



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN**

**"LAS PROTEASAS VEGETALES (*de Yucca filifera*),
COMO SUSTITUTO DE ENZIMAS PROTEOLITICAS"**

**PROYECTO DE INVESTIGACION
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
INGENIERIA EN ALIMENTOS
P R E S E N T A
PEREZ CORONILLA YARA MARIA**

ASESOR: DRA. ROSALVA MORA ESCOBEDO (IPN)
M. EN C. LIDIA DORANTES ALVAREZ (IPN)
M. EN C. DENEZ CAMACHO MORFIN (UNAM)

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO.

1997

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

DR. JAIME KELLER TORRES
DIRECTOR DE LA FES-CUAUTITLÁN
P R E S E N T E .

AT'NI: Ing. Rafael Rodríguez Ceballos
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la F.E.S. - C.

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el

El proyecto de Investigación: "Las proteasas vegetales
(de Yucca filifera), como sustituto de enzimas proteolíticas".

que presenta la pasante: Yara María Pérez Coronilla
con número de cuentas 7333523 - 6 para obtener el TÍTULO de:
Ingeniera en Alimentos.

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXÁMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E .
"POR MI PAZ HABLARA EL ESPIRITU"
Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 17 de Octubre de 1996.

PRESIDENTE	<u>Dr. F. B. S. Patricia Izanda Castro</u>
VOCAL	<u>M. en C. Andrés Romero Rojas</u>
SECRETARIO	<u>M. en C. Daniel Camacho Verdín</u>
1er. SUPLENTE	<u>Dr. F. B. Carolina Moreno Barón</u>
2do. SUPLENTE	<u>Dr. F. B. Edgar Acuña Jaraón</u>

La identificación de la planta para el planteamiento de este proyecto fue realizado gracias a la valiosa colaboración:

-del Dr. Rafael Fernández Nava Investigador del herbario de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional.

Quedando las respectivas muestras de la palma barreta (Yucca filifera) en el herbario.

- del M en C Roberto Cruz Cisneros investigador del Departamento de Botánica y Laboratorio de Ecología Vegetal y,

- del Investigador Ignacio Piña Luján coautor de las Plantas Mexicanas del Genero *Yucca*

Agradecimiento a los maestros :

Dra. Rosalva Mora Escobedo
M. en C. Lidia Dorantes Alvarez.
M. en C. Deneb Camacho Morfin

Por su apoyo y orientación que hicieron posible la realización del presente proyecto.

**Así mismo agradezco las valiosas observaciones de los sinodales que revisaron este trabajo
y el apoyo brindado**

**De la misma manera agradezco a los campesinos del Ejido Francisco Medrano de
cd. Tula Tamaulipas la valiosa información y ayuda proporcionada y que sin la cual no
se hubiera hecho el presente trabajo**

A mis padres:

**Que me dieron lo mas valioso
que tengo " la vida" y que me
ha proporcionado la inmensa
felicidad de vivirla.**

A mis hermanos:

**Alfredo , Lourdes. Maricela
Edgar, Hugo y Yemina,
que son los seres que me inspiraron
en el trayecto de mis estudios.**

**A mis familiares que de alguna
manera contribuyeron a concluir
mi carrera, como fue mi tia Pilar
y mis sobrinos.**

**A mis amigos que son los seres
que al tenderme aquella mano franca
me enseñaron lo más hermoso con que
puede contar el ser humano "LA AMISTAD" Gracias.**

**A mis tesoros:
Toñy, Shenan, y Tonatiuh,
Mi cielo, mis estrella, y mi sol alumbrado,
por motivarme a cumplir y realizar completamente
la meta trazada al plantear este proyecto y
darme la oportunidad de vivir el sueño de ser feliz con ustedes.**

**Para todos aquellos humildes de mi
tierra que no tienen la oportunidad de
tener la educación superior a su
alcance y que tienen hambre de
conocimiento por ellos termine.**

CONTENIDO

1.- RESUMEN

2.- INTRODUCCIÓN

3.- JUSTIFICACIÓN

4.- OBJETIVOS

5.- METODOLOGÍA

- Desarrollo Experimental
- Materiales
- Métodos

6.- BIBLIOGRAFÍA

**PROTOCOLO QUE PRESENTO PARA TITULARME POR: PROYECTO DE
INVESTIGACIÓN EN MAESTRÍA**

TITULADO:

**“ LAS PROTEASAS VEGETALES (de *Yucca filifera*), COMO SUSTITUTO DE
ENZIMAS PROTEOLÍTICAS**

ÍNDICE

1.- Resumen	10
2.- Introducción	12
2.1 Generalidades	12
2.2 Fuentes de Enzimas	13
2.3 Enzimas Vegetales	13
2.4 Aplicaciones	14
2.5 Clasificación de proteasas	15
2.6 Coagulación de la leche	16
2.6.1 Mecanismos de coagulación	17
2.6.1.1 Coagulación ácida	17
2.6.1.2 Coagulación enzimática	17
2.6.1.3 Coagulación mixta	18
2.7 Descripción de las zonas áridas	18
2.7.1 <u>Yucca filifera</u>	22
3.- Justificación	26
4.- Objetivo General	27
4.1 Objetivos específicos	27
5.- Desarrollo experimental	28
5.1 Diagrama de flujo	31
5.2 Materiales y Métodos	32
5.2.1 Muestras	32
5.2.2 Lugar de muestreo	32
5.2.3 Recolección	32
5.2.4 Obtención de cutícula	32
5.3 Métodos	32
5.3.1 Análisis químico proximal	32
5.3.2 Determinación de la concentración proteica	33
5.3.3 Determinación de actividad coagulante	34

5.3.4 Actividad Proteolítica	35
5.3.5 Extracción y aislamiento de la(s) proteasa(s)	36
5.3.6 Caracterización de la(s) proteasa(s)	37
5.3.7 Determinación de peso molecular y pureza por electroforesis	38
5.3.8 Cromatografía en columna	39
5.3.9 Punto isoelectrico	39
6.- Bibliografía.	41

“ LAS PROTEASAS VEGETALES de (*Yucca filifera*), COMO SUSTITUTOS DE ENZIMAS PROTEOLÍTICAS “

1.- RESUMEN

Las enzimas son biocatalizadores que se emplean en el procesamiento de alimentos. En México la producción de ellas es limitada según lo indican las estadísticas del sector oficial teniéndose en una alta proporción la importación de las mismas.

Las enzimas del cuajo desde tiempos remotos se han utilizado para coagular las proteínas de la leche y obtener así el queso. En la actualidad también es posible utilizar proteasas de origen vegetal, con este mismo propósito. Existen antecedentes de que en las zonas semiáridas de nuestro país se utiliza como sustituto del cuajo la hoja de la *Yucca filifera* (palma barreta), que crece en Tula Tamaulipas y su entorno.

Por tal motivo en el presente trabajo se pretende aislar y caracterizar a las proteasas presentes en *Yucca Filifera*. La enzima o enzimas presentes se extraerán con solución reguladora en un pH de 4 - 8 con un intervalo de 0.5, ayudando a mejorar la extracción con la adición de NaCl al 5%, se medirá la actividad quimosinica, la actividad proteolítica por Kunitz modificado por Ortega y Del Castillo, también se medirá la concentración proteica por Lowry. Si existe actividad se procederá a aislar y separar la enzima en el mejor pH de extracción obtenido, precipitándola con Sulfato de Amonio al 100% de saturación, la proteína floculada se separará y dializará. Una vez dializada la proteína se determinará el peso molecular de la enzima, su punto isoeléctrico, y si la enzima

presenta más de una banda en la electrofóresis, se procederá a determinar un fraccionamiento por cromatografía en columna con las condiciones establecidas por (Dutoit, 1975), utilizando Sephadex G75 y G200, enseguida se procederá a determinar la actividad proteolítica por Kunitz modificado por (Ortega y Del Castillo, 1982) de las fracciones recolectadas así como su concentración proteínica y actividad quimosínica. Posteriormente de acuerdo a los sobrenadantes que tengan mayor actividad proteolítica, se procederá a determinar la cinética enzimática, determinando el pH óptimo en un intervalo de (4 - 8), temperatura óptima (5 - 65°C), efecto de concentración de enzima con caseína (0.5%) y efecto de concentración de sustrato utilizando caseína a diferentes concentraciones. Así mismo se procederá a determinar un análisis químico proximal para observar como afectan estos componentes en la extracción de las posibles enzimas.

Una vez realizados los ensayos propuestos se procederá a reportar los resultados obtenidos.

2.- INTRODUCCIÓN

2.1 Generalidades

Las proteínas están dentro de los principales constituyentes de los organismos y deben ser renovadas continuamente y esta es tarea de las enzimas proteolíticas.

Las proteasas catalizan el rompimiento hidrolítico del enlace peptídico produciendo pequeñas unidades de péptidos

Las enzimas proteolíticas son de un amplio interés para la comunidad científica ya que desempeñan papeles críticos en los sistemas biológicos, y además se les puede utilizar como herramientas, para los químicos de proteínas, químicos de síntesis, biólogos clínicos y biólogos de membrana, las proteasas son herramientas o las usan como sondas para el estudio de polipeptidos y de la estructura macromolecular. (Oliver, 1994)

Las enzimas proteolíticas constituyen uno de los grupos más importantes de las enzimas industriales representan aproximadamente el 25% de las ventas de las enzimas (Oliver, 1994).

En México, la importación de enzimas para cualquiera de las ramas industriales que las utilizan, resulta muy costoso, por lo que el desarrollo de tecnologías basadas en estos productos implica un riesgo de dependencia externa cada vez mayor, cabe señalar que en 1994, la importación de enzimas,

alcanzó un costo de \$ 26, 540, 000(Anuario Est. 1994) disminuyendo el uso de las mismas por su alto valor comercial con respecto al año anterior que fue tres veces más la cantidad importada. por esta razón es necesario la generación de tecnología propia así como la búsqueda de fuentes de obtención de enzimas en el país por la importancia industrial que representan puesto que las enzimas proteolíticas son empleadas en la industria, cervecera, para la clarificación de mostos fermentados; como ablandadores de carne, en panificación, en farmacia para disminuir edemas, como antihelmintico, entre otros. (Ibarra, 1968)

2.2 Fuentes de Enzimas

Las enzimas proteolíticas pueden ser de origen animal, (quimosina); de origen vegetal como la mexicaína) y de origen microbiano (*A. oryzae*), (*E. Parasítica*).

Diversas fuentes bibliográficas mencionan que en el periodo que comprende entre 1940 y 1970 hubo un crecimiento notable en el uso de las enzimas en la Industria Alimentaria, Durante este periodo se empezaron a emplear diversas enzimas proteolíticas (Cruz y Victoria, 1993)

2.3 Enzimas de origen vegetal

La fuente principal para la elaboración de proteinasas son las plantas, aunque algunos investigadores en 1949. (Berger, Jhonson y Peterson), demostraron la presencia de proteínas con actividad proteolítica y peptídica en los cultivos de *A. oryzae*, entre otros.(Ibarra, 1968)

Algunas de las plantas que producen las proteasas son : la piña (*Anana sativa*, *A. comosa*, *Bromelia ananas*).

Varias especies del género *Ficus* (higueras) contienen en su látex una proteasa conocida como ficina, empleada como antihelmíntico

La *Asclepias mexicana* y *A speciosa*, (Algodoncillo o Tlalayoti) contienen enzimas llamadas asclepainas

Estudios realizados por Castañeda y colaboradores en el año de 1943 informan de la presencia de otra proteasa, llamada por los autores forbaina, que se encuentra en la candelilla (*Euphorbia cernifera*)

Aún cuando existe una gran cantidad de organismos de donde obtener proteinasas Henry menciona en el año 1959 que dentro de las enzimas que se producen a más bajo costo se encuentra la papaina que se extrae del látex de la papaya (*Carica papaya*) (Ibarra, 1968)(Anuario Estadístico, 1994)

Datos Estadísticos de INEGI mencionan que hasta 1993 la papaina seguía siendo una enzima de relevante importancia económica por sus importaciones siendo esta la de mayor volumen que se utiliza en el mercado nacional e internacional siendo la proteinasa más popular de las plantas superiores y de uso más extendido.

2.4 Aplicaciones

Estas proteasas de origen vegetal tiene muchas aplicaciones industriales tales como en la producción de hidrolizados proteínicos de origen animal, y vegetal, en la elaboración de quesos, detergentes, en la industria pastéira, en los procesos de fabricación de cerveza, como ablandadores de carne, entre otros

2.5 Clasificación de Proteasas

En 1960 Hartley hizo una clasificación de las enzimas proteolíticas y las dividió en 4 grupos con base a su mecanismo de acción:

- a) Proteasas serínicas
- b) Proteasas sulfhidrílicas
- c) Proteasas que contienen metal
- d) Proteasas ácidas (Whitaker, 1994)

Los datos experimentales reunidos hasta el momento, permiten suponer que las enzimas pertenecientes al grupo (a) y (b) operan por mecanismos similares, en tanto que las (c) y (d) lo hacen de modo distinto. Al primer grupo (a) corresponden proteínas de origen animal y microbiano, como la quimosina y tripsina. En el segundo grupo (b) se encuentran la mayoría de las proteínas de origen vegetal. Las enzimas de los dos primeros grupos hidrolizan enlaces en el interior de la cadena peptídica, por lo que se les llama endopeptidasas. A diferencia de éstas, las del tercer grupo (c) o exopeptidasas, únicamente pueden actuar sobre el enlace extremo de la cadena, bien sea el carboxílico (carboxipeptidasas) o el amínico (aminopeptidasas). Finalmente como ejemplo del cuarto grupo (d), se puede citar a la pepsina del jugo gástrico de los mamíferos (Cruz y Victoria, 1973).

Las proteasas sulfhidrílicas tienen la característica común de ser inhibidas por reactivos sulfhidrílicos los cuales reaccionan con el grupo tiol del sitio activo. A este grupo pertenecen las enzimas de plantas superiores como: papaina, ficina, bromelina, mexicaina, etc (Yeh Ceballos, 1991). Estudios realizados señalan que

no todas las proteasas de plantas superiores son sulfhidrílicas como es el caso de la proteasa encontrada en el trompillo (*Solanum elaeagnifolium*) (Velasco, 1984).

Las enzimas proteolíticas de origen vegetal presentan una propiedad común, la de coagular la caseína de la leche, característica que les permite ser utilizada en la fabricación de quesos (Whitaker, 1994)

2.6 Coagulación de la Leche

La coagulación de la leche en la producción de quesos y la habilidad de la quimosina por conducir la formación del coágulo ha sido conocida por largo tiempo. La adición de la quimosina a la leche a pH 5 - 6 resulta en una hidrólisis rápida de los enlaces peptídicos que destruye la estabilidad de las micelas de κ -caseína. La hidrólisis de los enlaces peptídicos que destruye la estabilidad de la micela de la κ -caseína la cual está asociada con la formación del coágulo. El paso inicial es una catalisis enzimática los otros pasos son no enzimáticos. La energía de activación para el primer paso es cercana a 6 kcal/mol, mientras que la disociación y pasos de agregación es cercana a 40 kcal/mol. (Alais, 1984)

No todas las enzimas proteolíticas son iguales para coagular la leche y producir quesos. Algunas enzimas proteolíticas al adicionarse a la leche no solo forman coágulo sino que continúan hidrolizando los enlaces peptídicos en toda la caseína dando lugar a una proteólisis general. La aceptabilidad de las enzimas proteolíticas para producción de quesos está determinada por la velocidad de actividad de coagulación de la leche en una proteólisis general, y por la inhabilidad para formar péptidos que produzcan sabores amargos a los quesos almacenados. (Whitaker, 1994)

2.6.1 Mecanismos de coagulación

La complejidad del fenómeno de coagulación de la leche, comprende una serie de transformaciones con posibilidad de superponerse entre sí, y puede producirse por tres diferentes mecanismos a) ácida; b) enzimática; c) mixta (Veisøyre, 1972)(Alais, 1984)

2.6.1.1 La coagulación ácida : consiste en que la leche normalmente presenta una flora variada, formada principalmente por *Lactococcus* y *Lactobacillus*. Estos microorganismos son los responsables de la fermentación de la lactosa produciendo ácido láctico, el cual es capaz de disminuir el pH de la leche hasta alcanzar el punto isoelectrico de las caseínas que es de 4.6, originando su precipitación.

Las características de textura (firmeza, fragilidad, permeabilidad) de la cuajada se ven disminuidas por este mecanismo, así mismo el rendimiento se reduce debido que durante el desuerado se pierde parte de la caseína, además se elimina calcio, lo cual no es muy conveniente desde el punto de vista nutricional

2.6.1.2 La coagulación enzimática se puede efectuar por tres variedades de enzimas, las de origen vegetal, animal y microbiano. Dentro de las cuales las proteasas de origen vegetal son las que ocupan nuestro interés

En la coagulación enzimática la enzima que más se utiliza es la quimosina o cuajo que rompe el enlace específico 105 - 106 de la κ -caseína el cual contiene una gran cantidad de cargas, desestabilizando la micela de caseína compuesta por las caseínas α_s , β , κ y de esta manera las caseínas sensibles al calcio (α_s , β)

se agregan entre sí para formar propiamente el coágulo, el cual presenta una consistencia gelatinosa, elástica, gran impermeabilidad y contractibilidad de las micelas. La gran impermeabilidad de la cuajada impide el desuerado espontáneo lo que trae como consecuencia la intervención mecánica que implica corte agitación y prensado, al evitarse pérdida de calcio por este tipo de coagulación se permite obtener pastas más firmes y mayor rendimiento en obtención de quesos.

A causa de la escasez y carencia del cuajo (quimosina) de temero en determinadas épocas del año se han utilizado diferentes sustitutos entre los que se encuentran las proteasas vegetales, aunque estos no se preparan industrialmente. (Alais, 1984)

2.6.1.3 Coagulación mixta: la leche se coagula por la acción conjunta del cuajo y la acidificación, es la más ampliamente difundida y utilizada por todas las queserías, ya que permite obtener características de cuajado intermedias entre las dos anteriores además de disminuir el tiempo de coagulación.

2.7 Descripción de las zonas áridas y semiáridas

La cubierta vegetal de las regiones de clima árido y semiárido de México, es tan variable desde el punto de vista económico que diversos autores (Metler, 1947; Miranda y Hernández, 1968; Rzedowsky, 1966) reconocieron y denominaron para esta parte del país una serie de tipos de vegetación caracterizados por su aspecto sobresaliente. En síntesis reconocieron reunir todas las comunidades de porte arbustivo de las zonas áridas y semiáridas dentro de un colectivo

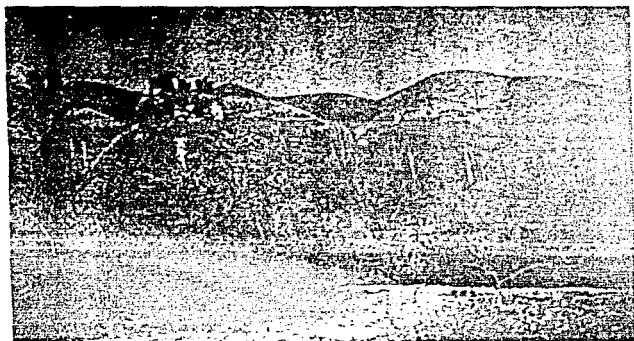
denominado matorral xerófilo. La vegetación xerófita encuadra de manera armónica diferentes sistemas de tipos de vegetación.

El matorral xerófito cubre la mayor parte del territorio de la península de Baja California, grandes extensiones de la planicie costera, de las montañas de Sonora, altas áreas del Altiplanicie, desde Chihuahua, Coahuila hasta Jalisco, Guanajuato, Hidalgo, Estado de México, Puebla, Oaxaca, Además constituye la vegetación de una parte de la Planicie Costera nororiental desde Coahuila Tamaulipas la sierra madre oriental etc.

Los matorrales xerófitos se pueden observar prácticamente en todo tipo de condiciones topográficas y no hacen mayor discriminación en lo relativo al sustrato geológico, aunque estos factores, al igual que el tipo de suelo, con frecuencia influyen en forma notable en la fisonomía y en la composición florística de las comunidades.

Los matorrales xerófitos, considerados en conjunto son quizá de las comunidades menos afectadas por las actividades del hombre, consecuencia lógica de las condiciones climáticas imperantes que por lo general no son favorables ni en el desarrollo de la agricultura, ni al de la ganadería intensiva y el aprovechamiento de las plantas silvestres es limitado.

Pero a su vez la falta de recursos hace que el hombre que habita las regiones áridas se empeñe más en obtener provecho de la vegetación natural que el que vive en áreas con suficiente agua. De esta manera un gran número de plantas silvestres se utilizan para fines de construcción, como ceras, como combustible, como textiles, medicinales y aún como productos alimenticios, sobre todo en épocas de escasez.



1.- Matorral Xerófito - bosque seco de la zona de La Loma de Guadalupe.

2.- Matorral xerófito y al fondo la Yucua Edilera



3 - Yucca filifera. 4 - Cojullo en desarrollo

Los efectos de su empleo a menudo son muy poco notables en los alrededores de los poblados, pero pocas veces a mayor distancia. Unas cuantas especies, en cambio son o han sido objeto de explotación intensiva con fines de comercio e industrialización en escala más o menos importante. (Rzedowski, 1978)

2.7.1 La Yucca filifera

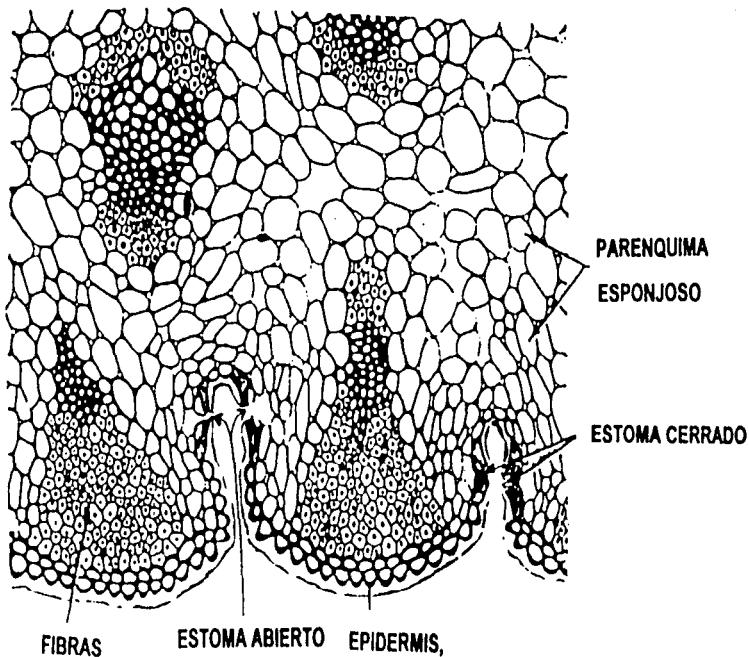
La Yucca filifera se encuentra distribuida como lo muestra la figura 1. Las mayores densidades se localizan en dos zonas, ubicadas una en el Mpio. de Salinas Victoria, N. L.; y la otra en el Mpio. de Guadalcázar, S.L.P. (hasta más de 300 plantas por ha). Su hábitat se encuentra en planicies con suelos profundos, bien drenados o con deficiente drenaje: con altitudes entre 500 y 2400 m snm. Forma parte del estrato arbóreo, principalmente en el Matorral desértico. Es la Y. filifera la especie con más amplia distribución y que presenta las mayores densidades, aunque tal como sucede con otras especies, cada día son substituidas sus áreas de dispersión por terrenos de cultivo. (Piña, Matuda, 1980)

Debido a que en la zona de Tula, Tamaulipas (ver figura 1 *) utilizan la cutícula de la Yucca filifera (palma barreta) como un sustituto de cuajo para la elaboración de quesos y/o jocoque, que consiste en adicionar a la leche recién ordeñada aproximadamente 2g de cutícula de la palma, dejarla reposar cerca de la chimenea, (1 - 2h), posteriormente ya formado el coagulo, cortan y desueran la cuajada, la muelen, salan y moldean la cuajada para formar el queso. O bien solo coagulan la leche recién ordeñada, con la cutícula la dejan reposar y una vez formado el coagulo adicionan sal y consumen el jocoque.



Figura 1

Figura 2



ESTRUCTURA DE LA CUTICULA DE LA HOJA DE Yucca

La Yucca filifera es conocida entre los pobladores como palma barreta, es una planta arborecente que llega a medir hasta 20 m de altura con el tallo generalmente simple, con las hojas aglomeradas y en forma de daga, agudas con el borde filifero de aproximadamente 3 cm de ancho, y hasta 55 cm de largo, flores blancas de hasta 3 cm de largo en panículas más o menos cilíndrica pendular, por lo contrario a otras palmas (o *Yuccas*, por ejemplo la Y. Coronadosana) con la cual se le confunde por sus características fisiológicas, la fibra de Yucca filifera los campesinos no la consideran explotable por su fragilidad, las flores y frutos son comestibles. (Piña, Matuda, 1980)

En el centro y la parte superior de la planta se encuentra un cúmulo de hojas jóvenes entremezcladas que se le denomina vulgarmente cojullo.

Las monocotiledoneas arborecentes como aloe y *Yucca*, presentan un crecimiento secundario de un tipo especial. En la corteza se forma un campo que produce grupos de células en su lado interno que se desarrollan en haces vasculares cerrados típicos y en el lado externo en relativamente pocas células de parénquima. (Robbins, 1974)

En la figura 2 se muestra como la cutícula se encuentra protegiendo el espesor de la epidermis a lo largo del haz fibroso, y se observa los estomas hundidos en las cavidades de las hojas de *Yucca* que es donde se cree se encuentran las proteasas culpables de la coagulación de leche.

Por lo que se pensó que probablemente esta cutícula podría tener actividad proteolítica.

En la literatura se encontró que la base de extracto de hojas de la planta de *Agave americana variegata* pudieron hidrolizar ciertas proteínas. Esto fue

establecido después de una observación en la que la savia que se encuentra en las hojas, de la planta irritaba la piel humana en un marcado grado. Esta observación ocasiono que en 1975 Dutoit aislara una nueva proteasa del extracto de las hojas del Agave americana , la proteasa EC 3.4.-

Se decidió que en el proceso de aislamiento y purificación de la(s) proteasa(s) que se obtengan en Yucca, coincidan parcialmente, por el proceso efectuado en las investigaciones hechas por Dutoit.

El Agave americana pertenece a la familia Agavaceae al igual que la Yucca filifera ,sin embargo las hojas de esta planta no irritan la piel humana de acuerdo a lo establecido por la información de los lugareños del entorno del municipio de Tula Tamaulipas donde utilizan la Yucca como un recurso para coagular la leche.

3.- JUSTIFICACIÓN

La falta de recursos hace que el hombre que habita las regiones áridas se empeñe más en obtener provecho de la vegetación natural . De esta manera un número de plantas silvestres se utilizan para diferentes fines entre los que destaca por su importancia actual a nivel mundial la alimentación que en épocas de escasez de alimentos estas plantas se utilizan como un recurso alternativo del lugar.

Debido a que en la zona de Tula Tamaulipas se utiliza la cutícula de las hojas de "palma" (Yucca filifera) como un elemento con características para coagular la leche, hecho que se ha realizado tradicionalmente por los habitantes. Se piensa que posiblemente esta cutícula podría tener actividad proteolítica. Por

lo que se cree importante realizar un estudio de esta planta, para evaluar cuáles son los factores determinantes de este fenómeno y si lo que actúa es una enzima.

También como menciona Alais(1984) y Yeh Ceballos(1991) que a causa de la escasez y carencia de cuajo en determinadas épocas del año (cuando hay una alta producción de quesos) se han utilizado diferentes sustitutos de quimosina entre los que se encuentran las proteasas vegetales, por lo que esta "enzima" podría ser una alternativa de uso para estas épocas.

4.- OBJETIVO GENERAL

- Determinar si en la cutícula de hojas de Yucca filifera que utilizan para coagular la leche hay una o más enzimas proteolíticas.

4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar que tipo de sustancia es la responsable de la coagulación.
- Evaluar mediante el método de actividad quimosínica las mejores condiciones de extracción a diferentes pH de 4-8, con intervalos de 0.5 y determinar el tiempo de coagulación más corto.
- Evaluar el uso potencial de una nueva enzima extraída de Yucca filifera tipo quimosínico
- Evaluar la cinética enzimática.

- Aislar y purificar la (s), enzima responsable de la coagulación de la leche extraída de *Yucca-filifera*.

- Determinar la actividad proteolítica de la enzima tanto cruda como durante todo el proceso de purificación.

- Evaluar los efectos de la concentración de proteína durante el proceso de purificación.

- Cuantificar los efectos de Temperatura, [E], [S], pH en la enzima purificada y comparar con los efectos del extracto enzimático.

- Determinar el Peso Molecular (PM), Punto Isoeléctrico (pI)

[S] = Concentración de sustrato

[E] = Concentración de enzima

5. DESARROLLO EXPERIMENTAL

En el presente trabajo se emplearán métodos de actividades coagulantes, proteolíticas, concentración proteica, y separación e identificación de la proteína.

De las hojas jóvenes sanas y limpias de *Yucca filifera*, se obtendrán muestras de extractos almacenándose en fracciones de 40 ml a temperaturas de 0°C. Determinándose los primeros ensayos de actividad de la "enzima" como se muestra en el diagrama de flujo, y se determinará el mejor pH de extracción, la concentración proteica y la posible actividad proteolítica de la(s) proteasas presente(s) además de determinar una cinética enzimática. Posteriormente se

procederá a precipitar la proteína con $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ al 100% a saturación y dializarlo.

Al dializado recuperado se le determinará la concentración proteica por el procedimiento de Lowry, método que se utilizará a lo largo de la caracterización parcial de la enzima, actividad quimosínica, y alternativamente se determinará la actividad proteolítica de la muestra por el método de Kunitz modificado. Así mismo al dializado recuperado se le determinará el Peso molecular de las proteína(s) presente(s) en la suspensión por el método de electroforesis nativa en un gel de poliacrilamida (7.5% acrilamida, 2.5% de bis - acrilamida), utilizando marcadores moleculares.(Dutoit, 1975)

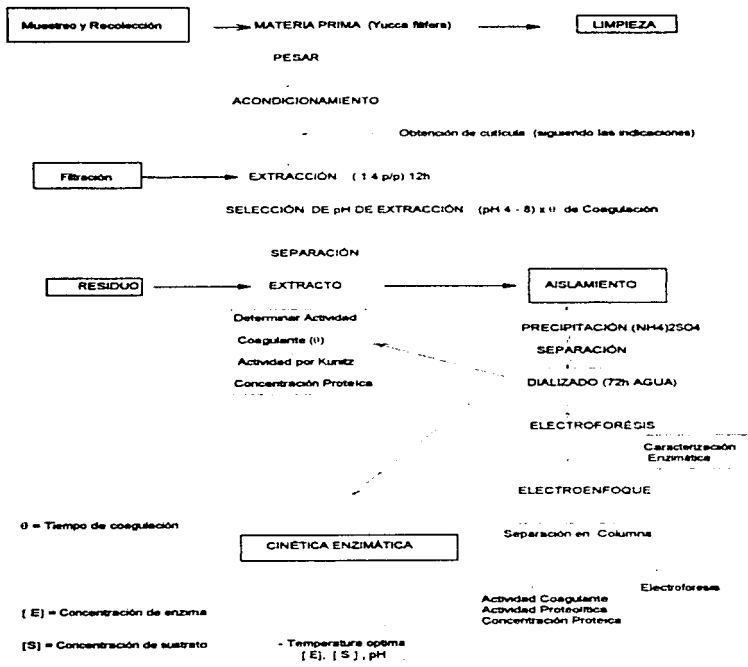
Posteriormente se determinará el punto isoelectrico en un periodo de 72 H usando 1% (w/v) de concentraciones de anfolitas cercanas a los rangos de pH de 3 - 10 . En función a las proteínas presentes, usando enfoque isoelectrico en cilindros de gel de poliacrilamida utilizando una cámara electroforética Buchier

Así mismo, al dializado dependiendo de (los) pesos moleculares encontrados en la proteína se hace pasar por cromatografía en columna por filtración en gel usando Sephadex G- 75, a G 200 Dutoit recomienda para ese tipo de proteasas columnas de (2.5 - 90 cm) Al llevarse a cabo este fraccionamiento se le determinará tanto la actividad enzimática como la concentración proteica sucesivamente en todas las fracciones obtenidas.

Posteriormente se le determinará la composición de aminoácidos, así como se determinará el contenido sulfhidrilo de la enzima con (DTNB), también se evaluará el análisis químico proximal (contenido de carbohidratos, extracto etéreo y minerales y humedad de la muestra)

Alternativamente a la(s) fracción(es) que presenten la máxima actividad proteolítica serán utilizadas para caracterizar cinéticamente a las proteasa(s) presentes en las hojas jóvenes de Yucca filifera. Se determinará el pH óptimo de actividad, la temperatura óptima de actividad, el efecto de concentración de enzima utilizando caseína desnaturalizada (0.5%) como sustrato y obtener por consiguiente la especificidad enzimática, así como el efecto de concentración de sustrato utilizando diferentes concentraciones de caseína desnaturalizada como sustrato.

5.1 DIAGRAMA DE FLUJO



5.2 MATERIALES Y MÉTODOS.

5.2.1 Muestras

Se coleccionará cojullos (hojas jóvenes) de la palma barreta (*Yucca filifera*)

5.2.2 Lugar de muestreo

El muestreo se llevará a cabo en la región árida de Tula Tamaulipas en un área aproximada de 10 Ha. donde es utilizada la cutícula de las hojas de palma

5.2.3 Recolección

La recolección se llevará a cabo al azar y de las palmas que se encuentre más accesibles para su recolección, que sean jóvenes.

5.2.4 Obtención de la Cutícula

- a) A las hojas de *Yucca* se les separará la cutícula manualmente.
- b) Debido a que el tejido secundario en donde se encuentra el principio activo se localiza entre la cutícula y la epidermis, se cortaran las hojas en cuadrntos de aproximadamente 1 cm²
- c) Experimentos previos mostraron que tanto la cutícula como la epidermis de las hojas indicaban actividad proteolítica por lo que se trabajará con ambas partes de las hojas.
- d) La muestra no se molerá para evitar en lo posible la interferencia de algunos otros compuestos, presentes en la hoja.

Los reactivo que se utilizaran en el presente trabajo serán de grado analítico, además del material de uso común del laboratorio.

5.3 MÉTODOS

5.3.1 Análisis Químico Próximo

Para tener un análisis completo de la planta se efectuará el contenido de humedad, proteína, lípidos, fibra cruda, cenizas y carbohidratos, determinándolos por los métodos recomendados por el AOAC (1995)

5.3.2 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN PROTEICA.

El método de Lowry para la determinación de la concentración de proteína se llevará a cabo en dos pasos: a) reacción del cobre con la proteína en medio alcalino, b) reducción del reactivo de Folin - Ciocalteu (ácido fosfomolibdico - ácido - fosfotúngstico), por la proteína tratada con cobre.

En este método, se obtiene una curva de calibración de proteína utilizando albúmina sérica de bovino cristalizada, se prepararán series de tubos con concentraciones de albúmina entre 20 μg / ml hasta 200 μg / ml, en un volumen final de 6.5 ml

La proporción de los reactivo será la siguiente:

Reactivo A.- Solución al 2% de Na_2CO_3 en NaOH 0.1 N.

Reactivo B.- Solución de $\text{Cu}_2\text{SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ en citrato de sodio al 1%.

Reactivo C.- 1 ml de reactivo B + 50 ml de reactivo A

Reactivo D.- Reactivo de Folin - Cicalteu diluido (1:1)

Una vez mezclada la solución tipo con los reactivos, la absorción de la luz del compuesto colorido, se mide en el espectrofótometro a una longitud de onda de 750 nm y con el promedio de los valores obtenidos en las determinaciones, se traza la gráfica de absorbancia contra concentración de proteína. Esta curva de calibración cumple la ley de Lambert - Beer, dentro de las concentraciones usadas. La ecuación de la recta se obtendrá por el método de los mínimos cuadrados y es

$$y = aX + b \quad ; \quad y = \text{absorbancia} \quad ; \quad X = \text{Concentración proteica}$$

Para la determinación de la concentración proteínica durante el trabajo, en cada ocasión se prepararan una serie de tubos por triplicado con cantidades iguales de solución enzimática, siguiendo la adición de reactivo en orden, es importante que después de la adición de C se dejen pasar 10 minutos de reacción, posteriormente se adicionan los 0.5 ml de solución D, al cabo de media hora se mide la absorción de luz en el espectrofotómetro. El valor obtenido de absorbancia se sustituye en la ecuación para encontrar el valor de la concentración proteínica. Se considera como válido el valor que este dentro del intervalo de la curva de calibración.

5.3.3 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD COAGULANTE

El método utilizado para esta determinación, es el tiempo de coagulación de la leche, el cuál consiste en añadir la solución enzimática a 5 ml de leche, contenidos en tubos de ensaye, colocados en un baño de agua a una temperatura constante de 35°C, se mide el tiempo inicial al añadir 1 ml de enzima y se agita el tubo, observándose sus paredes, hasta el momento en que se observan partículas de caseína precipitada en las paredes del tubo, este es el tiempo final (tiempo de coagulación) de la determinación.

El procedimiento se lleva cabo como sigue:

Se pesaran 11g de leche en polvo descremada por 100 ml de regulador de acetatos 0.2M, pH = 5,

conteniendo la leche 1 mg / ml de cloruro de calcio, quedando como se muestra en el cuadro 1.

CUADRO 1

Concentración final de la Enzima	desconocida
Volumen de la Leche	5 ml
Concentración final del cloruro de calcio en leche.	1 mg / ml
	pH 5.0
Enzima	1 ml

Se colocaran por triplicado los tubos de ensaye en un baño a la temperatura deseada. A cada extracto se hace un testigo, que en vez de 1 ml de enzima se lleva 1 ml de regulador. (Whitaker, J., 1995)

5.3.4 ACTIVIDAD PROTEOLITICA .

Método de Kunitz:

La determinación de la actividad proteolítica se realizará por el método de Kunitz, modificado por Ortega y Del Castillo,(1966). Este método consiste en dejar actuar cierta cantidad de enzimas sobre un sustrato proteínico, la caseína desnaturalizada (Kunitz, 1946). Dicha actividad se detendrá por la adición de ácido tricloroacético al 5%.

Procedimiento: El sustrato se prepara de la siguiente forma 2 g de caseína se disuelven en regulador de fosfato 0.05M pH 7.6. La caseína se desnaturaliza en baño María a ebullición durante 10 min. , se deja enfriar y el volumen se lleva a 190 ml con el regulador, quedando al 1% al mezclarse finalmente con la enzima . En un baño a temperatura constante a 35°C se colocan los tubos conteniendo 1.9 ml de caseína para su incubación por 10 min. Posteriormente se les agrega 0.1 ml de la mezcla

de enzima de los diferentes extractos y se deja actuar el tiempo establecido , la reacción se detiene adicionando 3 ml de ácido tricloroacético ATC al 5 %.

Paralelamente se corre un testigo , el cual se prepara adicionando primero el ATC al 5% y al final la solución enzimática .al termino de la reacción , los tubos se filtran, en el sobrenadante se encontraran aminoácidos libres y peptidos pequeños como producto de la hidrólisis enzimática que se leerán a 280 nm, ajustando previamente el aparato con una solución formada de 2 ml de regulador de fosfato 0.05 M pH 7.6 y 3 ml de ATC al 5% .

La actividad proteolitica se reportará en mg de tirosina liberados/ g de muestra , utilizando como referencia una curva tipo de tirosina que se lee a 280 nm. La actividad proteolitica se determinará de acuerdo a la ecuación de la recta :

$$y = a + b X ; \quad X = \text{Tirosina liberada} ; y = \text{Absorbancia}$$

(Oliver, 1994, Cruz y Victoria, 1993)

5.3.5 Extracción y Aislamiento de la(s) Proteasa(s)

La extracción de la enzima se llevará a cabo con 100g de hojas de Yucca filifera en 400 ml de solución extractora de regulador de acetatos (0.02M), y fosfatos (0.05 M), en una proporción de 1:4 (p/p), con un pH de 4 - 8 y un intervalos de 0.5, probándose además la adición NaCl al 5%, para tratar de mejorar la extracción. El tiempo de extracción será de 12 horas.

Posteriormente se filtrará la solución en papel filtro de poro medio y se separaran los sólidos.

De las extracciones anteriores se medirá la actividad coagulante y la que resulte después de ensayos sucesivos con un menor tiempo de coagulación, será

seleccionada para efectuar los efectos de la concentración de sustrato [S], de extracto enzimático [E], utilizando como sustrato leche desgrasada. El efecto de la temperatura en la actividad enzimática del extracto será evaluada en un rango de 5 - 60°C, con intervalos de 5°C.

Se determinará la actividad proteolítica por el método de Kunitz modificado por Ortega, además de la concentración proteica por Lowry(1951) y la actividad quimosínica.

Después de haber seleccionado la mejor extracción enzimática se procederá a aislar a la proteína precipitándola con sulfato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 100 % de saturación (por cada 100 ml de solución extractora 70 g de sulfato de amonio) .(Dutoit, 1975), se deja reposar durante 12 h, esta suspensión se centrifuga a 5000 rpm durante 30 min el sobrenadante se lleva a dializar contra agua durante 16 - 24 h en una membrana semipermeable de peso molecular 10 kD.

Durante el proceso de diálisis se llevará a cabo a Temperaturas entre 4-6°C

5.3.6 CARACTERIZACIÓN DE LA PROTEASA

Después de dializar la muestra se determinará proteína, actividad quimosínica y actividad proteolítica con el fin de estar seguros de que el tratamiento no afecto a la enzima. En la misma muestra se procederá a realizar la cinética enzimática en donde se determinaran los efectos de concentración de sustrato [S], utilizando caseína desnaturalizada (0.2, 0.4, 0.5, 0.6, 0.8, y 1%). se determinará el efecto de la concentración de la enzima [E], el efecto de la temperatura se determinará en un rango de 5 - 65°C con un incremento de 5°C ,

para el efecto del pH se les medirá actividad proteolítica en un rango de pH 4.0 - 8.0 con un intervalo de 0.5.

Se efectuarán las evaluaciones para determinar el pH y temperatura óptimos así como la correspondiente cinética enzimática encontrando por consiguiente el K_m , $V_{máx}$ así como la Energía de activación.

Además se determinará el contenido sulfhidrilo de la enzima por el método empleado por (Dutoit, 1975), utilizando 5, 5' - ditiobis 2 - nitrobenzoico ácido (DTNB), bajo condiciones de desnaturalización.

5.3.7 DETERMINACIÓN DE PESO MOLECULAR Y PUREZA POR ELECTROFORESIS

La electroforesis es generalmente usada para la determinación de una muestra proteica más que para la purificación de la misma. La separación de las proteínas por este método depende de la densidad de carga, distribución de la carga, y el tamaño y la forma (electroforesis en gel) de las moléculas. La densidad de la carga de una proteína puede ser cambiada por un cambio de pH de la solución, lo cual ofrece invaluable herramienta en la separación de una proteína de otra. La electroforesis nativa será la que se utilizará en el presente trabajo.

Con el fin de determinar si se aisló una o más proteasas se realizará electroforesis nativa, además de determinar el PM (peso molecular) de la(s) proteasa(s). Para lograr esto al dializado recuperado se tomará una muestra tal que contenga entre 40 y 80 μg de proteína. De tal manera que al aplicarla al gel se utilicen 20 μl como máximo de muestra. El gel que se corra la muestra podrá ser un gel de poliacrilamida (7.5% acrilamida, 2.5% de bis - acrilamida),

(Dutoit, 1975). El peso molecular se determinará estimándose por la migración relativa de estándares de peso molecular (Pharmacia): Albúmina (67,000), Ovoalbúmina (43,000), Anhidrasa carbonica (30,000), Inhibidor de tripsina (20,000) y α - Lactoalbúmina (14,000) (Pharmacia, 1979). Posteriormente las bandas proteicas que se lleguen a presentar se teñirán con 0.1% de Azul brillante de Coomassie, y la solución desteñidora que se utilizara será (agua:metanol:ác acético, 5:5:2). (Pharmacia, 1979)

5.3.8 CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA

Esta técnica se empleará para separar en fracciones el dializado enzimático se utilizará una columna de Sephadex G75 - G200 dependiendo de la masa molecular que tenga la proteína encontrada en electroforesis con los marcadores moleculares. La solución empleada para eluir será regulador de fosfatos. La columna de gel se calibrará. Posteriormente en las fracciones colectadas se medirá la concentración proteica, actividad proteolítica y actividad quimosínica (Dutoit, 1975) (Pharmacia, 1982)

Se evaluará el hecho en este punto de que a la fracción que contenga la mejor actividad proteolítica y quimosínica, de determinar los efectos de [S], [E], temperatura y pH en los rangos anteriores y comparar con los anteriores ensayos.

5.3.9 PUNTO ISOELÉCTRICO

El método de enfoque isoelectrico consiste en someter las proteínas a un campo eléctrico en un gradiente de pH. En estas condiciones, cada especie molecular emigra hasta la zona donde el pH = pI en la cual su carga neta es nula.

ESTA COPIA NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

la proteína se fija ahí constituyendo una banda. A diferencia de la electroforesis común, la amplitud de la banda es independiente del tiempo y viene determinada por el balance de la difusión, la fuerza del campo eléctrico y la inclinación del gradiente del pH. A la muestra dializada se le determinará el punto isoeléctrico en un período de 72 H usando 1% (w/v) de concentraciones de anfolitas cercanas a los rangos de pH de 3 - 10 . En función a las proteínas presentes, usando enfoque isoeléctrico en cilindros de gel de policrilamida utilizando 50% de solución de acrilamida (9.7% acrilamida, 0.3% bis - acrilamida), y 6.3% de anfolitas y 13.3 % de glicerol al 87 %, utilizando una cámara electroforética Buchler con NaOH 1N en el Cátodo y H₃PO₄ 1N en el ánodo con un preenfoco 2 mA/cilindro durante 1 h, posteriormente se corren 5 - 10µg de proteína de las muestras en 20 µl , con 2mA/cilindro por 3.5 - 4h. (Pharmacia, 1982). Posteriormente de completar el enfoque, los cilindros se fijan en una solución fijadora, se tiñen y se destiñen varias veces . (Pharmacia, 1982) (Dutoit, 1975)

Además de aplicar los métodos anteriores para aislar y purificar la proteasa encontrada en *Yucca filifera* se tomará una microfotografía entre la epidermis y la cutícula lugar donde se encuentra la enzima mediante una prueba histoquímica.

6. Bibliografía

- Alais , Ch., 1984, Ciencia de la Leche., Ed. Continental S.A. de C. V., México
- Alais Ch., 1977, Curso sobre ciencia de la leche., ENCB., IPN
- Beltrán, E., 1964, Las Zonas áridas del Centro y Noreste de México., Ed IMRNR. México.
- Cruz, Victoria, M.T., 1993, Aislamiento y Caracterización Parcial de la enzima proteolítica "Hemisferacina" obtenida de la *Bromelia Hemisphaerica*., Tesis de Maestría ENCB IPN
- Cruz, M.T., Del Castillo, L.M., & Castañeda - Agulló, M., 1986, Proteinases of mexican plants XIII. Time course of protein hidrólisis. Rev Latinoamer. Quim. 16: 4 ; 160 - 162
- Diezak, J. D., 1991, Enzymes : Catalysts for Food Processes. Food Technology
- Dixon. 1979, Source Book of Food Enzimology. Ed. Longmans, London
- Donald, J. M., y Rodney, J. B., 1985, Effects of enzyme type on milk coagulación, Jornal Dairy Science, 68 ; 628 - 632
- Douglas, G. D., 1980, Effect of milk concentration on the rennet coagulation time, Jornal of Dairy Research 47 ; 231 - 235
- Dutoit, P.J., 1975, Isolation and Partial Characterization of a Protease from *Agave americana variegata* , Biochim. et Biophysical Acta, 429 (1976), 895 - 911
- Dutoit, P. J., Schabort, J.C., Kempff, P.G., y Laubschers, D.S.A., 1978, Aminopeptidase from *Agave americana*, Isolation and Pysical Characterization, Biochemistry, 1978, V 17: 365 - 369

- Dutoit, P.J. y Schabort, J.C., 1978, An aminopeptidase from *Agave americana*, chemical properties of the enzyme. *Biochemistry*, 1978, V 17: 371 - 375
- Estadísticas Históricas de México, 1994, Anuario Estadístico de Comercio Exterior, E.U.M.
- Gupta, C. B., Eskin, N. A. 1977, Potential Use of Vegetable Rennet in the Production of Cheese, *Food Technology*, 31 (5): 62 - 66
- Ibarra, R. R., 1968, Un método para la obtención de enzimas proteolíticas a partir de látex fresco. Tesis de Ingeniería Bioquímica. E.N.C.B. - I.P.N., México.
- Kimmes, J. R., y Smith, Emil, L., 1954, Crystalline Papain, *The Journal Biological Chemistry*, V. 27 ed. for the American Society of Biological Chemists., Baltimore
- Lazlo, L. 1976, *Proteolytic Enzymes, Methods in Enzymology* XLI,m Ed. Academic Press., New York San Francisco London.
- López, M. C. A., Quintero, R. R., 1987, *Tecnología Enzimática*, Ed. Pual, UNAM
- Lowry, O.H., Rosenbrough, N.L., & etal., 1951, Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 1; 265 -275
- Martínez, M., 1959, *Plantas Útiles de la Flora Mexicana* , Ed. Botas. México
- Martínez, M., 1979, *Catálogo de nombres vulgares y científicos de Plantas Mexicanas.*, Ed. Fondo de Cultura Económica. México.
- Mora, E. R., 1995, *Manual de Prácticas de Enzimología*, DGIA, ENCB - IPN
- Oliver, S.M.C., 1994, *Hidrólisis Enzimática de un Sustrato Macromolecular por proteínas de origen vegetal.*, Tesis de Maestría. ENCB, IPN
- Oliver, M. C., Del castillo, L.M. Y Castañeda - Agulló, m., 1975, *Proteinasas de plantas mexicanas VII. Rev. Latinoam. Quim.* 8: 155 -160

- Ortega, D. M. L., del Castillo, L. M., 1968, Actividad de la Mexicana en presencia de altas concentraciones de Urea., Ciencia, 24; (5-6); 247- 251
- Pharmacia Fine Chemicals. 1979, Pharmacia Electrophoresis Calibration Kits. pp 1- 4
- Pharmacia Fine Chemicals, 1982, Gel Filtration. Theory and Practice. pp 7 -11
- Pharmacia Fine Chemicals, 1982, Isoelectric Focusing, Principles and Methods pp 64 - 68
- Piña, L., Y., y Matuda, E., 1980, Las Plantas Mexicanas del Genero Yucca., Ed. Serie Fernando de Alva Ixtlixochitl, Colección Miscelánea del estado de México, Co edición., LANFI.
- Rendina, G., 1974, Técnicas de Bioquímica Aplicada., Ed Interamericana.
- Romo de V., Arrequín, B., Camacho, R., Guerrero, C., Ortega, A., y Castillo, M.J. 1974 Contenido Esteroidal de Yucca filifera., Rev Latinoamericana. Quím., 5, 240 - 243
- Rzedowski, J. , 1978, Vegetación de México., Ed. Limusa, México.
- Shann, T. J., Moody, M. W., Hsing, Ch. Ch., 1991, Purification and Characterization of Proteasa., Journal of Food Science, 5 (2) ; 322 - 326
- Sidney, P. C. and Nathan, O., 1976, Protolytic Enzymes, Mhetods in Enzimology, ed. Gertrude E Perlman Lazlo Lorand. pp 273
- Valle, Vega, P., 1983, Enzimas Proteolíticas en la Industria Alimentaria., Tecno. Aliment. (Méx.), V. 19: 2 ; (4 -9)
- Velasco, O., 1981, " El trompillo como una alternativa para la elaboración de queso asadero en Chihuahua" .. Tesis de Maestría., ENCB, IPN

- Whitaker , J.R. 1994. Principles of Food Enzimology for the food Science. Edit. Marcel Decker, N.Y.
- Yeh, C. M. A., 1991, Caracterización y Aplicación de la Enzima Proteolítica del Látex de la Chaya. . Tesis de Maestría ENCB - IPN
- Campesinos del Municipio de Tula Tamaulipas.