5).

CUADRO 7. Fuerza del cuajo del extracto obtenido según GUPTA y ESKIN (1977), ultrafiltrado.

Repeticiones	Fuerza del cuajo (g/mL)
1	1: 2800
2	1:2680
3	1:2735
Promedio \pm D.E.	2738,33 \pm 60,06

La fuerza del cuajo obtenida en el extracto de maqui, coincide con lo obtenido por PEREZ (2004), en *Ulex europaeus* y RUIZ (2005) en maqui, los cuales también encontraron que el mejor método de extracción de proteínas correspondía al propuesto por GUPTA y ESKIN (1977), obteniendo valores promedio de fuerza del cuajo de 1:1696,13 g de cuajo /mL de leche para el caso de *Ulex europaeus* y 1:1175,75 (g/mL) para maqui, ambos sin concentrar.

4.2 Determinación de la temperatura y pH óptimo de actividad coagulante del extracto enzimático de origen vegetal

En la FIGURA 12, se presentan los resultados de fuerza del cuajo a diferentes temperaturas. Se observa que la temperatura correspondiente a 30°C alcanza un máximo de fuerza del cuajo de 1:2800 (g/ml), temperatura que es similar a la mencionada por MACEDO *et al.* (1993), quienes trabajaron con Cynarasas a temperaturas entre 27 y 29°C, además VIOQUE *et al.* (2000), señalan que la mayor fuerza del cuajo en extractos vegetales se obtiene entre 29 y 28°C.

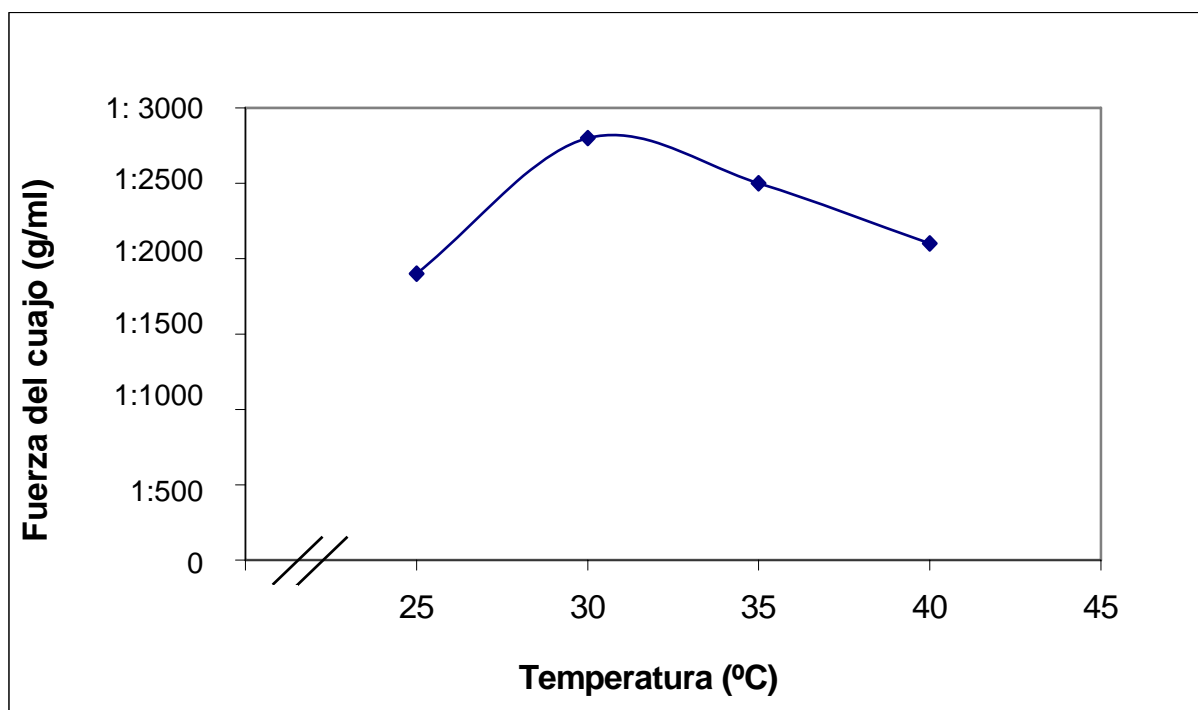


FIGURA 12. Temperatura óptima del extracto enzimático de maqui ultrafiltrado.

El resultado obtenido, coincide con lo encontrado por PEREZ (2004) en *Ulex europaeus* y RUIZ (2005) en maqui, ambos sin concentrar, puesto a que la actividad máxima para estos extractos fue a pH 5,5 con una fuerza del cuajo de 1:2010 y 1:1175,75 (g/ml) respectivamente.

En la FIGURA 13, se puede observar que el pH óptimo de actividad coagulante corresponde a 5,5 con una fuerza del cuajo de 1:2800 (g/ml), lo cual coincide con PEREZ (2004), en *Ulex europaeus* y RUIZ (2005), en maqui, quienes obtuvieron una fuerza de 1:2010 y 1:1333 (g/ml) respectivamente en muestras sin concentrar.

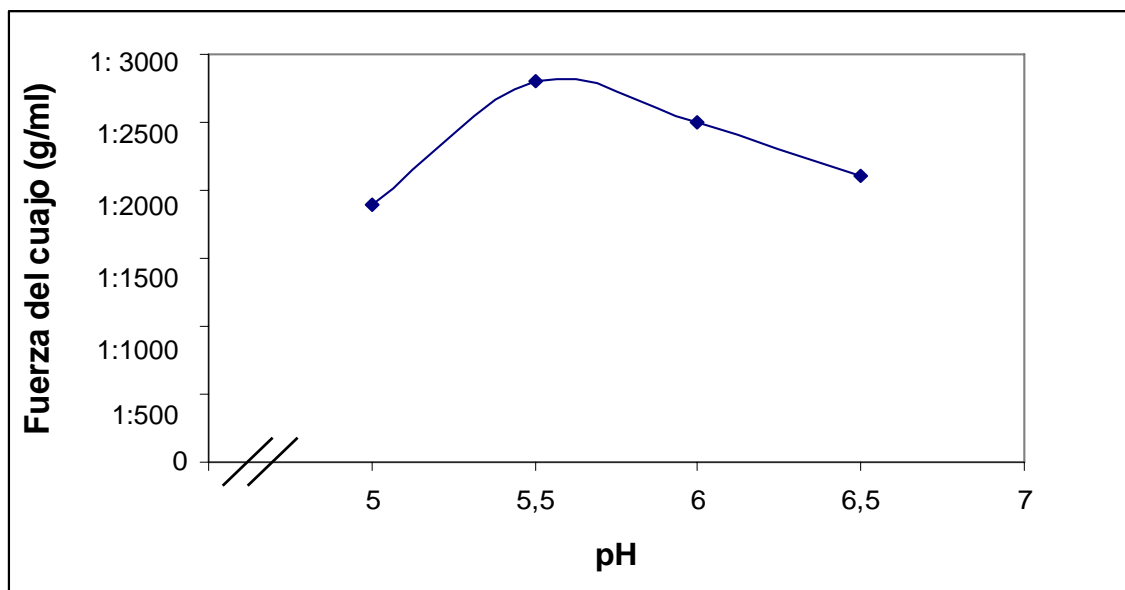


FIGURA 13: pH óptimo del extracto enzimático de maqui ultrafiltrado.

Por su parte VIERA DE SÁ y BARBOSA (1976), trabajaron con *Cynara cardunculus* a tres diferentes pH 6,6, 6,4 y 5,8, encontrando el óptimo a pH 5,8.

Además, Veríssimo et al. citado por VIOQUE *et al.* (2000), señalaron que en el extracto de las flores de *Cynara cardunculus*, se aislaron tres proteasas del grupo aspárticas llamadas cynarasas, las cuales fueron purificadas y caracterizadas en términos de actividad, presentando una máxima actividad a pH 5.1.

4.3 Contenido de proteínas y humedad de la hoja de maqui (*Aristotelia chilensis* Mol.)

Los resultados de la determinación de humedad y de proteína total para los tres muestreos se presentan en el CUADRO 8.

CUADRO 8. Contenido de proteína y humedad en hojas de maqui (*Aristotelia chilensis* Mol.)

Muestreos	Muestras	Humedad (%)	Proteína (%) (Base Húmeda)	Proteína (%) (Base seca)
1	1	56,04	3,93	8,94
	2	54,70	3,98	8,78
	3	53,50	4,50	9,68
	$\bar{X} \pm \sigma$	$54,75 \pm 1,270b$	$4,13 \pm 0,315a$	$9,13 \pm 0,480a$
2	1	57,56	4,90	11,55
	2	60,15	4,21	10,56
	3	58,24	4,49	10,75
	$\bar{X} \pm \sigma$	$58,65 \pm 1,343c$	$4,53 \pm 0,347a$	$10,95 \pm 0,525a$
3	1	51,53	5,92	12,21
	2	51,57	5,93	12,24
	3	50,75	5,93	12,04
	$\bar{X} \pm \sigma$	$51,28 \pm 0,462a$	$5,93 \pm 0,0057b$	$12,16 \pm 0,107b$

El análisis de varianza realizado indicó que existen diferencias estadísticamente significativas en el contenido de humedad entre muestreos ($p < 0,05$)(ANEXO 6).

Las diferencias en el contenido de humedad en hojas de maqui de los tres muestreos, se debe primordialmente a las condiciones climáticas presentadas en el día del muestreo. De acuerdo a datos proporcionados por la Estación

Meteorológica del Instituto de Geociencia de la Facultad de Ciencias de la Universidad Austral de Chile (ANEXO 7), el día (02/08/05) correspondiente al segundo muestreo, se tuvieron 10,4 mm de precipitación, mientras que para el día (12/05/05) correspondiente al primer muestreo, se presentaron 0,2 mm, y por último en el tercer muestreo (13/09/05), no hubo precipitaciones, lo cual concuerda con los resultados de humedad obtenidos en los tres muestreos, puesto a que el mayor porcentaje de humedad se presentó en el segundo muestreo.

En cuanto al contenido de proteínas de las hojas de maqui se observó que también existen diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre los muestreos realizados (ANEXO 8). Los resultados indican, que en el tercer muestreo se encuentra el promedio más alto de proteína total en base seca, con un porcentaje de $12,16 \% \pm 0,107$.

Según BARCELO *et al.* (2001), el aumento en el contenido de proteínas de las plantas se debe a su estado de senescencia, por lo que las hojas utilizadas en los análisis pudieron ser de diferentes edades, es por eso que se obtuvieron resultados diversos en cada uno de los muestreos realizados.

4.4 Caracterización del extracto enzimático de maqui ultrafiltrado

4.4.1 Contenido de proteínas del extracto enzimático de maqui ultrafiltrado. El contenido de proteínas del extracto enzimático vegetal ultrafiltrado, implicaría una mayor actividad proteolítica del extracto y una adecuada fuerza del cuajo, mayor que la obtenida con extracto sin concentrar.

Los resultados señalados en el CUADRO 9 para el contenido de proteínas en el extracto enzimático vegetal, indican que no existen diferencias significativas entre muestreos ($p > 0,05$) (ANEXO 9).

El contenido de proteínas promedio del extracto enzimático vegetal ultrafiltrado fue de 20,67 mg/g, similar a lo obtenido por PEREZ (2004), en *Ulex europaeus*, quien obtuvo un promedio de proteínas de 22,18 mg/g y superior al obtenido por RUIZ (2005), que fue de 12,63 mg/g, ambos extractos sin concentrar. El cálculo de la expresión de proteínas mg/g se presenta en el ANEXO 10, donde además se presentan los resultados de los análisis duplicados a la hoja de maqui, a los extractos enzimáticos de cada muestreo y los resultados de la ultrafiltración realizada al extracto de maqui, en la cual la enzima se concentró cuatro veces.

CUADRO 9. Contenido de proteínas del extracto enzimático de maqui ultrafiltrado.

Muestréos	Muestras	Proteínas (mg/g)
1	1	18,32
	2	22,76
	3	18,36
	$\bar{X} \pm \sigma$	19,81 \pm 2,551a
2	1	19,05
	2	22,03
	3	18,15
	$\bar{X} \pm \sigma$	19,74 \pm 2,031a
3	1	19,86
	2	23,19
	3	25,28
	$\bar{X} \pm \sigma$	22,77 \pm 2,734a
Cuajo estándar	1	30,7
	2	29,4
	3	29,8
	$\bar{X} \pm \sigma$	29,97 \pm 0,665

Se observa, que el contenido de proteínas es mayor para el cuajo estándar, el cual obtuvo un promedio de proteínas de 29,9 mg/g.

4.4.2 Fuerza del cuajo del extracto enzimático de maqui ultrafiltrado. En el CUADRO 10 se presentan los resultados obtenidos para la fuerza del cuajo del extracto enzimático vegetal.

CUADRO 10. Fuerza del cuajo del extracto enzimático de maqui ultrafiltrado.

Muestreos	Muestras	Fuerza del cuajo (g/mL)
1	1	1:2.875
	2	1:2.598
	3	1:3.050
	$\bar{X} \pm \sigma$	1:2.841,0 \pm 227,9a
2	1	1:2.993
	2	1:3.179
	3	1:2.910
	$\bar{X} \pm \sigma$	1:3.027,3 \pm 137,7a
3	1	1:2.935
	2	1:3.048
	3	1:3.179
	$\bar{X} \pm \sigma$	1:3.054,0 \pm 121,1a
Cuajo estándar	1	1: 282.353
	2	1:342.857
	3	1: 282.353
	$\bar{X} \pm \sigma$	1:302.521 \pm 34.932

De acuerdo a los resultados obtenidos en la fuerza del cuajo, no se determinaron diferencias estadísticamente significativas para la fuerza del cuajo entre las diferentes preparaciones enzimáticas ($p > 0,05$) (ANEXO 11).

En cuanto a la fuerza del cuajo del extracto enzimático vegetal comparado a la fuerza del cuajo estándar, se puede apreciar que existe una gran diferencia entre ellos. Al observar el promedio entre los tres muestreos se obtiene que 1 gramo de extracto enzimático vegetal es capaz de coagular 2,9 litros de leche en un tiempo de 40 minutos, a un pH de 5,5 y una temperatura de 30°C, en cambio para el cuajo estándar se obtiene que 1 gramo de cuajo es capaz de coagular 302,5 litros de leche bajo las mismas condiciones de pH y temperatura.

Al comparar estos resultados con RUIZ (2005), el cual trabajó con extracto de maqui sin concentrar, determinó que 1 gramo de cuajo es capaz de coagular 1,3 litros de leche a pH 5,5, lo cual es 2,2 veces inferior a los resultados obtenidos con el cuajo ultrafiltrado.

PEREZ (2004), por su parte, determinó que 1 g de cuajo vegetal extraído de *Ulex europaeus* sin concentrar es capaz de coagular 1,9 litros de leche a 30°C, pH 5,5 lo cual también resulta ser inferior a lo obtenido por el extracto de maqui concentrado, lo cual demuestra que el proceso de Ultrafiltración logró concentrar las proteínas reflejado en la fuerza del cuajo obtenida.

4.4.3 Tiempo de coagulación del extracto enzimático de maqui ultrafiltrado. El tiempo de coagulación esta basado en la reacción primaria de la coagulación enzimática de la leche, en la cual la k-caseína es hidrolizada por la enzima coagulante (ROBINSON, 1991).

En el CUADRO 11, se presentan los resultados obtenidos para el tiempo de coagulación del extracto enzimático vegetal correspondiente a los tres muestreos y el obtenido con cuajo estándar.

CUADRO 11. Tiempo de coagulación del extracto enzimático de maqui ultrafiltrado.

Muestreos	Muestras	Tiempo de coagulación (s)
1	1	412
	2	406
	3	410
	$\bar{X} \pm \sigma$	409,3 \pm 3,05 a
2	1	406
	2	393
	3	407
	$\bar{X} \pm \sigma$	402,0 \pm 7,81a
3	1	407
	2	399
	3	396
	$\bar{X} \pm \sigma$	400,7 \pm 5,69a
Cuajo estándar	1	272
	2	286
	3	280
	$\bar{X} \pm \sigma$	279,3 \pm 7,02

Para el tiempo de coagulación, tampoco se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre muestreos ($p > 0,05$) (ANEXO 12).

Al comparar el tiempo de coagulación del extracto enzimático vegetal y el del cuajo estándar, se aprecia que el cuajo estándar presenta un menor tiempo de coagulación, debido a que deben transcurrir 279 segundos para que ocurra la floculación de la leche, en cambio para el extracto enzimático vegetal es necesario que transcurran 404 segundos para que aparezcan los primeros flóculos.

Al comparar estos resultados con PEREZ (2004), el cual trabajó con *Ulex europaeus* sin concentrar, determinó que deben transcurrir 728 s para que se produzca la floculación de la leche, lo cual resulta ser mayor a lo obtenido por el extracto de maqui concentrado.

Los resultados obtenidos para el extracto de maqui concentrado están relacionados directamente con los valores obtenidos para contenido de proteínas del extracto, ya que a menor contenido de proteínas, mayor es el tiempo de coagulación que posee. De igual forma, se demuestra en el tercer muestreo, puesto a que se obtuvo un menor tiempo de coagulación y un mayor contenido de proteínas del extracto enzimático vegetal.

4.4.4 Sinéresis del gel con extracto enzimático de maqui ultrafiltrado.

Según WALSTRA *et al.* (1999), la cantidad de suero que queda retenido en la cuajada determina muchas de las características de las distintas variedades de quesos, tales como dureza, textura, velocidad e intensidad de maduración, entre otros.

En el CUADRO 12 se presentan los resultados de sinéresis del gel obtenido utilizando extracto enzimático de maqui ultrafiltrado y cuajo estándar.

CUADRO 12. Sinéresis del gel del extracto enzimático de maqui ultrafiltrado.

Muestreos	Muestras	Sinéresis del gel (ml)
1	1	11,0
	2	14,8
	3	12,5
	$\bar{X} \pm \sigma$	12,8 \pm 1,91a
2	1	11,2
	2	11,7
	3	12,2
	$\bar{X} \pm \sigma$	11,7 \pm 0,50a
3	1	16,0
	2	11,0
	3	14,0
	$\bar{X} \pm \sigma$	13,7 \pm 2,52a
Cuajo estándar	1	30
	2	33
	3	29
	$\bar{X} \pm \sigma$	30,7 \pm 2,08

Para la sinéresis del gel, no se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre los muestreos ($p > 0,05$) (ANEXO 13).

Se puede apreciar que el volumen promedio de suero obtenido con cuajo estándar es mayor al obtenido utilizando extracto enzimático vegetal los cuales corresponden a 30,7 mL y 12,7 mL respectivamente. Esto significa que la cuajada del extracto enzimático vegetal es menos firme o más blanda que la obtenida con el cuajo estándar, lo cual se debe a un desuerado incompleto por

parte del extracto vegetal, que conlleva a tener un mayor contenido de humedad. Al comparar este resultado con el obtenido por PEREZ (2004), con un promedio de 5,5 ml de suero para el extracto obtenido de *Ulex europaeus*, se aprecia que éste presentó una sinéresis mucho menor, por lo tanto la cuajada sería más blanda que la obtenida con extracto de maqui concentrado.

4.4.5 Fuerza del gel del extracto enzimático de maqui ultrafiltrado. El CUADRO 13 presenta los resultados obtenidos para la fuerza del gel utilizando extracto enzimático de maqui.

CUADRO 13. Fuerza del gel con extracto enzimático de maqui ultrafiltrado.

Muestreos	Muestras	Fuerza del gel (g _f)
1	1	6,8
	2	8,7
	3	7,5
	$\bar{X} \pm \sigma$	7,7 ± 0,96a
2	1	6,8
	2	7,5
	3	7,5
	$\bar{X} \pm \sigma$	7,3 ± 0,40a
3	1	9,4
	2	6,8
	3	8,1
	$\bar{X} \pm \sigma$	8,1 ± 1,30a
Cuajo estándar	1	15,25
	2	15,25
	3	16,37
	$\bar{X} \pm \sigma$	15,62 ± 0,65

De acuerdo a los resultados obtenidos, no se determinaron diferencias estadísticamente significativas para la fuerza del gel entre muestreos ($p > 0,05$) (ANEXO 14).

Se puede apreciar, que el valor promedio en los tres muestreos para la fuerza del gel con cuajo vegetal comparado al valor promedio obtenido con el cuajo estándar es menor, estos corresponden a 7,7 gf y 15,6 gf respectivamente, por lo tanto la cuajada elaborada con extracto enzimático vegetal es menos firme y mucho más blanda que la elaborada con cuajo estándar (ANEXO 15).

Al comparar estos resultados con PEREZ (2004), quien obtuvo un promedio de 4,7 gf con extracto obtenido de *Ulex europaeus* sin concentrar, se aprecia que presentó una fuerza del gel menor a la obtenida con extracto de maqui concentrado.

Finalmente, al observar los valores promedios para fuerza del gel del extracto enzimático de maqui en los tres muestreos y relacionarlos con sinéresis del gel, se observa que al existir una mayor expulsión de suero, se obtiene una cuajada mas firme (AMIOT 1991). Esto se refleja en el extracto del tercer muestreo en el cual se presenta una mayor expulsión de suero (13,7 ml) y una mayor fuerza del gel (8,1 gf).

4.4.6 Electroforesis discontinua en geles PAA-SDS. GARCIA (2000), señala que para romper las interacciones entre moléculas y desnaturalizar por completo las proteínas se utiliza en el buffer y en el gel SDS, que es un detergente aniónico en dodecil sulfato de sodio que permite disociar las proteínas o mezclas de ellas, debido a que las proteínas al ser tratadas con SDS forman complejos proteínas – SDS que se comportan como polianiones de modo que su separación se hace independiente de la carga y sólo depende del tamaño.

La FIGURA 14 muestra los resultados obtenidos en la electroforesis realizada.

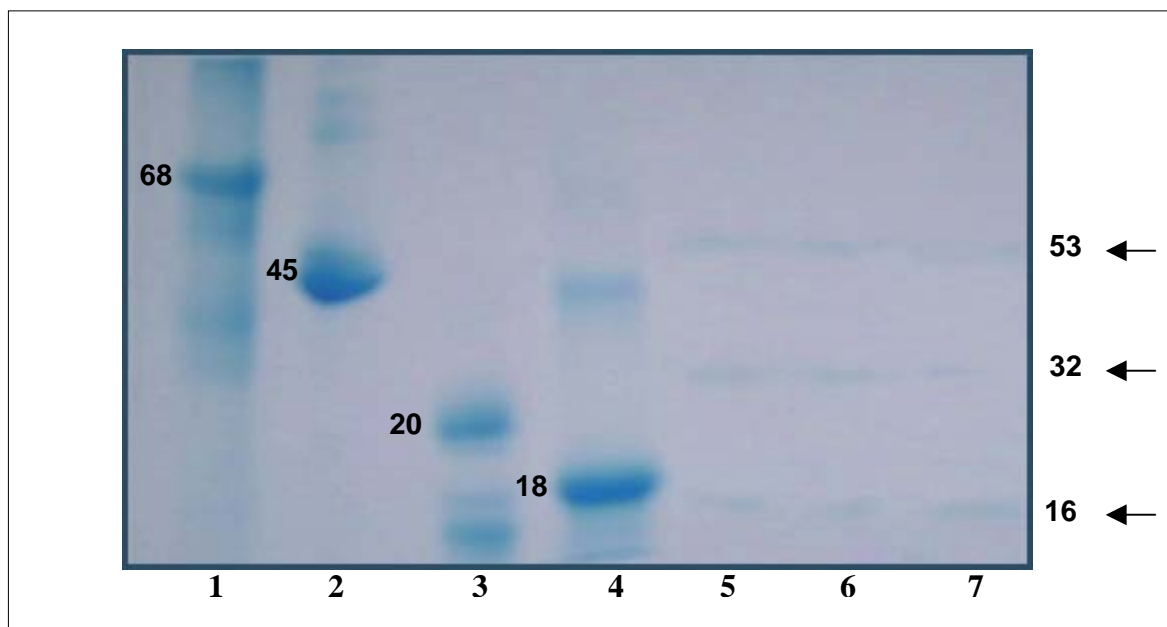


FIGURA 14. Electroforesis PAA-SDS del extracto enzimático de maqui y estándares de peso molecular*.

* 1, 2, 3, 4 estándares de peso molecular correspondientes a: albúmina fracción V, albúmina, Tripsina y β -lactoglobulina respectivamente. Banda 5, 6 y 7 extractos vegetales de muestreos 1, 2 y 3 respectivamente.

Se observa que las bandas correspondientes a los tres muestreos son poco visibles, en comparación a los estándares utilizados, esto se debe a la baja concentración de proteínas obtenidas en el extracto.

Para obtener los pesos moleculares de las bandas encontradas para el extracto enzimático vegetal, se realizó el cálculo del R_f (movilidad relativa) para los estándares de peso molecular, el cual corresponde a la relación entre la distancia de migración de la proteína y la distancia de migración del frente iónico.

La FIGURA 15 muestra el gráfico de Rf v/s Log del peso molecular de los estándares utilizados y la interpolación de los valores de Rf de las proteínas del extracto enzimático vegetal para encontrar los pesos moleculares correspondientes.

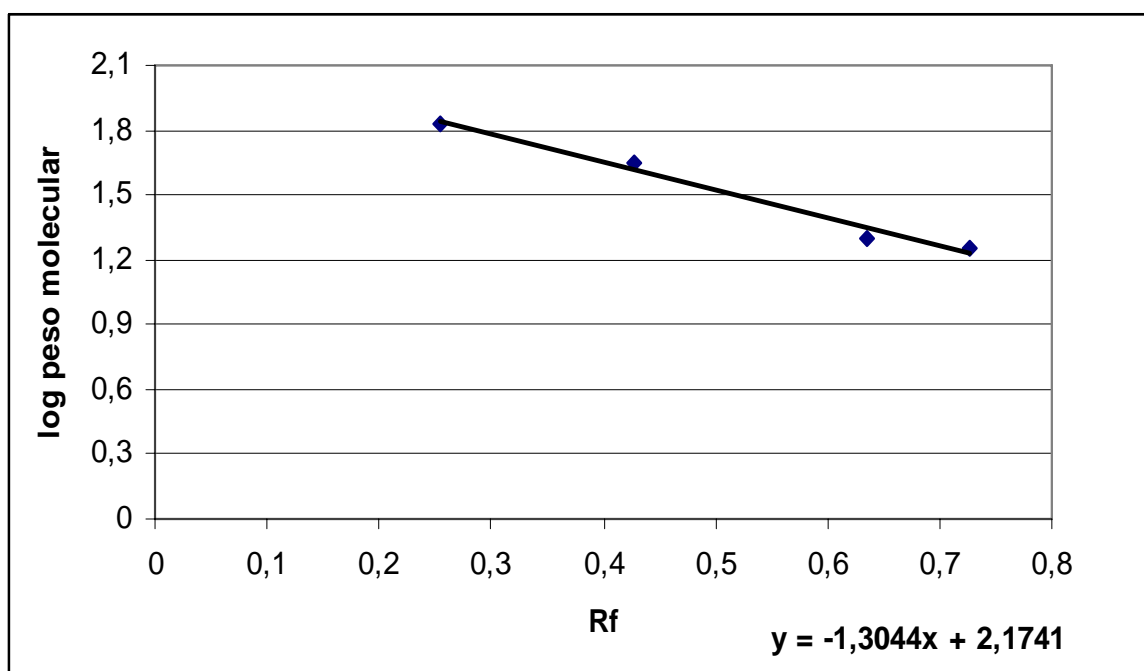


FIGURA 15. Gráfico de movilidad relativa (Rf) v/s peso molecular.

De acuerdo a la migración de las proteínas estándares, se obtuvieron los pesos moleculares de las proteínas presentes en los extractos vegetales ultrafiltrados correspondientes a los tres muestreos, estos valores corresponden a 53, 32 y 16 Kda (ANEXO 16), algo diferente a los pesos moleculares de 44,3 y 17,3 kda determinados por RUIZ (2005), quien preparó extractos enzimáticos con hojas de maqui sin concentrar.

4.4.7 Cromatografía en columna DEAE celulosa. El objetivo de realizar la cromatografía consistió en obtener la separación de las enzimas presentes en el extracto enzimático de maqui ultrafiltrado.

En la FIGURA 16 se observa el perfil de elución del extracto enzimático de maqui y del cuajo estándar.

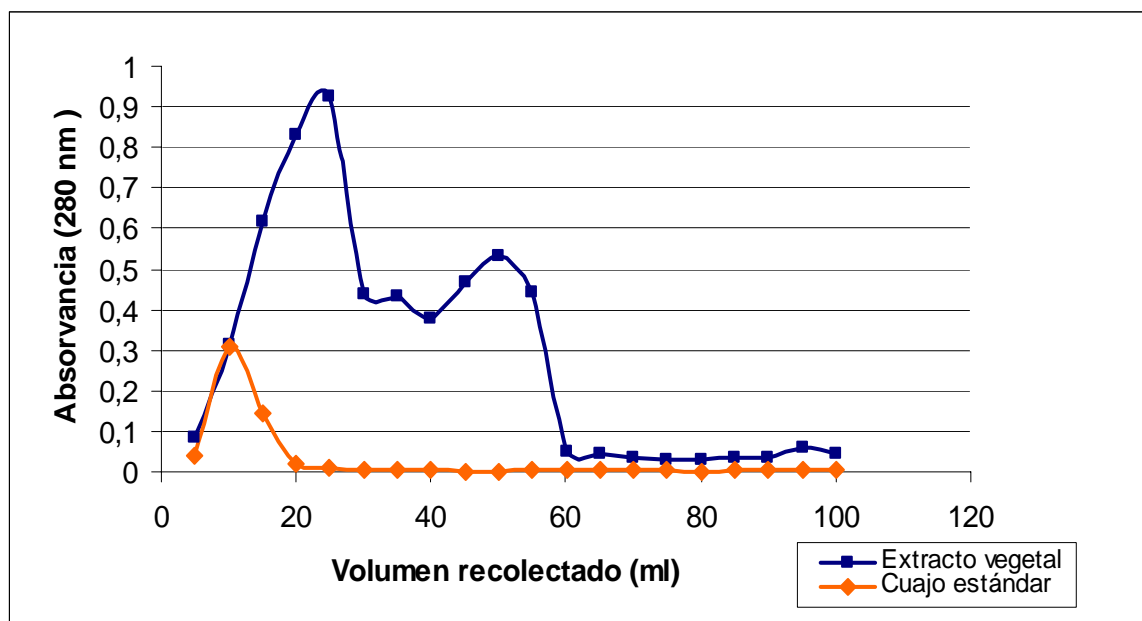


FIGURA 16. Perfil de elución del extracto enzimático de maqui (muestreo 1) y del cuajo estándar.

Se puede apreciar que el extracto enzimático vegetal presenta el pico más alto durante la primera elución a los 20 ml de recolección en la cual se utilizó buffer NaCl 0,20M. En cambio, para el cuajo estándar el pico más alto se alcanzó a los 10 ml de recolección, por lo tanto se habría producido la elución de la quimosina en esta etapa de la separación.

HEIMGARTNER *et al.* (1990), señalan que las enzimas encontradas en *Cynara cardunculus*, específicamente cynarasa 2 eluye a los 20 ml de recolección lo cual es similar a los obtenido por el extracto enzimático de maqui.

En el CUADRO 14 se presenta la fuerza del cuajo de los principales picos de absorbancia del extracto enzimático de maqui ultrafiltrado.

CUADRO 14. Fuerza del cuajo de los principales picos de absorbancia del extracto enzimático de maqui ultrafiltrado.

Nº tubo y ml de elución	Fuerza del cuajo (g/ml)
3,4,5 y 20 ml	1:2008
9,10,11y 50 ml	1:1416

De acuerdo a los resultados obtenidos, la enzima eluída en la primera fracción presentó una mayor fuerza del cuajo que la eluída durante la segunda fracción, por lo tanto corresponderían a las fracciones de quimosina y pepsina respectivamente. El cuajo estándar por su parte no contiene pepsina.

4.5 Estudio de estabilidad del extracto enzimático de maqui ultrafiltrado

4.5.1 Efecto de la adición de sorbato de potasio sobre la actividad coagulante del extracto enzimático de maqui ultrafiltrado. En el CUADRO 15 se presentan los resultados obtenidos para la actividad coagulante del extracto enzimático de maqui en los tratamientos sin sorbato y con conservante.

CUADRO 15. Efecto de la adición de sorbato de potasio sobre la actividad coagulante del extracto enzimático de maqui concentrado.

Tratamiento	Meses							
	T ₀		T ₁		T ₂		T ₃	
	F.C	T.C	F.C	T.C	F.C	T.C	F.C	T.C
Enzima UF sin sorbato K	1:2855	412	1:2875	415	1:3058	400	1:3582	408
Enzima UF con sorbato K	1:2806	417	1:2418	427	1:2500	444	1:2359	470

FC: Fuerza del cuajo (g/ml) TC: Tiempo de coagulación (s).

Se puede apreciar que el valor más alto para la fuerza del cuajo del extracto enzimático vegetal sin sorbato de potasio, se presenta al tercer mes con 1:3582 (g/ml), en cambio para el tratamiento con sorbato de potasio se obtuvo la mayor fuerza al inicio del estudio (T_0), la cual fue de 1: 2806 (g/ml).

Con respecto al tiempo de coagulación para el caso del extracto enzimático vegetal sin sorbato de potasio, se observa que en los dos últimos meses (T_2 y T_3) se obtuvo un tiempo de coagulación menor, en cambio para el extracto vegetal con sorbato de potasio, el menor tiempo se obtuvo al inicio del estudio (T_0).

En la FIGURA 17 se destaca el efecto del sorbato de potasio sobre la fuerza del cuajo durante los tres meses de estudio.

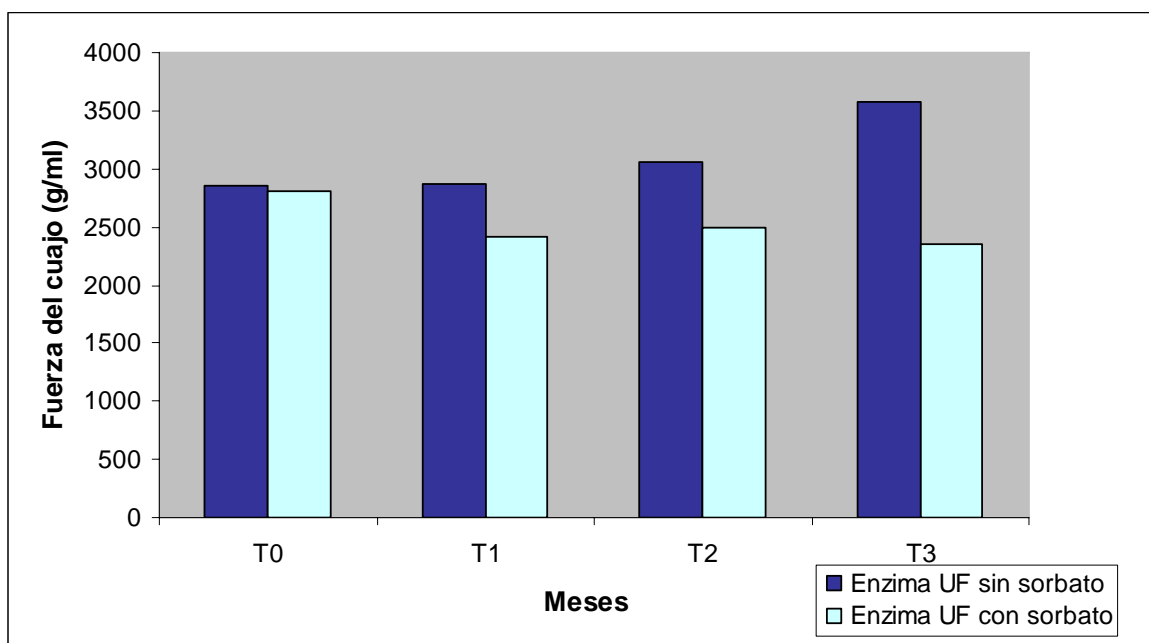


FIGURA 17. Efecto de la adición de sorbato de potasio sobre la fuerza del cuajo del extracto enzimático de maqui ultrafiltrado.

Se puede apreciar que la muestra control experimenta un aumento a partir del primer mes, en cambio la muestra con sorbato de potasio presenta una disminución a través del tiempo en su actividad coagulante, por lo cual el sorbato de potasio ejercería un efecto inhibitorio sobre ésta. El hecho de que se presente un aumento en la fuerza del cuajo de la muestra sin sorbato de potasio durante los tres meses de estudio, podría deberse a una sobreacidificación de la leche calentada a 30°C y a pH 5,5, producida por las bacterias mesófilas presentes en el extracto, las cuales fueron aumentando a través del tiempo.

En la FIGURA 18 se muestra el efecto del sorbato de potasio sobre el tiempo de coagulación del extracto enzimático vegetal durante los tres meses de estudio.

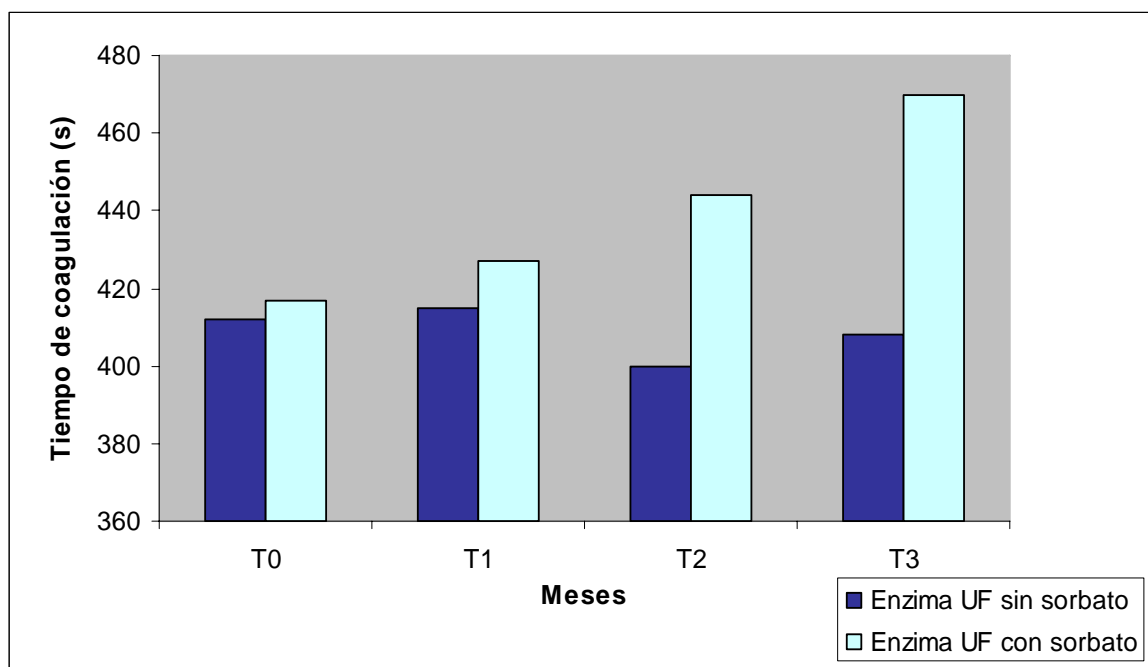


FIGURA 18. Efecto de la adición de sorbato de potasio sobre el tiempo de coagulación del extracto enzimático ultrafiltrado de maqui.

Al comparar ambos tratamientos, se observa que el tiempo de coagulación del extracto enzimático vegetal con sorbato de potasio presenta un aumento a

través del tiempo lo cual no es favorable si se quiere utilizar como método de conservación. En cambio el extracto vegetal sin sorbato de potasio no experimenta mayores variaciones en el tiempo de coagulación durante el tiempo de almacenamiento.

Por otro lado, GUINEE (2004), señala que el efecto de las sales sobre la actividad coagulante del cuajo se debe a la fuerza iónica del medio. Al aumentar la fuerza iónica del medio por la adición de sales, se observa un aumento en el tiempo de coagulación del cuajo.

Según DAVIAU *et al.* (2000), el aumento en la fuerza iónica conduce a una protección de la carga negativa sobre la quimosina y de la carga positiva sobre la k-caseína lo cual impide la atracción enzima-sustrato. A baja fuerza iónica la atracción entre quimosina y k-caseína se ve favorecida por las cargas positivas de la k-caseína, por lo tanto la adición de aniones provoca la inhibición de la hidrólisis de la k-caseína por la quimosina y de la agregación de micelas de paracaseína, entonces no se produce la coagulación de la leche.

4.5.2 Efecto de la adición de sorbato de potasio sobre la calidad microbiológica del extracto enzimático de maqui ultrafiltrado. Los sorbatos son conservantes químicos (agentes antimicrobianos) capaces de retrasar o prevenir el desarrollo de microorganismos como la levadura, bacterias y hongos. Sus principales mecanismos son la reducción del agua y el aumento de la acidez (GHADEER, 1997).

Para el caso de recuento de enterobacterias, no se obtuvo contaminación microbiológica en ambos tratamientos analizados durante los tres meses de estudio, al igual que en el recuento de *Staphylococcus aureus*, en el cual no se encontró presencia de este microorganismo en los dos tratamientos. En tanto para el recuento de bacterias mesófilas, se observó desarrollo de éstas, sin

embargo no se presentaron mayores variaciones a lo largo de los tres meses de estudio en ambos tratamientos, considerando que durante el desarrollo de este estudio no se trabajó bajo condiciones estériles.

En la FIGURA 19, se presentan los resultados del recuento total de bacterias aerobias mesófilas expresados como logaritmo de unidades formadoras de colonias ufc/ml por tres meses del extracto enzimático vegetal concentrado.

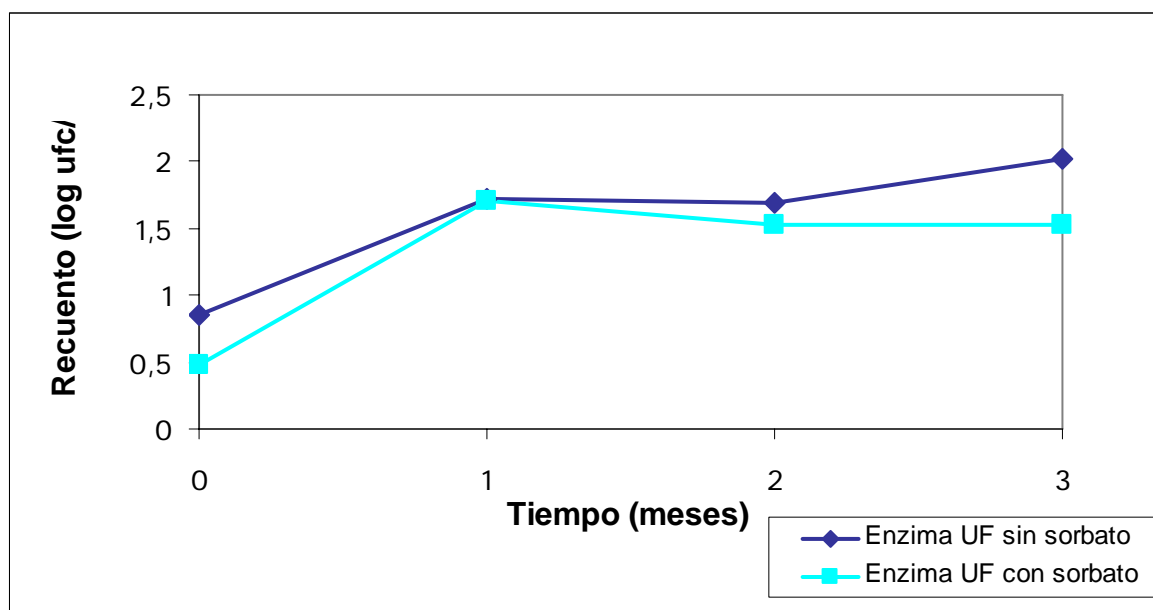


FIGURA 19. Recuento total de bacterias aerobias mesófilas en el extracto enzimático de maqui ultrafiltrado.

Se puede apreciar que el sorbato de potasio utilizado fue capaz de prevenir o reducir la proliferación de microorganismos presentes en el extracto enzimático vegetal, evitando que sean sobrepasados los límites exigidos para los cuajos, cuyo máximo permitido para bacterias mesófilas es 10^5 ufc/ml (ESPAÑA, MINISTERIO DE LA PRESIDENCIA, 1996).

Por lo tanto, el extracto enzimático de maqui se conservó adecuadamente al adicionarle sorbato de potasio, debido a la capacidad inhibitoria de esta sal sobre los microorganismos, pero no resultó adecuada la adición de este conservante sobre la fuerza del cuajo del extracto enzimático, puesto que ejerce un efecto inhibitorio sobre ésta. Sin embargo, también se debería investigar el efecto de otros conservantes, tales como benzoato de sodio o NaCl.

Finalmente, se puede concluir que de acuerdo a los resultados de estabilidad del extracto de maqui, el método de conservación mas favorable sería sin la adición de conservantes, ya que se mantiene adecuadamente durante los tres meses de estudio tanto en la fuerza del cuajo como en la calidad microbiológica, lo cual concuerda con lo obtenido por HERNANDEZ (1995), quien trabajó con abomaso de cabrito ultrafiltrado, obteniendo como método de conservación más adecuado la enzima ultrafiltrada sin conservante químico.

5. CONCLUSIONES

- Con el proceso de Ultrafiltración, se logró aumentar la fuerza del cuajo del extracto enzimático de maqui 2,2 veces respecto a la enzima sin concentrar.
- El pH y temperatura óptima de actividad coagulante del extracto enzimático de maqui ultrafiltrado fue de 5,5 y 30°C, respectivamente.
- El contenido de proteínas del extracto enzimático de maqui fue inferior al obtenido en el cuajo estándar.
- La fuerza del cuajo, tiempo de coagulación, sinéresis del gel y fuerza del gel están directamente relacionados con el contenido de proteínas del extracto enzimático vegetal, ya que comparado con el cuajo estándar, el extracto vegetal presenta menor contenido de proteínas y por lo tanto una menor actividad coagulante.
- A través de la electroforesis se observó la presencia de tres proteínas en el extracto enzimático de maqui, con pesos moleculares de 53, 32 y 17 Kda.
- La mejor estabilidad en el tiempo la presenta el extracto vegetal sin la adición de conservantes, ya que mantiene adecuadamente durante los tres meses del estudio tanto la fuerza del cuajo como su calidad microbiológica.

6. RESUMEN

El objetivo de la presente investigación fue obtener un extracto enzimático de hojas de la planta nativa maqui y concentrarlo mediante ultrafiltración para su utilización en quesería.

Se realizaron tres muestreos durante el periodo invierno – primavera, se efectuaron análisis de humedad y proteínas a las hojas de la planta y luego se obtuvo el extracto enzimático vegetal al cual se le realizaron pruebas de fuerza del cuajo, tiempo de coagulación, sinéresis del gel y fuerza del gel.

Posteriormente se sometió el extracto enzimático vegetal a una electroforesis con el fin de determinar los pesos moleculares de las proteínas presentes en el extracto y finalmente mediante cromatografía en DEAE celulosa separar las enzimas coagulantes presentes en el extracto.

Los resultados señalaron que las mejores condiciones para realizar la extracción enzimática fue a pH 5,5 y a una temperatura de 30°C. Al comparar los resultados obtenidos en actividad coagulante del extracto vegetal con los del cuajo estándar utilizado denotan una gran diferencia entre ellos, debido a que este último presenta una actividad coagulante mayor que el extracto estudiado bajo las condiciones especificadas.

En cuanto a la mejor estabilidad del extracto vegetal en el tiempo, la presenta el extracto sin la adición de conservantes, ya que mantiene adecuadamente durante los tres meses del estudio su actividad coagulante y su calidad microbiológica.

SUMMARY

The objective of this investigation was to obtain an enzymatic extract from leaves of the native plant maqui and to concentrate it by means of ultrafiltration for use in cheeses.

Three samples were done during the winter - spring period; analysis of moisture and proteins were made to the leaves of the plant and then the vegetable enzymatic extract was obtained to which tests of rennet strength, coagulation time, sineresis of the gel and gel strength were realized.

Later the vegetable enzymatic extract was submitted to electrophoresis with the purpose of finding the molecular weights of proteins present in the extract and finally by means of chromatography in cellulose DEAE to separate the coagulating enzymes present in the extract.

The results indicated that the best conditions to make the enzymatic extraction were pH 5.5 and to a temperature of 30°C. When comparing the results obtained in coagulating activity of the vegetable extract with those of the used standard rennet it was denoted that there was a great difference between them, because the standard rennet presents a coagulating activity greater than the extract studied under the specified conditions.

As for the best stability of the vegetable extract through time, the extract without the addition of preservatives presents the best conditions, since it adequately maintains itself during the three months of the study its coagulating activity and its microbiological quality

7. BIBLIOGRAFIA

ALAIS, CH. 1985. Ciencia de la leche. Principios de Técnica Lechera. Editorial Reverté S.A. Barcelona, España. 873p.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. APHA. 1992. Standard methods for the Examination of Dairy Products. 16th Edition. 547 p.

AMIOT, J. 1991. Ciencia y Tecnología de la leche. Editorial Acribia S.A. Zaragoza, España. 547p.

AÑON, M. y MARTINEZ, E. 1996. Proteínas de Amaranto II: preparación de aislados de diferente composición y grado de desnaturalización. Simposio Iberoamericano sobre proteínas para alimentos. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Buenos Aires. Argentina. pp 59-64.

ARIAS, P. 2002. Factores que influyen en la coagulación enzimática de la leche. Laboratorio de Bromatología de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad Nacional de Córdoba. Córdoba, Argentina. Available at: <http://www.unne.edu.ar/cyt/2002/08-Exactas> (Accesed: 14/04/04).

ASSOCIATION OF ANALYTICAL CHEMISTS, AOAC. 1995. Volumen I. Method 930.01. Moisture in plants. Pirr

BADUI, 1997. Química de los Alimentos. Editorial Pearson Educación. México. 648p.

- BARBOSA, M., VASSAL, E. y MOCQUOT, G. 1976. L'utilisation d'extrait de *Cynara cardunculus* L. comme agent coagulant en fabrication de fromages à pâte cuite. Lait. 54: 1-7.
- BARCELO, J. 2001. Fisiología Vegetal. Ediciones Pirámide. Madrid, España. 350p.
- BELITZ, H y GROSH, W. 1997. Química de los Alimentos. Editorial Acribia S.A. Zaragoza, España. 1087p.
- BENÍTEZ, 2000. Aplicación Industrial de enzimas. Laboratorio de Ciencia y Tecnología de la Leche de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zulia. Maracaibo, Zulia. Venezuela. Available at: [www. Members. tripod. com.ve](http://www.Members.tripod.com.ve) (Accesed: 16/04/04)
- BIVAR, L; BARBOSA, M; AMES, J; WILBEY, A. 2003. Cheesemaking with vegetable coagulants, the use of *Cynara L.* for the production of ovine milk cheeses. International Journal of Dairy Technology. 56(2): 76-83
- BROOME, M.C.; LIMSOWTIN, G.K.Y. 1998. Milk coagulants. The Australian Journal of Dairy Technology. 53: 188 – 190
- CARBONELL, M; NUÑEZ, M; FERNANDEZ, E. 2002. Seasonal variation compounds in ewe raw milk La Serena cheese. Lait. 82: 699-711
- CHERYAN, M. 1998. Ultrafiltration and Microfiltration. Technomic Publishing Company, Inc. Lancaster, Pennsylvania.527p.

- CHILE, MINISTERIO DE SALUD. 2003. Reglamento Sanitario de los Alimentos. Editorial Génova. Santiago, Chile. 170p.
- CHILE, MINISTERIO DE VIVIENDA Y URBANISMO. 2005. El Maqui. Parque Metropolitano de Santiago. Chile. (<http://www.zoologico.cl/~prodesign/floranativa/maqui.pdf>) visitada el 07/09/2005.
- CHYMAX. 1990. Memoria de registro de Chy – max (CHIMOSINA). Madrid, España. 106 p.
- CORTEZ, X. 2002. Composición de proteínas de la leche y su relación con pruebas de aptitud tecnológica. Tesis Lic. Ingeniería en Alimentos, Facultad de Agronomía. Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias Agrarias. 103p.
- DAVIAU, C; PIERRE, A; FAMELART, M; GOUDEDRANCHE, H; JACOB, D; GARNIER, M; MAUBOIS, J. 2000. Characterisation of whey drainage kinetics during sofá cheese manufacture in relation with the physicochemical and technological factors, pH at renneting, casein concentration and ionic strength of milk. Lait. 80: 417-432
- DOMINGUEZ, W. 2004. Ultrafiltración. Instituto Zamorano. Honduras. Available at: <http://www.geocities.com/wildominguez/ultra.htm>. (Accesed: 25/10/04)
- EL- SHENAWY, M y MARTH, E. 1988. Sodium Benzoate inhibits growth of or inactivats Listeria Monocytogenes. Journal of Food Protection. 51(7):525-530.

- ESPAÑA, MINISTERIO DE LA PRESIDENCIA. 1996. Norma General de Identidad y Pureza para el Cuajo y otras Enzimas Coagulantes de Leche destinados al mercado interior. España. Available at: www.tecnologiadelqueso.com/download/NG_cuajos_e.doc (Accesed: 25/10/04)
- FERNANDEZ, H; AUDAY, R; FRAILE, E; PIRPIGNANI, L; CASCONO, O. 1999. Purification and characterization of an acid proteinase from mesophilic *Mucor* sp. solid-state cultures. *Journal of Peptide Research*. 53: 599-605.
- GARCÍA, H. 2000. Electroforesis en geles de poliacrilamida: Fundamentos, actualidad e importancia. Facultad de Biología Universidad de La Habana, Cuba. Available en: www.bvs.sld.cu/revistas/uni/vol1_2_00/uni07200.htm.(Accesed: 14/11/05)
- GHADEER, F. 1997. Resistance of yeast Flora of Labaneh to Potassium Sorbate and Sodium Benzoate. *Journal of Dairy Science*. 80: 2304-2309
- GUINEE, T. 2004. Salting and the role of salt in cheese. *International Journal of Dairy Technology*. 57(2): 99-103
- GUPTA, C; ESKIN, N. 1977. Potential Use of Vegetable Rennet in the Production of Cheese. *Food Technology*. 62 – 66
- HEIMGARTNER, U; PIETRZAK, M; GEERTSEN, R; BRODELIUS, P; FIGUEIREDO, A.C; PAIS, M.S. 1990. Purification and Partial Characterizacion of Milk Clotting Proteases from Flowers of *Cynara Cardunculus*. *Phytochemistry*. 29: 1411 – 1415

- HERNÁNDEZ, C. 1995. Estabilidad de la enzima coagulante de abomaso de cabrito ultrafiltrada. Tesis Licenciado en Bioquímica. Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias. Valdivia. Chile. 108p.
- HOFFMANN, E. 1997. Flora Silvestre de Chile. Zona Araucana. Ed. Fundación Claudio Gay, Santiago, Chile. 257 p
- INDA, A. 2000. Optimización de Rendimiento y Aseguramiento de Inocuidad en la Industria de la Quesería. Proyecto OEA/GTZ de Gestión de la Calidad en la Pequeña y Mediana Empresa (PYME). México. Available at: http://www.science.oas.org/OEA_GTZ/LIBROS/QUESO/cap2_que.htm. (Accesed: 08/12/05)
- INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION, IDF/FIL. 1991. New applications of Membranes Processes. N° 9201. 6p
- INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION, IDF/FIL. 1987. Determination of the clotting time of milk to which a milk-clotting enzyme solution has been added (modification of Berrige's method). Appendix A: 110 A.
- INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION, IDF/FIL. 1987. Calf rennet and adult bovine rennet. Determination of Chymosin and bovine pepsine contents (Chromatografic method) 110 A. 3 p
- KIM, J; KANG, M; KIM, C. 2005. Fabrication of membranes for the liquid separation. Journal of Membrane Science. 265: 167-175.

- KIM, S; GUNASEKARAN, S; OLSON, N. 2004. Combined Use of Chymosin and Protease from *Cryphonectria parasitica* for Control of Meltability and Firmness of Cheddar Cheese. *Journal of Dairy Science*. 87: 274-283.
- LAEMMLI, V. 1970. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage. T4. *Nature* 227:680-685.
- LEHNINGER, 2001. *Principios de Bioquímica*. Editorial Omega. Barcelona, España. 1152p.
- LOWRY, O., ROSEBROUGH, N., FARR, A. y RANDALL, R. 1951. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *Journal of Biological Chemistry*. 193: 265-275.
- MACEDO, A.C.; MALCATA, F.; OLIVEIRA, J. 1993. The Technology, Chemistry, and Microbiology of Serra Cheese. *J. Dairy Science*. 76: 1725 – 1739.
- MARSHALL, R. 1981. An improved method for measurement of the syneresis of curd formed by rennet action on milk. *National Institute for Research in Dairying Reading RG2 9 AT. UK*. 26: 329-335.
- MATTHEI, J. 1995. *Manual de las malezas que crecen en Chile*. Santiago. Chile. pp 27, 258.
- MISTRY, V y KOSIKOWSKI, F. 1985. Influence of Potassium Sorbate and Hydrogen Peroxide on Psychrotrophic Bacteria in milk. *Journal of Dairy Science*. 68(3):605-608.

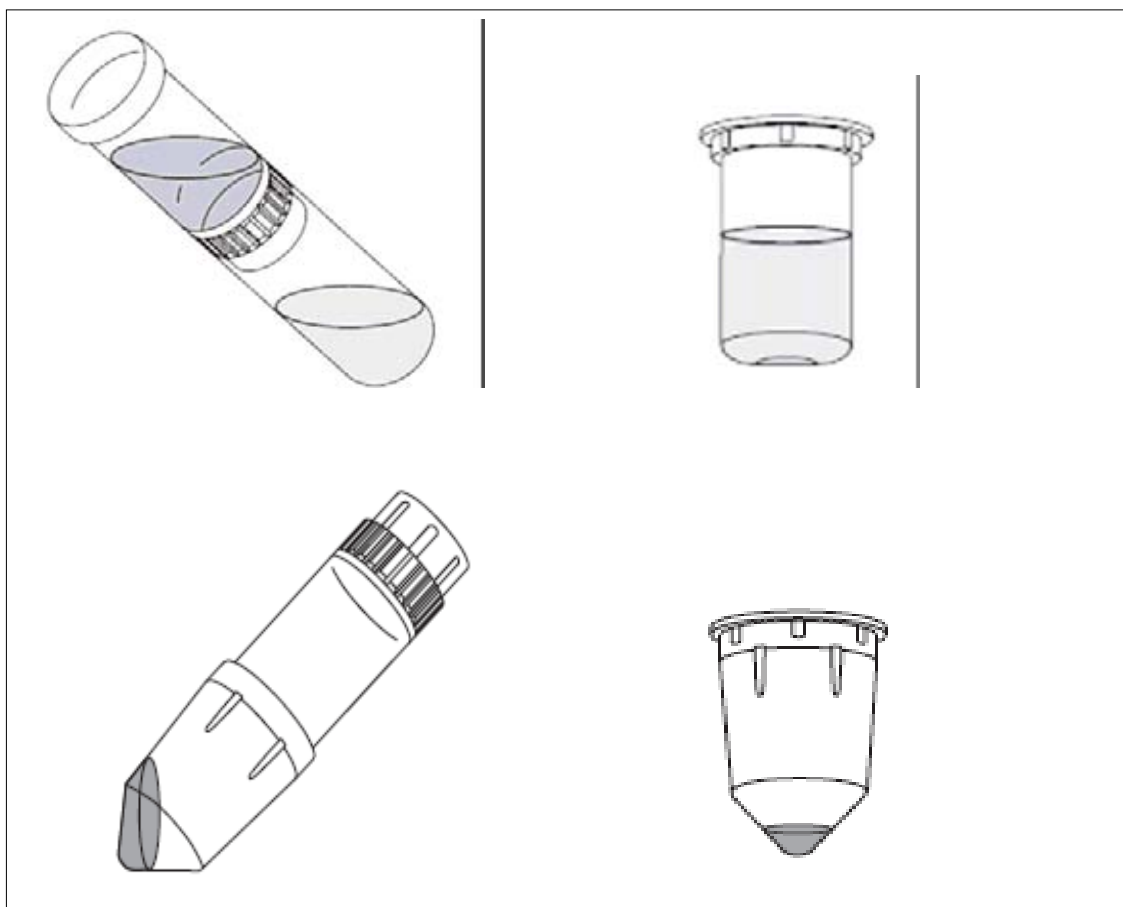
- MONTENEGRO, G. 2000. Chile Nuestra Flora Útil. Ediciones Universidad Católica de Chile. Santiago, Chile. 267 p.
- MORRIS, H.A y ANDERSON, K. 1991. A comparative Study of Cheddar Cheeses made with Fermentation Produced Calf Chymosin from *Kluyvermomyces Lactis* and with Calf Rennet. *Cultured Dairy Products Journal*. 13 – 20.
- O`MAHONY, J; SOUSA, M; MCSWEENEY, P. 2003. Proteolysis in miniature Cheddar-type cheeses made using blends of chymosin and *Cynara cardunculus* proteinases as coagulant. *International Journal of Dairy Technology*. 56(1): 52-57
- ORTIZ DE APODACA, M; AMIGO, L; RAMOS, M. 1994. Study of the milk-clotting and proteolytic activity of calf rennet, fermentation-produced chymosin, vegetable and microbial coagulants. *Milchwissenschaft*. 49: 13 – 16.
- PEREZ, J. 2004. Extracción de proteasas de *Ulex europaeus* L. y su potencial utilización como sustituto de cuajo. Tesis Lic. Ing. Alimentos, Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Austral de Chile, 118p.
- RAMÍREZ, M. A. 2003. El uso de coagulantes en quesería. *Industrias Lácteas*. 297: 68-70.
- ROBINSON, D. 1991. Bioquímica y valor nutritivo de los Alimentos. Editorial Acribia S. A. Zaragoza, España. 534p.

- RUIZ, J. 2005. Extracción y caracterización de proteasas de especies vegetales nativas y su potencial utilización en quesería. Tesis Lic. Ing. Alimentos, Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Austral de Chile. 85p.
- STEUBING, L.; GODOY, R y ALBERDI, M. 2002. Métodos de Ecología Vegetal. Ed. Universitaria. Santiago, Chile. 345 p.
- STORRY, E. y GRAEME, D. 1981. Some factors affecting the post clotting development of coagulum strength in rennet milk. *Journal of Dairy Research*. 49: 470-477.
- TUBESHA, Z. 2003. Rennin-like milk coagulant enzyme produced by a local isolate of *Mucor*. *International Journal of Dairy Technology*. 56 (4): 237-241.
- VALBUENA, E. 2003. Enzimas Coagulantes. Laboratorio de Ciencia y Tecnología de la Leche de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zulia. Maracaibo, Zulia. Venezuela. Available at: www.Members.tripod.com.ve (Accesed: 14/04/04)
- VAN DEN BERG, G. 1992. Fermentation – Produced Chymosin; Technological aspects of its use for cheesemaking. *Bulletin of the IDF*. 269: 13-17.
- VERISSIMO, P; FARO, C; MOIR, A; LIN, Y; TANG, J; PIRES, E. 1996. Purification, characterization and partial amino acid sequencing of two new aspartic proteinases from fresh flowers of *Cynara cardunculus* L. *European Journal Biochemistry*. 235: 762-768.

- VIEIRA DE SA, F. y BARBOSA, M. 1976. Cheese-making with a vegetable rennet from cardo (*Cynara cardunculus*). Journal of Dairy Research. 39: 335-343.
- VIOQUE, M; GOMEZ, R; SANCHEZ, E; MATA, C; TEJADA, L; FERNANDEZ-SALGUERO, J. 2000. Chemical and Microbiological Characteristics of Ewes' Milk Cheese manufactured with Extracts from Flowers of *Cynara cardunculus* and *Cynara humilis* as coagulant. J. Agric. Food Chem. 48: 451 – 456.
- WALSTRA, P; GEURTS, T; NOOMEN, A; JELLEMA, A.y S. VAN BOEKEL, M. 1999. Dairy Technology. Editor: Marcel Dekker. New York, USA. 727p.
- YUN, J; KIELY, J; KINDSTEDT, P; BARBANO, D. 1993. Mozzarella Cheese: Impact of Coagulant Type on Functional Properties. Journal of Dairy Science. 76: 3657-3663.
- ZHANG, F; CHEN, J; YANG, F; QIANG LI, L. 2005. Effects of age and suckling on chymosin and pepsin activities in abomasums of goat kids. International Journal of Dairy Technology. 58 (2): 115-118.

ANEXOS

ANEXO 1

Figura de filtros Centriplus de Millipore de concentración y recuperación.

ANEXO 2

Determinación del contenido de nitrógeno según STEUBING *et al.* (2002).

1. Preparación de la muestra.

- Se pesan 0,5 g de hojas de maqui y se agregan 2 tabletas Kjeldahl al tubo digestor. Luego agregar 20 ml de ácido sulfúrico concentrado (98%), mezclando en forma suave. Se deja reposar 5 min.

2. Digestión.

- Digerir la muestra por 90 minutos a 360°C. y luego enfriar el tubo.
- Agregar 50 ml de agua destilada a cada tubo.

3. Destilación

- Agregar 70 ml de hidróxido de sodio al 40%. Se recibe el destilado en un matraz erlenmeyer con 50 ml de ácido bórico y 0,2 ml de solución indicadora.

4. Titulación

Se titula el destilado con una solución de HCl 0,1N.

3. Blanco

Al mismo tiempo que se digieren las muestras, se debe digerir una muestra en blanco que contiene 2 ml de agua destilada y 0,25 g de sacarosa.

4. Resultados

$$\% \text{ (m/m) N} = \frac{0,14 (V - V_0)}{m} \times 6,25$$

Donde: V: volumen en ml utilizado en la titulación de la muestra.

V₀: volumen en ml utilizado en el blanco.

m: masa en g de muestra.

ANEXO 3

Determinación del contenido de proteínas, de acuerdo al método de LOWRY *et al.* (1951).

Materiales y equipos

- Solución A: Na_2CO_3 2% P/V disuelto en NaOH 0,1N.
- Solución B: $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ al 1% P/V y Tartrato de Na y K al 2% P/V. Mezclar en volúmenes iguales al momento de usar.
- Solución C: mezclar solución A y B en proporciones 50:1.
- Solución E: reactivo Folin- Ciocalteau 1N.
- Espectrofotómetro
- Jeringa Hamilton 100 μl .
- Pipetas 0,5 y 1,0 ml.

Metodología:

- Se miden 0,6 ml del extracto enzimático. Para la curva de calibración se utiliza una solución patrón Seroalbúmina de bovino (BSA) 2 mg/ml.
- Agregar a tubos de ensayo solución BSA en cantidades de 10, 20, 30, 40, 50, y 60 μl (20, 40, 60, 80, 100 y 120 μg de proteína) y completar con agua destilada hasta completar 0,6 ml.
- Se agrega a cada tubo 3 ml de solución C y se deja a temperatura ambiente por 10 minutos.
- Se agrega 0,3 ml de la solución E.
- Dejar durante 30 minutos a temperatura ambiente.
- Medir absorbancia a 750 nm.

Blanco: 0,6 mL de buffer.

(Continuación ANEXO 3)

Absorbancia a diferentes cantidades de solución BSA.

μl solución BSA (2 mg/ml)	μg de proteína	D.O. 750 nm
10	20	0,113
20	40	0,186
30	60	0,262
40	80	0,350
50	100	0,403
60	120	0,439

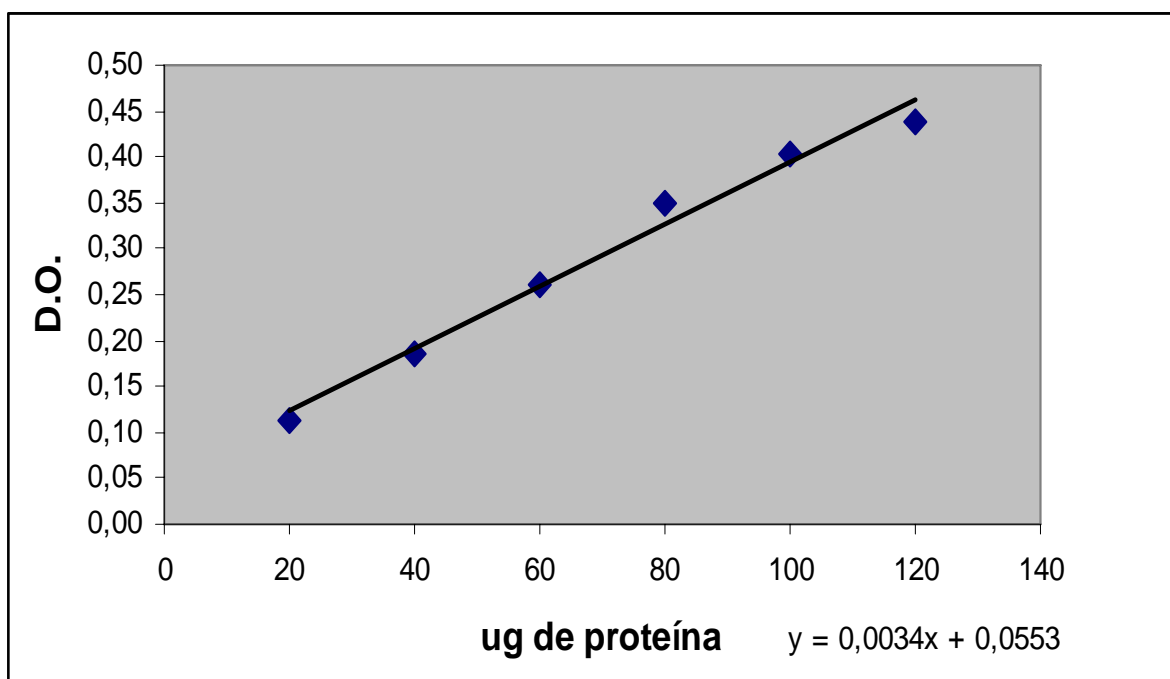


FIGURA 20. Curva de calibración obtenida de acuerdo al método de LOWRY *et al.* (1951).

ANEXO 4

Determinación de la fuerza del cuajo de acuerdo al método descrito por ALAIS (1985), modificado en la temperatura y contenido de calcio.

1. Material.

Se requiere un tarro de diámetro aproximado 10 -10,5 cm. con un orificio de 1 mm de diámetro, ubicado en el centro de la parte inferior del tarro.

2. Método.

- Se toman 500 mL de leche cruda y se le agrega 0,3 g de CaCl₂.
- Se ajusta el pH de la leche a pH 5,5 con adición de HCL 1N.
- Se calienta a 30 - 31°C.
- Se toman 100 mL de leche a 30°C, pH 5,5 y se colocan en el tarro con el orificio inferior tapado.
- Se agregan 5 mL de cuajo y se agita la leche.
- Se deja escurrir la leche por el orificio hasta que el goteo se detenga
- Se toma el tiempo (en segundos) desde que se comienza a agregar el cuajo hasta que se detiene el goteo.

3. Resultados.

$$\text{Poder coagulante} = \frac{100 \text{ (mL)} \times 2.400 \text{ (s)}}{P \text{ (g)} \times T \text{ (s)}}$$

Donde:

100: mL de leche utilizados

2400: segundos equivalente a 40 minutos

T: tiempo en segundos

P: gramos de cuajo utilizados

ANEXO 5

Electroforesis en geles de PAA-SDS. Método de LAEMMLI (1970) modificado en placa.

Reactivos.

- Solución A: Acrilamida BIS 30%.
- Solución B: 1,5 Tris-HCl pH 8,8.
- Solución C: 0,5 Tris-HCl pH 6,8.
- SDS 10%.
- Persulfato de amonio 1%.
- Temed.
- Buffer Electrodo pH 8,3 (6g tris, 28,8g glicina, 10ml SDS10%, 900ml agua destilada).
- Buffer Muestra (Solución C, glicerol 87%, SDS 10%, β mercaptoetanol 13M, azul de bromofenol 0,05%, agua destilada).
- Reactivos de Fijación y Tinción: Coomasie 0,25 g en 300 ml Isopropanol-Acido acético-Agua. Proporción: 2,5:1:2,5.
- Reactivo Decolorante (ácido acético 7%).

Preparación de los geles.

	Gel Separador	Gel Espaciador
Solución A	1,5 ml	0,25 ml
Solución B	1,25 ml	-
Solución C	-	0,625 ml
SDS 10%	50 μ l	25 μ l
Persulfato de amonio 1%	16,6 μ l	25 μ l
Temed	2,5 μ l	2,5 μ l
Agua destilada	2,2 ml	1,5725 ml
VOLUMEN FINAL	5 ml	2,5 ml

(Continuación ANEXO 5)**Procedimiento:**

- Preparar el gel separador y dejar gelificar por al menos 1 hora y luego preparar el gel espaciador. Montar el sistema. Hacer precorrida a 50v por 10 minutos.
- Colocar 25 μ l de las muestras del extracto enzimático vegetal y 10 μ l de los estándares de peso molecular, agregar buffer electrodos y conectar a la fuente de poder a 200v y 400mA.
- Dejar hasta que el frente iónico llegue 1cm antes de la parte inferior de la placa, aproximadamente 90 minutos.
- Sacar el gel del vidrio. Teñir y Fijar por 2 horas.
- Decolorar por 12 horas.
- Medir la migración de las bandas con pie de metro.

Preparación de las muestras de extracto enzimático para la electroforesis:

Muestreos	Proteína mg/ml	μ l muestra	μ l buffer muestra	μ l aplicados	μ g proteínas
1	1,981	100,96	504,80	25	9,9
2	1,976	101,21	506,05	25	9,9
3	2,277	87,83	439,15	25	11.4

ANEXO 6

Análisis estadístico del contenido de humedad en hojas de maqui.**Análisis de Varianza para Humedad - Sumas de Cuadrados de Tipo III**

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
EFFECTOS PRINCIPALES					
A: Muestreos	163,141	2	81,5707	41,05	0,0000
RESIDUOS	29,8079	15	1,9872		
TOTAL (CORREGIDO)	192,949	17			

Los cocientes F están basados en el error cuadrático medio residual.

Contraste Múltiple de Rango para Humedad según Muestreos

Método: 95,0 porcentaje HSD de Tukey			
Muestreos	Frec.	Media	Grupos homogéneos
2	6	51,28	X
3	6	54,7467	X
1	6	58,65	X
Contraste	Diferencias		+/- Límites
1 - 2	*7,37		2,123
1 - 3	*3,90333		2,123
2 - 3	*-3,46667		2,123

* indica una diferencia significativa.

ANEXO 7**Información meteorológica para los días de muestreo.**

Datos correspondientes a precipitaciones, temperatura y humedad relativa de los días de muestreo.

Día de muestreo	Precipitaciones (mm)	Temperatura (°C)	Humedad Relativa (%)
12/07/05	0,2	6,8	99,0
02/08/05	10,4	9,8	80,0
13/09/05	0	10,8	58,0

ANEXO 8

Análisis estadísticos para proteína total en base seca en hojas de maqui.

Análisis de Varianza para proteína base seca - Sumas de Cuadrados de Tipo III

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
EFFECTOS PRINCIPALES					
A: Muestreo	66,5891	2	33,2945	59,77	0,0000
RESIDUOS	8,35503	15	0,557002		
TOTAL (CORREGIDO)	74,9441	17			

Los cocientes F están basados en el error cuadrático medio residual.

Contraste Múltiple de Rango para proteína base seca según muestreo

Método: 95,0 porcentaje HSD de Tukey

Muestreo	Frec.	Media	Grupos homogéneos
2	6	9,315	X
1	6	10,02	X
3	6	13,7017	X

Contraste	Diferencias	+/- Límites
1 - 2	0,705	1,12398
1 - 3	*-3,68167	1,12398
2 - 3	*-4,38667	1,12398

* indica una diferencia significativa.

ANEXO 9

Análisis estadísticos para contenido de proteínas del extracto enzimático vegetal.

Análisis de Varianza para Proteínas del extracto - Sumas de Cuadrados de Tipo III

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
EFFECTOS PRINCIPALES					
A: Muestreos	35,7108	2	17,8554	3,52	0,0557
RESIDUOS	76,0168	15	5,06778		
TOTAL (CORREGIDO)	111,728	17			

Los cocientes F están basados en el error cuadrático medio residual.

Contraste Múltiple de Rango para Proteínas del extracto según Muestreos

Método: 95,0 porcentaje HSD de Tukey

Muestreos	Frec.	Media	Grupos homogéneos
2	6	19,7583	X
1	6	19,8167	X
3	6	22,775	X

Contraste	Diferencias	+/- Límites
1 - 2	0,0583333	3,3903
1 - 3	-2,95833	3,3903
2 - 3	-3,01667	3,3903

* indica una diferencia significativa.

ANEXO 10

Resultados de análisis realizados a la hoja y extracto de maqui.

Muestreo	M	Rep.	H (%)	PT (%)	PE (mg/g)	FC (g/ml)	TC (s)	SG (ml)	FG (gf)
1	1	1	56,12	3,93	18,75	1: 2857	419	10,0	6,25
		2	55,96	3,94	17,89	1:2892	405	12,0	7,50
	2	1	54,43	3,95	22,29	1:2513	407	14,2	8,75
		2	54,97	4,02	2,324	1:2682	406	15,3	8,75
	3	1	51,86	4,28	18,27	1:2962	412	13,1	7,50
		2	55,14	4,73	18,46	1:3137	408	120	7,50
2	1	1	58,15	4,85	18,75	1: 2909	410	12	7,50
		2	56,97	4,96	19,44	1:3077	401	10,3	6,25
	2	1	61,75	4,31	22,77	1:3200	390	11,5	7,50
		2	58,56	4,11	21,30	1:3158	395	11,8	7,50
	3	1	59,26	4,35	17,68	1:2857	405	12,1	7,50
		2	57,21	4,64	18,61	1:2963	408	12,3	7,50
3	1	1	51,15	5,92	19,78	1:2944	406	17	10,0
		2	51,90	5,92	19,93	1:2926	408	15	8,75
	2	1	51,80	5,94	23,61	1:3000	400	12	7,50
		2	51,34	5,92	22,77	1:3096	398	10	6,25
	3	1	49,90	5,97	24,74	1:3157	397	13	7,50
		2	51,59	5,89	25,82	1:3200	395	15	8,75

Donde: H: humedad (%) P.T: Proteína total (%) P.E: Proteína del extracto (mg/ml)
 FC: Fuerza del cuajo (g/mL) TC: Tpo de coagulación (s) SG: Sinéresis del gel (ml)
 FG: Fuerza del gel (gf).

Cálculo de Proteínas del extracto en mg/g:

$$\begin{array}{l}
 0,5 \text{ g} \longrightarrow 5\text{mL extracto} \\
 X \longrightarrow 15 \text{ mL extracto final}
 \end{array}
 \qquad
 \frac{1,875 \text{ mg/ml} \times 15 \text{ ml}}{1,5 \text{ g}} = 18,15 \text{ mg/g}$$

$$X = 1,5 \text{ g}$$

(Continuación ANEXO 10)

Volúmenes obtenidos en el proceso de Ultrafiltración.

Muestreo	Rep.	Vol. Entrada (mL)	Vol. Salida (mL) (Permeado)	Volumen Concentrado (mL) (Retenido)
1	1	260	200	60
	2	250	188	62
	3	262	198	64
2	1	270	202	68
	2	259	196	63
	3	261	199	62
3	1	258	193	65
	2	265	201	64
	3	268	202	66

Luego:

$\frac{\text{Volumen entrada (mL)}}{\text{Volumen concentrado (mL)}} = \text{Factor de concentración}$

Ejemplo de cálculo: $\frac{260}{60} = 4,3 \approx 4$

ANEXO 11

Análisis estadísticos para fuerza del cuajo del extracto enzimático vegetal.

Análisis de Varianza para Fuerza del cuajo - Sumas de Cuadrados de Tipo III

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
EFFECTOS PRINCIPALES					
A: Muestreos	162240,0	2	81120,1	3,05	0,0776
RESIDUOS	399576,0	15	26638,4		
TOTAL (CORREGIDO)	561816,0	17			

Los cocientes F están basados en el error cuadrático medio residual.

Contraste Múltiple de Rango para Fuerza del cuajo según Muestreos.

Método: 95,0 porcentaje HSD de Tukey

Muestreos	Frec.	Media	Grupos homogéneos
1	6	2840,5	X
2	6	3027,33	X
3	6	3053,83	X

Contraste	Diferencias	+/- Límites
1 - 2	-186,833	245,801
1 - 3	-213,333	245,801
2 - 3	-26,5	245,801

* indica una diferencia significativa.

Cálculo para Fuerza del cuajo: 10 g hoja \longrightarrow 100ml buffer acetato
 X \longrightarrow 5 ml extracto obtenido
X = 0,5 g

ANEXO 12

Análisis estadísticos para tiempo de coagulación del extracto enzimático vegetal.

Análisis de Varianza para Tiempo de coagulación - Sumas de Cuadrados de Tipo III

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
EFFECTOS PRINCIPALES					
A: Muestreos	274,333	2	137,167	3,53	0,0553
RESIDUOS	582,167	15	38,8111		
TOTAL (CORREGIDO)	856,5	17			

Los cocientes F están basados en el error cuadrático medio residual.

Contraste Múltiple de Rango para Tiempo de coagulación según Muestreos

Método: 95,0 porcentaje HSD de Tukey

Muestreos	Frec.	Media	Grupos homogéneos
3	6	400,667	X
2	6	401,5	X
1	6	409,333	X

Contraste	Diferencias	+/- Límites
1 - 2	7,83333	9,38227
1 - 3	8,66667	9,38227
2 - 3	0,833333	9,38227

* indica una diferencia significativa.

ANEXO 13

Análisis estadísticos para sinéresis del gel del extracto enzimático vegetal.

Análisis de Varianza para Sinéresis del gel - Sumas de Cuadrados de Tipo III

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
EFFECTOS PRINCIPALES					
A: Muestreos	12,04	2	6,02	1,76	0,2061
RESIDUOS	51,36	15	3,424		
TOTAL (CORREGIDO)	63,4	17			

Los cocientes F están basados en el error cuadrático medio residual.

Contraste Múltiple de Rango para Sinéresis del gel según Muestreos

Método: 95,0 porcentaje HSD de Tukey			
Muestreos	Frec.	Media	Grupos homogéneos
2	6	11,6667	X
1	6	12,7667	X
3	6	13,6667	X
Contraste	Diferencias		+/- Límites
1 - 2	1,1		2,78674
1 - 3	-0,9		2,78674
2 - 3	-2,0		2,78674

* indica una diferencia significativa.

ANEXO 14

Análisis estadísticos para fuerza del gel del extracto enzimático vegetal.

Análisis de Varianza para Fuerza del gel - Sumas de Cuadrados de Tipo III

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
EFFECTOS PRINCIPALES					
A: Muestreos	2,08333	2	1,04167	1,09	0,3611
RESIDUOS	14,3229	15	0,954861		
TOTAL (CORREGIDO)	16,4063	17			

Los cocientes F están basados en el error cuadrático medio residual.

Contraste Múltiple de Rango para Fuerza del gel según Muestreos

Método: 95,0 porcentaje HSD de Tukey			
Muestreos	Frec.	Media	Grupos homogéneos
2	6	7,29167	X
1	6	7,70833	X
3	6	8,125	X
Contraste	Diferencias		+/- Límites
1 - 2	0,416667		1,47163
1 - 3	-0,416667		1,47163
2 - 3	-0,833333		1,47163

* indica una diferencia significativa.

ANEXO 15

Imágen de cuajo vegetal y cuajo estándar HALA.

Cuajo Vegetal**Cuajo Estándar**

ANEXO 16

Obtención de pesos moleculares de proteínas del extracto enzimático vegetal encontradas utilizando electroforesis en geles de PAA-SDS.

Posillo nº	Proteína	Dist. de Migración (cm)	Rf	P.M. (KDa)
1	Albúmina Fr. v	1,74	0,254	68
2	Albúmina	2,93	0,428	45
3	Tripsina	4,34	0,635	20
4	β -lactoglobulina	4,97	0,727	18
5	Muestreo 1	2,56	0,357	53
		3,83	0,560	32
		5,21	0,763	16
6	Muestreo 2	2,56	0,357	53
		3,83	0,560	32
		5,21	0,763	16
7	Muestreo 3	2,56	0,357	53
		3,83	0,560	32
		5,21	0,763	16