



OBTENCIÓN, CARACTERIZACIÓN Y DETERMINACIÓN DE pH ÓPTIMO DE LA PROTEASA DEL CARDO (*Cynara cardunculus L.*) APLICABLE EN LA TECNOLOGÍA QUESERA.

HERNÁNDEZ González, María. HERNÁNDEZ Centeno, Francisco. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, ILINA, Anna. RUELAS Chacón, Xóchitl. REBOLLOSO Padilla, Oscar N.

Dpto. de Nutrición y Alimentos. Buenavista, Saltillo, Coah. 25315, Tel. (844)4110324. maryhg12@yahoo.com.

Palabras clave: quesos, cardo, proteasas.

Introducción. Como muchas enzimas coagulantes, la proteasa del Cardo (*C. cardunculus L.*) inicia la coagulación de la leche por fractura del enlace Phe₁₀₅-Met₁₀₆ de la caseína κ (1). Como la conformación de las proteínas depende, en parte, de sus cargas eléctricas, habrá un pH en el cual la conformación será la más adecuada para la actividad catalítica (2). El coagulante obtenido de las flores de cardo (*C. cardunculus L.*) ha sido usado de forma empírica en algunas regiones del bajío Mexicano, sin que se hayan establecido condiciones óptimas de uso de este coagulante vegetal (3).

Objetivo. Obtener, caracterizar y determinar la actividad de la proteasa de las flores del cardo (*C. cardunculus L.*) en función al pH, para el establecimiento de condiciones óptimas en la tecnología quesera.

Metodología. Se recolectó el material biológico a evaluar. Se realizó una purificación parcial del extracto proteico de flores de cardo (*C. cardunculus L.*) por medio de precipitación con sulfato de amonio en 5 concentraciones, posteriormente se sometió a diálisis, para eliminar el exceso de sales, y se realizó una segunda purificación por cromatografía de intercambio catiónico. La evaluación de la actividad y del pH óptimo se realizaron con seguimiento cinético, en espectrofotómetro U.V. a 280 nm con la metodología descrita por Dujovich y Esquivel, (1995), y la caracterización se realizó basándose en el arreglo gráfico de Lineweaver-Burk para la ecuación de Michaelis-Menten. La cuantificación de proteína, se realizó por método Bradford.

Resultados y Discusión. La proteasa del cardo (*C. cardunculus L.*) presentó comportamiento michaeliano, al igual que la renina del cuajo animal, con parámetros cinéticos $V_{max}=1.68 \times 10^{-2}$ U_{ABS}/min y $K_m=2.16 \times 10^{-3}$ mM/ml (Fig. 1). En las cinéticas de actividad (en base a V_0) para determinación del pH óptimo de esta proteasa, las fracciones precipitadas en concentraciones de sulfato de amonio al 16.66 y 66.66% presentaron un pH óptimo de 6.6 y 6.3 respectivamente, lo que sugiere la existencia de un complejo enzimático, más que de una sola enzima, pero la mejor fracción para usarse en leche fresca es la de 66.66%, por desarrollar mayor actividad a pH 6.3 y tener los mayores rendimientos (Fig. 2), pues a pH 6.6 no existe diferencia significativa ($p \geq 0.05$) entre la actividad desarrollada por las fracciones precipitadas al 66.66 y 83.33%. La fracción de 16.66%, que presentó buena actividad cinética a pH 6.6, no

tiene utilidad práctica por su bajo rendimiento, y porque no mostró actividad en la evaluación práctica (fig. 2).

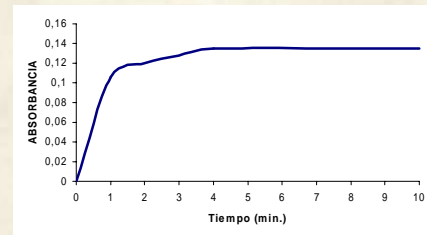


Fig.1. Cinética de formación de caseinomacropéptido en reacción enzimática sobre solución de caseína al 2% a pH 6.3

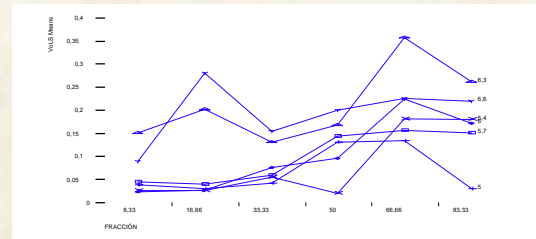


Fig. 2. Cinéticas de actividad (V_0), a diferente pH, de las fracciones del extracto de flor de Cardo.

Conclusiones. La proteasa del cardo (*C. cardunculus L.*) se ajusta al comportamiento michaeliano. La evaluación cinética de las fracciones, variando pH, demuestra la presencia de un complejo enzimático, más que la actividad de una sola enzima. Para el establecimiento de condiciones tecnológicas prácticas, la evaluación de fracciones demuestra como mejores a las de 66.66 y 83.33% con las mayores actividades a pH 6.3 y 6.6, que corresponden al pH de la leche fresca, por lo que se recomienda usar esas fracciones combinadas en la tecnología quesera práctica, en función a los rendimientos del extracto obtenido.

Bibliografía.

1. FARO, C. J. (1991). *Purificação e caracterização Físico-Química da protease de Cynara cardunculus L.* Coimbra, ed. aut., p. 163. <http://www.uc.pt/sdp/teses/>,
2. GONZÁLEZ M., J.M. (2005). *Bioquímica y Biología Molecular.* <http://www.ehu.es/biomoleculas/ENZ/ENZ2-2.htm#ph>.
3. HERNÁNDEZ G., M; HERNÁNDEZ C., F. (2004). Obtención y Caracterización de proteasas con aplicación en la industria quesera a partir del cardo. (*Cynara cardunculus L.*) Tesis de Licenciatura. U.A.A.A.N, Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.