



Universidad de San Carlos de Guatemala
Facultad de Ingeniería
Escuela de Ingeniería Química

**EXTRACCIÓN DE LA QUIMOSINA PRODUCIDA DE FORMA NATURAL A TRAVÉS DEL
CUARTO ESTÓMAGO DE TERNERO A PARTIR DE DIFERENTES TIEMPOS DE
EXTRACCIÓN Y EDADES DEL BOVINO A ESCALA LABORATORIO**

Gabriela Marlene Caal Martínez

Asesorado por la Inga. Telma Maricela Cano Morales

Guatemala, octubre de 2015

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA



FACULTAD DE INGENIERÍA

**EXTRACCIÓN DE LA QUIMOSINA PRODUCIDA DE FORMA NATURAL A TRAVÉS DEL
CUARTO ESTÓMAGO DE TERNERO A PARTIR DE DIFERENTES TIEMPOS DE
EXTRACCIÓN Y EDADES DEL BOVINO A ESCALA LABORATORIO**

TRABAJO DE GRADUACIÓN

PRESENTADO A LA JUNTA DIRECTIVA DE LA
FACULTAD DE INGENIERÍA

POR

GABRIELA MARLENE CAAL MARTÍNEZ

ASESORADO POR LA INGA. TELMA MARICELA CANO MORALES

AL CONFERÍRSELE EL TÍTULO DE

INGENIERA QUÍMICA

GUATEMALA, OCTUBRE DE 2015

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE INGENIERÍA



NÓMINA DE JUNTA DIRECTIVA

DECANO	Ing. Pedro Antonio Aguilar Polanco
VOCAL I	Ing. Angel Roberto Sic García
VOCAL II	Ing. Pablo Christian de León Rodríguez
VOCAL III	Inga. Elvia Miriam Ruballos Samayoa
VOCAL IV	Br. Raúl Eduardo Ticún Córdova
VOCAL V	Br. Henry Fernando Duarte García
SECRETARIA	Inga. Lesbia Magalí Herrera López

TRIBUNAL QUE PRACTICÓ EL EXAMEN GENERAL PRIVADO

DECANO	Ing. Angel Roberto Sic García
EXAMINADORA	Inga. María Alejandra Ma Villatoro
EXAMINADOR	Ing. Gerardo Ordoñez
EXAMINADOR	Ing. Erwin Manuel Ortíz Castillo
SECRETARIO	Ing. Hugo Humberto Rivera Pérez

HONORABLE TRIBUNAL EXAMINADOR

En cumplimiento con los preceptos que establece la ley de la Universidad de San Carlos de Guatemala, presento a su consideración mi trabajo de graduación titulado:

EXTRACCIÓN DE LA QUIMOSINA PRODUCIDA DE FORMA NATURAL A TRAVÉS DEL CUARTO ESTÓMAGO DE TERNERO A PARTIR DE DIFERENTES TIEMPOS DE EXTRACCIÓN Y EDADES DEL BOVINO A ESCALA LABORATORIO

Tema que me fuera asignado por la Dirección de la Escuela de Ingeniería Química, con fecha 13 de mayo de 2015.



Gabriela Marlene Caal Martínez



Guatemala, 14 de Junio de 2015

Ingeniero
Victor Manuel Monzón Valdez
Director Escuela de Ingeniería Química
Facultad de Ingeniería
Universidad de San Carlos de Guatemala
Presente.

Ingeniero Monzón:

Por medio de la presente HACEMOS CONSTAR que hemos revisado y dado nuestra aprobación al Informe Final del trabajo de graduación titulado "EXTRACCIÓN DE LA QUIMOSINA PRODUCIDA DE FORMA NATURAL A TRAVÉS DEL CUARTO ESTÓMAGO DE TERNERO A PARTIR DE DIFERENTES TIEMPOS DE EXTRACCIÓN Y EDADES DEL BOVINO A ESCALA LABORATORIO", de la estudiante de Ingeniería Química Gabriela Marlene Caal Martínez quien se identifica con el carné número 2007-14442.

Sin otro particular me suscribo de usted.

Atentamente,


Ing. Qco. Mario José Mérida Méndez
Coordinador
Laboratorio de Investigación
de Extractos Vegetales -LIEXVE-
Asesor




Inga. Qca. Telma Maricela Cano Morales
Directora
Centro de Investigaciones de Ingeniería / CII
Asesora





Guatemala, 04 de septiembre de 2015.
Ref. EIQ.TG-IF.059.2015.

Ingeniero
Víctor Manuel Monzón Valdez
DIRECTOR
Escuela de Ingeniería Química
Facultad de Ingeniería

Estimado Ingeniero Monzón:

Como consta en el registro de evaluación del informe final EIQ-PRO-REG-007 correlativo **095-2013** le informo que reunidos los Miembros de la Terna nombrada por la Escuela de Ingeniería Química, se practicó la revisión del:

INFORME FINAL DE TRABAJO DE GRADUACIÓN

Solicitado por la estudiante universitaria: **Gabriela Marlene Caal Martínez**.
Identificada con número de carné: **2007-14442**.
Previo a optar al título de **INGENIERA QUÍMICA**.

Siguiendo los procedimientos de revisión interna de la Escuela de Ingeniería Química, los Miembros de la Terna han procedido a **APROBARLO** con el siguiente título:

EXTRACCIÓN DE LA QUIMOSINA PRODUCIDA DE FORMA NATURAL A TRAVÉS DEL CUARTO ESTÓMAGO DE TERNERO A PARTIR DE DIFERENTES TIEMPOS DE EXTRACCIÓN Y EDADES DEL BOVINO A ESCALA LABORATORIO

El Trabajo de Graduación ha sido asesorado por los Ingenieros Químicos: **Telma Maricela Cano Morales** y **Mario José Mérida Meré**.

Habiendo encontrado el referido informe final del trabajo de graduación **SATISFACTORIO**, se autoriza al estudiante, proceder con los trámites requeridos de acuerdo a las normas y procedimientos establecidos por la Facultad para su autorización e impresión.

"ID Y ENSEÑAD A TODOS"


Inga. Adela María Marroquín González
COORDINADORA DE TERNA
Tribunal de Revisión
Trabajo de Graduación



C.c.: archivo





Ref.EIQ.TG.151.2015

El Director de la Escuela de Ingeniería Química de la Universidad de San Carlos de Guatemala, luego de conocer el dictamen del Asesor y de los Miembros del Tribunal nombrado por la Escuela de Ingeniería Química para revisar el Informe del Trabajo de Graduación de la estudiante, **GABRIELA MARLENE CAAL MARTÍNEZ** titulado: "**EXTRACCIÓN DE LA QUIMOSINA PRODUCIDA DE FORMA NATURAL A TRAVÉS DEL CUARTO ESTÓMAGO DE TERNERO A PARTIR DE DIFERENTES TIEMPOS DE EXTRACCIÓN Y EDADES DEL BOVINO A ESCALA LABORATORIO**". Procede a la autorización del mismo, ya que reúne el rigor, la secuencia, la pertinencia y la coherencia metodológica requerida.

"Id y Enseñad a Todos"


Ing. Otto Raúl de León de Paz
Director a.i.
Escuela de Ingeniería Química



Guatemala, octubre 2015

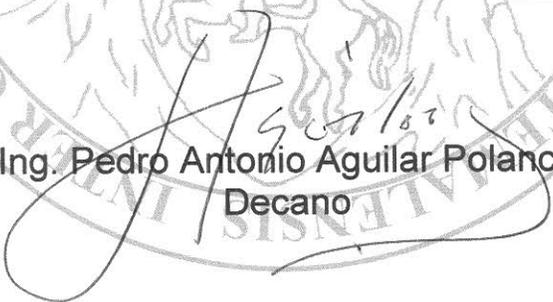
Cc: Archivo
VMMV/ale





El Decano de la Facultad de Ingeniería de la Universidad de San Carlos de Guatemala, luego de conocer la aprobación por parte del Director de la Escuela de Ingeniería Química, al trabajo de graduación titulado: **EXTRACCIÓN DE LA QUIMOSINA PRODUCIDA DE FORMA NATURAL A TRAVÉS DEL CUARTO ESTÓMAGO DE TERNERO A PARTIR DE DIFERENTES TIEMPOS DE EXTRACCIÓN Y EDADES DEL BOVINO A ESCALA LABORATORIO**, presentado por la estudiante universitaria: **Gabriela Marlene Caal Martínez**, y después de haber culminado las revisiones previas bajo la responsabilidad de las instancias correspondientes, se autoriza la impresión del mismo.

IMPRÍMASE


Ing. Pedro Antonio Aguilar Polanco
Decano

Guatemala, octubre de 2015

/cc



ACTO QUE DEDICO A:

- Dios** Por estar siempre a mi lado y jamás dejarme, por muy difíciles que se viera la situación.
- Mis padres** Juan Francisco Caal y Briseida Marlene Martínez de Caal, por ser mi ejemplo de amor y paciencia, sin ellos no hubiera logrado culminar mis metas y mis sueños, siempre confiaron en mí.
- Mi hermano** Jetro Emmanuel Caal Martínez, por ser mi mejor amigo y confidente que siempre ha estado conmigo en todo momento.
- Mi esposo** Oscar Salguero Ventura. Por ser mi compañero de vida; por ser mi apoyo en momentos difíciles y mostrarme el amor verdadero. Gracias por decidir compartir cada instante y pido a Dios que nuestro amor sea para siempre.
- Mi hija** Guiselle Abigail Salguero por ser motivo de mi inspiración y la personificación del amor verdadero.
- Mis amigos** Por ser la familia que he escogido y pasar los mejores momentos juntos.

AGRADECIMIENTOS A:

**Universidad de San
Carlos de Guatemala**

Mi *alma mater*. Por darme las herramientas para ser una persona que aporte al desarrollo en Guatemala.

Facultad de Ingeniería

Por abrirme las puertas y darme las herramientas del conocimiento.

Mis amigos

Oscar Raúl Salguero Ventura, Claudia María Quiroa, Sergio Palencia Zetina, Manuel Fernando Aroche, Vivian María Cano, Billy Hernández, Saida Bautista y demás amigos.

Inga. Telma Cano

Por guiarme y darme los conocimientos en la elaboración de este trabajo de graduación, ya que sin su ayuda nada de esto hubiera sido posible y confiar en mí.

Ing. Mario Mérida

Por guiarme y darme las herramientas y conocimientos necesarios en el transcurso de la carrera y por confiar en mí, apoyando mi trabajo de graduación como coasesor.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES.....	V
LISTA DE SÍMBOLOS	IX
GLOSARIO	XI
RESUMEN.....	XV
OBJETIVOS.....	XVII
Hipótesis.....	XVIII
INTRODUCCIÓN	XXI
1. ANTECEDENTES	1
2. MARCO TEÓRICO.....	3
2.1. Aparato digestivo de rumiantes.	3
2.1.1. Rumen o panza	3
2.1.2. Retículo, redecilla o bonete	3
2.1.3. Omaso	4
2.1.4. El abomaso.....	4
2.2. Quimosina	5
2.2.1. Síntesis.....	5
2.2.2. Quimosina recombinante.....	6
2.3. Cuajo	7
2.3.1. Cuajo animal.....	8
2.3.1.1. Cuajos comerciales.....	9
2.3.1.2. Cuajos artesanales	9
2.3.2. Cuajo vegetal.....	10
2.3.3. Cuajo microbiano.....	10

2.3.4.	Cuajo genético	11
2.4.	Aislamiento, separación y purificación de proteínas.....	12
2.4.1.	Naturaleza y almacenamiento del material de inicio.	12
2.4.2.	Extracción de proteínas.....	14
2.4.3.	Amortiguadores para extracción de proteínas.....	16
2.4.4.	Purificación de la proteína.	17
2.4.5.	Método de purificación por fraccionamiento	18
2.4.6.	Purificación por medio de ultrafiltración por membrana	19
2.4.7.	Purificación por medio de centrifugación diferencial	19
2.4.8.	Purificación cromatográfica de proteínas	20
2.4.8.1.	Cromatografía de filtración en gel.....	20
2.4.8.2.	Cromatografía de intercambio iónico....	21
2.5.	Actividad enzimática.....	22
2.6.	Porcentaje de rendimiento	24
2.7.	Adsorción e intercambio iónico	24
2.7.1.	Adsorbentes y procesos de adsorción	25
2.7.2.	Isotermas de adsorción	26
2.7.3.	La quimisorción o adsorción activada	27
2.7.4.	Naturaleza de los adsorbentes.....	27
2.8.	Difusión	28
2.9.	Lixiviación.....	30
2.9.1.	Preparación del sólido.....	30
2.9.2.	Eficacia de las etapas en lixiviación	31
3.	DISEÑO METODOLÓGICO.....	35
3.1.	Localización	35

3.2.	Variables.....	35
3.2.1.	Variables independientes	35
3.2.2.	Variables dependientes.	35
3.3.	Delimitación del campo de estudio	36
3.4.	Obtención de las muestras	36
3.5.	Recurso humano disponible	36
3.6.	Recursos materiales disponibles	37
3.7.	Técnicas cuantitativas de la investigación.	38
3.8.	Análisis estadístico de los datos.....	41
3.9.	Recolección y ordenamiento de la información	44
3.10.	Tabulación, ordenamiento y procesamiento de la información	47
4.	RESULTADOS	51
5.	INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS.....	59
	CONCLUSIONES	65
	RECOMENDACIONES	67
	BIBLIOGRAFÍA	69
	APÉNDICES.....	73
	ANEXOS	85

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

FIGURAS

1.	Sistema digestivo de un ternero	5
2.	Ecuación para determinación de actividad enzimática	23
3.	Ecuación para determinar el rendimiento porcentual	24
4.	Gráfica de la actividad enzimática de la quimosina obtenida a partir del cuarto estómago de ternero en edad de lactancia y poslactancia, a diferentes tiempos de maceración dinámica	52
5.	Gráfica de porcentaje de rendimiento de la actividad enzimática de la quimosina obtenida a partir del cuarto estómago de ternero en edad de lactancia y poslactancia, a diferentes tiempos de maceración dinámica	53
6.	Gráfica de la densidad <i>versus</i> tiempo de maceración dinámica de la quimosina obtenida en edad de lactancia.....	55
7.	Gráfica de la densidad <i>versus</i> tiempo de maceración dinámica de la quimosina obtenida en edad de poslactancia	56
8.	Gráfica comparativa de la densidad de la quimosina obtenida a partir del cuarto estómago de ternero a diferentes tiempos de maceración dinámica en edad de lactancia y poslactancia	57

TABLAS

I.	Datos típicos para el diseño de bloques al azar	41
II.	Análisis de varianza para el experimento de bloque aleatorio.....	43
III.	Resultados de la quimosina producida de forma natural a través del cuarto estómago de ternero durante la lactancia y tiempo de maceración dinámica de 1 hora	44
IV.	Resultados de la quimosina producida de forma natural a través del cuarto estómago de ternero durante la lactancia y tiempo de maceración dinámica de 2 horas	44
V.	Resultados de la quimosina producida de forma natural a través del cuarto estómago de ternero durante la lactancia y tiempo de maceración dinámica de 3 horas	45
VI.	Resultados de la quimosina producida de forma natural a través del cuarto estómago de ternero durante la poslactancia y tiempo de maceración dinámica de 1 hora	45
VII.	Resultados de la quimosina producida de forma natural a través del cuarto estómago de ternero durante la poslactancia y tiempo de maceración dinámica de 2 horas.....	46
VIII.	Resultados de la obtención de la quimosina producida de forma natural a través del cuarto estómago de ternero durante la poslactancia y tiempo de maceración dinámica de 3 horas	46
IX.	Densidad de la quimosina obtenida a partir del cuarto estómago de ternero en edad de lactancia a tres diferentes tiempos de maceración dinámica	47
X.	Densidad de la quimosina a partir del cuarto estómago de ternero en edad de poslactancia a tres diferentes tiempos de maceración dinámica.....	48

XI.	Actividad enzimática de la quimosina obtenida a partir del cuarto estómago de ternero en edad de lactancia, a diferentes tiempos de maceración dinámica.....	49
XII.	Actividad enzimática de la quimosina obtenida a partir del cuarto estómago de ternero en edad de poslactancia a diferentes tiempos de maceración dinámica.....	50
XIII.	Actividad enzimática de la quimosina obtenida a partir del cuarto estómago de ternero en edad de lactancia y poslactancia, a diferentes tiempos de maceración dinámica	51
XIV.	Ecuación de la gráfica de actividad enzimática de la quimosina obtenida a partir del cuarto estómago de ternero en edad de lactancia y poslactancia, a diferentes tiempos de maceración dinámica.....	52
XV.	Porcentaje de rendimiento de la actividad enzimática de la quimosina obtenida a partir del cuarto estómago de ternero en edad de lactancia y poslactancia a diferentes tiempos de maceración dinámica	53
XVI.	Ecuación de la gráfica de porcentaje de rendimiento de actividad enzimática de la quimosina obtenida a partir del cuarto estómago de ternero en edad de lactancia y poslactancia a diferentes tiempos de maceración dinámica	54
XVII.	Densidad de la quimosina obtenida a partir del cuarto estómago de ternero en edad de lactancia a tres diferentes tiempos de maceración dinámica.....	54
XVIII.	Ecuación de la gráfica de densidad <i>versus</i> tiempo de maceración dinámica de la quimosina en edad de lactancia	55
XIX.	Densidad de la quimosina a partir del cuarto estómago de ternero en edad de poslactancia a tres diferentes tiempos de maceración dinámica	56

XX.	Ecuación de la gráfica de densidad <i>versus</i> tiempo de maceración dinámica de la quimosina en edad de poslactancia	57
XXI.	Ecuación del gráfico	57
XXII.	Resultado del análisis microbiológico obtenido de la quimosina producida de forma natural a partir del cuarto estómago de ternero, a diferentes tiempos de maceración.....	58
XXIII.	tiempos de maceración dinámica	74

LISTA DE SÍMBOLOS

Símbolo	Significado
cm³	Centímetro cúbico
pKa	Fuerza que tienen las moléculas de disociarse
°C	Grados Celsius
g	Gramos
h	Horas
L	Litro
pH	Medida de acidez o alcalinidad
<	Menor que
mL	Mililitros
mm	Milímetros
M	Molaridad
α	Nivel de confianza
NMP	Número más probable
%	Porcentaje
UV	Rayos ultravioleta
s	Segundos
UFC	Unidades formadoras de colonias

GLOSARIO

Abomaso	Último compartimiento del estómago de los rumiantes.
Amilasa	Llamada también sacarasa o ptialina; es una enzima hidrolasa que tiene la función de catalizar la reacción de hidrólisis.
Aminoácidos	Compuestos orgánicos que se combinan para formar las proteínas.
Anfótero	Sustancia que puede reaccionar ya sea como un hidrácido o como una base.
Anaeróbico	Ausencia de oxígeno.
Bobino	Referente a la vaca, el toro o el buey.
Buffer	También llamado tampón; se refiere a una o varias sustancias químicas que afectan la concentración de los iones de hidrógeno en el agua.
Caseína	Fosfoproteína presente en la leche y en sus derivados.
Célula	Unidad morfológica y funcional de todo ser vivo.

Cuajar	Acción de hacer que una sustancia líquida se vuelva más espesa y compacta.
Enzima	Conjunto de moléculas de naturaleza proteica y estructural que catalizan reacciones químicas.
Genoma	Conjunto de genes contenidos en los cromosomas.
Gram positiva	Aquellas bacterias que se tiñen de azul oscuro o violeta por la tinción de gram.
Hidrofóbica	Sustancia que no es miscible con el agua.
Hidrólisis	Es una reacción química entre una molécula de agua y otra diferente, en la cual la molécula de agua divide sus átomos.
Ingesta	Acción o resultado de ingerir.
Ion	Partícula cargada eléctricamente, constituida por un átomo o molécula que no es eléctricamente neutral.
Lisozima	También llamada muramidasa; es una enzima que daña las células bacterianas.
Neonato	Recién nacido.

Ósmosis	Fenómeno físico relacionado con el movimiento de un solvente a través de una membrana semipermeable.
Pepsina	Enzima digestiva que segrega el estómago y que hidroliza las proteínas en el estómago.
Proteasa	Enzimas que rompen los enlaces peptídicos.
Proteína	Moléculas formadas por cadenas lineales de aminoácidos.
Proteolítico	Sustancia que disuelve las materias albuminoides o proteicas.
Quimosina	Quimosina o rennina; enzima proteasa aspártica encontrada en el cuajo.
Ribosoma	Complejos macromoleculares de proteínas y ácido ribonucleico que se encuentran en el citoplasma, en las mitocondrias, en el retículo endoplasmático y en los cloroplastos.
Rumiantes	Animal que digiere alimentos en dos etapas, primero consume y luego realiza la rumia.
Ternero	Cría de la vaca.
Titulación	Método de análisis para determinar concentración.

Zimógeno

Conocido como proenzima; es un precursor enzimático.

RESUMEN

El presente trabajo de graduación trata sobre la extracción de la quimosina producida de forma natural a través del cuarto estómago de ternero, a partir de diferentes tiempos de extracción y edades del bovino, a escala laboratorio.

La quimosina o rennina es una enzima empleada comúnmente como cuajo en la elaboración de quesos; es producida por las vacas en el abomaso (cuarto y último estómago). Se llevó a cabo el procedimiento experimental a escala laboratorio de la extracción y purificación de la enzima, a través de un método en el que se evaluaron dos variables importantes en el rendimiento de la obtención de la enzima. La primera fue la duración de la maceración dinámica, la cual tuvo duraciones de 1, 2 y 3 horas; de igual manera se evaluó al ternero a dos diferentes edades; la primera fue en edad de lactancia y la segunda en edad de poslactancia, para determinar cómo afectan estas dos variables en el rendimiento.

De igual manera se obtuvo el rendimiento de la actividad enzimática, determinando que el mayor rendimiento se presenta en un tiempo de maceración dinámica de 2 horas, utilizando el abomaso de ternero en edad de lactancia como materia prima 36,437 % de rendimiento. De igual manera el menor de los datos se registró en un tiempo de maceración dinámica de 1 hora, utilizando abomaso de ternero en edad de lactancia de 35,327 % de rendimiento.

Se realizó la determinación de densidad de la enzima y el análisis microbiológico de la quimosina en solución.

OBJETIVOS

General

Evaluar las condiciones de extracción de la quimosina producida de forma natural, a partir del cuarto estómago de ternero con base en dos diferentes edades y en función de tres tiempos de maceración dinámica bajo la especificación de la patente europea “Procedimiento para la recuperación de quimosina producida de forma natural”; número de publicación ES 2 078 345 de fecha 01.04.92, a escala laboratorio.

Específicos

1. Obtener la quimosina producida de forma natural a partir del abomaso de ternera en edades de lactancia y poslactancia, para evaluar la actividad enzimática y su rendimiento.
2. Realizar la extracción por maceración dinámica de la quimosina a tres diferentes tiempos, determinando cómo afecta la actividad enzimática y su rendimiento.
3. Analizar el comportamiento de la densidad experimental de la solución salina que contiene la quimosina según las edades del bovino.
4. Realizar análisis microbiológico y determinar si la solución contenedora de quimosina es apta para el consumo humano.

Hipótesis

Hipótesis de trabajo

Existe una diferencia significativa entre la edad del ternero y cómo influye en el rendimiento de la actividad enzimática. De igual manera la duración del tiempo de maceración dinámica influye de forma significativa en el rendimiento de la actividad enzimática y el rendimiento enzimático y determinar si el procedimiento garantiza una quimosina inocua y apta al consumo humano.

Hipótesis estadística

Hipótesis de investigación ($H_{i,1}$):

Existe diferencia significativa en parámetros como la edad del ternero y la duración de la maceración dinámica en la actividad enzimática, el rendimiento enzimático y la densidad de la quimosina.

Hipótesis de investigación ($H_{i,2}$):

La quimosina obtenida es apta para el consumo humano.

Hipótesis nula ($H_{o,1}$):

No existe diferencia significativa en parámetros como la edad del ternero y la duración de la maceración dinámica en la actividad enzimática, el rendimiento enzimático y la densidad de la quimosina.

Hipótesis nula ($H_{0,1}$):

La quimosina obtenida no es apta para el consumo humano.

INTRODUCCIÓN

La quimosina o rennina, cuyo código es E.c.3.4.23.4, es la enzima proteasa se obtiene tradicionalmente del abomaso de terneros jóvenes. La acción principal de esta enzima es la de cuajar la leche que toman, garantizando así una mejor absorción. La quimosina posee una mayor fuerza de coagulación que los cuajos utilizados convencionalmente, ya que para este fin puede ser también aplicable la enzima que se activa al inhibirse la producción de quimosina en los terneros.

Existen distintos tipos de cuajo; los hay de tipo animal (de ternero, cordero y cabritos), cuajo vegetal, microbiano y genético. Entre la clasificación anterior la quimosina pertenece al tipo de cuajo animal, la cual puede ser obtenida a partir de cualquier rumiante. Para su obtención se realiza una serie de pasos definidos; primero se efectúa una homogeneización de cuchillas, en las cuales las células grandes se rompen mediante acción de corte que permite liberar la enzima, en este caso la quimosina. Luego se realiza una maceración dinámica durante un tiempo definido para garantizar la máxima extracción de la enzima, seguida de una filtración para eliminar contaminantes sólidos que permitan obtener como resultado una solución contenedora de quimosina.

Después de realizado lo anterior se procede a un centrifugado para eliminar cualquier contaminante en suspensión y así tener una mayor purificación de la enzima. Se efectúa una cromatografía de intercambio catiónico en la cual se hace pasar la solución contenedora de quimosina, permitiendo también el paso de todos los demás contaminantes en solución.

Debido a que la quimosina se adhiere a la resina catiónica junto con la pepsina, se realizan dos lavados: el primero con cloruro de sodio para eliminar la pepsina adherida a la resina catiónica y luego un lavado con una solución de cloruro de sodio y fosfato diácido de sodio, liberando así la quimosina adherida a la resina y obteniendo una quimosina en solución.

Es importante determinar los principios básicos que conforman el procedimiento anterior, ya que de esta manera se garantiza una mejor y mayor obtención de quimosina, en este caso. La importancia de la quimosina es su fuerza de cuajo; es mucho más potente a la existente en el mercado comercial, debido a que se obtiene del abomaso, una materia prima que muchas veces es desechada.

1. ANTECEDENTES

Se realizó un estudio del caso que se encuentra plasmado en una patente europea titulada "Procedimiento para la recuperación de quimosina producida de forma natural Núm. ES 2 078 345", la cual muestra un análisis en la metodología para la obtención y purificación de la enzima llamada quimosina, a partir de soluciones acuosas que la contienen, obtenidas a partir de la extracción de fuentes naturales.

En esta metodología se describe la manera por la cual se puede obtener la quimosina, ya que al momento de realizar la extracción directa del cuarto estómago del ternero, esta solución contiene muchos contaminantes como la pepsina, la cual afecta el rendimiento del cuajo en la elaboración de queso.

Este estudio enfatiza en la manera en que se puede lograr la purificación de la enzima; este proceso consiste en una extracción líquido-líquido en la que existe una formación de dos fases con un polialcohol, poliéter o polisacárido sustituido y no sustituido de alto peso molecular, y una sal inorgánica en donde la fase del polietilenglicol contiene a la enzima; posteriormente de esta fase se podrá obtener la enzima mediante el proceso de adsorción a un intercambiador iónico, eliminando mediante lavado el polímero que forma la fase y la recuperación posterior de la enzima.

Este procedimiento permitirá obtener una quimosina con más del 10 % en peso de contaminantes, lo cual beneficiará en el rendimiento que la enzima tenga en la elaboración de quesos.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Aparato digestivo de rumiantes

Los rumiantes son animales poligástricos, es decir que la estructura anatómica de sus estómagos es sumamente compleja por estar formada por 4 compartimientos que son: el retículo, rumen, omaso y abomaso. Los tres primeros se denominan conjuntamente preestómagos y poseen mucosa glandular y el último de los cuatro, el abomaso, es el que posee una estructura glandular equivalente a la del estómago simple en los monogástricos.

2.1.1. Rumen o panza

El rumen actúa como una cámara de fermentación microbiana y es el lugar principal de asimilación de ácidos grasos de cadenas cortas. El rumen forma junto con el retículo el retículo-rumen. Allí el alimento es fermentado por microorganismos anaeróbicos que pueden utilizar la fibra, especialmente la celulosa, para obtener la energía necesaria.

El rumen se encuentra dividido en sacos; el dorsal y el ventral por los pilares y su superficie interna es de tipo epitelial.

2.1.2. Retículo, redcilla o bonete

Su función es movilizar el alimento digerido hacia el rumen o hacia el omaso en la regurgitación del bolo alimenticio después de la rumia. Esta presenta una forma piriforme y es el más frontal y pequeño de los ventrículos.

2.1.3. Omaso

Este ayuda a reducir el tamaño de las partículas del alimento digerido. Interviene en el control del paso del bolo alimenticio hacia el tubo digestivo inferior y extrae los líquidos retenidos en la ingesta.

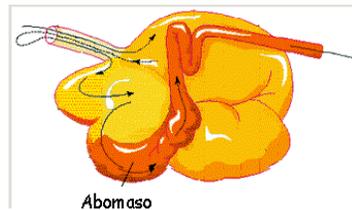
Sus láminas y papilas pueden funcionar como una comunicación directa entre el retículo y el abomaso para los líquidos y alimentos finamente triturados. El omaso tiene una forma elipsoidal.

2.1.4. El abomaso

El abomaso o mejor conocido como cuajar, es la última parte del estómago de los rumiantes. En rumiantes adultos secreta la rennina, la cual se denomina cuajo; esta es utilizada comúnmente en la elaboración de queso a nivel artesanal.

El abomaso secreta la rennina o quimosina además de ácido clorhídrico y pepsina, realizando una función similar al estómago monogástrico. En este órgano los microorganismos y los residuos sin fermentar, pero digeribles de los alimentos, se someten a la digestión enzimática y sus productos son absorbidos. La secreción de ácido clorhídrico y pepsina inicia la degradación de las proteínas alimenticias y microbianas; se produce la prorrenina en rumiantes neonatos, el cual es un zimógeno que al entrar en contacto con el ácido clorhídrico se transforma en quimosina y ataca la proteína de la leche conocida como caseína en presencia de iones calcio, formando un producto denominado paracaseína, al que posteriormente desdoblan enzimas duodenales.

Figura 1. **Sistema digestivo de un ternero**



Fuente: *sistema digestivo de terneros*. www.ugrj.org.mx/index.php?option=com_content.

Consulta: marzo de 2015.

2.2. Quimosina

La quimosina o rennina cuyo código es E.c.3.4.23.4, es una enzima proteasa que se obtiene tradicionalmente del abomaso de terneros jóvenes. La quimosina es producida por las células principales en el estómago de bebés y niños, con el fin de cuajar la leche que toman, garantizando así una mayor y mejor absorción. Se encuentra como enzima digestiva mezclada con pepsina, siendo la proporción de quimosina y la calidad del cuajo mayor cuanto más joven es el animal. También se encuentra en otras especies animales como el cerdo.

2.2.1. Síntesis

La quimosina se sintetiza como proquimosina, proteína que tiene en su cadena 58 aminoácidos más que la quimosina activa, y que no tiene actividad proteolítica. Se secreta al estómago como proquimosina; también inactiva tras el corte de 16 aminoácidos, y se transforma en el enzima activo por la eliminación proteolítica de otro fragmento de 42 aminoácidos, quedando con un peso molecular de aproximadamente 30.700.

El enzima, como todas las proteinasas, puede autodigerirse si se conserva en las condiciones en las que es activo. Puesto que la quimosina se inactiva reversiblemente con concentraciones elevadas de cloruro de sodio, se conserva en esta forma. Al disminuir la concentración salina al utilizarla, se reactiva nuevamente.

La quimosina tiene tres variantes genéticas, la variante A, con un resto de aspártico en la posición 286 y la B, que tiene en esa misma posición un resto de glicina y la variante C. La variante A es algo más activa que la B frente a la caseína kappa, posiblemente porque la carga del aspártico favorece su interacción con ella. En cambio, la variante B es algo más estable a pH 3.5 o inferior.

2.2.2. Quimosina recombinante

Se han desarrollado técnicas para la producción de quimosina utilizando microorganismos en cuyo genoma se ha insertado el gen de la proquimosina bovina. La cadena polipeptídica es evidentemente la misma que la de la quimosina bovina, pero la glicosilación es distinta.

La primera quimosina recombinante se obtuvo en quimosina B, en la levadura *Kluyveromyces lactis* con el nombre comercial de Maxirem. Se sintetiza en forma de proquimosina que se activa tras el lisado de las células, una vez detenida la fermentación. Quimosina B en el hongo filamentoso *Aspergillus awamori*, gen de la proquimosina. Se segrega al medio de cultivo, de donde se recupera. Quimosina A en *Escherichia coli* k-12; quimosina B. en *pichia pastoris*, otra levadura. La proquimosina se almacena en cuerpos de inclusión, siendo necesario destruir las células microbianas y solubilizar la enzima.

2.3. Cuajo

Es una sustancia presente en el abomaso de los mamíferos rumiantes; contiene principalmente la enzima llamada rennina o quimosina, utilizada en la fabricación de quesos, cuya función es separar la caseína que conforma casi el 80 % aproximadamente del total de proteínas de su fase líquida, la cual está formada por agua, proteínas del lactosuero y carbohidratos, llamado suero.

La acción de la enzima sobre la caseína y el calcio disuelto en la leche forma paracaseinato de calcio, comúnmente llamado cuajo. El cuajo es conocido desde tiempos muy antiguos, pero su componente activo y puro, la quimosina, es conocida solo desde hace unas cuantas décadas. El cuajo antiguo se obtenía del estómago de terneros lactantes. Se sumergía una parte del estómago en salmuera y tras dejarlo reposar hasta que la rennina difundiera a la salmuera, se utilizaba parte de ese líquido en la leche a cuajar. El inconveniente de este método antiguo radicaba en la dificultad para obtener dosis precisas de cuajo, y en su variabilidad de concentración a lo largo de su tiempo de uso.

El cuajo químico, la quimosina pura, no tiene este inconveniente, por lo que es más fácil estandarizar los tiempos de cuajado. En cuanto al cuajo puro, existen cuajos naturales: quimosina extraída cortando el estómago de los terneros y cuajo sintético, descubierto hace una década y de presentación en pastillas; esta es quimosina obtenida a partir de procedimientos de síntesis química sin usar el estómago de terneros como materia prima.

La acción de la quimosina es bien conocida por la industria láctea. Actúa directamente en un punto delimitado de la caseína con calcio. Al alterar dicha molécula se inicia la formación de un gel que atrapa la mayoría de los

componentes sólidos de la leche; este gel se contrae poco a poco ayudado por la acidificación previa de la leche por medio de bacterias acidolácticas, y al contraerse va expulsando suero. Al cortar el gel en cubitos, se logra separar entre un 50 y un 90 % del contenido inicial del suero de la leche.

La efectividad del cuajo está en función de la temperatura y la concentración del sustrato; en este caso la leche, concentración de calcio y la acidez. Las temperaturas usuales de coagulación pueden variar entre los 28 °C y los 41 °C, aunque lo más usual es una de 35 °C; según el tipo de queso se pueden hacer mezclas de leche con una acidez que puede variar entre 0,18 % de acidez titulable hasta el 0,46 %.

2.3.1. Cuajo animal

Este procede del cuarto estómago de los rumiantes entre estos los terneros, corderos y cabritos. En estos predominan las proteasas, las cuales ayudan a la digestión de las proteínas. Entre las principales se encuentran la quimosina y la pepsina; la quimosina es abundante en los animales recién nacidos y va disminuyendo su producción a medida que crece el animal, aumentando así la producción de pepsina en la que un animal adulto cuenta con mayor cantidad.

Existen diferentes tipos de cuajo animal entre estos están los comerciales y los artesanales. Se extraen muy comúnmente de los bovinos, los cuales son en su gran mayoría; estos pueden presentarse en líquidos y en polvo; en estas la diferencia es la cantidad de quimosina y pepsina, ya que la quimosina únicamente se puede contener en forma líquida. De los animales ovinos se conocen muy pocos tipos de cuajos y los únicos en los que se puede encontrar en estado líquido.

2.3.1.1. Cuajos comerciales

Las ventajas en los cuajos comerciales es su fuerza coagulante estandarizada de lote a lote, la cual se puede medir en unidades de fuerza conocidas y su coagulación es uniforme. Se sabe que contienen quimosina o pepsina, su actividad proteolítica general es baja, no requieren esfuerzo de preparación y su calidad microbiológica es controlada; la gran mayoría solo contienen proteasas y no contienen lipasa pregástrica. Entre los cuajos comerciales extraídos de bovinos se pueden encontrar en la siguiente proporción: 95 % quimosina, 80 % quimosina y 20 % pepsina; 60 % quimosina y 40 % pepsina; 20 % quimosina y 80 % pepsina.

Entre los cuajos comerciales extraído de corderos se pueden encontrar de la siguiente manera: 75 % a 80 % quimosina y 25 % a 20 % pepsina.

2.3.1.2. Cuajos artesanales

Estos son preparados por los mismos queseros y las recetas varían según su localidad. Estas pueden ser en forma de pasta, extractos líquidos o cuajar seco. Los procedimientos de obtención suelen ser laboriosos y largos. Este tipo de cuajo por lo regular presenta altos índices de contaminación microbiológica; su fuerza coagulante no es estandarizada de lote a lote, ya que de esta no se tiene una concentración exacta y se va dando un estimado a prueba y error los primeros días con cada lote.

La composición enzimática es desconocida; no se saben los porcentajes de quimosina y de pepsina exactas; además, cuentan con presencia de lipasas pregástricas.

Debido a los procedimientos de conservación pueden presentar una variación de la composición enzimática manifestada en una pérdida de actividad lipasa pregástrica.

2.3.2. Cuajo vegetal

Estas se pueden obtener del cardo (*Cynara cardunculus*), alcachofa (*Cynara scolymus*), cardo mariano (*Silybum marianum*), cardo estrellado (*Centaurea calcitrapa*), planta lechetrezna (*Euphorbia serrata*), piña (*Ananás comosus* (L.) Merr.), papaya (*Carica papaya*), diente de león, ortiga (*Urtica gracilis*) y calotropis procera.

Estos son utilizados en países como España, Portugal, Grecia, norte de África y África occidental, Oriente Medio, India y Afganistán. En los países occidentales su utilización es para la fabricación de quesos vegetarianos.

Este tipo de cuajo se basa en el cultivo de plantas, recolección de flores de plantas silvestres, adquisición local de flores secas y no son disponibles comercialmente. La fuerza coagulante suele ser muy variable.

2.3.3. Cuajo microbiano

Debido a la problemática que se suscitó en el suministro de cuajo animal a partir de la década del 1940, se forzó la búsqueda de enzimas alternativas al cuajo animal. La primera proteinasa microbiana utilizada fue la de *Mucos pusillus*, pero presenta el problema de que es más activa que el cuajo de ternero. En la fabricación de quesos industriales se utilizan habitualmente proteinasas obtenidas de microorganismos en lugar del cuajo animal.

Una de las más utilizadas es la proteinasa de *Rhizomucor miehei*, que es también una aspartil-proteinasa, como la quimosina. El centro activo de esta proteinasa como el de otras aspartil-proteinasas, está situado en un profundo bucle entre los dos dominios.

Esta es conformada por una mezcla compleja de proteasas microbianas, obtenidas como resultado de la fermentación y su posterior purificación. Los microorganismos autorizados para este tipo de prácticas son: *Rhizomucor miehei*, *Cryphonectria parasítica* y *Aspergillus oryzae*.

Este tipo de cuajo trabaja con base en la hidrólisis de la *k*-caseína, produciendo la coagulación de la leche, beneficiando la hidrólisis de las otras caseínas; además, puede ser bastante amplia. Estas enzimas son termoestables y de tipo comercial. Sus presentaciones son: en líquido o en polvo y su fuerza coagulante es estandarizada y conocida.

2.3.4. Cuajo genético

Para este tipo de cuajo utilizan el gen que codifica la quimosina bovina, el cual es insertado en *Aspergillus niger var, Kluyveromyces lactis*. Esta es una quimosina producida por medio de fermentación y es altamente purificada; no se detectan otras actividades enzimáticas que afecten el grado de pureza. Las características de esta son exactamente iguales a las de la quimosina bovina, la cual tiene la misma secuencia de aminoácidos y las mismas características enzimáticas; esta puede ser utilizada para producir quesos vegetarianos y se puede encontrar comercialmente en forma líquida o en polvo.

Entre los distintos quesos que son elaborados a base de este tipo de cuajo están el *chedar*, *manchego*, *feta*, *gouda* y *mozzarella*.

2.4. Aislamiento, separación y purificación de proteínas

Se puede tener poca influencia en la elección del material de inicio para la purificación de una proteína. Una fermentación que ha sido previamente optimizada para producir una gran cantidad de una enzima, en particular es un ejemplo clásico.

2.4.1. Naturaleza y almacenamiento del material de inicio

El material para purificar una proteína puede venir de una gran variedad de fuentes entre estos están los tejidos animales, materiales de plantas, leche, sangre y productos de cultivos microbianos. En la mayoría de los casos, el interés se enfoca en una actividad biológica en particular, tal como una enzima, y el origen de esta actividad es a menudo de poca importancia. Se debe tener por lo tanto un gran cuidado en la selección de la fuente adecuada de esta enzima, ya que puede haber considerables variaciones respecto de la concentración y estabilidad de esta, como la disponibilidad y costos de la materia prima, la presencia de actividades y proteínas interferentes, y dificultades en el manejo de materias primas en particular.

Las proteínas son productos de la actividad ribosomal, por lo tanto están asociadas al metabolismo celular. Consecuentemente, sin importar la fuente, las proteínas se localizan ya sea dentro de la célula, formando parte de su estructura o secretadas fuera de ella.

Las proteínas localizadas dentro de la célula incluyen cuerpos de inclusión insolubles, enzimas solubles o proteínas estructurales que forman parte de una estructura celular tal como la membrana.

Las proteínas que son secretadas por las células o localizadas en el espacio periplásmico también pueden proveer un proceso de purificación más simple, dado que el nivel de contaminantes proteicos es reducido en comparación con el de proteínas intracelulares.

Además, las proteínas extracelulares como la lisozima y la amilasa son generalmente más grandes, ya que tienen que operar en ambientes adversos. Las proteínas intracelulares son generalmente menos estables y presentan un mayor reto para los científicos purificadores debido a su mayor labilidad y presencia de otras proteínas contaminantes. Cuando las proteínas están asociadas con material celular, es recomendable generar extractos clarificados del material de inicio tan pronto sea posible, a través de rompimiento celular, solubilización de la proteína blanco en un amortiguador apropiado y eliminación de las células a través de filtración o centrifugación.

Cuando la proteína es extracelular al material celular, se requiere una separación inicial que permita retirar las células y dejar un sobrenadante claro que contenga la proteína blanca. A partir de entonces, la preparación clara puede utilizarse inmediatamente para la purificación o se pueden congelar alícuotas para uso futuro.

La utilización de materiales de inicio más frescos es sumamente importante dado los procesos de degradación natural y la contaminación por microorganismos que ocurren rápidamente y resultan en reducción de los niveles de proteína blanco y un material de inicio no representativo. Por lo tanto, a menos que la purificación se dé al momento de la obtención del material de inicio, la degradación debe ser reducida a través, o mediante congelamiento a -70 °C por días.

Es necesario considerar que durante el congelamiento ciertos cambios pueden suceder en el material de inicio, los cuales, si no son verificados pueden reducir subsecuentemente la eficiencia de la purificación.

2.4.2. Extracción de proteínas

Con el fin de aislar las proteínas intracelulares se debe realizar la ruptura celular. Se encuentran disponibles varias técnicas de rompimiento celular, tanto mecánicas como químicas. Es necesario desarrollar un protocolo de ruptura celular eficiente para liberar la proteína en forma soluble desde su compartimiento intracelular. El protocolo de disrupción debe ser lo más suave como sea posible para la proteína, dado que la etapa de extracción es el punto de partida para todos los procedimientos posteriores. El éxito de la ruptura celular depende de una serie de variables, tales como la elección de *buffers*, la presencia de inhibidores, proteasas, y el grado de ósmosis del *buffer* en suspensión. La condición y constitución del tampón de extracción dependerá de la naturaleza del tipo celular, de la proteína blanco y su aplicación.

Algunas de las técnicas y sus principios más utilizados en la obtención de la proteína blanco son:

- Digestión enzimática: esta se basa en la digestión de la pared celular llevando a la disrupción osmótica de la membrana celular. El tiempo de lisis es de 15 a 30 minutos. Un ejemplo de estas son las bacterias Gram positivas.
- Lisis por choque osmótico: esta se basa en una disrupción osmótica de la membrana celular. El tiempo de lisis es menor a los 5 minutos y un ejemplo de esta son los glóbulos rojos.

- Homogeneización manual: las células son forzadas a través de un espacio estrecho, lo cual las lleva al rompimiento de la membrana celular. El tiempo de lisis está entre 10 a 15 minutos. Un ejemplo de esta es el tejido de hígado.
- Homogeneizador de cuchillas: las células grandes se rompen mediante acción de corte. El tiempo de lisis está entre 5 a 10 minutos. Ejemplo de esta son los tejidos muscular, animal y el de plantas.
- Molienda con alumbre o arena: las paredes celulares se rompen debido a superficies rugosas microscópicas. El tiempo de lisis está entre 5 a 10 minutos. Un ejemplo son las bacterias.
- Molienda con perlas de vidrio: las paredes celulares se rompen por la vibración rápida del vidrio. El tiempo de lisis está entre 10 a 20 minutos y un ejemplo de estas son las bacterias.
- Prensa francesa: las células son forzadas a pasar a través de un orificio pequeño a una presión muy alta. Las fuerzas cortantes desbaratan las células. El tiempo de lisis es entre 10 a 30 minutos. Un ejemplo de estas son las bacterias y células de plantas.
- Zonificación: la disrupción celular se realiza debido a las fuerzas cortantes y cavitación causada por ondas sónicas de alta presión. El tiempo de lisis está entre 5 a 10 minutos y un ejemplo de esta son las bacterias.

2.4.3. Amortiguadores para extracción de proteínas

Las proteínas son macromoléculas biológicas extremadamente heterogéneas. Sus propiedades pueden ser afectadas severamente por pequeños cambios en la concentración de iones hidrógeno, de tal forma que es necesario un pH estable del ambiente proteico.

Se consideran varios factores durante la elección de un amortiguador. Estos factores son el pKa y los efectos de la temperatura, interacciones con otros componentes, compatibilidad con diferentes técnicas de purificación, absorción UV, permeabilidad a través de membranas biológicas y costos. Cuando se estudian las propiedades de una proteína, se debe determinar el pH óptimo de la actividad de la proteína con el objeto de elegir el mejor amortiguador.

Para determinar el pH óptimo se aconseja empezar con una serie de amortiguadores relacionados, que abarcan un amplio rango de pH. Una vez que el pH óptimo ha sido determinado, diferentes amortiguadores dentro del mismo rango de pH pueden ser examinados para un efecto amortiguador específico. Cuando ya se ha elegido el tampón apropiado, es mejor trabajar a la mínima concentración razonable para evadir efectos de “fuerza iónica” no específicos.

A continuación se describen algunos de los amortiguadores utilizados para la obtención de proteínas.

- Fosfato: este es compatible con cromatografía de permeación en gel e intercambio catiónico. Es compatible con la mayoría de reactivos para entrecruzamiento, y su costo es bajo. Entre sus desventajas están la débil capacidad amortiguadora dentro del rango de pH, el cual es de 8 a

11, precipita en presencia de cationes polivalentes, inhibe una amplia variedad de enzimas, incluyendo las quinasas, fosfatasas y deshidrogenasas.

- Tris: este es adecuado para las cromatografías de exclusión y de intercambio aniónico; su costo es barato. Presenta la desventaja de tener un pH por debajo de 7. Pasa a través de membranas biológicas, contiene una amina primaria reactiva, por lo tanto forma aductos de bases de *schiff* con aldehídos, e inhibe la conjugación por entrecruzamiento basado en aminas.
- Borato: su costo es barato. Forma complejos con motivos de ribosa de los ácidos nucleicos y otros mono y oligosacáridos. Se une a alguna proteína y da origen a complejos metálicos.
- Carbonato: es de bajo costo, su solubilidad es limitada dado que el carbonato está en equilibrio con el dióxido de carbono; los estudios deben ser llevados a cabo en sistemas cerrados.

2.4.4. Purificación de la proteína

En la purificación de proteínas es importante adoptar procedimientos que no causen su desnaturalización, especialmente de la proteína de interés. La elección de métodos de purificación también está influenciada por factores tales como la forma en que se utilizará la proteína en estudios, la cantidad de proteína purificada necesaria y los costos de materiales y reactivos utilizados en la purificación.

Un paso de purificación que pueda desnaturalizar la proteína no es adecuado para estudios de sus propiedades biológicas, pero puede ser adecuado para la determinación de su estructura primaria, tamaño de subunidad, entre otros. Los protocolos de purificación para obtener un nivel en microgramos de proteína purificada pueden ser diferentes de aquellos que produzcan grandes cantidades de proteína purificada. El costo de los ligandos utilizados para la inmovilización de matrices y para evolución de una proteína unida en cromatografía de afinidad pueden ser factores limitantes para purificaciones a gran escala.

Hay varias propiedades tales como peso molecular, carga, hidrofobicidad, entre otros, que pueden ser explotadas para purificar o aislar una proteína de una mezcla; estas propiedades se basan en varios procedimientos cromatográficos y no cromatográficos.

Una proteína puede ser purificada en un paso simple, por ejemplo cromatografía de afinidad o por una combinación de varios pasos, por ejemplo fraccionamiento con sales, intercambio iónico, filtración en gel, entre otros. En general las cromatografías de intercambio aniónico se emplean para la purificación de proteínas ácidas. Similarmente, para la purificación de una proteína básica, la cromatografía de intercambio catiónico es la mejor elección. La cromatografía de fase reversa es adecuada para una familia de proteínas activas de carga similar.

2.4.5. Método de purificación por fraccionamiento

El fraccionamiento de las proteínas mediante precipitación con sulfato de amonio es el método más comúnmente usado para enriquecer una proteína particular. Las proteínas de alto peso molecular usualmente precipitan debajo

de 25 % de saturación de sulfato de amonio. Los extractos crudos pueden ser sujetos a fraccionamiento en tres etapas 0-30 %, 30-60 % y 60-80 % de saturación de sulfato de amonio. Se evalúa la actividad de las proteínas precipitadas de cada etapa más el sobrenadante del 80 %.

2.4.6. Purificación por medio de ultrafiltración por membrana

La ultrafiltración del extracto crudo a través de una membrana con un peso molecular específico de corte es una forma alternativa de enriquecimiento de una proteína deseada sin una pérdida significativa de actividad biológica. En esta técnica los solutos son forzados a través de una membrana, usualmente mediante presión de nitrógeno no se utiliza aire para evitar la oxidación de la proteína. Solutos pequeños pueden pasar a través de los poros de la membrana dejando retenidas las moléculas más grandes.

Las propiedades de retención de las membranas son normalmente expresadas como un MWCO que rechaza aproximadamente el 90 % de una proteína globular de un determinado peso molecular. Si la ultrafiltración se realiza primero con el propósito de, ya sea concentrar o desalinizar la proteína purificada; entonces es importante realizar experimentos piloto para verificar la capacidad de retención de la membrana previo al uso.

2.4.7. Purificación por medio de centrifugación diferencial

El principio de separación por medio de centrifugación diferencial se basa en las propiedades de tamaño molecular, forma y densidad de las diferentes proteínas. Si se centrifuga en condiciones suaves, por ejemplo: poco tiempo o poca fuerza de aceleración, estas sedimentarán las partículas mayores o densas. Cuando el sobrenadante de la primera centrifugación es centrifugado

de nuevo en condiciones de más tiempo y más fuerza de aceleración, sedimentan de nuevo las partículas más densas presentes, y así sucesivamente. Esta técnica es ampliamente usada para el fraccionamiento subcelular de un homogenizado de tejidos.

2.4.8. Purificación cromatográfica de proteínas

Todos los sistemas cromatográficos consisten en dos fases: la fase estacionaria y la móvil. La fase estacionaria puede ser un sólido, un gel, un líquido o una mezcla de sólido y líquido. Mientras que la fase móvil puede ser líquida o gaseosa y fluye a través de la fase estacionaria. Todas las purificaciones cromatográficas de proteínas se basan en un equilibrio logrado entre la fase estacionaria y la fase móvil. La mayoría de sistemas cromatográficos requieren cierto equipo en común. Este es: reservorio para amortiguador, tubería, bomba peristáltica, columna, detector UV, graficador y colector de fracciones.

2.4.8.1. Cromatografía de filtración en gel

En la filtración en gel, las proteínas son fraccionadas de acuerdo con su tamaño relativo. Este tipo de cromatografía también es reconocido como la cromatografía de permeación en gel, cromatografía de exclusión por tamaño, y de tamizado molecular. Además de utilizarse para purificación, la cromatografía de permeación en gel también se utiliza para determinar el peso molecular de la proteína y para eliminar impurezas de bajo peso molecular. En la filtración en gel, el líquido dentro de las partículas de gel está en equilibrio con una fase móvil. Las moléculas de soluto se difunden por medio de un movimiento browniano, tanto hacia dentro como fuera de las partículas del gel.

Las moléculas son separadas debido a sus diferentes habilidades de entrar a los poros de las partículas de gel. Las moléculas muy grandes no pueden entrar en los poros de las partículas de gel y así viajan muy rápido a través de los espacios intersticiales de las partículas de gel.

2.4.8.2. Cromatografía de intercambio iónico

La cromatografía de intercambio iónico es ampliamente usada al principio de un esquema de purificación y está diseñada para la separación de compuestos iónicos o ionizables en la fase móvil; mediante el colector de iones que se encuentra del lado opuesto de la fase estacionaria esta puede ser un empaque de la columna. En la cromatografía de intercambio iónico, los grupos funcionales ionizables se unen covalentemente a la fase estacionaria.

Las proteínas son anfotéricas; esto significa que contienen tanto cargas positivas como negativas. La ionización de los residuos de lisina y arginina producen cargas positivas, mientras que la ionización de residuos de ácido aspártico y glutámico producen cargas negativas. La ionización de tales grupos es dependiente del pH, y por lo tanto la carga neta de una proteína será función del pH del amortiguador. A un pH idéntico al pL de la proteína, la carga neta de una proteína es cero. A un pH mayor que el pL, la proteína está cargada negativamente, y aún pH menor que el pL, la proteína está cargada positivamente.

Durante la cromatografía, las proteínas de carga similar interactúan con cargas opuestas en la fase estacionaria, liberando otras proteínas de carga idéntica a las cargas de la fase estacionaria, liberando otras proteínas de carga idéntica a las cargas de la fase estacionaria.

Las proteínas unidas pueden entonces ser eluidas o desplazadas de la fase estacionaria por un nuevo ion; usualmente esta puede ser NaCl con una mayor afinidad por las cargas fijas de la fase estacionaria que la proteína.

La cromatografía de intercambio iónico se nombra con base en el signo de las cargas desplazables. Así, en la cromatografía de intercambio aniónico las cargas fijas son positivas, y las cargas desplazables en la fase móvil son negativas. Similarmente, en la cromatografía de intercambio catiónico, las cargas fijas son negativas y las cargas desplazables son positivas.

2.5. Actividad enzimática

La calidad del cuajo se puede determinar por medio de la actividad enzimática, determinando su variable o escasa fuerza de coagulación. Un cuajo normal es capaz de coagular 10,000 veces su volumen de leche fresca; en otras palabras un centímetro cúbico coagulará diez litros de leche a temperatura de 35 °C y en el plazo de 40 minutos.

En la actividad enzimática se ven implicadas distintas leyes que se deberán tomar en consideración. La primera de ellas dice que la cantidad de cuajo está en relación directa con la cantidad de leche. La segunda ley indica que el tiempo actúa inversamente a la coagulación, es decir que a igualdad de volumen de leche y a la misma temperatura, doble cantidad de cuajo requerirá mitad de tiempo; por ejemplo, si se cuaja en cincuenta minutos, al agregar el doble de cuajo se conseguirá la coagulación en veinticinco minutos solamente.

La última de las leyes enseña que la acción del cuajo está en relación inversa con la temperatura de la leche, suponiendo constantes las otras circunstancias.

En la industria es importante la valoración de un cuajo ya que lo más indispensable es comprobar la fuerza del mismo. Para ello se puede seguir un método y recordar que en un cuajo normal, un centímetro cúbico es capaz de coagular 10 litros de leche a 35 grados en cuarenta minutos, o 100 centímetros cúbicos solamente en veinticuatro segundos.

Recordando esto, se procede a tomar cinco centímetros cúbicos de cuajo y a mezclarlos con otros tantos de agua, añadiendo dos centímetros cúbicos de la mezcla a 100 centímetros cúbicos de leche, calentada a 35 °C, agitando intensamente y observando el número de segundos que tarda en producirse la coagulación, momento que se determina exactamente frotando contra las propias paredes de la vasija, con una varilla de cristal o con el mismo termómetro, pequeñas porciones de leche, las cuales descenderán de forma homogénea, hasta que se produzca la coagulación; es decir, hasta el instante en que se tornan granuladas. Hecho esto, basta realizar el siguiente cálculo.

Figura 2. **Ecuación para determinación de actividad enzimática**

$$\text{Actividad enzimática} = \frac{10,000 * 24}{N}$$

Fuente: Universidad País Vasco. *Tipos de cuajos y sus características*. p. 35.

En la que N representa los segundos en que se realizó la coagulación, la cual está dada en centímetros cúbicos de cuajo por litro de leche.

Porcentaje de rendimiento

El rendimiento químico es la cantidad de producto obtenido a partir de una reacción química. Para determinar el rendimiento se divide la cantidad de producto obtenido por el rendimiento teórico y se multiplica por 100 para obtener el rendimiento porcentual. Este se ve representado a partir de la siguiente ecuación:

Figura 3. Ecuación para determinar el rendimiento porcentual

$$\text{Rendimiento porcentual} = \frac{\text{Rendimiento real}}{\text{Rendimiento teórico}} * 100$$

Fuente: Ecuación de porcentaje de rendimiento.

http://es.wikipedia.org/wiki/Rendimiento_qu%C3%ADmico. Consulta: marzo de 2015.

2.6. Adsorción e intercambio iónico

Las operaciones de adsorción explotan la capacidad especial de ciertos sólidos para hacer que sustancias específicas de una solución se concentren en la superficie de la misma.

Las separaciones típicas de líquidos incluyen la eliminación de ciertas proteínas en soluciones acuosas. Se pone en contacto con la fase insoluble el sólido adsorbente; la distinta distribución de los componentes originales entre la fase adsorbida en la superficie sólida y el fluido permite que se lleve a cabo una separación.

Otra operación sólido-líquido de gran importancia es el intercambio iónico, el intercambio reversible de iones entre ciertos sólidos y una solución de electrolitos, que permite la separación y fraccionamiento de solutos electrolíticos.

La adsorción es un proceso de separación en la que ciertos componentes de una fase fluida se transfieren hacia la superficie de un sólido adsorbente. Generalmente las pequeñas partículas de adsorbente se mantienen en un lecho fijo mientras que el fluido pasa continuamente a través del lecho hasta que el sólido está prácticamente saturado y no es posible alcanzar ya la separación deseada.

Se desvía entonces el flujo hacia un segundo lecho hasta que el adsorbente saturado es sustituido o regenerado. El intercambio de ion es otro proceso que generalmente se lleva a cabo en semicontinuo, en un lecho fijo de forma similar, así que se debe ablandar o desionizar; se hace pasar sobre un lecho de esferas de resina de intercambio ion, situadas en una columna, hasta que la resina alcanza prácticamente la saturación. La separación de trazas de impurezas por reacción con sólidos puede también realizarse en lechos fijos, siendo un ejemplo bien conocido la separación del ácido sulfúrico contenido en el gas de síntesis, utilizando *pellets* de óxido de zinc.

2.6.1. Adsorbentes y procesos de adsorción

La mayor parte de los adsorbentes son materiales altamente porosos y la adsorción tiene lugar fundamentalmente en el interior de las partículas sobre las paredes de los poros en puntos específicos. Puesto que los poros son generalmente muy pequeños, el área de la superficie interna tiene varios órdenes de magnitud superior al área externa y puede alcanzar valores tan

elevados como $2000 \text{ m}^2/\text{g}$. La separación se produce debido a que diferencias de peso molecular o de polaridad dan lugar a magnitudes variadas de peso molecular o de polaridad que dan lugar a que algunas moléculas se adhieren más frecuentemente a la superficie que otras.

En muchos casos el componente que se adsorbe (adsorbato) se fija tan fuertemente que permite una separación completa de dicho componente, desde un fluido sin apenas adsorción de otros componentes. El adsorbente puede regenerarse con el fin de obtener el adsorbato en forma concentrada o prácticamente pura.

La adsorción a partir de una fase líquida se utiliza para separar componentes orgánicos de aguas residuales, impurezas coloreadas de disoluciones de azúcar y aceites vegetales, así como también agua de líquidos orgánicos. La adsorción se utiliza también para recuperar productos de reacción que no son fácilmente separables por destilación o cristalización. Algunos tipos de sólidos se utilizan indistintamente para adsorción en fase de vapor y en fase líquida, si bien los adsorbentes con mayor tamaño de poro son preferibles para el caso de líquidos.

2.6.2. Isotermas de adsorción

La isoterma de adsorción es la relación de equilibrio entre la concentración en la fase fluida y la concentración en las partículas de adsorbente a una temperatura determinada. Para el caso de gases la concentración viene generalmente dada como fracción molar o como presión parcial. Para líquidos, la concentración se expresa habitualmente en unidades de masa, tales como partes por millón.

La concentración de adsorbato sobre el sólido viene dada como masa adsorbida por unidad de masa de adsorbente original.

2.6.3. La quimisorción o adsorción activada

Es el resultado de la interacción química entre el sólido y la sustancia adsorbida. La fuerza de la unión química puede variar considerablemente y es posible que no se formen compuestos químicos en el sentido usual; pero la fuerza de adhesión es generalmente mucho mayor que la observada en la adsorción física. El calor liberado durante la quimisorción es comúnmente grande, es parecido al calor de una reacción química. El proceso frecuentemente es irreversible, en la desorción, de ordinario se descubre que la sustancia original ha sufrido un cambio químico.

La misma sustancia, que en condiciones de baja temperatura sufrió substancialmente solo la adsorción física sobre un sólido, algunas veces exhibe quimisorción a temperaturas más elevadas; además los dos fenómenos pueden ocurrir al mismo tiempo.

2.6.4. Naturaleza de los adsorbentes

Los sólidos adsorbentes por lo general se utilizan en forma granular, varían de tamaño; desde aproximadamente 12 mm de diámetro hasta granos tan pequeños de 50 micrómetros. Los sólidos deben poseer ciertas propiedades según la aplicación que se les vaya a dar. Si se utilizan en un lecho fijo a través del cual va a fluir un líquido o un gas, por ejemplo, no deben ofrecer una caída de presión del flujo muy grande, ni deben ser arrastrados con facilidad por la corriente que fluye. Deben tener adecuada consistencia para que no se reduzca su tamaño al ser manejados o para que no se rompan al soportar su propio

peso en el lecho del espesor requerido. Si se van a sacar y meter con frecuencia de los recipientes que los contienen, deben fluir libremente.

Los adsorbentes poliméricos sintéticos son un tipo de material sólido adsorbente, el cual son perlas esféricas porosas, 0,5 mm de diámetro; cada perla es un conjunto de microesferas 10^{-4} mm de diámetro. El material es sintético, fabricado de monómeros poliremizables de dos tipos principales. Los fabricados a partir de aromáticos insaturados como estireno y divinilbenceno, son útiles para la adsorción de orgánicos no polares a partir de soluciones acuosas.

Los fabricados a partir de ésteres acrílicos son adecuados para solutos más polares. Se utilizan principalmente en el tratamiento de soluciones acuosas; se regeneran por lixiviación con alcoholes o cetonas de bajo peso molecular.

2.7. Difusión

La difusión es el movimiento, bajo la influencia de un estímulo físico, de un componente individual a través de una mezcla. La causa más frecuente de la difusión es un gradiente de concentración del componente que difunde. Un gradiente de concentración tiende a mover el componente en una dirección tal, que iguale las concentraciones y anule el gradiente. Cuando el gradiente se mantiene mediante el suministro continuo de los componentes de baja y alta concentración; el flujo del componente que se difunde es continuo.

Este movimiento es aprovechado en las operaciones de transferencia de materia. Por ejemplo, un cristal de sal en contacto con una corriente de agua o de una disolución diluida, genera un gradiente de concentración en las

proximidades de la interface, difundándose la sal a través de las capas de líquido en la dirección perpendicular a la interface. El flujo de sal hacia fuera de la interface continúa hasta que el cristal se disuelve. Cuando la sal está íntimamente mezclada con un sólido insoluble, el proceso es un ejemplo de lixiviación.

Aunque la causa habitual de la difusión es un gradiente de concentración; la difusión también puede ser originada por un gradiente de presión, por un gradiente de temperatura o por la aplicación de una fuerza externa como en el caso de una centrífuga. La difusión molecular inducida por un gradiente de temperatura es la difusión térmica.

La difusión no está restringida a la transferencia molecular a través de capas estacionarias de sólido o fluido. También tiene lugar en fases fluidas debido a la mezcla física o a los remolinos del flujo turbulento, de la misma forma que el calor puede fluir en un fluido por convección. Este hecho recibe el nombre de difusión en régimen turbulento.

A veces el proceso de difusión va acompañado de flujo global de la mezcla en una dirección paralela a la dirección de difusión y con frecuencia está relacionada con el flujo de calor.

En todas las operaciones de transferencia de materia la difusión ocurre por lo menos una fase, y con frecuencia en dos fases. En absorción de gases el soluto se difunde a través de la fase gaseosa hacia la interface y a través de la fase líquida desde la interface. En destilación, el componente menos volátil difunde a través de la fase líquida hacia la interface y desde esta hacia el vapor. El componente menos volátil difunde en sentido contrario y pasa a través del vapor hasta el seno del líquido.

En lixiviación, la difusión del soluto a través de la fase sólida va seguida de la difusión en el seno del líquido. En extracción líquido-líquido el soluto difunde a través de la fase de refinado hacia la interface y después hacia el interior de la fase extracto. En cristalización, el soluto difunde a través de las aguas madres hacia los cristales y se deposita sobre las superficies sólidas. En humidificación no hay difusión a través de la fase líquida debido a que esta es un componente puro y no existe gradiente de concentración en ella; pero el vapor difunde hacia o desde la interface gas-líquido hacia fuera o hacia dentro de la fase gaseosa. En el secado, el agua líquida difunde a través del sólido hacia la superficie del mismo, se evapora, y después se difunde como vapor en la fase gaseosa.

2.8. Lixiviación

La lixiviación es la disolución preferente de uno o más componentes de una mezcla sólida por contacto con un disolvente líquido. El término extracción también se emplea por lo común para describir esta operación particular, aunque también se aplica a todas las operaciones de separación, que utilicen métodos de transferencia de masa o mecánicos. La decocción se refiere específicamente al uso del disolvente a su temperatura de ebullición. Cuando el material soluble está sobre todo en la superficie de un sólido insoluble y simplemente se lava con el disolvente, la operación algunas veces recibe el nombre de elución.

2.8.1. Preparación del sólido

El éxito de una lixiviación y la técnica que se va a utilizar dependen con mucha frecuencia de cualquier tratamiento anterior que se le pueda dar al sólido.

En algunos casos las pequeñas partículas del material soluble están completamente rodeadas de una matriz de materia insoluble. Entonces, el disolvente se debe difundir en la masa y la solución resultante se debe difundir hacia el exterior antes de poder lograr una separación. Esto es lo que sucede con muchos materiales metalúrgicos.

La trituración y molienda de estos sólidos acelerará bastante la acción de lixiviación, porque las porciones solubles son entonces más accesibles al disolvente. Por ejemplo, cierto mineral de cobre puede lixiviarse eficazmente por soluciones de ácido sulfúrico de 4 a 8 h, si se muele hasta que pase a través de una malla 60; en 5 días, si se tritura hasta gránulos de 6 mm, y de 4 a 6 años si se utilizan rocas de 140 mm.

Cuando la sustancia soluble está distribuida más o menos uniformemente en todo el sólido o aun en solución del sólido, la acción de lixiviación puede proporcionar canales para el paso del disolvente fresco y tal vez no sea necesaria una molienda muy fina. El derrumbe del esqueleto insoluble que permanece después de la separación del soluto puede, sin embargo, presentar problemas.

2.8.2. Eficacia de las etapas en lixiviación

La eficacia de las etapas en un proceso de lixiviación depende del tiempo de contacto entre el sólido y la disolución, así como de la velocidad de difusión del soluto desde el sólido hacia el líquido. Si las partículas del sólido no son porosas y el soluto solamente está contenido en la película de líquido que rodea a las partículas, la transferencia de materia es rápida y un tiempo de contacto razonable conducirá al equilibrio.

Un proceso de este tipo es en realidad un lavado en vez de una lixiviación, y si se realiza en una serie de tanques, la eficacia de las etapas se puede tomar igual a la unidad. El tiempo de residencia en cada etapa depende principalmente de la velocidad de sedimentación de la suspensión; las pequeñas partículas requieren tiempos más largos, si bien la transferencia de materia es más rápida.

Cuando la mayor parte del soluto está inicialmente disuelta en los poros de un sólido poroso, o presente en una fase separada en el interior de partículas sólidas, la velocidad de difusión desde el interior hacia la superficie del sólido, generalmente es la etapa controlante de la velocidad global de lixiviación.

Una vez que las partículas están suspendidas en el líquido, el aumento de la agitación tiene poco efecto sobre la velocidad de transferencia de materia, pero en cambio la velocidad aumenta considerablemente si el sólido está finalmente dividido.

Cuando la resistencia interna a la difusión es el único factor limitante, el tiempo necesario para alcanzar un determinado grado de acercamiento al equilibrio, varía con el cuadrado de la menor dimensión de las partículas, tanto si las partículas son esferas, cilindros o láminas delgadas.

Cuando se lixivian minerales contenidos en un material pétreo, el tamaño óptimo de las partículas está determinado por el coste de molienda y la variación de la velocidad con el tamaño de partículas. La lixiviación de materiales naturales, tales como remolacha azucarera o habas de soja, es compleja debido a que el material está contenido en células vegetales; antes ha de pasar a través de la pared celular.

Si la resistencia de esta etapa es relativamente grande, el efecto de cortar partículas más pequeñas no será tan grande como en el caso de difusión en un sólido uniforme. En la extracción de aceite a partir de habas de soja, el material se tritura para romper las paredes celulares y dejar libre el aceite, pero la remolacha se corta formando láminas que dejan la mayor parte de las células en contacto, lo que retarda la difusión de las impurezas de elevado peso molecular más que la difusión de la sacarosa.

Bajo ciertas condiciones idealizadas, la eficacia de las etapas en la extracción de algunos (pero no todos) materiales celulares puede estimarse a partir de datos experimentales de difusión obtenidos en las mismas condiciones de agitación y temperaturas que se han de utilizar en la planta.

3. DISEÑO METODOLÓGICO

3.1. Localización

El desarrollo de la parte experimental del tema de investigación, fue realizado en la Universidad de San Carlos de Guatemala; en las instalaciones del Laboratorio de Investigación de Extractos Vegetales (LIECVE), Sección de Química Industrial del Centro de Investigaciones de Ingeniería.

3.2. Variables

Dentro de las variables que fueron consideradas dentro del desarrollo del tema de investigación fue importante tomar en cuenta tanto las variables independientes, las cuales fueron consideradas como las causas, y las variables dependientes consideradas como el factor observado y medido para determinar el efecto de la variable independiente.

3.2.1. Variables independientes

- Tiempo de maceración que fue necesario para obtener la quimosina en solución. los tiempos fueron 1, 2 y 3 horas.
- Edad del ternero: puesto que se variaron a medida que se aumentó la edad del ternero. las edades fueron durante la lactancia y poslactancia.

3.2.2. Variables dependientes

- Densidad de la quimosina

- Actividad enzimática
- Rendimiento de la extracción

3.3. Delimitación del campo de estudio

El procedimiento de extracción de la quimosina producida de forma natural a través del cuarto estómago de ternero a partir de diferentes tiempos de extracción y edades del bovino a escala laboratorio; se realizó en el Laboratorio de Investigación de Extractos Vegetales (LIEXVE) sección de Química Industrial, del Centro de Investigaciones de Ingeniería de la Universidad de San Carlos se realizó la extracción a dos diferentes edades del ternero; durante la lactancia y poslactancia y a tres diferentes tiempos extractivos (1, 2 y 3 horas). Se realizaron 3 repeticiones para cada una de las variables, y así obtener datos con bajo grado de incerteza.

3.4. Obtención de las muestras

La obtención de las muestras se logró por medio de una solicitud realizada a persona dedicada a la venta de derivados de ganado vacuno y se acordó proveer el abomaso de las edades solicitadas. Estas venían del departamento de Jutiapa, específicamente del municipio de Moyuta; con personas que se dedican también a la compra y venta de ganado vacuno.

3.5. Recurso humano disponible

- Investigadora: Gabriela Marlene Caal Martínez
- Asesora: Inga. Qca Telma Maricela Cano Morales
- Coasesor: Ing. Qco Mario José Mérida Meré

3.6. Recursos materiales disponibles

- Insumos
 - o Marcadores: para etiquetar.
 - o Cinta adhesiva: Utilizada para etiquetar
 - o Papel filtro. Utilizado en la separación de sólido-líquido
 - o Hojas papel bond

- Equipo de protección personal
 - o Bata
 - o Botas industriales
 - o Guantes

- Cristalería y equipo de trabajo
 - o Balanza analítica
 - o Plancha de calentamiento con agitación
 - o Balón aforado
 - o Agitadores
 - o Embudo de separación
 - o Embudo *buchner*
 - o Probetas de 10 mL, 100 mL y 500 mL
 - o Beakers de 50 mL, 100 mL y 1000 mL de pirex
 - o Termómetro
 - o Potenciómetro
 - o Pipeta volumétrica
 - o Bomba de vacío

- Reactivos
 - o Polietilenglicol
 - o Sulfato de sodio anhidro
 - o Cloruro de sodio grado industrial
 - o Ácido sulfúrico
 - o Fosfato di ácido de sodio
 - o Resina catiónica de ácido fuerte (de venta en el mercado nacional para tratamiento de agua).
- Materia prima
 - o Abomaso de ternero (edad lactancia y poslactancia)

3.7. Técnicas cuantitativas de la investigación

- Extracción y purificación de la quimosina.
 - o Solución acuosa

Se obtuvo el abomaso tratando de dejar únicamente la parte interna de la pieza para obtener la mayor cantidad de quimosina en solución y evitar otro tipo de contaminantes. Posteriormente se procedió a pesar la cantidad estándar y poder tener cantidades iguales de quimosina en solución.

- o Homogeneización de cuchillas: luego del pesado se procedió a la extrusión por medio de cuchillas para hacer una solución rica en quimosina. Se reguló el pH a 3,5 con ácido sulfúrico para evitar crecimiento bacteriano.

- o Maceración dinámica: se colocó la solución con el pH regulado a 3,5 con ácido sulfúrico y se colocó en maceración dinámica durante 1, 2 y 3 horas las cuales formaron parte de las variables de la investigación.

- o Filtración: posteriormente de la maceración se procedió a la filtración para eliminar contaminantes sólidos y poder obtener la solución contenedora de quimosina. A esta fase se le reguló nuevamente el pH a 3,5, ya que esto evitó la contaminación y crecimiento bacteriano en la solución. Al finalizar la filtración se adicionó a la solución.

- o Centrifugación: a la solución contenedora de quimosina ya filtrada se le agregó polietilenglicol al 20 % en peso respecto del volumen y a su vez el sulfato de sodio anhidro en un 11 % respecto del volumen, para garantizar la mayor cantidad de separación en fase de la quimosina. Luego se procedió a realizar el centrifugado durante 10 minutos a la máxima potencia en revoluciones por minuto, para obtener en la fase del polietilenglicol la quimosina y proceder a su debida separación.

- o Cromatografía de intercambio catiónico: en esta fase, la solución contenedora de quimosina en el polietilenglicol se midió previamente el pH que se encontraba a 3,5 y se hizo fluir esta solución en la columna de intercambio iónico, dejando pasar los contaminantes y reteniendo la quimosina. Se realizaron dos lavados, el primero con una solución de cloruro de sodio (NaCl) a 0,5M para eliminar cualquier residuo de polietilenglicol y pepsina, aún presentes en la resina; el segundo lavado se realizó con fosfato

diácido de sodio a 0,05M y con una solución 2 molar de cloruro de sodio para desprender en masa a la quimosina.

- o Determinación de densidad: para la determinación de densidad se tomó una alícuota de 25 mL en cada una de las extracciones y se midió el peso, esto para las dos diferentes edades del ternero (durante la lactancia y poslactancia), así también para los tres diferentes tiempos de maceración dinámica (1,2 y 3 horas).
- o Actividad enzimática: para la determinación de la actividad enzimática ha sido necesario tomar una alícuota de la quimosina en solución estándar para cada una de las pruebas la cual fue de 20 mL. Posteriormente se tomaron para cada una de las extracciones una cantidad de 75 mL de leche, a la cual se le agregaron los 20 mL de la solución de quimosina.

Luego de realizado lo anterior, se procedió a medir el tiempo en el cual se efectuaba la separación de la caseína del suero totalmente. A esto se le anotó el tiempo, volumen y peso.

- o Rendimiento de la actividad enzimática: el rendimiento se ha obtenido por medio de la relación entre peso de la caseína separada del suero y la cantidad total utilizada de leche utilizada en cada una de las pruebas.

3.8. Análisis estadístico de los datos

Se realizó para cada componente de la determinación fisicoquímica un análisis de varianza por medio de un diseño de bloques aleatorio con la distribución de Fisher; esto es debido a que se trataron más de dos diferentes niveles para la tabulación de la información. A continuación se muestra la manera en la que se arregló cada tratamiento:

Tabla I. Datos típicos para el diseño de bloques al azar

COMPONENTE	OBSERVACIONES O SERIES					
	Cn					
Tratamientos	1	2	3	J	Total a	Promedio a
1	$Y_{1,1}$	$Y_{1,2}$	$Y_{1,3}$	$Y_{1,1}$	$Y_{1,a}$	$Y_{1,a}$
2	$Y_{2,1}$	$Y_{2,2}$	$Y_{2,3}$	$Y_{1,1}$	$Y_{2,a}$	$Y_{2,a}$
3	$Y_{3,1}$	$Y_{3,2}$	$Y_{3,3}$	$Y_{1,1}$	$Y_{3,a}$	$Y_{3,a}$
	:	:	:	:	:	:
I	$Y_{i,1}$	$Y_{i,b}$	$Y_{i,b}$	$Y_{i,j}$	$Y_{i,a}$	$Y_{i,a}$
Total b	$Y_{i,b}$	$Y_{2,b}$	$Y_{3,b}$	$Y_{1,b}$	$Y_{i,j}$	
Promedio b	$Y_{i,b}$	$Y_{2,b}$	$Y_{3,b}$	$Y_{1,b}$		Y

Fuente: MONTGOMERY, Douglas C.; HINES, William.. *Probabilidad y estadística para ingeniería y administración*. 834p.

En donde:

$Y_{i,j}$ = total de las observaciones bajo el i,j -ésimo tratamiento

y = promedio total de las observaciones bajo el i,j -ésimo tratamiento

$Y_{a,b}$ = datos obtenidos para cada observación bajo cada tratamiento

Por lo general un procedimiento para el diseño de un bloque aleatorio consiste en seleccionar b bloques y en ejecutar una repetición completa del experimento en cada bloque, con un solo factor con a niveles. Cada una de las observaciones establecidas puede representarse por medio de un modelo estadístico lineal de la siguiente manera:

$$\begin{aligned} i &= 1, 2, \dots, a \\ y_{ij} &= \mu + \tau_i + \beta_j + \epsilon_{ij} \\ j &= 1, 2, \dots, b \end{aligned}$$

Donde:

y_{ij} = observación

μ = media general

τ_i = efecto del tratamiento i -ésimo

β_j = efecto del bloque j -ésimo

ϵ_{ij} = error aleatorio

Los efectos de bloque y tratamiento se definen como desviaciones respecto de la media general. Como el interés es probar la igualdad de los efectos del tratamiento, siendo:

$$H_0: \tau_1 = \tau_2 = \dots = \tau_a = 0$$

$$H_1: \tau_i \neq 0 \text{ al menos una } i$$

Las operaciones para el análisis de varianza se resumen en la siguiente tabla, así como las fórmulas para el cálculo de suma de cuadrados.

Tabla II. **Análisis de varianza para el experimento de bloque aleatorio**

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media cuadrática	F _o
Tratamientos	$\sum_{i=1}^a y_{i.}^2 b - y^2 \dots ab$	$a - 1$	$(SS_{tratamientos}) / (a - 1)$	$(MS_{tratamientos}) / MS_E$
Bloques	$\sum_{j=1}^b y_{.j}^2 b - y^2 \dots ab$	$b - 1$	$(SS_{tratamientos}) / (b - 1)$	
Error	SS_E (<i>por sustracción</i>)	$(a - 1)$ $(b - 1)$	$(SS_E) / [(a - 1) / (b - 1)]$	
Total	$\sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^b y_{ij}^2 - y^2 \dots ab$	$ab - 1$		

Fuente: MONTGOMERY, Douglas C.; HINES, William.. *Probabilidad y estadística para ingeniería y administración*. p. 834.

La hipótesis nula de ningún efecto de tratamiento se probó mediante la razón de Fisher, que se define como: $F = \frac{MS_{Tratamientos}}{MS_E}$ donde $MS_{tratamientos}$ es la media cuadrática de los tratamientos y MSE es la media cuadrática del error; y que para un nivel de confianza $\alpha = 0.05$ y con 2 grados de libertad para tratamientos y 5 para bloques.

3.9. Recolección y ordenamiento de la información

En la elaboración del estudio de investigación se recolectaron los distintos datos obtenidos durante el desarrollo del mismo. Se determinó la actividad enzimática de la quimosina para cada una de las muestras y porcentaje de rendimiento.

Tabla III. **Resultados de la quimosina producida de forma natural a través del cuarto estomago de ternero durante la lactancia y tiempo de maceración dinámica de 1 hora**

Peso (g)	Volumen de quimosina (mL)	Tiempo de cuajo (s)
26,660	24,965	6220
26,090	24,965	7200
26,730	24,965	7400

Fuente: elaboración propia, con datos experimentales.

Tabla IV. **Resultados de la quimosina producida de forma natural a través del cuarto estómago de ternero durante la lactancia y tiempo de maceración dinámica de 2 horas**

Repeticiones	Peso (g)	Volumen de quimosina (mL)	Tiempo (s)
1	27,180	24,965	7120
2	27,600	24,965	6220
3	27,200	24,965	7160

Fuente: elaboración propia, con datos experimentales.

Tabla V. **Resultados de la quimosina producida de forma natural a través del cuarto estómago de ternero durante la lactancia y tiempo de maceración dinámica de 3 horas**

Repeticiones	Volumen de quimosina (mL)	Tiempo (s)
1	24,965	7030
2	24,965	6980
3	24,965	6870

Fuente: elaboración propia, con datos experimentales.

Tabla VI. **Resultados de la quimosina producida de forma natural a través del cuarto estómago de ternero durante la poslactancia y tiempo de maceración dinámica de 1 hora**

Repeticiones	Peso (g)	Volumen de quimosina (mL)	Tiempo (s)
1	26,630	24,965	8220
2	27,210	24,965	8220
3	27,660	24,965	8360

Fuente: elaboración propia, con datos experimentales.

Tabla VII. **Resultados de la quimosina producida de forma natural a través del cuarto estómago de ternero durante la poslactancia y tiempo de maceración dinámica de 2 horas**

Repeticiones	Peso (g)	Volumen de quimosina (mL)	Tiempo (s)
1	27,520	24,965	7960
2	26,880	24,965	8100
3	26,890	24,965	7980

Fuente: elaboración propia, con datos experimentales.

Tabla VIII. **Resultados de la obtención de la quimosina producida de forma natural a través del cuarto estómago de ternero durante la poslactancia y tiempo de maceración dinámica de 3 horas**

Repeticiones	Peso (g)	Volumen de quimosina (mL)	Tiempo (s)
1	27,000	24,965	7630
2	25,780	24,965	7850
3	26,900	24,965	7640

Fuente: elaboración propia, con datos experimentales.

3.10. Tabulación, ordenamiento y procesamiento de la información

A continuación se mostrará los datos obtenidos a partir del estudio de investigación en donde se tabularon, ordenaron y procesaron los datos obtenidos de la densidad, actividad enzimática,

Tabla IX. **Densidad de la quimosina obtenida a partir del cuarto estómago de ternero en edad de lactancia a tres diferentes tiempos de maceración dinámica**

Tiempo (h)	Repeticiones	Densidad (g/mL)	Densidad Promedio (g/mL)	Error en la densidad	Error Promedio	Desviación Estándar
1	1	1,068	1,061	0,010	0,011	0,014
	2	1,045		0,010		
	3	1,071		0,010		
2	1	1,089	1,094	0,010	0,011	0,009
	2	1,106		0,011		
	3	1,090		0,010		
3	1	1,086	1,089	0,010	0,011	1,094
	2	1,094		0,010		
	3	1,088		0,010		

Fuente: elaboración propia, con base en recolección y ordenamiento de la información, (tablas III, IV, V).

Tabla X. **Densidad de la quimosina a partir del cuarto estómago de ternero en edad de poslactancia a tres diferentes tiempos de maceración dinámica**

Tiempo (h)	Repeticiones	Densidad (g/mL)	Densidad Promedio (g/mL)	Error en la densidad
1	1	1,067	1,088	0,010
	2	1,090		0,011
	3	1,108		0,011
2	1	1,102	1,085	0,011
	2	1,077		0,011
	3	1,077		0,011
3	1	1,082	1,064	0,011
	2	1,033		0,010
	3	1,078		0,011

Fuente: elaboración propia, con base en recolección y ordenamiento de la información, (tablas VI, VII, VIII).

Tabla XI. **Actividad enzimática de la quimosina obtenida a partir del cuarto estómago de ternero en edad de lactancia, a diferentes tiempos de maceración dinámica**

Tiempo (h)	Repeticiones	Actividad Enzimática (cm ³ /L)*	Actividad enzimática promedio (cm ³ /litro)	Desviación estándar de actividad enzimática	Rendimiento De actividad enzimática (%) **
1	1	38,585	34,783	3,322	35,550
	2	33,333			34,790
	3	32,432			35,640
2	1	33,708	35,270	2,871	36,240
	2	38,585			36,800
	3	33,519			36,270
3	1	34,139	34,486	0,04072	36,160
	2	34,384			36,410
	3	34,934			36,230

*Según ecuación de la figura Núm.2= Actividad enzimática=10,000*24/N referencia bibliográfica 14
 ** Según la ecuación de la figura Núm.3= Rendimiento porcentual = Rend. real/Rend Teórico*100

Fuente: elaboración propia, con base en recolección y ordenamiento de la información, tablas (III, IV, V).

Tabla XII. **Actividad enzimática de la quimosina obtenida a partir del cuarto estómago de ternero en edad de poslactancia a diferentes tiempos de maceración dinámica**

Tiempo (h)	Repeticiones	Actividad enzimática (cm ³ /L) *	Actividad enzimática promedio (cm ³ /l)	Desviación estándar de actividad enzimática	Rendimiento actividad enzimática (%)**
1	1	29,197	29,034	0,282	35,510
	2	29,197			36,280
	3	28,708			36,880
2	1	30,150	29,951	0,281	36,690
	2	29,629			35,840
	3	30,075			35,850
3	1	31,454	31,147	0,497	36,000
	2	30,573			34,370
	3	31,413			35,870

*Según ecuación de la figura No.2= Actividad enzimática=10,000*24/N
referencia bibliográfica 14

** Según la ecuación de la figura No.3= Rendimiento porcentual=Rend. Real/Rend. Teórico*100

Fuente: elaboración propia, con base en recolección y ordenamiento de la información, (tablas VI, VII, VIII).

4. RESULTADOS

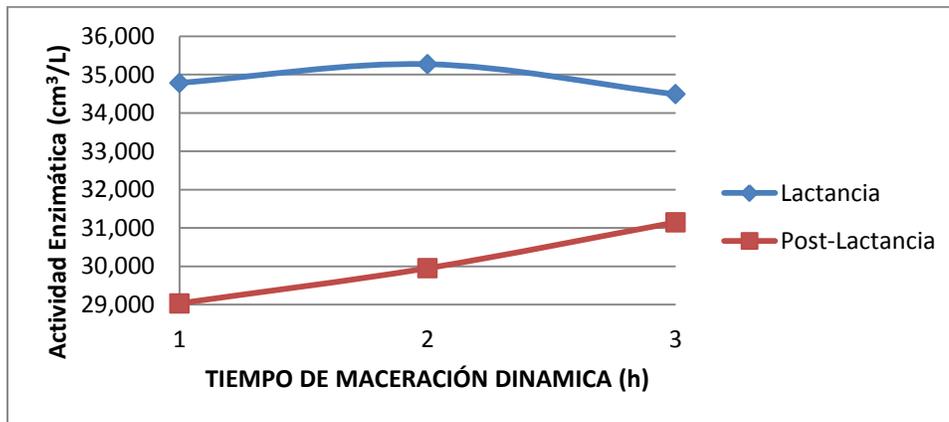
En el estudio de investigación, se han recolectado y ordenado los datos en la medición de actividad enzimática, densidades y porcentaje de actividad enzimática obtenidos en las diferentes edades de ternero y tiempos de maceración, obteniendo los siguientes resultados:

Tabla XIII. **Actividad enzimática de la quimosina obtenida a partir del cuarto estómago de ternero en edad de lactancia y poslactancia, a diferentes tiempos de maceración dinámica**

Edad del ternero	Tiempo de maceración dinámica (h)	Actividad enzimática Promedio (cm ³ /L) *	Desviación estándar de actividad enzimática
Lactancia	1	34,783	3,322
	2	35,270	2,871
	3	34,486	0,407
Poslactancia	1	29,034	0,262
	2	29,951	0,281
	3	31,147	0,497

Fuente: elaboración propia, con base en tabulación, ordenamiento y procesamiento de la información, tablas XI, XII.

Figura 4. **Gráfica de la actividad enzimática de la quimosina obtenida a partir del cuarto estómago de ternero en edad de lactancia y poslactancia, a diferentes tiempos de maceración dinámica**



Fuente: elaboración propia, con base en tabulación, ordenamiento y procesamiento de la información, (tablas XI, XII,).

Tabla XIV. **Ecuación de la gráfica de actividad enzimática de la quimosina obtenida a partir del cuarto estómago de ternero en edad de lactancia y poslactancia, a diferentes tiempos de maceración dinámica**

Edad de ternero	Ecuación del gráfico	Valor de R ²
Lactancia	$Y = -0,6355x^2 + 2,3935x + 33.025$	1
Poslactancia	$Y = 1,0565x + 27,931$	0,9942

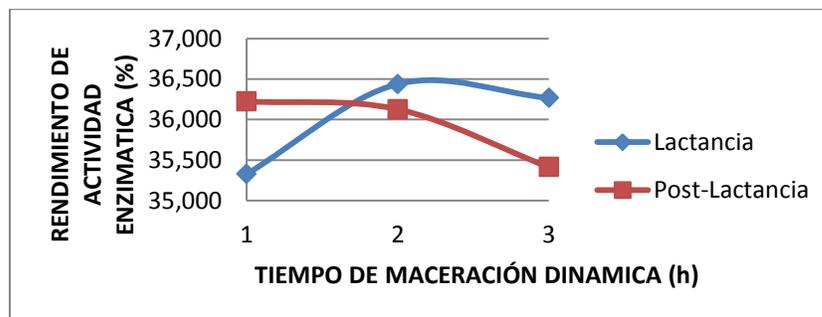
Fuente: elaboración propia, datos obtenidos de figura.4.

Tabla XV. **Porcentaje de rendimiento de la actividad enzimática de la quimosina obtenida a partir del cuarto estómago de ternero en edad de lactancia y poslactancia a diferentes tiempos de maceración dinámica**

Edad del ternero	Tiempo de maceración dinámica (h)	Rendimiento de actividad enzimática promedio (%) *	Desviación del rendimiento promedio
Lactancia	1	35,327	0,467
	2	36,437	0,315
	3	36,267	0,129
Poslactancia	1	36,223	0,687
	2	36,127	0,488
	3	35,413	0,906

Fuente: elaboración propia, con base en tabulación, ordenamiento y procesamiento de la información (tablas XI, XII).

Figura 5. **Gráfica de porcentaje de rendimiento de la actividad enzimática de la quimosina obtenida a partir del cuarto estómago de ternero en edad de lactancia y poslactancia, a diferentes tiempos de maceración dinámica**



Fuente: elaboración propia, con base en tabulación, ordenamiento y procesamiento de la información (tablas XI, XII).

Tabla XVI. **Ecuación de la gráfica de porcentaje de rendimiento de actividad enzimática de la quimosina obtenida a partir del cuarto estómago de ternero en edad de lactancia y poslactancia a diferentes tiempos de maceración dinámica**

Edad del ternero	Ecuación del gráfico	Valor de R²
Lactancia	$Y=-0,64x^2+3,03x+32,937$	1
Poslactancia	$Y=-0,3083x^2+0,8283x+35,703$	1

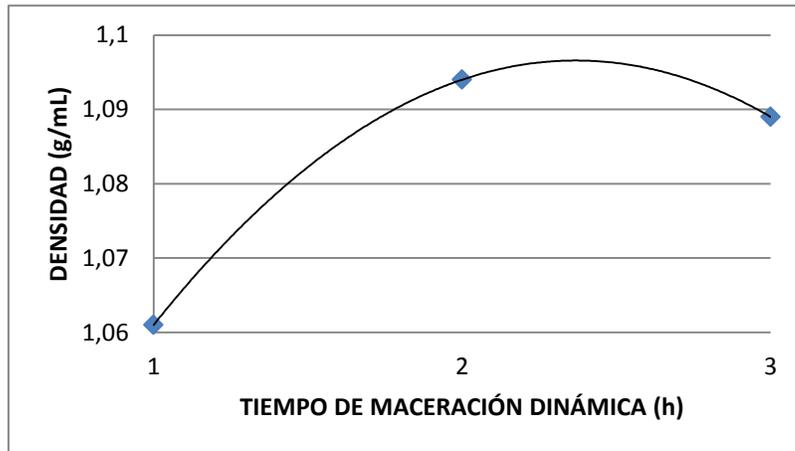
Fuente: elaboración propia, datos obtenidos de figura 5.

Tabla XVII. **Densidad de la quimosina obtenida a partir del cuarto estómago de ternero en edad de lactancia a tres diferentes tiempos de maceración dinámica**

Tiempo (h)	Densidad promedio (g/mL)	Error promedio en la densidad	Desviación estándar de la Densidad
1	1,061	0,011	0,014
2	1,094	0,011	0,009
3	1,089	0,011	1,094

Fuente: elaboración propia, con base en tabulación, ordenamiento y procesamiento de la información (tabla IX).

Figura 6. **Gráfica de la densidad versus tiempo de maceración dinámica de la quimosina obtenida en edad de lactancia**



Fuente: elaboración propia, con base en tabulación, ordenamiento y procesamiento de la información (tabla IX).

Tabla XVIII. **Ecuación de la gráfica de densidad versus tiempo de maceración dinámica de la quimosina en edad de lactancia**

Ecuación del gráfico	$Y = -0,019x^2 + 0,09x + 0,99$
Valor de R^2	1

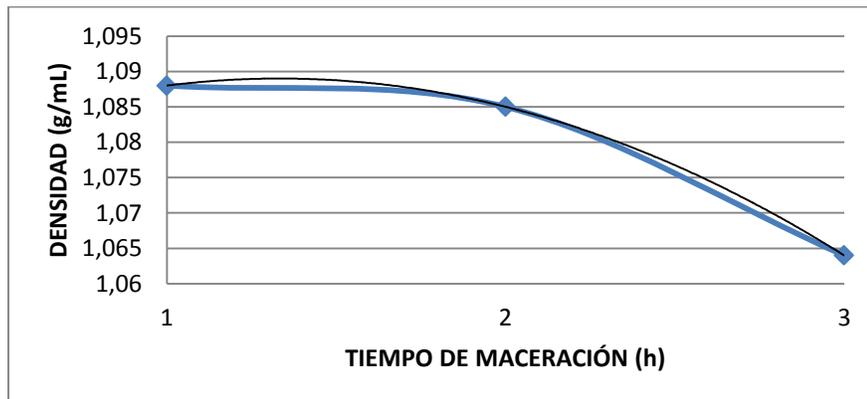
Fuente: elaboración propia, datos obtenidos de figura 6.

Tabla XIX. **Densidad de la quimosina a partir del cuarto estómago de ternero en edad de poslactancia a tres diferentes tiempos de maceración dinámica**

Tiempo (h)	Densidad promedio (g/mL)	Error promedio en la densidad	Desviación estándar de la densidad
1	1,088	0,011	0,020
2	1,085	0,011	0,014
3	1,064	0,010	1,032

Fuente: elaboración propia, con base en tabulación, ordenamiento y procesamiento de la información (tabla X).

Figura 7. **Gráfica de la densidad versus tiempo de maceración dinámica de la quimosina obtenida en edad de poslactancia**



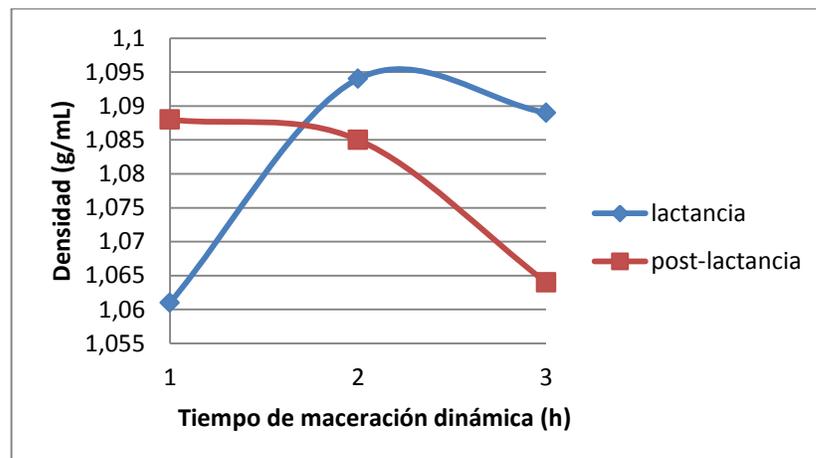
Fuente: elaboración propia, con base en tabulación, ordenamiento y procesamiento de la información (tabla X).

Tabla XX. Ecuación de la gráfica de densidad versus tiempo de maceración dinámica de la quimosina en edad de poslactancia

Ecuación del gráfico	$Y=-0,009x^2+0,024x-1,073$
Valor de R ²	1

Fuente: elaboración propia, datos obtenidos de figura No.7.

Figura 8. Gráfica comparativa de la densidad de la quimosina obtenida a partir del cuarto estómago de ternero a diferentes tiempos de maceración dinámica en edad de lactancia y poslactancia



Fuente: elaboración propia, con base en tabulación, ordenamiento y procesamiento de la información (tablas IX, X).

Tabla XXI. **Resultado del análisis microbiológico obtenido de la quimosina producida de forma natural a partir del cuarto estómago de ternero, a diferentes tiempos de maceración**

ANALISIS	RESULTADO	DIMENSIONAL
Recuento de coliformes Totales	<3 NMP/mL	NMP/mililitro
Recuento de coliformes fecales	<3 NMP/mL	NMP/mililitro
Aislamiento de Identificación de <i>Escherichia coli</i>	Ausencia	Ausencia o presencia
Recuento e identificación de <i>Staphylococcus aureus</i>	<10 UFC/mL	UFC/MI

Fuente: Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, USAC.

5. INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

En el desarrollo del presente trabajo de graduación, el cual trata sobre la extracción de la quimosina producida de forma natural a través del cuarto estómago de ternero; se evaluaron diferentes parámetros como actividad enzimática, rendimiento de actividad enzimática, evaluación de la densidad y si es apta o no para el consumo humano. Lo anterior fue realizado a escala laboratorio.

Inicialmente se procedió a realizar la limpieza del abomaso, seccionando únicamente las piezas internas, las cuales eran de mayor importancia por la cantidad de quimosina contenida en estas piezas, para garantizar la mayor extracción de la enzima. Luego se realizó una homogeneización de cuchillas donde se colocó la misma cantidad de sólido para todas las muestras y se les agregó agua desmineralizada para poder romper la membrana y liberar en solución a la quimosina; a esta se le reguló el pH a 3,5 con ácido sulfúrico, para evitar contaminación microbiana y facilitar la extracción.

Luego de realizar la homogeneización de cuchillas, se realizó la maceración dinámica a tres diferentes horas para cada una de las muestras, las cuales fueron 1, 2 y 3 horas y se procedió al filtrado para eliminar contaminantes sólidos y dejar únicamente en solución la quimosina, se reguló el pH a 3,5, para evitar una contaminación microbiana. Posteriormente se agregó a la solución acuosa de quimosina el polietilenglicol en un 20 % en peso y sulfato de sodio anhidro en un 11% respecto del volumen, para garantizar sistemas de dos fases donde la fase del polietilenglicol contiene a la quimosina,

esto se logró realizando un centrifugado para eliminar cualquier sólido aún presente en la solución contenedora de quimosina.

Se realizó una cromatografía de intercambio iónico en la que se hizo fluir la solución de propilenglicol, rica en quimosina y otros contaminantes, dejando pasar los contaminantes y adhiriendo a la resina la quimosina y pepsina. Para retirar la quimosina de la resina se realizaron dos lavados: el primero con una solución de cloruro de sodio (NaCl) a 0,5 M para eliminar cualquier residuo de polietilenglicol y pepsina aún presentes en la resina; el segundo lavado se realizó con fosfato di ácido de sodio a 0,05M y una solución 2M de cloruro de sodio para desprender en masa a la quimosina.

En la tabla XIII en la que se encuentran tabulados los datos de la actividad enzimática de la quimosina obtenida a partir del cuarto estómago de ternero en edad de lactancia y poslactancia a diferentes tiempos de maceración dinámica se puede observar que los datos varían notablemente entre la actividad enzimática durante la lactancia y la poslactancia, tal como se puede observar en la figura 4, en donde el punto máximo en actividad enzimática se encuentra en la extracción con maceración dinámica de 2 horas con abomaso de ternero en edad de lactancia, la cual tiene una actividad enzimática de $35,270 \text{ cm}^3/\text{L}$.

Como se puede observar el punto máximo de actividad enzimática de la quimosina en poslactancia se encuentra en la obtenida con un tiempo de maceración dinámica de 3 horas, la cual corresponde a $31,147 \text{ cm}^3/\text{L}$. En cuanto a la relación del tiempo de maceración dinámica respecto de la actividad enzimática para la edad de lactancia, es inversamente proporcional en relación con la actividad enzimática; en cuanto al abomaso en edad de poslactancia es directamente proporcional a mayor tiempo de maceración dinámica existe una mayor actividad enzimática.

En la tabla XV en la que se encuentran tabulados los datos del rendimiento de la actividad enzimática de la quimosina obtenida a partir del cuarto estómago de ternero en edad de lactancia y poslactancia a diferentes tiempos de maceración dinámica; se puede observar que los rendimientos difieren muy poco entre sí, ya que la cantidad de sólidos obtenida en relación con la cantidad de leche total utilizada en cada una de las muestras representa significativamente un porcentaje de rendimiento por debajo del 50 %, representado como el mayor de los datos.

Se observa en el abomaso en edad de lactancia con un tiempo de maceración dinámica de 2 horas 36,437 % de rendimiento en la actividad enzimática y el menor de los rendimientos en la actividad enzimática en el abomaso en edad de lactancia con un tiempo de maceración dinámica de 1 hora 35,327 %.

Como se puede observar en la figura 4 las tendencias que se representan en cada una de las líneas la relación que existe entre el rendimiento y el tiempo de maceración dinámica en edad de lactancia aumenta a medida que el tiempo transcurre llegando al máximo de 2 horas de maceración; a partir de ese punto tiene un decrecimiento en el rendimiento, mientras que para el abomaso en edad de poslactancia se puede observar que la tendencia decrece a medida que transcurre el tiempo de maceración, por lo cual se puede decir que es inversamente proporcional el rendimiento de actividad enzimática en relación al tiempo de maceración dinámica.

En la tabla XVII se encuentran tabulados los datos de la densidad promedio de la quimosina obtenida a partir del cuarto estómago de ternero en edad de lactancia, a tres diferentes tiempos de maceración dinámica; como se puede observar de mejor manera en la figura 6 inicialmente la densidad es

1,061 g/mL; la cual representa el menor de los datos, entre la primera y segunda hora de la maceración, la densidad aumenta, disminuyendo en la tercera hora levemente, pudiendo observar que el tiempo óptimo de la extracción es de dos horas, ya que presenta una densidad de 1,094 g/mL.

De igual manera en la tabla XIX en la que se encuentran tabulados los datos de la densidad de la quimosina a partir del cuarto estómago de ternero en edad de poslactancia, a tres diferentes tiempos de maceración dinámica, se puede observar que la tendencia en la densidad decrece a medida que el tiempo aumenta; la tendencia es inversamente proporcional. La densidad mayor se encuentra en un tiempo de maceración de 1 hora la cual es 1,088 g/mL y la menor se encuentra a un tiempo de maceración de 3 horas en la que la densidad es 1,064 g/mL. En la figura 7 se puede observar de manera comparativa que en los datos de la densidad, el punto máximo se ve representado en la densidad del abomaso de ternero en edad de lactancia.

En la tabla XXI, en la que se encuentran los resultados del análisis microbiológico obtenido de la quimosina producida de forma natural a partir del cuarto estómago de ternero, a diferentes tiempos de maceración, se puede observar que el número de coliformes totales se encuentran en el rango permisible, de igual manera los coliformes fecales y una ausencia total de *Escherichia coli*, y muy por debajo del máximo de *Staphylococcus aureus*.

En la tabla XXII del apéndice se puede observar que el porcentaje de error en los datos de la densidad del abomaso de ternero en edad de lactancia y poslactancia se encuentra por debajo del 1,1, por lo que se puede decir que los datos no representan mayor error en el método.

En las tabla XXIII del apéndice en donde se encuentran los resultados de análisis estadístico de la densidad de la quimosina obtenida a partir del abomaso de ternero en edad de lactancia y poslactancia, a diferentes tiempos de maceración dinámica, se encuentra que la desviación estándar para los datos es mínimamente considerable, ya que los datos se encuentran poco dispersos, el coeficiente de variación se encuentra debajo de 1, por lo que se puede decir que los datos obtenidos son homogéneos. Los datos obtenidos en el coeficiente de Fisher son menores a 1 se confirma entonces que los datos corresponden a la hipótesis estadística.

En la tabla XXIV se puede observar que la desviación estándar no representa mayor dispersión en los datos, al igual que el coeficiente de variación; se puede observar que existe homogeneidad en los datos. En la prueba de Fisher los datos se encuentran menores a 1, al igual que la prueba de χ^2 en la que se puede observar que los datos corresponden a la hipótesis de investigación.

CONCLUSIONES

1. Se obtuvo quimosina a partir del abomaso de ternero en edad de lactancia y en edad de poslactancia, para los cuales se obtuvo un mayor rendimiento de actividad enzimática de 36,437 % que corresponde al abomaso de ternero en edad de lactancia y una mayor actividad enzimática de 35,270 cm³/L con abomaso de ternero en edad de lactancia.
2. Se obtuvo quimosina por medio de maceración dinámica a tres diferentes tiempos de duración, en la cual se determinó que la mayor actividad enzimática se da en un tiempo de maceración dinámica de 2 horas para el abomaso en edad de lactancia, y de 3 horas para el abomaso de ternero en edad de poslactancia.
3. Se obtuvo quimosina por medio de maceración dinámica a tres diferentes tiempos de duración en la cual se determinó que el mayor rendimiento de la actividad enzimática para el abomaso en edad de lactancia es de 2 horas y para el abomaso en edad de poslactancia, con un tiempo de maceración dinámica de 1 hora.
4. La densidad de la quimosina se ve afectada por parámetros como la edad del ternero y la duración en los tiempos de maceración dinámica.
5. Se determinó realizando un análisis microbiológico que la solución contenedora de quimosina es apta para el consumo humano.

6. Las hipótesis que han sido aprobadas en el presente trabajo de graduación; son las dos hipótesis de investigación planteadas.

RECOMENDACIONES

1. Trabajar con un rango más amplio de horas en la maceración dinámica.
2. Trabajar de inmediato con abomaso fresco para evitar contaminación bacteriana y obtener la mayor cantidad de quimosina.
3. Utilizar para el método de obtención de quimosina la menor cantidad de pasos, haciendo corto el tiempo de manipulación, ya que esto evita la contaminación y que la enzima se degrade.
4. Utilizar estómago de ternero de la misma especie con las mismas características.
5. Para completar con el trabajo de investigación, trabajar con estómago de cabra ya que este de igual manera produce quimosina en lactantes.

BIBLIOGRAFÍA

1. BIRD Byron & Warren E. Stewart. *Transport phenomena*. 2a ed. New York: John Wiley & Sons, Inc. 2002. 914 p.
2. CUSSLER E.L. *Diffusion mass transfer in fluid systems*. 3a ed. United States of America by Cambridge University Press, New York. Edit Gregg Crane, 2007. 655 p.
3. *Ecuación de porcentaje de rendimiento*. [en línea] http://es.wikipedia.org/wiki/Rendimiento_qu%C3%ADmico. [Consulta: abril de 2014].
4. GEANKOPLIS C.J; *Procesos de transporte y operaciones unitarias*. 3a ed. México: Continental, 1998. 1024 p.
5. JAMES R. Welty. *Fundamentos de transferencia de momento, calor y masa*. 3a ed. Mexico: Emilsa, 1999. 859 p.
6. *Límites máximos permisibles en el análisis microbiológico en alimentos*. [en línea] http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/Limitespermisibles_18844.pdf [Consulta: 26 de noviembre 2014].
7. MATALLANA VENTURA, Santiago. *Fuerza y cálculo del cuajo*. Madrid, 1950. 5 p.

8. MCCABE, Warren L; SMITH, Julian C; METER, Harriot. *Operaciones unitarias en Ingeniería Química*. 4a ed. México: McGraw-Hill, 2000. 1114 p.
9. MONTGOMERY, Douglas C. William W. Hines. *Probabilidad y estadística para ingeniería y administración*. 3a ed. México: Continental, 1994. 834 p.
10. PERRY, Robert H; GREEN Don W. *Manual del Ingeniero Químico*. 7a ed. México: McGraw-Hill, 1999. 68 p.
11. QUIABOMEX. *Extracción de enzimas coagulantes a partir del abomaso de Rumiantes Adultos*. Departamento de Biotecnología. México: Unidad Iztapalapa Ciencias Biológicas y de la Salud, 2011. 118 p.
12. TREYBAL, Robert E. *Operaciones de transferencia de masa*. 2a ed. México: McGraw-Hill, 2000. 862 p.
13. Taringa. *Sistema digestivo de los rumiantes*. [en línea] <http://www.taringa.net/posts/ciencia-educacion/13669378/Sistema-Digestivo-de-los-Rumiantes.html> [Consulta: 26 de noviembre de 2014].
14. Universidad País Vasco. *Tipos de cuajos y sus características*. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Vitoria-Gasteiz. Octubre de 2007. 35 p.

15. WELTY, Wicks; WILSON, Rorrer. *Fundamentals of momentum, heat, and mass Transfer*. 5a ed. Oregon State: John Wiley & Sons, Inc., 2007. 1050 p.
16. WALTER, L Badger; BANCHERO, Julius T. *Introducción a la ingeniería química*. 2a ed. México: McGraw-Hill, 1996. 394 p.

APÉNDICES

Apéndice A: Datos calculados

Apéndice A1. **Datos obtenidos de la quimosina obtenida a partir del abomaso de ternero en edad de lactancia y poslactancia**

	Tiempo (h)	Repeticiones	Tiempo de cuajo (s)	Peso (g)	Densidad (g/mL)
Lactancia	1	1	6220	26,660	1,068
		2	7200	26,090	1,045
		3	7400	26,730	1,071
	2	1	7120	27,180	1,089
		2	6220	27,600	1,106
		3	7160	27,200	1,090
	3	1	7030	27,120	1,086
		2	6980	27,310	1,094
		3	6870	27,170	1,088
Poslactancia	1	1	8220	26,630	1,067
		2	8220	27,210	1,090
		3	8360	27,660	1,108
	2	1	7960	27,520	1,102
		2	8100	26,880	1,077
		3	7980	26,890	1,077
	3	1	7630	27,000	1,082
		2	7850	25,780	1,033
		3	7640	26,900	1,078

Fuente: Datos experimentales, -LIEXVE-.

Apéndice A2. **Densidad de la quimosina obtenida a partir del abomaso de ternero en edad de lactancia y poslactancia a diferentes tiempos de maceración dinámica**

	Tiempo (h)	Repeticiones	Densidad (g/mL)	Densidad Promedio (g/mL)	Error relativo en la densidad (g/mL)	% de error en la densidad
Lactancia	1	1	1,068	1,061	0,00038	1,068
		2	1,045		0,00038	1,045
		3	1,071		0,00037	1,071
	2	1	1,089	1,095	0,00037	1,089
		2	1,106		0,00036	1,106
		3	1,090		0,00037	1,090
	3	1	1,086	1,090	0,00037	1,086
		2	1,094		0,00037	1,094
		3	1,088		0,00037	1,088
Poslactancia	1	1	1,067	1,088	0,00038	1,067
		2	1,090		0,00037	1,090
		3	1,108		0,00036	1,108
	2	1	1,102	1,085	0,00037	1,102
		2	1,077		0,00037	1,077
		3	1,077		0,00037	1,077
	3	1	1,082	1,064	0,00037	1,082
		2	1,033		0,00039	1,033
		3	1,078		0,00037	1,078

Fuente: elaboración propia, con base en las técnicas cuantitativas de la investigación.
(Tablas IX, X).

Apéndice A3. **Resultados de análisis estadístico de la densidad de la quimosina obtenida a partir del abomaso de ternero en edad de lactancia y poslactancia a diferentes tiempos de maceración dinámica**

	Tiempo (h)	Desviación estándar	Varianza	Coef. Variación	Fisher	Chi ²
Lactancia	1	0,014	0,00020	0,01325	0,01406	0,00011
	2	0,009	0,00009	0,00867	0,00949	0,00005
	3	1,094	0,00002	0,00404	0,00001	0,00022
Poslactancia	1	0,021	0,00043	0,01930	0,02068	0,00011
	2	0,015	0,00022	0,01353	0,01469	0,00005
	3	1,033	0,00074	0,97063	0,00071	0,00021

Fuente: elaboración propia, con base en la recolección y ordenamiento de la información.
(Tablas IX, X).

Apéndice A4. **Resultados de análisis estadístico de la actividad enzimática de la quimosina obtenida del abomaso de ternero en edad de lactancia y poslactancia a diferentes tiempos de maceración dinámica**

	Tiempo (h)	Desviación estándar	Varianza	Coef. V Variación	Fisher	Chi ²
Lactancia	1	3,323	11,042	0,096	0,30094	0,27254
	2	2,872	8,247	0,081	0,34821	0,22943
	3	0,407	0,166	0,012	0,40724	0,09275
Poslactancia	1	0,282	0,080	0,003	0,28229	0,27133
	2	0,282	0,079	0,009	0,28160	0,22841
	3	0,497	0,248	0,016	0,49750	0,09234

Fuente: elaboración propia, con base en la recolección y ordenamiento de la información.
(Tablas XI, XII).

Apéndice A5. **Porcentaje de rendimiento de actividad enzimática de la quimosina obtenida a partir del abomaso de ternero en edad de lactancia y poslactancia a diferentes tiempos de maceración dinámica**

	Tiempo (h)	Rendimiento de actividad enzimática (%)	Promedio (%)	Error relativo	Error absoluto (%)
Lactancia	1	35,547	35,324	0,222	0,639
		34,787		0,538	1,546
		35,640		0,316	0,907
	2	36,240	36,436	0,196	0,554
		36,800		0,364	1,033
		36,267		0,169	0,479
	3	36,160	36,267	0,107	0,309
		36,413		0,147	0,425
		36,227		0,040	0,116
Poslactancia	1	35,507	36,222	0,716	2,465
		36,280		0,058	0,199
		36,880		0,658	2,266
	2	36,693	36,129	0,564	1,885
		35,840		0,289	0,965
		35,853		0,276	0,920
	3	36,000	35,413	0,587	1,884
		34,373		1,040	3,339
		35,867		0,453	1,455

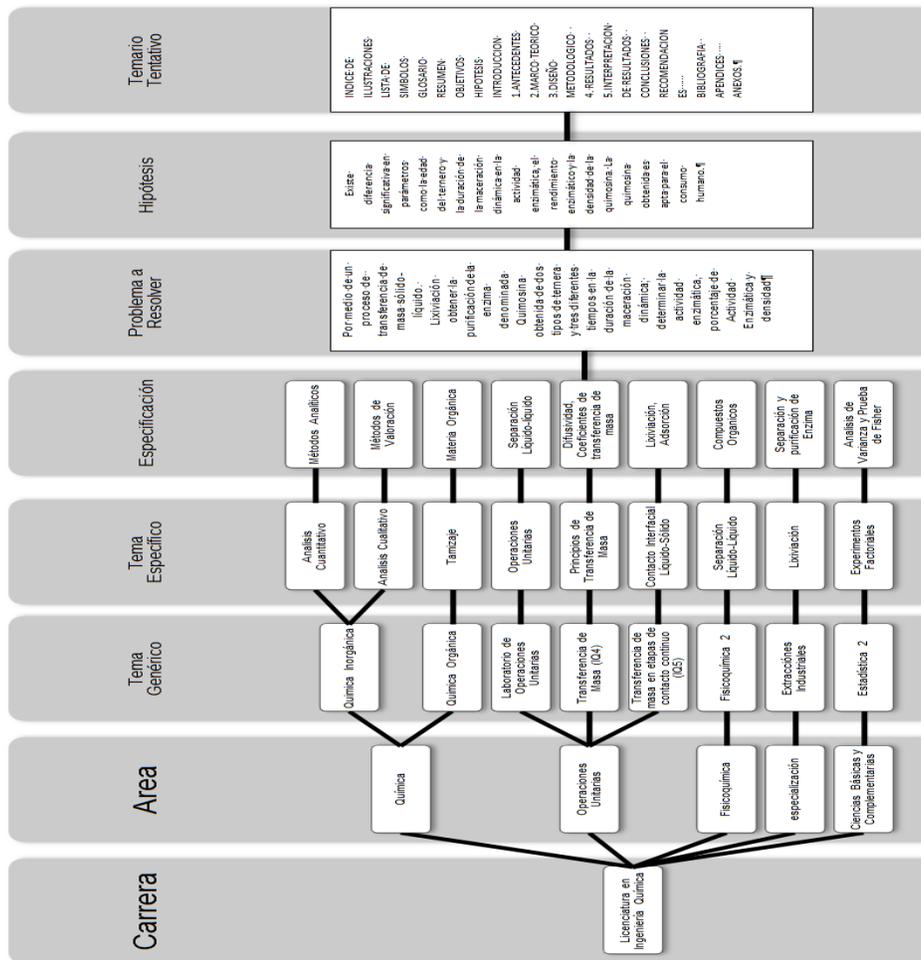
Fuente: elaboración propia, con base en la recolección y ordenamiento de la información.
(Tablas XI, XII).

Apéndice A6. **Resultados de análisis estadístico del porcentaje de rendimiento de la actividad enzimática de la quimosina obtenida del abomaso de ternero en edad de lactancia y poslactancia a diferentes tiempos de maceración dinámica.**

	Tiempo (h)	Desviación estándar	Varianza	Coef. variación	Fisher	Chi2
Lactancia	1	0,468	0,219	0,013	0,46806	0,00382
	2	0,316	0,100	0,009	0,31590	0,00152
	3	0,131	0,017	0,004	0,13132	0,00719
Poslactancia	1	0,688	0,474	0,013	0,68849	0,00380
	2	0,489	0,239	0,014	0,48887	0,00151
	3	0,903	0,816	0,026	0,90313	0,00715

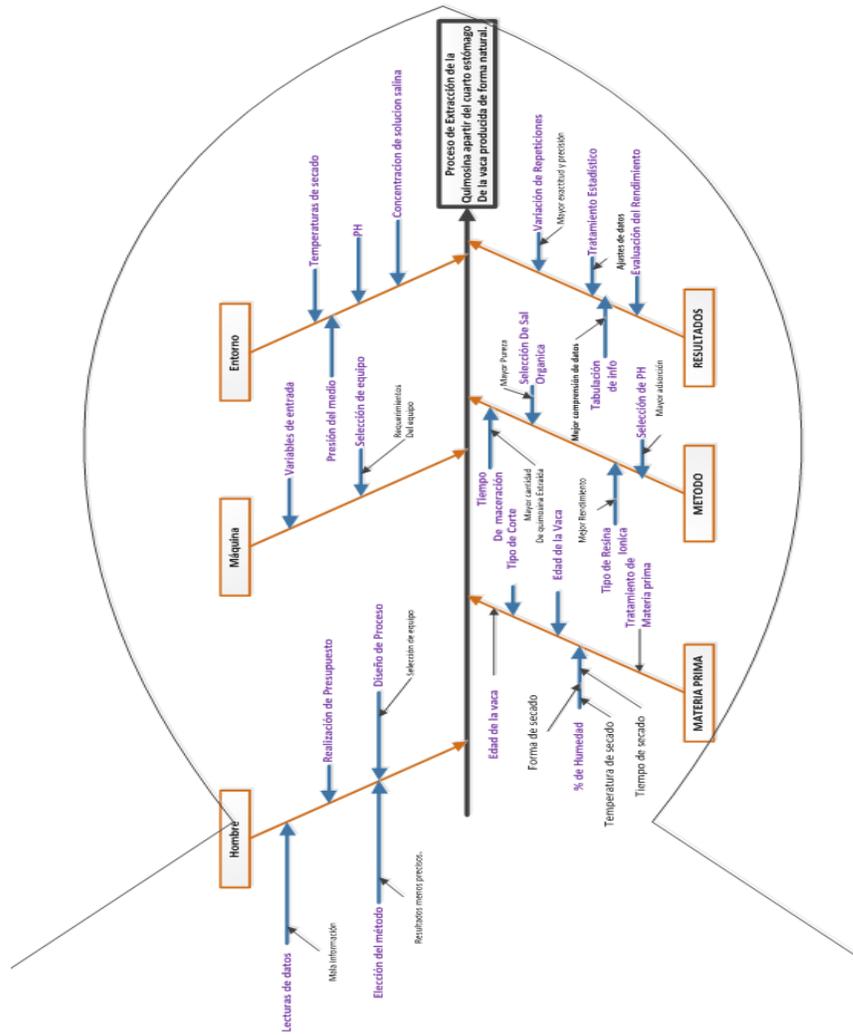
Fuente: elaboración propia, con base en la recolección y ordenamiento de la información.
(Tablas XI, XII).

Apéndice A7. Diagrama de procedimiento para la elaboración de trabajo de graduación de extracción de la quimosina producida de forma natural a través del cuarto estómago de ternero, a partir de diferentes tiempos de extracción y edades del bovino a escala laboratorio



Fuente: elaboración propia.

Apéndice A8. Diagrama de causa y efecto para determinar las variables de proceso de extracción



Fuente: elaboración propia.

Apéndice B. **Materia prima y procedimiento**

Apéndice B1. **Abomaso de ternero**



Fuente: datos experimentales, laboratorio de Investigación de Extractos Vegetales – LIEXVE-.

Apéndice B2. **Maceración dinámica de quimosina en solución**



Fuente: datos experimentales, Laboratorio de Investigación de Extractos Vegetales – LIEXVE-.

Apéndice B3. **Centrifugado de quimosina en solución**



Fuente: datos experimentales, Laboratorio de Investigación de Extractos Vegetales – LIEXVE-.

Apéndice C3. **Separación de fases posterior al centrifugado**



Fuente: datos experimentales, Laboratorio de Investigación de Extractos Vegetales – LIEXVE-.

Apéndice B5. Solución de primer lavado con NaCl



Fuente: datos experimentales, Laboratorio de Investigación de Extractos Vegetales – LIEXVE-.

Apéndice B6. Columna catiónica para realizar la cromatografía de intercambio catiónico en la purificación de la quimosina



Fuente: datos experimentales, Laboratorio de Investigación de Extractos Vegetales, – LIEXVE-.

Apéndice B8. Obtención de quimosina en solución



Fuente: datos experimentales, Laboratorio de Investigación de Extractos Vegetales, –
LIEXVE-.

Apéndice B9. Elaboración de prueba de actividad enzimática de la quimosina obtenida



Fuente: datos experimentales, Laboratorio de Investigación de Extractos Vegetales, –
LIEXVE- .

Apéndice B10. **Determinación de porcentaje de actividad enzimática**



Fuente: datos experimentales, Laboratorio de Investigación de Extractos Vegetales – LIEXVE-.

ANEXOS

Anexo 1. Análisis microbiológico de la quimosina en solución obtenida a partir del cuarto estómago de ternero a diferentes tiempos de maceración dinámica

Universidad de San Carlos de Guatemala

 Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia
 Laboratorio de Análisis Fitoquímicos y Microbiológicos LAQYM

Informe de Resultados de Análisis Microbiológico

No. de ingreso:	489	No. De muestra:	1 (una)
Dirigido a:	<i>Gabriela Marlen Casal Martínez</i>	Ingreso:	31-03/14
Nombre del producto:	QUIMIOSINA	Inicio de análisis:	31-03/14
		Reporte final:	04-04/14

Lote: 1 HORA (1)

ANÁLISIS	RESULTADO	DIMENSIONAL
Recuento de Coliformes Totales	<3 NMP/mL	NMP/mlilitro
Recuento de Coliformes Fecales	<3 NMP/mL	NMP/mlilitro
Aislamiento e identificación de <i>Escherichia coli</i>	Ausencia	Ausencia o Presencia
Recuento e identificación de <i>Staphylococcus aureus</i>	< 10 UFC/mL	UFC/mL

*Métodos de Referencia: BAM, APHA
 *Prohibida la parcial o total reproducción por el cliente u otra persona, sin la debida autorización escrita por parte del laboratorio LAQYM
 *Este informe pertenecerá íntegramente y exclusivamente a la muestra descrita, tal y como fue recibida en el laboratorio.

1. Nomenclatura utilizada:

NMP/mL	Número Más Probable por mililitro	UFC/g	Unidades Formadoras de Colonias por gramo
--------	-----------------------------------	-------	---


 Omar Serrano, QB
 Analista




 Lidia Ana Roldán de García, QB
 Jefa LAQYM

3. Calle 9-47 zona 1
 Teléfono: 22531319 Fax: 22205013
 laf@usac@intnet.gt

Fuente: datos experimentales, Laboratorio de Investigación de Extractos Vegetales – LIEXVE-.

Anexo 2. **Informe del Laboratorio de Investigación de Extractos Vegetales –LIEXVE-**

 **CENTRO DE INVESTIGACIONES DE INGENIERIA
FACULTAD DE INGENIERIA
UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA** 

No. 4523

O.T. No. 33104
No. Informe LIEXVE-QI 19-2014

Interesado: Gabriela Marlene Caal Martínez
Estudiante de Ingeniería Química/USAC
Carné No. 2007-14442

Proyecto: Trabajo de de Graduación a nivel tesis **Extracción y caracterización de la Quimosina Producida de forma natural a través del cuarto estómago de ternero a partir de diferentes tiempos de extracción y edades del bovino a escala laboratorio.**

Fecha: Guatemala, 30 de Junio de 2014

Se realizó el estudio de tesis titulado "Extracción y caracterización de la Quimosina Producida de forma natural a través del cuarto estómago de ternero a partir de diferentes tiempos de extracción y edades del bovino a escala laboratorio" con la extracción a escala de laboratorio de la enzima de Quimosina y Pepsina a partir del cuarto estómago de ternero.

EXTRACCIÓN DE LA ENZIMA LLAMADA QUIMOSINA Y PEPSINA A PARTIR DEL CUARTO ESTÓMAGO DE TERNERO

Se procedió a romper la membrana en agua desmineralizada con la ayuda de una licuadora, luego se procedió a disminuir el pH de la solución con ayuda de ácido sulfúrico, luego se procedió a realizarle un proceso de maceración en un tiempo de 1,2 y 3 horas, luego la solución obtenida se filtró para eliminar los contaminantes presentes en la solución.

A la solución filtrada, se le agregó sulfato sódico anhidrido y Propilenglicol al 10% en peso, esta solución se colocó en una centrifuga durante 10 minutos para poder eliminar las partículas en suspensión presentes en la solución que contenía la enzima. Terminada la centrifugada, se extrajo la fase acuosa y se pasó por una columna catiónica a la que se le hicieron un lavado con solución salina de Cloruro de Sodio en concentración 0.5M, en la que se extrajo la enzima pepsina y luego se procedió a realizar un segundo lavado con una solución de Cloruro de Sodio en concentración 2M junto a Fosfato Sódico 0.5M en donde se extrajo la Quimosina.

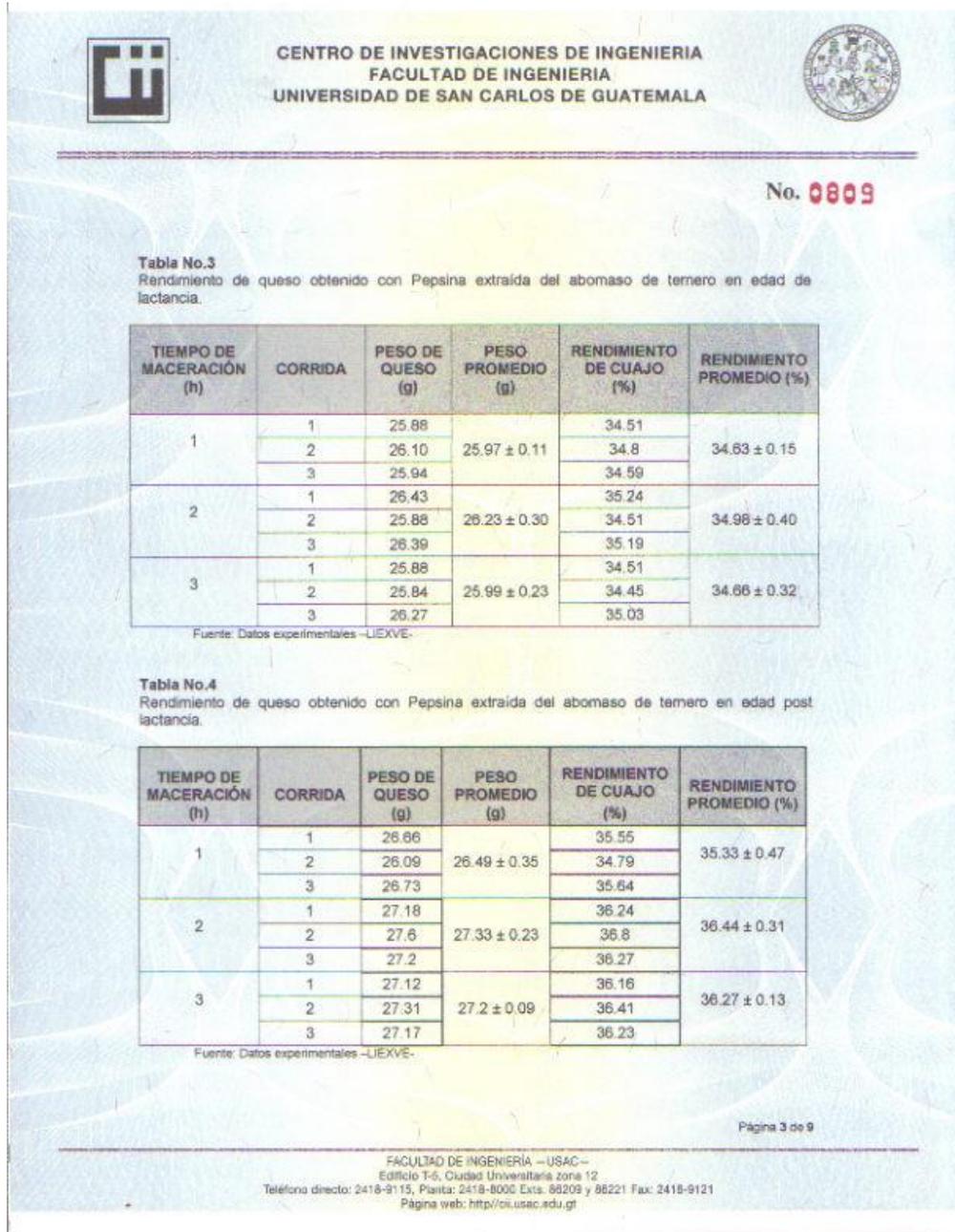
Se determinó la fuerza de cuajo en la Quimosina y Pepsina colocando en cada una de las muestras, la cantidad de 75mL, de leche entera a la que se le agregó 20mL, de cada una de las muestras y se les midió el tiempo de cuajado, para posteriormente determinar la fuerza de cuajo.

Página 1 de 9

FACULTAD DE INGENIERIA --USAC--
Edificio T-5, Ciudad Universitaria zona 12
Teléfono directo: 2418-9115, Planta: 2418-8000 Ext. 86209 y 86221 Fax: 2418-9121
Página web: <http://oi.usac.edu.gt>

Fuente: datos experimentales, Laboratorio de Investigación de Extractos Vegetales – LIEXVE-.

Anexo 3. **Informe del Laboratorio de Investigación de Extractos Vegetales –LIEXVE-**



Fuente: datos experimentales, Laboratorio de Investigación de Extractos Vegetales – LIEXVE-.

Anexo 4. **Informe del Laboratorio de Investigación de Extractos Vegetales –LIEXVE-**



**CENTRO DE INVESTIGACIONES DE INGENIERIA
FACULTAD DE INGENIERIA
UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA**



No. 0010

Tabla No.5
Densidad de Quimosina extraída del abomaso de ternero en edad de lactancia.

TIEMPO DE MACERACIÓN (h)	CORRIDA	DENSIDAD (g/mL)	DENSIDAD PROMEDIO (g/mL)
1	1	1.07	1.06 ± 0.011
	2	1.05	
	3	1.07	
2	1	1.09	1.09 ± 0.005
	2	1.10	
	3	1.09	
3	1	1.08	1.08 ± 0.005
	2	1.09	
	3	1.09	

Fuente: Datos experimentales –LIEXVE-

Tabla No.6
Densidad de Quimosina extraída del abomaso de ternero en edad post lactancia.

TIEMPO DE MACERACIÓN (h)	CORRIDA	DENSIDAD (g/mL)	DENSIDAD PROMEDIO (g/mL)
1	1	1.06	1.06 ± 0.02
	2	1.09	
	3	1.10	
2	1	1.10	1.08 ± 0.02
	2	1.07	
	3	1.07	
3	1	1.08	1.06 ± 0.03
	2	1.03	
	3	1.07	

Fuente: Datos experimentales –LIEXVE-

Página 4 de 9

FACULTAD DE INGENIERIA –USAC–
Edificio T-5, Ciudad Universitaria zona 12
Teléfono directo: 2418-9115, Planta: 2418-8000 Exts. 86208 y 86221 Fax: 2418-9121
Página web: <http://cii.usac.edu.gt>

Fuente: datos experimentales, Laboratorio de Investigación de Extractos Vegetales –
LIEXVE-.

Anexo 5. **Informe del Laboratorio de Investigación de Extractos Vegetales –LIEXVE-**



**CENTRO DE INVESTIGACIONES DE INGENIERIA
FACULTAD DE INGENIERIA
UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA**



No. 0811

Tabla No.7
Densidad de Pepsina extraída del abomaso de ternero en edad de lactancia.

TIEMPO DE MACERACIÓN (h)	CORRIDA	DENSIDAD (g/mL)	DENSIDAD PROMEDIO (g/mL)
1	1	1.04	1.04 ± 0.005
	2	1.04	
	3	1.03	
2	1	1.06	1.05 ± 0.011
	2	1.04	
	3	1.06	
3	1	1.04	1.04 ± 0.01
	2	1.03	
	3	1.05	

Fuente: Datos experimentales –LIEXVE–

Tabla No.8
Densidad de Pepsina extraída del abomaso de ternero en edad de post lactancia.

TIEMPO DE MACERACIÓN (h)	CORRIDA	DENSIDAD (g/mL)	DENSIDAD PROMEDIO (g/mL)
1	1	1.04	1.04 ± 1.04
	2	1.04	
	3	1.05	
2	1	1.04	1.04 ± 1.05
	2	1.03	
	3	1.06	
3	1	1.06	1.05 ± 1.05
	2	1.04	
	3	1.07	

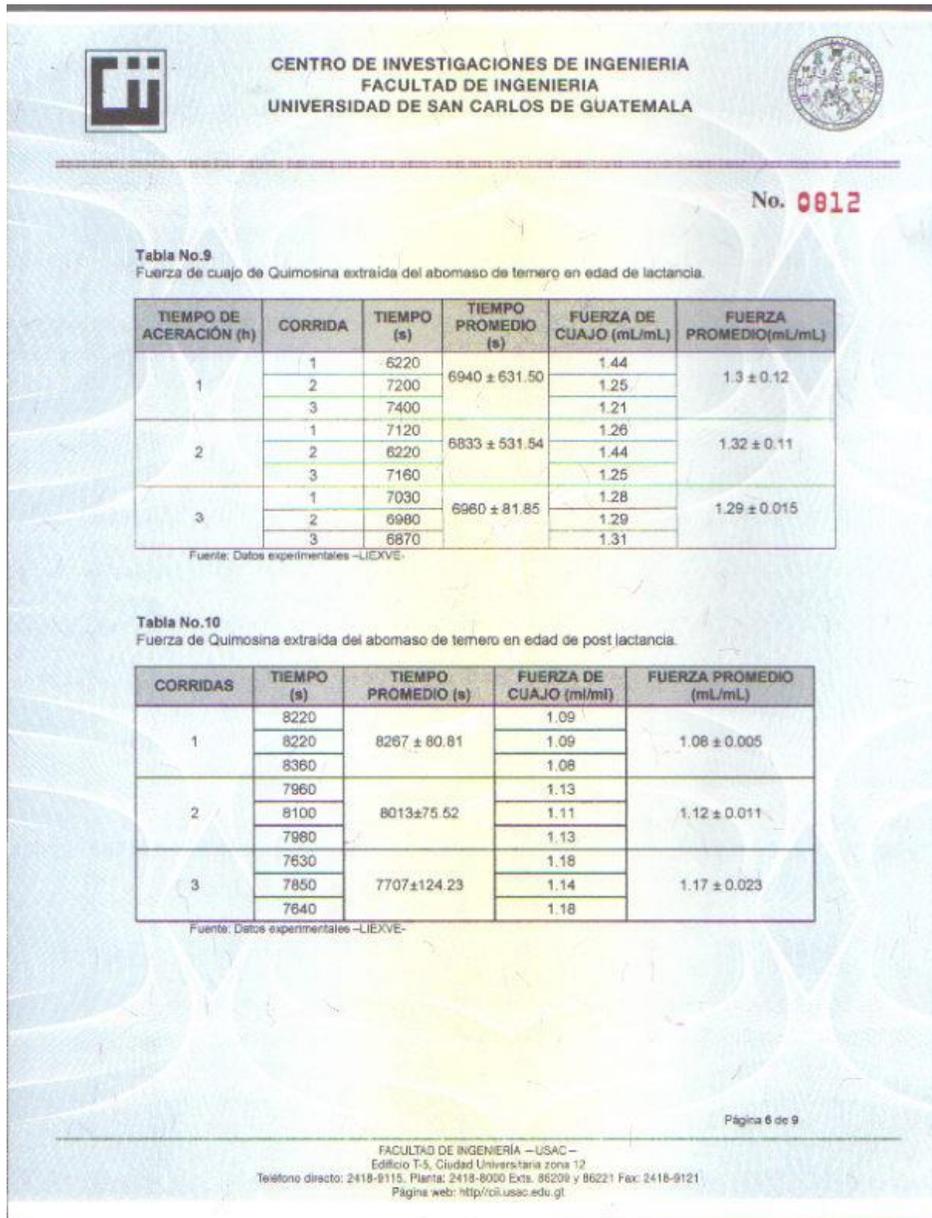
Fuente: Datos experimentales –LIEXVE–

Página 5 de 9

FACULTAD DE INGENIERIA –USAC–
Edificio T-5, Ciudad Universitaria zona 12
Teléfono directo: 2418-9115, Planta: 2418-8000 Exts. 86209 y 86221 Fax: 2418-9121
Página web: <http://ci.uesc.edu.gt>

Fuente: datos experimentales, Laboratorio de Investigación de Extractos Vegetales –
LIEXVE-.

Anexo 6. Informe del Laboratorio de Investigación de Extractos Vegetales –LIEXVE-



Fuente: datos experimentales, Laboratorio de Investigación de Extractos Vegetales – LIEXVE-.

Anexo 7. Informe del Laboratorio de Investigación de Extractos Vegetales –LIEXVE-



**CENTRO DE INVESTIGACIONES DE INGENIERIA
FACULTAD DE INGENIERIA
UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA**



No. 0013

Tabla No.11
Fuerza de cuajo de Pepsina extraída del abomaso de ternero en edad de lactancia.

TIEMPO DE MACERACIÓN (h)	CORRIDA	TIEMPO (s)	TIEMPO PROMEDIO (s)	FUERZA DE CUAJO (mL/mL)	FUERZA PROMEDIO (mL/mL)
1	1	2100	2113 ± 15.27	4.28	4.26 ± 0.030
	2	2110		4.26	
	3	2130		4.22	
2	1	1950	1970 ± 26.45	4.61	4.57 ± 0.058
	2	1960		4.58	
	3	2000		4.50	
3	1	2030	1980 ± 43.58	4.43	4.54 ± 0.098
	2	1950		4.61	
	3	1960		4.59	

Fuente: Datos experimentales –LIEXVE-

Tabla No.12
Fuerza de cuajo de Pepsina extraída del abomaso de ternero en edad de lactancia.

TIEMPO DE MACERACIÓN (h)	CORRIDA S	TIEMPO (s)	TIEMPO PROMEDIO (s)	FUERZA DE CUAJO (ml/ml)	FUERZA PROMEDIO (ml/ml)
1	1	2340	2333 ± 30.55	3.84	3.85 ± 0.051
	2	2300		3.91	
	3	2360		3.81	
2	1	2320	2307 ± 15.27	3.87	3.9 ± 0.030
	2	2290		3.93	
	3	2310		3.89	
3	1	2150	2190 ± 34.64	4.18	4.11 ± 0.0828
	2	2210		4.07	
	3	2210		4.07	

Fuente: Datos experimentales –LIEXVE-

Página 7 de 9

FACULTAD DE INGENIERIA –USAC–
Edificio T-5, Ciudad Universitaria zona 12
Teléfono directo: 2418-9115, Planta: 2418-8000 Exts. 80209 y 80221 Fax: 2418-9121
Página web: <http://ci.usc.edu.gt>

Fuente: datos experimentales, Laboratorio de Investigación de Extractos Vegetales –
LIEXVE-.

Anexo 8. **Informe del Laboratorio de Investigación de Extractos Vegetales –LIEXVE-**

 **CENTRO DE INVESTIGACIONES DE INGENIERIA
FACULTAD DE INGENIERIA
UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA** 

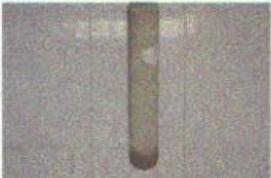
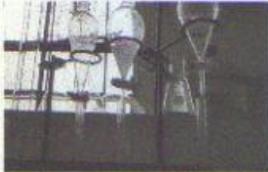
No. **0814**

ANEXOS
EXTRACCIÓN DE QUIMOSINA Y PEPSINA

Separación, lavado y rompimiento de membrana de abomaso de ternero

Centrifugado, separación de fase y solución de lavado para extracto

Columna catiónica con solución salina de Quimosina

Página 8 de 9

FACULTAD DE INGENIERIA –USAC–
Edificio T-5, Ciudad Universitaria zona 12
Teléfono directo: 2418-9115, Planta: 2418-8000 Exts. 86209 y 86221 Fax: 2418-9121
Página web: <http://ci.usac.edu.gt>

Fuente: datos experimentales, Laboratorio de Investigación de Extractos Vegetales –
LIEXVE-.

Anexo 9. **Informe del Laboratorio de Investigación de Extractos Vegetales –LIEXVE-**

**CENTRO DE INVESTIGACIONES DE INGENIERIA
FACULTAD DE INGENIERIA
UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA**

No. **0015**

Fuerza de cuajo en leche con enzima de quimosina y pepsina extraída del abomaso de ternero

Ing. Qco. Mario José Mérida Méndez
COORDINADOR
Laboratorio de Investigación de Extractos Vegetales
-LIEXVE-
Sección Química Industrial CI/USAC

Vc.Bo. Inga. Qca. Tatiana Maricela Cano Morales
DIRECTORA
Centro de Investigaciones de Ingeniería/USAC

Página 9 de 9

FACULTAD DE INGENIERIA –USAC–
Edificio T-5, Ciudad Universitaria zona 12
Teléfono directo: 2418-9115, Planta: 2418-8000 Exts. 86209 y 86221 Fax: 2418-9121
Página web: <http://ci.usac.edu.gt>

Fuente: datos experimentales, Laboratorio de Investigación de Extractos Vegetales –
LIEXVE-.

Anexo 10. Patente Europea



10

OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 N.º de publicación: **ES 2 078 345**

51 Int. Cl.º: C12N 9/64

12

TRADUCCION DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **90910042.2**

86 Fecha de presentación : **13.06.90**

87 Número de publicación de la solicitud: **0 477 284**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **01.04.92**

54 Título: **Procedimiento para la recuperación de quimosina producida de forma natural.**

30 Prioridad: **13.06.89 US 365937**

73 Titular/es: **Genencor International, Inc.
180 Kimball Way
South San Francisco, CA 94080, US**

45 Fecha de la publicación de la mención BOPI:
16.12.95

72 Inventor/es: **Heinsohn, Henry, G. ;
Lorch, Jeffrey, D. ;
Hayenga, Kirk, J. y
Arnold, Raymond, E.**

45 Fecha de la publicación del folleto de patente:
16.12.95

74 Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (artº 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

Venta de fascículos: Oficina Española de Patentes y Marcas. C/Panamá, 1 - 28038 Madrid

Fuente: Patente europea "procedimiento para la recuperación de quimosina producida de forma natural". Número de publicación. ES 2 078 345. Fecha de publicación. 01.04.92.

Anexo 11. Patente Europea

ES 2 078 345 T3

DESCRIPCION

Antecedentes de la invención

1. Campo de la invención

Esta invención se refiere a la recuperación y purificación de la quimosina producida de forma natural. En particular, esta invención está dirigida a los procedimientos para la recuperación y purificación de la quimosina a partir de soluciones acuosas que contienen quimosina que se ha obtenido a partir de la extracción de fuentes naturales de quimosina.

2. Estado de la técnica

La quimosina es una enzima conocida que es particularmente útil en la preparación del queso. Mientras que las fuentes de quimosina natural incluyen estómagos de ternero, estómagos de bovino, estómagos de cabra, estómagos de porcinos, etc., la quimosina comercial se obtiene básicamente a partir del cuarto estómago de los terneros alimentados con leche. Esto es debido a que dichas vacas producen mayores cantidades de quimosina comparadas a las de pepsina, mientras que otras fuentes de quimosina contienen generalmente mayores cantidades de pepsina comparadas a las de quimosina y, consecuentemente, la recuperación de la quimosina de estas fuentes es más dificultosa y económicamente menos rentable, es decir, hay menos quimosina para recuperar.

Sin embargo, debido al actual descenso en la producción de ternero, la fuente natural de quimosina descrita aquí ha disminuido, lo cual, en contrapartida, ha incrementado el interés en el desarrollo de procedimientos más eficientes para la recuperación y purificación de quimosina producida de forma natural. Específicamente, los procedimientos más eficaces proporcionarían una mejor recuperación y purificación de quimosina a partir de estómagos de ternero así como permitiría la recuperación y la purificación económica de la quimosina a partir de otras fuentes naturales.

Un obstáculo importante en el desarrollo de dicha metodología ha sido el alto nivel de contaminantes encontrados en la solución de quimosina obtenida a partir de fuentes naturales de quimosina. Además de la pepsina, el extracto acuoso obtenido de estas fuentes naturales de quimosina incluyen otros contaminantes como, por ejemplo, otras enzimas y proteínas del estómago. Dichos contaminantes han complicado el desarrollo de una metodología eficiente de recuperación y purificación.

Mientras que se han descrito numerosos procedimientos para aislar enzimas de soluciones acuosas, como los de la fermentación de la cerveza, ninguna de las referencias a las que los Solicitantes han tenido acceso describen procedimientos para la recuperación y purificación de quimosina producida de forma natural, especialmente la quimosina producida de forma natural mezclada con pepsina u otros contaminantes, que emplean un sistema de dos fases líquido-líquido.

Respecto a esto, la Patente U.S. núm. 4.144.130 describe el uso de (1) una mezcla de un polialcohol polieter, polivinilpirrolidona o polisacárido sustituido y no sustituido de alto peso molecular, y una sal inorgánica, (2) una mezcla de como mínimo dos de los polímeros de alto peso molecular descritos anteriormente para recuperar las enzimas intracelulares a partir de una solución acuosa que ha sido liberada de las células. Cuando se emplea una mezcla de polietilenglicol y una sal inorgánica, la enzima intracelular deseada va a la capa superior de polietilenglicol mientras que los restos celulares y otros productos de fermentación van hacia la capa inferior que contiene menos sal. Esta referencia describe que cuando se trataba una masa de células normales el coeficiente de reparto de varias enzimas recuperadas en la capa de glicol era de alrededor de 0,3, y podían incrementar a aproximadamente 3 cuando células congeladas se mezclaban con agua y se desintegraban para liberar sus enzimas.

De forma similar, la Patente U.S. núm. 4.728.613 describe un proceso para la recuperación de enzimas producidas extracelularmente como la proteasa, amilasa y cuajar microbiano, a partir del fermento total de cerveza empleando una sal inorgánica en combinación con un polímero seleccionado de un grupo consistente en polietilenglicol, un derivado amino del polietilenglicol, un derivado carboxilado del polietilenglicol, propilenglicol, un derivado amino de polipropilenglicol, un derivado carboxilado del polipropilenglicol, un éster poli(etilenglicol), polietilenimina, trimetilamino-polietilenglicol, alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona y mezclas de los mismos. Los ejemplos de esta referencia describen la obtención de coeficiente de reparto de hasta 80 para dichas enzimas extracelulares.

De forma similar, Kula y col., "Purification of Enzymes by Liquid-liquid Extraction", describe numerosos procedimientos para la purificación de enzimas mediante la extracción líquido-líquido. Entre los

2

Fuente: Patente europea "procedimiento para la recuperación de quimosina producida de forma natural". Número de publicación. ES 2 078 345. Fecha de publicación. 01.04.92.

Anexo 12. Patente Europea

ES 2 078 345 T3

numerosos procedimientos desarrollados, Kula y col. describen que la adición de una mezcla de polietilenglicol/sal inorgánica a una solución acuosa que contenga la enzima formará un sistema de dos fases en donde la fase de polietilenglicol contendrá la enzima. Kula y col., describen además en la página 111 que el polímero que forma la fase (polietilenglicol) puede eliminarse de la enzima mediante adsorción de la enzima a intercambiadores iónicos; eliminando mediante lavado el polímero que forma la fase; y la recuperación posterior de la enzima.

Por otra parte, la Patente U.S. núm. 4.508.825 describe que la proteasa extracelular y la amilasa que se producen en la fermentación por un microorganismo capaz de producirlas se separan mediante la adición de polietilenglicol y un copolímero catiónico epihalohidrina/poliamina o polímero de dextrano en el medio de fermentación y permitiendo a los polímeros separarse en fases para formar una fase rica en proteasa y una fase rica en amilasa.

Asimismo, la Patente U.S. núm. 4.591.563 describe un proceso para la purificación y la concentración simultánea de la enzima dextrano-sacarasa a partir de un medio de cultivo con sacarosa. En particular, el procedimiento descrito incluye la adición de un políeter como el polietilenglicol de tal forma que se formen dos fases; la primera fase es una fase pesada rica en dextrano que incluye la enzima dextran-sacarasa purificada y concentrada, y la segunda es una fase ligera rica en políeter que contiene las actividades enzimáticas contaminantes, las cuales son eliminadas.

Teniendo en cuenta lo descrito, es evidente que en las técnicas citadas no se desarrolla la recuperación y purificación de quimosina producida de forma natural a partir de soluciones acuosas que contengan pepsina u otros contaminantes mediante el empleo de un sistema de dos fases derivado de la adición de polietilenglicol y sal inorgánica acoplada con el uso de una resina de intercambio iónico. Por otra parte, la recuperación y purificación a escala industrial o comercial de la quimosina producida de forma natural se facilita enormemente mediante el uso de dicho sistema de dos fases líquido-líquido para la recuperación de la quimosina, y con la utilización de una resina de intercambio iónico para la purificación de quimosina.

En consecuencia, la presente invención hace referencia a los procesos eficientes para la recuperación y purificación de la quimosina producida de forma natural a partir de mezclas acuosas que contienen quimosina, pepsina y otros contaminantes producidos durante la extracción acuosa de fuentes naturales de quimosina.

Consecuentemente, la presente invención proporciona un procedimiento de recuperación y purificación de quimosina producida de forma natural, en el cual la recuperación se consigue empleando un sistema de dos fases líquido-líquido y la purificación se consigue utilizando una resina de intercambio iónico.

La presente invención también proporciona un proceso de recuperación y purificación de quimosina producida de forma natural en el cual la recuperación se logra mediante un sistema de dos fases líquido-líquido que permite la recuperación selectiva de la quimosina y pepsina frente a otros contaminantes que se encuentran en la solución acuosa.

En consecuencia, la presente invención proporciona un proceso de purificación de la quimosina producida de forma natural a partir de una solución acuosa/polietilenglicol que contiene quimosina y pepsina.

Un aspecto de esta invención proporciona un procedimiento para la recuperación y purificación de la quimosina a partir de una solución acuosa que contiene quimosina obtenida a partir de fuentes naturales y que además contiene pepsina y otros contaminantes, cuyo procedimiento comprende:

(a) ajustar el pH de la solución acuosa a menos de aproximadamente 6,5 y añadir a la solución acuosa una cantidad efectiva de polietilenglicol (PEG) y una sal inorgánica para formar un sistema de dos fases;

(b) permitir que la solución acuosa de la mezcla polietilenglicol-sal inorgánica se separe en una fase de polietilenglicol rica en quimosina y pepsina y una fase salina pobre en quimosina y pepsina;

(c) recuperar la fase de polietilenglicol rica en quimosina y pepsina;

(d) poner en contacto la fase de polietilenglicol rica en quimosina y pepsina con una resina de intercambio iónico bajo condiciones en las que la quimosina se une a la resina y el polietilenglicol y la pepsina pasan a través de la resina;

(e) recuperar la quimosina de la resina.

3

Fuente: Patente europea "procedimiento para la recuperación de quimosina producida de forma natural". Número de publicación. ES 2 078 345. Fecha de publicación. 01.04.92.

Anexo 13. Patente Europea

ES 2 078 345 T3

De forma sorprendente, en el paso de extracción, la mayor parte de la quimosina y de la pepsina están contenidas en la fase de polietilenglicol mientras que los contaminantes diferentes a la pepsina se mantienen en la fase salina. Además, cuando se pone en contacto la fase de polietilenglicol con una resina de intercambio iónico adecuada, la quimosina se une a la resina mientras que la pepsina pasa a través de ella. A continuación, la quimosina, básicamente libre de pepsina u otros contaminantes (es decir, la contaminación es menor del 10% del peso en base al peso de la quimosina), se recupera de la resina. Por lo tanto, el procedimiento de la presente invención es un procedimiento extremadamente eficaz para la recuperación y la purificación de la quimosina producida de forma natural.

En general, el pH de una solución acuosa puede ser cualquiera en el que la quimosina sea estable, es decir, aproximadamente 6,5 o menor. Sin embargo, en una realización preferida, se ha determinado que en la solución acuosa el uso de pHs menores, es decir, pH 3 o menor, y preferiblemente de pH de 2 a 2,5, da como resultado coeficiente de reparto más elevados (mayor selectividad) para la separación de la quimosina en la fase de polietilenglicol comparado con el uso de pHs de 3 a 6,5.

Descripción detallada de la invención

La separación de varias enzimas a partir de soluciones acuosas utilizando polímeros como el polietilenglicol de varios pesos moleculares en combinación con otros polímeros, como por ejemplo, el dextrano, o sales inorgánicas es conocido en el estado de la técnica. Sin embargo dicha invención está dirigida en parte al descubrimiento inesperado de que la quimosina puede recuperarse y purificarse eficientemente a partir de soluciones acuosas que contengan quimosina producida de forma natural, pepsina y otros contaminantes mediante la adición de cantidades suficientes de polietilenglicol y una sal inorgánica a la solución acuosa para formar un sistema de dos fases. Bajo estas circunstancias, casi toda la quimosina y pepsina se reparten en la fase de polietilenglicol. Esto queda en evidencia por los coeficiente de reparto de la quimosina y de la pepsina en la fase de polietilenglicol mayores de aproximadamente 30 y preferiblemente mayores de aproximadamente 85. Por otra parte, la mayor parte de los contaminantes se mantienen en la fase salina. Por lo tanto, este paso de la extracción proporciona una forma de recuperación de la quimosina y de separación de la misma de sus contaminantes distintos a la pepsina.

La presente invención está dirigida en parte al descubrimiento inesperado de que cuando la fase de polietilenglicol se pone en contacto con una resina de intercambio iónico en condiciones en las que la quimosina se une a la resina, el polietilenglicol y la pepsina pasan a través de la resina. En consecuencia, cuando se combinan ambos pasos, el procedimiento de la presente invención permite la recuperación y la purificación de quimosina sustancialmente libre de pepsina u otros contaminantes.

Sin embargo, antes de tratar esta invención en detalle, se definirán los siguientes términos:

“Quimosina producida de forma natural” - se refiere a la quimosina obtenida a partir de mamíferos incluyendo, por ejemplo, los estómagos de bovinos (que incluyen los cuatro estómagos de los terneros), de cabra, de porcinos, de ovejas, etc.

“Pepsina” - se refiere a la pepsina obtenida a partir de mamíferos incluyendo, por ejemplo, los estómagos de bovinos (que incluyen los cuatro estómagos de los terneros), de cabra, porcinos, de ovejas, etc. Además de la quimosina, también se recupera pepsina en la extracción de estómagos macerados.

“Otros contaminantes” - se refiere a los componentes distintos a la quimosina y pepsina, que se obtienen en la extracción de estómagos de mamíferos macerados. Estos otros contaminantes incluyen, por ejemplo, proteínas (por ejemplo, albúmina), enzimas y similares.

“Soluciones acuosas que contienen quimosina producida de forma natural, pepsina y otros contaminantes” - se refiere a las soluciones acuosas obtenidas por la extracción de tejido de estómagos de mamíferos macerados para obtener quimosina producida de forma natural. Los procedimientos para la preparación (maceración) y extracción de la quimosina a partir de dichos tejidos son bien conocidos en el estado de la técnica y están descritos, por ejemplo, en “Fundamentals of Dairy Chemistry”, segunda edición, Webb y col. editores, AVI Publishing company, pág. 674-679 (1983). En dichos procedimientos de extracción conocidos también se extrae pepsina a partir del tejido de estómago así como otros contaminantes. En general, la cantidad de pepsina extraída en la solución acuosa depende de factores como la edad del animal del que se ha obtenido el estómago o si del animal ha sido destetado. El estómago de un animal joven que está todavía mamando contiene significativamente más quimosina y menos pepsina comparado con un animal mayor que ha sido destetado. Por otra parte, los estómagos de dichos animales mayores

Fuente: Patente europea “procedimiento para la recuperación de quimosina producida de forma natural”. Número de publicación. ES 2 078 345. Fecha de publicación. 01.04.92.

Anexo 14. Patente Europea

ES 2 078 345 T3

aún contienen cantidades recuperables de quimosina.

“Polietilenglicol” - se refiere a polietilenglicol de cualquier peso molecular que pueda emplearse para la extracción de quimosina de la forma descrita en esta invención. El polietilenglicol existe en formas de pesos moleculares de aproximadamente 400 a aproximadamente 22.000. El polietilenglicol preferido que se emplea aquí debe tener un peso molecular de aproximadamente 600 a aproximadamente 12.000. Un polietilenglicol particularmente preferido es el PEG-8000, es decir, el polietilenglicol con un peso molecular de unos 8000. La selección del polietilenglicol a utilizar depende, en parte, de la composición de la mezcla a partir de la cual se extrae la quimosina y en parte del coste económico del proceso, así como de otros factores.

“Sal inorgánica” - se refiere a cualquier sal inorgánica que pueda emplearse para la extracción de quimosina de la forma descrita en esta invención. Por ejemplo, sales inorgánicas adecuadas son las sales de sulfatos, las sales de fosfatos y similares. Las sales de sulfatos preferidas son el sulfato sódico, el sulfato magnésico, el sulfato amónico y similares. Además, también pueden emplearse mezclas de sales adecuadas así como mezclas de dichas sales en combinación con sal(es) como el cloruro sódico, que por ella misma no es capaz de inducir la partición en un sistema de dos fases con el polietilenglicol, pero que en combinación con una sal inorgánica adecuada se sabe que incrementa los coeficiente de reparto de las enzimas.

“Coeficiente de reparto (K)” - se define por la fórmula

$$K = C_t / C_b$$

en donde C_t se refiere a la concentración de equilibrio del compuesto desplazado a la fase superior y C_b se refiere a la concentración de equilibrio del compuesto desplazado a la fase inferior. En consecuencia, está claro que la cantidad cuantitativa del compuesto desplazado a cada una de las fases depende de su coeficiente de reparto así como del volumen de las fases. Esto es lo mismo que decir que si el compuesto desplazado tiene un coeficiente de reparto de una unidad (el compuesto está igualmente desplazado a las fases superior e inferior), entonces las fases contienen cantidades iguales del compuesto desplazado sólo si las fases tienen el mismo volumen. Si la fase superior es el 10% del volumen de la fase inferior entonces, cuando el coeficiente de reparto es la unidad, la fase superior sólo contiene un 10% del compuesto desplazado. En función de lo anterior, es evidente que un coeficiente de reparto muy elevado para el compuesto desplazado es extremadamente valioso porque permite la recuperación de grandes cantidades de este compuesto en la fase superior, incluso cuando el volumen de la fase superior es relativamente pequeño comparado con el de la fase inferior. Por tanto, en la presente invención, con el uso de cantidades pequeñas de polietilenglicol se consiguen coeficiente de reparto muy elevados que permiten recuperaciones muy elevadas de quimosina.

“Punto isoelectrico (PI)” - se refiere al pH al cual el polipéptido es electrostáticamente neutro, es decir, el polipéptido tiene un mismo número de cargas positivas y negativas funcionales. El punto isoelectrico de la quimosina es de aproximadamente 4,6 y el de la pepsina también es de aproximadamente 4,6. A un pH inferior al punto isoelectrico, la quimosina y la pepsina tienen una carga neta positiva; a un pH por encima del punto isoelectrico, la quimosina y la pepsina tienen una carga neta negativa.

“Resina de intercambio iónico” - se refiere a un material resinoso compatible con una proteína que es capaz de unir electrostáticamente compuestos cargados. Las resinas de intercambio iónico son bien conocidas en el estado de la técnica e incluyen tanto resinas de intercambio aniónico como catiónico.

En la práctica de esta invención, una solución acuosa de polietilenglicol que contenga quimosina y pepsina se pone en contacto con una resina de intercambio iónico bajo condiciones en las que la quimosina se unirá a la resina. El empleo de una resina de intercambio aniónico o catiónico en la presente invención depende del pH de la fase del polietilenglicol, es decir, si el pH de la solución está por encima o por debajo del punto isoelectrico de la quimosina. En consecuencia, la puesta en contacto de una solución que contiene quimosina con una resina de intercambio iónico en condiciones en las que la quimosina se une a la resina sólo se refiere al ajuste del pH de la solución por encima o por debajo de punto isoelectrico, de tal forma que la quimosina se una a la resina utilizada.

Por otra parte, se ha obtenido de forma inesperada que bajo estas condiciones la pepsina no se une a la resina de intercambio iónico aunque la pepsina tenga un punto isoelectrico similar al de la quimosina.

El pH para la solución acuosa de polietilenglicol es generalmente de 6,5 o menor, aunque pHs alrededor del punto isoelectrico de la quimosina, es decir, pHs de 3,6 a 5,0, no se prefieren debido a la baja carga

Fuente: Patente europea “procedimiento para la recuperación de quimosina producida de forma natural”. Número de publicación. ES 2 078 345. Fecha de publicación. 01.04.92.

Anexo 15. Patente Europea

ES 2 078 345 T3

electrostática neta de la quimosina, que reduce la efectividad de la unión a la resina. Asimismo, cuando la solución de polietilenglicol (fase) se mantiene a un pH entre 3-5, la quimosina sufre una autólisis más eficaz, aunque a una tasa apreciablemente menor que en agua. En cualquier caso, el mantenimiento de la fase acuosa de polietilenglicol a pHs entre 3-5 resultará en pérdida parcial de rendimiento de quimosina debida a autólisis. En consecuencia, cuando se emplea una resina de intercambio catiónico, es preferible mantener el pH de la solución por debajo de 3,0; en el caso de emplear una resina de intercambio aniónico, es preferible mantener el pH por encima de 5,0.

Las resinas de intercambio catiónico preferidas para su uso en esta invención incluyen, por ejemplo, la IBF SP-Spherodex, Pharmacia SP-Sephadex, Indion SP-2, IBF SP-Trisacryl y similares. Las resinas de intercambio aniónico preferidas para su uso en esta invención incluyen, por ejemplo, IBF Q-Spherodex, Pharmacia Q-Sephadex, Indion Q-2, IBF Q-Trisacryl y similares.

Los procedimientos de esta invención son útiles para la recuperación y la purificación de la quimosina producida naturalmente. Cuando se recupera y se purifica la quimosina producida naturalmente, la solución acuosa que contiene la quimosina, pepsina y otros contaminantes puede emplearse en su forma cruda, es decir, la solución que se obtiene tras la extracción de estómagos macerados, o, si se desea, la solución acuosa puede filtrarse primero para eliminar la mayor parte o todos los sólidos, utilizándose posteriormente el líquido filtrado para los procedimientos de esta invención.

En el primer paso de esta invención, la quimosina producida de forma natural se recupera mediante la adición a la solución acuosa que contiene quimosina, pepsina u otras impurezas, una cantidad efectiva de polietilenglicol (PEG) y una cantidad efectiva de una sal inorgánica para formar el sistema de dos fases. La solución resultante se deja reposar hasta que se separa en una fase de polietilenglicol rica en quimosina y pepsina y una fase salina pobre en quimosina o pepsina. La fase de polietilenglicol rica en quimosina y pepsina se recupera mediante técnicas convencionales.

Se ha determinado que bajo estas condiciones se consiguen coeficientes para partición de la quimosina y la pepsina en la fase de polietilenglicol mayores de 30 y preferentemente mayores de 85. Mientras que la extracción del polietilenglicol es útil para la recuperación de la quimosina a pH más elevados, es decir, pH de 6,5 o menor, es más eficiente cuando el proceso se realiza a pHs menores de 3. A dichos pHs bajos, pueden conseguirse coeficiente de reparto de la quimosina/pepsina de hasta 100 o más. Los coeficiente de reparto elevados son ventajosos porque permiten el uso de cantidades menores de polietilenglicol para conseguir la separación deseada de la quimosina a partir de la fermentación de la cerveza la cual, en contrapartida, facilita la posterior separación de la quimosina del polietilenglicol, es decir, hay menor cantidad de polietilenglicol a separar.

Se ha determinado además que como resultado de una única extracción, la fase de polietilenglicol contiene hasta el 95% o más de la quimosina total presente inicialmente en la solución acuosa y contiene muy poco, si existen, de otros contaminantes. Por tanto, además de proporcionar un medio para la recuperación sustancial de toda la quimosina producida de forma natural y pepsina incluida en la solución acuosa, este aspecto de la presente invención también proporciona un medio para recuperar la quimosina y separarla de otros contaminantes distintos a la pepsina.

En el siguiente paso de esta invención, la fase de polietilenglicol que contiene la quimosina y la pepsina extraídas, se separa de la otra fase o fases y la fase de polietilenglicol se pone en contacto con una resina de intercambio iónico manteniendo o ajustando el pH de tal forma que la quimosina se una a la resina. Debido a que el polietilenglicol no está cargado bajo estas condiciones, pasa a través de la resina. De forma sorprendente, en estas condiciones, la pepsina tampoco se une a la resina de intercambio iónico y pasa a través de la resina. Por lo tanto, este paso provoca la purificación de la quimosina no sólo del polietilenglicol sino también de la pepsina. Por lo tanto, cuando la fase de polietilenglicol aislada que contiene la quimosina y la pepsina se pone en contacto con la resina de intercambio iónico en condiciones en por las que la quimosina se une a la resina, básicamente toda la quimosina se separa de polietilenglicol y se une a la resina de intercambio iónico y el polietilenglicol y la pepsina pasan a través de la columna con resina. Tras el contacto inicial, la resina se lava con agua o agua y sal, preferentemente bajo condiciones que no eliminen la quimosina de la resina, y que eliminen el polietilenglicol y la pepsina residuales. A continuación, la quimosina se eluye de la columna empleando una solución salina y un tampón que mantenga el pH que separe la quimosina de la resina. Debido a la elevada selectividad en la recuperación de la quimosina, no es necesario usar un gradiente o una elución por pasos en la resina debido a que sólo la enzima o materia que está unida a la resina proveniente de la fase de polietilenglicol y liberada de la resina es quimosina. Por lo tanto, la quimosina puede eluirse de una sola vez con una solución salina aumentando o disminuyendo el pH (en función, naturalmente, de si se emplea una resina de intercambio

Fuente: Patente europea "procedimiento para la recuperación de quimosina producida de forma natural". Número de publicación. ES 2 078 345. Fecha de publicación. 01.04.92.

Anexo 16. Patente Europea

ES 2 078 345 T3

aniónico o catiónico) para que todo el contenido de quimosina unida a la resina se eluya en un solo paso. Preferentemente se añade una sal a la solución de elución para ayudar en la tasa o grado de elución, o en algunos casos, es decir, con una resina de intercambio aniónico, efectuar la elución de la quimosina de la resina, por ejemplo con fosfato sódico 50mM/NaCl 2M, pH 5,8. Se emplean las sales preferiblemente con la solución de elución debido a que la quimosina se vende generalmente en una presentación comercial en solución salina y, en consecuencia, es conveniente incorporar la sal con la quimosina en este paso.

Por lo tanto, la recuperación y purificación de la quimosina mediante el procedimiento de esta invención dará como resultado una quimosina esencialmente libre de pepsina y otros contaminantes, es decir, la cantidad contaminante es aproximadamente menor al 10% en peso en base al peso de quimosina y preferentemente, menor al 5% en peso, aproximadamente, basado en el peso de la quimosina. Esto es lo mismo que decir que el producto de quimosina resultante es al menos un 90% en peso puro y puede prepararse para su uso comercial sin un tratamiento posterior significativo para eliminar las impurezas. El producto de quimosina comercial se diluye generalmente a 5 gramos por galón o 1,5 gramos por litro de quimosina. La concentración salina (generalmente NaCl) se ajusta normalmente al 18% y se añade un conservante como el benzoato de sodio. La concentración final del producto propuesta para su uso en la alimentación está sujeta además a una filtración final para eliminar los sólidos no deseados o partículas que puedan estar presentes.

Aunque pueden utilizarse pH más elevados a través del proceso (pHs hasta 6,5), la eficiencia de la mezcla polietilenglicol/sal inorgánica durante la extracción de la quimosina de la solución acuosa que contiene quimosina, pepsina y otros contaminantes y consecuentemente la eficiencia del proceso no es tan elevada como cuando se mantienen un pH bajo durante el proceso de extracción. Por consiguiente, es preferible emplear bajos pHs y, en consecuencia, una resina de intercambio catiónico para incrementar la eficiencia de todo el proceso.

Se ha observado que una única extracción con polietilenglicol y un único contacto con la resina de intercambio iónico da como resultado la recuperación del 90 al 95% de la quimosina total presente en la solución acuosa cuando los aspectos preferidos de la anterior invención se combinan haciendo la extracción con polietilenglicol a pH de 3 o menor y se ponen en contacto la fase de polietilenglicol separada con una resina de intercambio catiónico mientras se mantiene el pH bajo.

Por otro parte, el uso de pH más elevados en el paso de extracción con polietilenglicol así como una resina de intercambio aniónico en la que se mantiene el pH por encima del punto isoeléctrico de la quimosina también proporciona resultados aceptables. Sin embargo, si se emplea un pH más elevado para extraer la quimosina y se desea un pH menor para poner en contacto la solución con la resina, esto puede realizarse ajustando simplemente el pH del extracto de polietilenglicol por debajo del punto isoeléctrico de la quimosina y, preferiblemente, a un pH de 3,6 o menor, y más preferiblemente a un pH de 3 o menor, y poniendo en contacto la quimosina con la resina de intercambio catiónico.

Además de la alta eficiencia para la quimosina y la pepsina, especialmente para la quimosina, recuperada de la mezcla de polietilenglicol/sal inorgánica descrita aquí, también se ha observado que la solubilidad de la quimosina en el polietilenglicol es aparentemente tan elevada que la quimosina se desplaza de la fase acuosa a la fase de polietilenglicol rápidamente. El tiempo requerido para la extracción de la quimosina en la fase de polietilenglicol es generalmente tan bajo que no es un factor significativo en el diseño del procedimiento. Este proceso es, en consecuencia, muy eficiente y económico en cuanto a manipulación y puede incrementarse fácilmente el volumen para su producción comercial.

Como puede observarse y dado el pH empleado, el procedimiento descrito aquí implica el desplazamiento de la quimosina y de la pepsina de la mezcla acuosa a una fase de polietilenglicol más hidrofóbica. Esto se lleva a cabo, al menos en parte, por la concentración salina en la fase o fases sin polietilenglicol. Si se emplea un polietilenglicol de bajo peso molecular, la fase de polietilenglicol es menos hidrofóbica y es necesaria una concentración salina más elevada en la(s) fase(s) sin polietilenglicol, que conlleva un incremento en los costes de producción. Si se emplea un polietilenglicol de mayor peso molecular y más hidrofóbico, se necesitará menos sal en el proceso, pero la tasa de separación puede ser menor a causa de la elevada viscosidad del polietilenglicol de alto peso molecular. Por lo tanto, el procedimiento de esta invención puede optimizarse para cualquier operación en particular mediante la selección del peso molecular deseado del polietilenglicol, la concentración salina y otros parámetros que puedan ser económicamente interesantes. Un objetivo acostumbra a ser la disminución del tiempo requerido para desplazar la quimosina a la fase de polietilenglicol, pero otro objetivo también es disminuir la cantidad de sal utilizada para realizar la transferencia de casi toda la quimosina a la fase de polietilenglicol. Mientras que la concentración salina en las fases sin polietilenglicol puede ser del 20% en peso, o mayor, generalmente

Anexo 17. Patente Europea

ES 2 078 345 T3

se necesita menos del 15% con el polietilenglicol apropiado. Por ejemplo, con el PEG-8000, se necesita del 10 al 13% de sulfato sódico. Por otra parte, la concentración de sal inorgánica mínima depende de la concentración de la sal necesaria para formar un sistema de dos fases con el polietilenglicol. Sin embargo, en una aplicación preferida, la concentración de sal inorgánica de un 8,5 a 20 en porcentaje peso:volumen
5 basado en el volumen de la solución acuosa que contiene la quimosina, pepsina y otros contaminantes.

Preferiblemente, también la concentración de polietilenglicol empleada aquí es menor a 20, y más preferiblemente menor a 15, en porcentaje peso:volumen basado en el volumen de la solución acuosa que contiene la quimosina, pepsina y otros contaminantes. Por motivos económicos y de facilidad en la
10 separación posterior, se emplea preferentemente la mínima cantidad posible de polietilenglicol.

Las concentraciones exactas de polietilenglicol y sal inorgánica empleadas aquí pueden determinarse fácilmente por un experto en la materia.

15 Después de que la quimosina se haya unido a la resina de intercambio iónico, la fase de polietilenglicol recuperada es rica en pepsina. La pepsina puede recuperarse de dicha solución mediante procedimientos conocidos y puede reciclarse el polietilenglicol. Alternativamente, el polietilenglicol puede descartarse.

Por otra parte, la resina de intercambio iónico puede regenerarse para su uso en lotes sucesivos de
20 polietilenglicol que contenga quimosina mediante el lavado de la resina de intercambio iónico con una solución acuosa ajustada a un pH apropiado. Por ejemplo, cuando se emplea una resina de intercambio catiónico, ésta puede regenerarse mediante el lavado con una solución acuosa que contenga suficiente ácido sulfúrico para bajar el pH a 2, aproximadamente.

25 Los aspectos anteriores de esta invención, que permiten la reutilización de las resinas de intercambio iónico, representa para los procedimientos de esta invención una manipulación comercial e industrialmente eficientes para la purificación de cantidades industriales de quimosina, en particular de la quimosina producida de forma natural.

30 Habiendo descrito la invención en términos generales, la invención puede entenderse mejor si se hace referencia a las siguientes realizaciones de la invención que están ilustradas en los ejemplos siguientes. Sin embargo, el campo de aplicación de esta invención está determinado por las reivindicaciones adjuntadas, mientras que los ejemplos siguientes son realizaciones de la invención meramente ilustrativas de opciones concretas que se derivan de la práctica de la invención aquí descrita.

35 Ejemplos

Ejemplo 1

40 Este ejemplo describe el uso de un procedimiento de extracción con polietilenglicol en dos fases acuosas seguido del contacto con una resina de intercambio iónico para producir quimosina para alimentación a partir de estómago de bovinos. La quimosina se recupera a partir de estómagos de terneros (bovinos) que contienen grandes cantidades de pepsina bovina y menores cantidades de quimosina. La solución acuosa empleada aquí se prepara moliendo los estómagos bovinos en un medio líquido adecuado y filtrando los
45 restos celulares. La solución acuosa resultante contiene quimosina producida de forma natural, pepsina y otros contaminantes.

Es este ejemplo, 500 ml de extracto de ternero se ajustaron a pH 2 con ácido sulfúrico. Se añadieron al extracto 20 gramos de PEG 8000 (porcentaje de 4 en peso respecto al volumen) y 55 gramos de sulfato
50 sódico anhidro (porcentaje de 11 de peso respecto volumen). El extracto se calentó a 37°C para facilitar la solubilidad de la sal de sulfato. La mezcla se separó en dos fases mediante centrifugación (centrifugadora Sorvall) a una 5000 x g durante unos 15 minutos y la fase de polietilenglicol (fase superior) se separó de la salina (fase inferior) eliminando la fase inferior con una bomba peristáltica. La fase de polietilenglicol se diluyó 1:3 con agua desionizada. Se observó que el pH de esta solución era de 2,7 y se ajustó a 2,3 con ácido sulfúrico. La fase diluida de polietilenglicol se pasó a través de una resina de
55 intercambio iónico consistente en IBF Spherodex SP (una resina de intercambio catiónico compatible con proteína) que se había equilibrado previamente con agua a pH 2 de tal forma que unía quimosina. Se recuperó la solución de polietilenglicol que pasó a través y se determinó que contenía pepsina. La resina se eluyó con una solución de NaCl 0,5M a pH 2,0 para eliminar cualquier residuo de polietilenglicol o
60 pepsina remanante en la resina, y se recuperó la solución de lavado. A continuación, la resina se eluyó con una solución de fosfato sódico 0,05M a pH 5,8 con NaCl 2M para desprender en masa a la quimosina. Se recuperó a continuación el líquido eluido que contenía la quimosina esencialmente libre de pepsina y

Anexo 18. Patente Europea

ES 2 078 345 T3

otros contaminantes.

Se diseñó el siguiente ensayo con la idea de diferenciar las cantidades relativas de quimosina y pepsina bovinas del producto. La capacidad de cuajado de la leche de las distintas soluciones se midió utilizando un aparato con una botella giratoria. Se preparó crema de leche a pH 6 y a 6,5. La pepsina bovina presenta más actividad a pH 6,0 y la quimosina tiene mayor actividad a pH 6,5. Las actividades de cuajado se compararon con un estándar consistente en quimosina al 90% y pepsina al 10%. Por lo tanto la relación de la actividad a pH 6 respecto a 6,5 es una medida de las cantidades relativas de ambas enzimas. Por definición, el estándar da una relación de 1. Debido a que la pepsina bovina es más activa a pH 6 que a 6,5, la relación de la actividad a pH 6 y a pH 6,5 será mayor de 1 y se acercará a 2 para la pepsina pura. Por otra parte, para niveles elevados de quimosina, la relación será menor de 1 y se acercará a 0,5 o menos.

En este ensayo, la solución acuosa de quimosina, pepsina y otras impurezas tenían una concentración total de quimosina y pepsina de 16,64 CHU/ml (pH6,5). Tras la recuperación de la fase superior, ésta se aplicó a la resina. Los resultados del lavado de la resina se describen como *el flujo pasado* (el material que pasa a través de la resina sin unirse); *lavado* (el material que proviene de la resina durante el paso de lavado para eliminar la pepsina y otros contaminantes); y *el eluido* (el material recuperado cuando se eluyó la columna para recuperar la quimosina). Los resultados de este ensayo son los siguientes:

Muestra ensayada	Concen. de quimosina y pepsina	relación (6/6,5)
Material de inicio	—	1,41
extracción de 500 ml	8320 CHU ^a (16,54 CHU7ml)	—
fase superior	7830 CHU (115,15 CHU7ml)	1,34
fase inferior	454,5 CHU (1,01 CHU/ml)	—
flujo pasante	971,6 CHU (6,94 CHU/ml)	1,08
lavado	179,75 CHU (7,19 CHU/ml)	1,54
eluido	822,25 CHU (32,89 CHU/ml)	0,49

a = CHU - Unidad Chris. Hansen - 1 CHU/ml es igual bajo las siguientes condiciones:

Sustrato: 110 g de polvo de leche desnatada deshidratada por aspersión de baja temperatura se resuspenden en 1000 ml de cloruro cálcico al 0,05%. La leche se agita durante 30 minutos a temperatura ambiente y se deja en reposo durante otros 30 minutos. La leche debe guardarse a una temperatura entre 4 y 25°C y no más de 3 horas. El pH de la leche es de 6,5 aproximadamente.

Temperatura: 32°C más/menos 0,2°C en un baño de agua termostatzado.

Adición de la enzima: Se añaden 0,5 ml de solución enzimática a 25 ml de crema de leche reconstituida, diluida para obtener un tiempo de cuajado de 380 a 500 segundos,

dará un tiempo de cuajado de 410 a 460 segundos.

b = el coeficiente de reparto para la quimosina/pepsina es de 114

A partir de los anteriores datos, es evidente que el material recuperado en el eluido es quimosina básicamente libre de pepsina y otro contaminante. Por lo tanto, el procedimiento de esta invención permite la recuperación eficiente de la quimosina a partir de fuentes naturales de quimosina.

De la misma manera, siguiendo los procedimientos descritos anteriormente, la quimosina puede recuperarse y purificarse igualmente mediante la extracción a un pH de 5 a 6,5, aproximadamente empleando una resina de intercambio aniónico. Entre las resinas de intercambio iónico adecuadas que pueden sustituir a la resina de intercambio catiónico del ejemplo anterior se incluyen, por ejemplo, IBF Q-Spherodex, Pharmacia Q-Sepahedx, Indion Q-2, IBF Q-Trypsacril y similares.

Fuente: Patente europea "procedimiento para la recuperación de quimosina producida de forma natural". Número de publicación. ES 2 078 345. Fecha de publicación. 01.04.92.

Anexo 19. Patente Europea

ES 2 078 345 T3

Ejemplo 2

Las enzimas señaladas a continuación se extrajeron separadamente de la solución acuosa en la fase de polietilenglicol mediante el sistema de dos fases líquido-líquido, de forma similar al procedimiento de extracción descrito en el Ejemplo 1 pero en un pH de 5,8, proporcionando los siguientes resultados (enzima pura empleada):

Enzima	Proteína (mg/ml)	Actividad CHU/ml	Coefficiente de partición
Quimosina de buey	1,7	28	87
Pepsina bovina	1,9	31	31,5
Pepsina porcina	2,3	29,7	1,45
Proteasa aspártica de E. parasítica	3,6	27	0,33
Proteasa del aspártico de E. miehei	2,4	20,5	0,24

El experimento se repitió pero esta vez a pH de 2-2,5 con los siguientes resultados:

Enzima	Proteína (mg/ml)	Actividad CHU/ml	Coefficiente de partición
Quimosina de buey	1,2	89	>943 ^c
Pepsina bovina	1,3	50	>462 ^c
Pepsina porcina	1,6	23,7	>206 ^c
Proteasa aspártica de E. parasítica	2,5	15,2	1,18
Proteasa del aspártico de E. miehei	1,7	48	0,94

c = Coeficiente de reparto de 200 o más aproximadamente son difíciles de medir de forma precisa por limitaciones del ensayo. Esto es lo mismo que decir que a causa de que el coeficiente de reparto es la relación de la concentración de quimosina de la fase superior dividida por la concentración de quimosina de la fase inferior y además debido a que la cantidad de quimosina en la fase inferior es generalmente muy pequeña, pequeños cambios en esta concentración de la fase inferior producirá grandes oscilaciones en el coeficiente de reparto. Además, la concentración determinada mediante la metodología del ensayo está particularmente sujeta a variaciones a concentraciones muy bajas.

Los resultados anteriores indican que en este sistema la quimosina y la pepsina tienen coeficiente de reparto muy altos. Sin embargo, también queda claro que el coeficiente de reparto para la pepsina bovina se incrementa sustancialmente al disminuir el pH de 5,8 a un pH de 2-2,5. Consecuentemente, es preferible realizar la extracción a un pH superior a 5 para reducir la cantidad de pepsina en la fase de polietilenglicol. Por otra parte, los coeficientes de reparto de la quimosina también se incrementan sustancialmente al disminuir el pH de 5,8 a pH de 2-2,5. Por lo tanto, si la extracción se realiza a un pH por encima de 5, la cantidad de quimosina recuperada quedará de alguna manera reducida, aunque en menor grado porque el coeficiente de reparto de la quimosina a pH 5,8 es mayor que el de la pepsina bovina.

Fuente: Patente europea "procedimiento para la recuperación de quimosina producida de forma natural". Número de publicación. ES 2 078 345. Fecha de publicación. 01.04.92.

Anexo 20. Patente Europea

ES 2 078 345 T3

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la recuperación y purificación de la quimosina a partir de una solución acuosa que contiene quimosina obtenida de fuentes naturales y que además contiene pepsina y otros contaminantes, cuyo procedimiento consiste en:
- 5 (a) ajustar el pH de la solución acuosa a menos de aproximadamente 6,5 aproximadamente y añadir a la solución acuosa una cantidad efectiva de polietilenglicol (PEG) y una sal inorgánica de tal forma que se forme un sistema de dos fases;
- 10 (b) permitir que la mezcla acuosa de polietilenglicol/sal inorgánica se separe en una fase de polietilenglicol rica en quimosina y pepsina y una fase salina pobre en quimosina y pepsina;
- (c) recuperar la fase de polietilenglicol rica en quimosina y pepsina;
- 15 (d) poner en contacto la fase de polietilenglicol rica en quimosina y pepsina con una resina de intercambio iónico en condiciones en que la quimosina se una a la resina y el polietilenglicol y la pepsina pasen a través de la resina;
- 20 (e) recuperar la quimosina de la resina.
2. Procedimiento según la reivindicación 1 en el cual el pH de la solución acuosa es aproximadamente 3 o menor.
- 25 3. Procedimiento según la reivindicación 1 o la reivindicación 2 en el cual el pH de la solución acuosa es menos de aproximadamente 2,8.
4. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones precedentes en el cual el peso molecular medio del polietilenglicol es de aproximadamente 600 a aproximadamente 12.000.
- 30 5. Procedimiento según la reivindicación 4 en el cual el peso molecular medio del polietilenglicol es de aproximadamente 5.000 a aproximadamente 10.000.
6. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones precedentes en el cual la sal inorgánica mencionada se selecciona del grupo consistente en sales de sulfato y sales de fosfato.
- 35 7. Procedimiento según la reivindicación 6 en el cual la sal inorgánica es una sal de sulfato.
8. Procedimiento según la reivindicación 7 en el cual la sal de sulfato mencionada se selecciona del grupo consistente en sulfato sódico, sulfato magnésico y sulfato amónico.
- 40 9. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones precedentes en el cual la mencionada solución acuosa se filtra primero antes de la adición del polietilenglicol mencionado y de la sal inorgánica mencionada.
- 45 10. Procedimiento según la reivindicación 1 en el cual el pH de la fase de polietilenglicol rica en quimosina y pepsina mencionada está entre 5,0 y 6,5 o es aproximadamente 3 o menor.
11. Procedimiento según la reivindicación 10 en el cual el pH de la fase de polietilenglicol rica en quimosina y pepsina es aproximadamente 3,0 o menor y se emplea una resina de intercambio catiónico.
- 50 12. Procedimiento según la reivindicación 11 en el cual el pH de dicha fase de polietilenglicol rica en quimosina y pepsina está entre aproximadamente 2,0 y 2,5.
13. Procedimiento según la reivindicación 10 en el cual el pH de dicha fase de polietilenglicol rica en quimosina y pepsina está entre aproximadamente 5,0 y aproximadamente 6,5 y se emplea una resina de intercambio aniónico.

60

11

Fuente: Patente europea "procedimiento para la recuperación de quimosina producida de forma natural". Número de publicación. ES 2 078 345. Fecha de publicación. 01.04.92.

Anexo 21. Patente Europea

ES 2 078 345 T3

14. Procedimiento según la reivindicación 1 en el cual la extracción del paso (a) se realiza a un pH de aproximadamente 3,0 o menor y después de la separación de la fase de polietilenglicol, el pH de esta fase se ajusta de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 6,5 y se emplea una resina de intercambio aniónico.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

NOTA INFORMATIVA: Conforme a la reserva del art. 167.2 del Convenio de Patentes Europeas (CPE) y a la Disposición Transitoria del RD 2424/1986, de 10 de octubre, relativo a la aplicación del Convenio de Patente Europea, las patentes europeas que designen a España y solicitadas antes del 7-10-1992, no producirán ningún efecto en España en la medida en que confieran protección a productos químicos y farmacéuticos como tales.

55

60

Esta información no prejuzga que la patente esté o no incluida en la mencionada reserva.

12

Fuente: Patente europea "procedimiento para la recuperación de quimosina producida de forma natural". Número de publicación. ES 2 078 345. Fecha de publicación. 01.04.92.

