

OBTENCIÓN DE UN EXTRACTO PROTEOLÍTICO CON POTENCIAL USO EN LA INDUSTRIA FARMACÉUTICA

Luis Ojeda, Nirza Noguera, Daniela Hurtado, Mery Iamarino, Sergio Hernández

Instituto de Investigaciones Biomédicas "Francisco Javier Triana Alonso" (BIOMED). Facultad Ciencias de la Salud Sede Aragua. Universidad de Carabobo.

Recibido: 4 Octubre Aceptado: 15 Octubre 2012

Correspondencia de Autor: Luis Ojeda. Correo: lojeda2@uc.edu.ve

RESUMEN

Cuando los elementos proteicos actúan como antígenos en el organismo del consumidor, generan síntomas digestivos de mala absorción intestinal. La intolerancia a las proteínas, suele solucionarse con la introducción en la dieta de alimentos previamente hidrolizados o medicamentos que completen el proceso digestivo a nivel intraduodenal; estos últimos obtenidos en su mayoría, a partir del páncreas porcino. En función de esto, en esta investigación se planteó producir y aislar proteasas a partir del *Lactobacillus casei* y evaluar su actividad proteolítica y potencial en la industria farmacéutica. Para ello, se diseñó un medio de cultivo con componentes alternativos que favorecieran el crecimiento del microorganismo. El *L. casei* se obtuvo a partir de un liofilizado comercial (Laboratorios ELMOR S.A), como medio estándar de cultivo se escogió el MRS y el medio alternativo se diseñó sustituyendo algunos de sus componentes. El extracto proteolítico obtenido se separó mediante precipitación con etanol y su actividad proteolítica se determinó usando el método de Kunitz, y fue comparada con la de productos digestivos comerciales. El medio alternativo demostró rendimiento óptimo, el extracto exhibió su máxima actividad proteolítica a un pH 8 y a una temperatura de 40°C (Vmax de 1,52 UAbs/min). Se concluyó que se pueden sustituir los componentes de un medio de cultivo estándar y el microorganismo puede crecer de la misma manera, en presencia de sustratos complejos como la caseína. El extracto enzimático obtenido posee funcionalidad comparable con las proteasas de los fármacos eupépticos actuales.

Palabras clave: *Lactobacillus casei*, proteasas, medios de cultivo

Obtaining an extract proteolytic potential use in the pharmaceutical industry

ABSTRACT

When the protein elements act as antigens in the body of the consumer, digestive symptoms develop deficient intestinal absorption. The protein intolerance is usually solved with the introduction into the diet of previously hydrolysed or drugs that complete the digestion process intraduodenal level, the latter obtained mostly from porcine pancreas. Based on this, in this research was the producing and isolating proteases from *Lactobacillus casei* and assess its proteolytic activity and potential in the pharmaceutical industry. For this purpose, devised a

culture medium with alternative components favoring the growth of the microorganism. The *L. casei* was obtained from a commercial freeze-dried (Elmor Laboratories S.A.) as standard medium MRS culture was chosen and was designed alternative means of replacing some components. The extract obtained was separated by proteolytic ethanol precipitation and its proteolytic activity was determined using the method of Kunitz, and was compared with the commercial digestive products. The performance demonstrated alternative means, the extract exhibited its maximum proteolytic activity at pH 8 and a temperature of 40 ° C (1.52 UAbs Vmax / min). It was concluded that the components can replace a standard culture medium and the microorganism can grow in the same way, in presence of complex substrates such as casein. The enzyme extract obtained has comparable functionality proteases present eupéptic drugs.

Key words: *Lactobacillus casei*, proteases, growth media

INTRODUCCIÓN

La industria farmacéutica desarrolló en materia nutricional compuestos que mejoran el proceso de absorción digestivo atacando las sustancias nocivas a las que el organismo se expone; el aforo de emplear compuestos que degraden factores alérgenos, es necesario para la utilización de componentes dietéticos, en individuos susceptibles a intolerancia.

Los elementos proteicos de la leche de vaca son los primeros antígenos no homólogos con los que se tiene contacto. La misma contiene más de 40 proteínas, que pueden actuar como alérgenos en la especie humana, entre ellas la β -lactoglobulina, y la caseína (1). La alergia a la caseína es una reacción acompañada de signos y síntomas relacionados con la atrofia de las vellosidades intestinales; tomando en cuenta que la alergia representa la hipersensibilidad con respuesta inmunológica, mientras que la intolerancia es una hipersensibilidad no inmunomediada (2). Esta última, contempla una prevalencia del 2% y en los países en los que existe promoción de la lactancia materna, ha disminuido su incidencia (1, 3). Sin embargo la lactancia materna exclusiva, no es un parámetro cumplido a la cabalidad, y la industria farmacéutica propuso alternativas como las fórmulas a base de proteínas hidrolizadas, con menor capacidad alergógena, estas se obtienen mediante tres técnicas principales: tratamiento térmico, hidrólisis enzimática y la combinación de ambas (1).

Síntomas de mala absorción intestinal, también son

producto de la insuficiencia funcional exocrina del páncreas, la cual se traduce en la ausencia de enzimas proteolíticas que degraden los lípidos, proteínas y polisacáridos. Uno de los principales responsables del déficit de enzimas pancreáticas, ocurre en pacientes adultos con pancreatitis crónica, y se ha demostrado que en la mayoría de los casos, no existe mejoría si solo se aplican cambios dietéticos (4). La solución que la industria farmacéutica planteó, fue la administración oral de extractos pancreáticos que ofrecen a nivel intraduodenal catalizadores que faciliten la digestión, y estos se obtienen a partir de preparados que se componen de enzimas digestivas extraídas del páncreas del ganado porcino, (5).

Los digestivos ofrecidos por la industria farmacéutica actual, provenientes de vísceras de cerdo, representan un problema para pacientes con hipersensibilidad a la carne porcina o que por motivos de índole religioso y/o cultural no pueden consumir alimentos provenientes de este animal. Para la fecha solo existe un eutéptico alternativo el cual proviene del cultivo de un hongo, lo que abre las puertas para la búsqueda de nuevos microorganismos capaces de ejercer el mismo efecto.

Probióticos ricos en *Lactobacillus casei*, favorecen la flora intestinal esencial para descomponer sustancias alimenticias que no fueron digeridas previamente (6). Microorganismos desarrollados en condiciones óptimas para la vida, pueden con su ciclo biológico producir enzimas, cuya acción digestiva se compara con la de los fármacos eutépticos, incluso con catalizadores usados en la hidrólisis proteica de los antígenos de la leche. El *Lactobacillus c.*, es muy resistente en amplios intervalos de pH y temperatura, extractos libres de células de este microorganismo generan actividad peptidasa en un pH 6,0 con una temperatura máxima de 50 °C (6, 7). Esta bacteria gram positiva funciona como proveedor de proteasas al intestino (6).

Por tales motivos se planteó en este estudio establecer las condiciones adecuadas para el cultivo de *Lactobacillus casei*, a partir de un agente probiótico liofilizado de uso comercial, con la posterior caracterización las proteasas obtenidas a partir del extracto, para comparar la su actividad enzimática con la de fármacos obtenido a partir de compuestos pancreáticos porcinos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Microorganismo

Se utilizó la cepa comercial de la bacteria *Lactobacillus casei* variedad rhamnosus, liofilizada de origen comercial (Laboratorios ELMOR C.A.).

Medio de cultivo

Como medio estándar se utilizó una base del caldo de cultivo Man Rogosa Sharpe (MRS). Se diseñaron varios medios de cultivo alternativos al MRS, donde se variaron uno o varios componentes del medio estándar, incorporando caseína y fertilizantes. En la siguiente tabla se muestran las combinaciones usadas. Adicionalmente se optimizaron todas las condiciones de cultivo.

Tabla 1. Medios de cultivo usados en el estudio

Ocupación	Número de Individuos	Número de Individuos Positivos <i>fa</i>	<i>fr</i> (%)
Jardinería	5	1	20
Agricultura	151	37	25

Reactivación del *Lactobacillus casei*

El microorganismo liofilizado se reactivó en el medio alternativo de cultivo (previamente esterilizado) durante 24 horas, a 100RPM de agitación y temperatura de 37°C (se emplearon 40mg del liofilizado por cada 50mL de solución). Se tomó un volumen del pie de inóculo, se incorporó a una fiola con el mismo medio y se incubó usando las mismas condiciones de incubación. Cada 2 horas, se determinó absorbancia a 600nm en un espectrofotómetro BECKMAN modelo DU 650 y se midió pH.

Determinación del estimado de proteínas

Se determinó el estimado de proteínas mediante la lectura de la absorbancia a 280nm en un espectrofotómetro BECKMAN modelo DU 650. (8)

Método de Kunitz modificado

Se preparó una solución de caseína al 1% previo al ensayo. Se colocaron en tubos eppendorf de 1,5 mL la siguiente mezcla: 350µL de caseína al 1%, el volumen de la muestra y se completo a un volumen final de 500µL con agua destilada. La mezcla se incubó por un tiempo y a una temperatura determinada y luego se detuvo la reacción añadiendo 500µL de ácido tricloro acético (TCA) al 10%, frío. Se centrifugó a razón de 10000RPM durante 5 minutos, y se determinó la absorbancia a 280nm del sobrenadante (9). Los datos obtenidos se reportaron en porcentaje de hidrólisis, en función de la cantidad de péptidos solubles que generaban los 350µL de caseína cuando se exponían a una hidrólisis total.

Purificación del extracto proteolítico

Se empleó la técnica de la precipitación con etanol. Se tomaron tres volúmenes de etanol (frío) por uno de extracto y se mezclaron, dejando reposar durante varias horas (4°C). Se centrifugó a 5000RPM durante 30min a 4°C; y el sedimento obtenido se liofilizó durante varias horas hasta que se confirmó la eliminación total de la humedad (11). Se tomó una cantidad del liofilizado y se disolvió en agua destilada, para posteriormente determinar su actividad proteolítica.

Caracterización del extracto proteolítico

Para determinar las condiciones óptimas de funcionamiento del extracto enzimático obtenido de la precipitación con etanol, se le determinó la actividad proteolítica variando parámetros como pH (5, 6, 7, 8 y 9) y temperatura (30, 40, 50, 60 y 70°C). La actividad enzimática se determinó por el método de Kunitz modificado.

Comparación de la actividad proteolítica del extracto con la actividad proteolítica de digestivos comerciales

Para determinar si las proteasas contenidas en el extracto liofilizado, poseían una alta actividad proteolítica, se comparó su actividad con la de las peptidasas incluidas en varios medicamentos digestivos de origen comercial como Festal®, Pankreon® y Pankreosil® (Tabla 2).

Tabla 2. Composición de los Digestivos Comerciales

Festal® grageas: Preparado de fermentos pancreáticos: lipasa amilasa y proteasa (tripsina y peptidasa).
Pankreon® Tabletetas: Pancreatina porcina 215mg. Estandarizada en mínimo: 5525 Unidades FIP de Amilasa, 6800 U FIP de Lipasa, 380 U FIP de Proteasa.
Pankreosil® comprimidos: Pancreatina 172mg; 5500 U FIP de Amilasa, 6825 U FIP de Lipasa, 400 U FIP de Proteasa. Dimetilpolixiloxano 80 mg, Excpc.s

Se tomó una unidad de cada digestivo, se pulverizó y se diluyeron 100mg de cada muestra en 1mL de buffer fosfato 100mM a pH 8, luego se determinó el estimado de proteínas en cada una. Para poder comparar la actividad enzimática se utilizó la misma cantidad de proteínas en los ensayos y se usó el método de Kunitz modificado.

Medición de la velocidad de hidrólisis del extracto proteolítico.

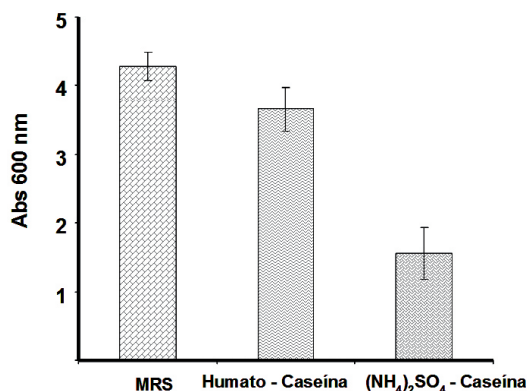
Se mezclaron en un tubo de ensayo, 10mL de caseína al 1% en buffer fosfato a pH 8 y un volumen del extracto, para luego incubar en baño de maría a 40°C. Durante una hora, se determinó absorbancia a 280nm con intervalos de medición cada 10 minutos, previa precipitación con TCA al 10%.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El uso de medios alternativos para cultivar el *Lactobacillus casei* ya ha sido reportado previamente. Sin embargo la búsqueda de materiales más económicos y de fácil acceso que brinden rendimiento similar hace que esta área de trabajo, siga generando nuevas alternativas.

1.- Obtención del medio alternativo para el cultivo del *Lactobacillus casei*

Después de someter al *Lactobacillus casei* a 36 horas de cultivo continuo en los diferentes medios se encontró que el crecimiento observado que el medio alternativo formulado a partir de Humato-caseína presentó valores de absorbancia muy parecidos al medio MRS modificado (Figura 1), lo que sugiere que este medio alternativo aporta los nutrientes y las sales minerales necesarias para que el microorganismo puede crecer. Este ensayo se realizó por triplicado.



Crecimiento del *Lactobacillus casei* en diferentes medios de cultivo

Figura 1. Comparación del crecimiento del *Lactobacillus casei* en diferentes medios de cultivo

En función de este resultado se realizó un ensayo con un mayor volumen en donde monitorearon los cambios de pH y la absorbancia del medio durante el tiempo de cultivo (Figura 2).

2.- Cultivo del *Lactobacillus casei*

En función de este resultado se realizó un ensayo con un mayor volumen en donde monitorearon los cambios de pH y la absorbancia del medio durante el tiempo de cultivo.

En la figura 2 se representa el comportamiento del *L. casei* en las condiciones definitivas de cultivo: velocidad de agitación de 100RPM, 80mg/L de liofilizado comercial, temperatura 37°C. Se inicio la curva con un pH inicial de 5.5.

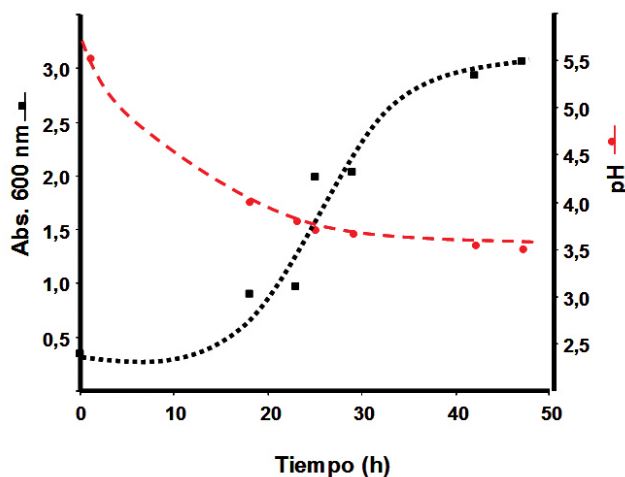


Figura 2. Curva de Cultivo del *Lactobacillus casei*. La línea de color rojo corresponde al pH del medio, la línea de color negro corresponde a la turbidez del medio.

En la figura 2, se observa como durante las primeras horas del cultivo no hay cambios en la absorbancia. Sin embargo, a partir de las 20 horas, se aprecia un cambio en el comportamiento del microorganismo, observándose un crecimiento logarítmico, el cual alcanza la fase estacionaria alrededor de las 48 horas del cultivo; con cambios de pH determinados por la acidificación del medio.

El crecimiento lento durante las primeras horas del estudio era de esperarse, en vista de que el inóculo utilizado provenía de un liofilizado. Un comportamiento similar fue observado al reactivar un liofilizado de *Lactobacillus rhamnosus* en un medio alternativo de lactosuero dulce, requiriéndose 54 horas para activar la bacteria (12). Sin embargo, en otro estudio reportado en lactosuero se observó el crecimiento del *Lactobacillus bulgaricus* en las primera 8 horas de cultivo, siendo necesarias 64 horas para activar la bacteria (13). En el presente estudio se invirtieron 18 horas para la activación del *Lactobacillus casei* partir de un liofilizado de uso comercial. Ese retraso en el crecimiento se pudo disminuir haciendo dos activaciones de 18 horas, para lograr que las condiciones del microorganismo mejoren y así pueda proliferar sin

ningún problema.

Se logró recuperar un 54,7% de actividad proteolítica usando la precipitación con etanol. Resultados similares fueron observados en el aislamiento de enzimas de un extracto pancreático de vísceras de pollo, observando que la precipitación con solventes orgánicos ofrecía mejor rendimiento que la precipitación con sulfato de amonio (11).

3.- Caracterización del extracto proteolítico

Para determinar las condiciones óptimas de funcionamiento de las peptidasas contenidas en el extracto, se establecieron diferentes condiciones de uso y se evaluó la actividad proteolítica de las mismas. Los resultados se muestran en la siguiente figura.

En la figura 4-A se observa que las peptidasas

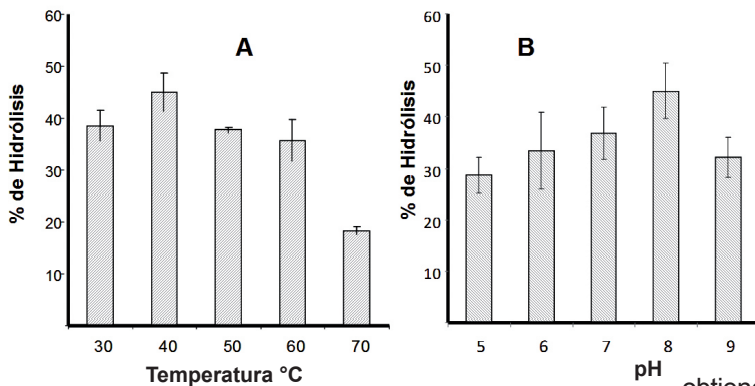


Figura 3. Actividad proteolítica del extracto obtenido después de la precipitación con etanol. A efecto de la temperatura y B efecto del pH sobre la actividad proteolítica.

contenidas en el extracto tienen un amplio intervalo de funcionamiento. Sin embargo poseen mayor actividad catalítica a 40 °C. También se observó una disminución gradual del porcentaje de hidrólisis en función de un aumento de temperatura. En la figura 4-B se evidenció un aumento gradual de la actividad en función del aumento del pH hasta el valor de 8, posteriormente se observa un descenso. La máxima actividad se aprecia entre pH 6 y 8, con mayor porcentaje de hidrólisis a pH 8.

Diversos estudios han determinado que las peptidasas obtenidas de un extracto libre de células de *Lactobacillus casei* tenían una máxima actividad proteolítica a pH 7, y entre 45 y 50°C (14). Igualmente, se aisló una aminopeptidasa a partir del *Lactobacillus helveticus*, encontrando que sus condiciones óptimas de funcionamiento eran 40 oC y pH 7 (15). Sin embargo, se han caracterizado aminopeptidasas de *Lactobacillus lactis*, que presentan su máxima actividad proteolítica entre los pH 6,2 y 7,2, a una temperatura de 47,5 °C (16). Estos resultados sugieren que las proteasas de diferentes especies de *Lactobacillus* funcionan mejor en condiciones

ligeramente alcalinas y varían según su especie, ya que algunas pueden secretar en mayor cantidad diferentes proteasas.

Las proteasas de este extracto al provenir de un microorganismo no patógeno y tener la propiedad de degradar la caseína, podrían ser incorporadas en diferentes procesos de la industria farmacéutica, como la obtención de hidrolizados proteicos para personas con problemas de mala absorción proteica o formulas para lactantes.

4.- Determinación de la velocidad de hidrólisis del extracto

El extracto proteolítico obtenido en este estudio está constituido por todas las peptidasas que produce en su metabolismo el *Lactobacillus casei* (cada una de ellas por separado tienen definidos sus parámetros cinéticos). Sin embargo algunos trabajos reportan la velocidad máxima (V_{max}) que alcanzan los extractos proteolíticos.

Como se puede observar en la figura 4-A se aprecia un comportamiento que muestra un aumento progresivo del número de péptidos solubles (medidos a 280nm), con una leve inclinación para los últimos minutos del estudio. En la figura 4-B, se observa el gráfico que se obtiene cuando se le aplica el arreglo de Lineweaver-Burk para la ecuación de Michaelis-Menten a los datos obtenidos en el ensayo. La V_{max} obtenida para el extracto enzimático es de 1,52 UAbs/min.

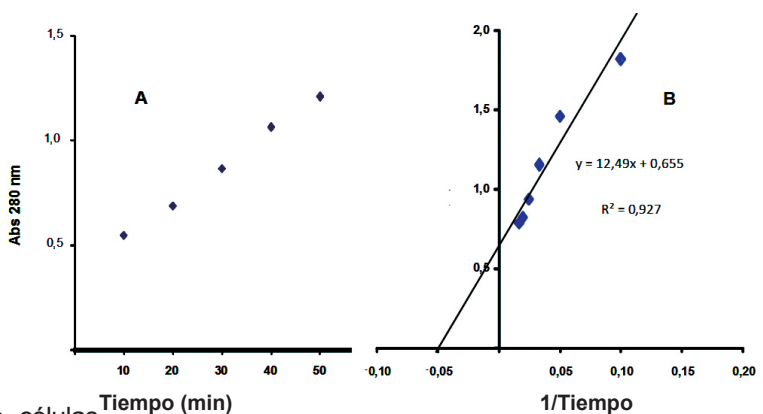


Figura 4. Determinación de la velocidad de hidrólisis del extracto proteolítico. A comportamiento del extracto proteolítico sobre la caseína. B aplicación del doble recíproco para conocer la V_{max} del extracto

No existen estudios que muestren esta variable cinética para un extracto de enzimas proteolíticas provenientes de *L. casei*. Sin embargo, en un trabajo previo, se utilizó un extracto enzimático de flores de cardo (*C. cardunculus L.*) parcialmente purificado, el cual presentó un comportamiento michaeliano, con parámetros cinéticos $V_{max} = 1.68 \times 10^{-2}$ UAbs/min (17).

La importancia de determinar esta variable es su aplicación a nivel industrial, debido a que en esta área no se manejan las propiedades cinéticas individuales de cada enzima sino las del extracto.

5-. Comparación de la actividad proteolítica del extracto precipitado con etanol con la de varios medicamentos digestivos de origen comercial

Para conocer si las peptidasas contenidas en el extracto tenían un alta función proteolítica, se comparó su actividad con la de las proteasas incluidas en varios medicamentos digestivos. Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente figura.

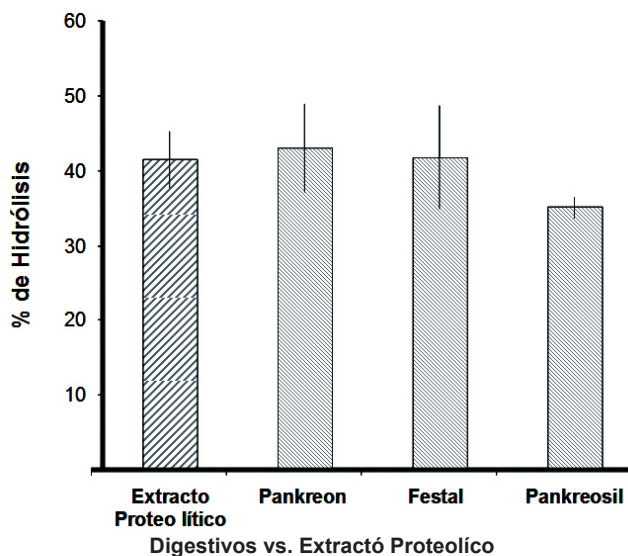


Figura 5. Comparación de las actividades proteolíticas. El extracto obtenido y de digestivos de origen comercial (Pankreon®, Festal®, y Pankreosil®).

En la figura 5, se observan porcentajes de hidrólisis similar entre las proteasas de los digestivos y las proteasas obtenidas en el estudio.

Los medicamentos usados en este estudio (Pankreon®, Festal®, y Pankreosil®) obtienen su principio activo de la extracción de enzimas de vísceras de animales como el cerdo. Las principales proteasas que contienen son la tripsina y la quimiotripsina, siendo dos potentes enzimas hidrolíticas. Los resultados obtenidos sugieren que las proteasas que excreta el *Lactobacillus* son tan eficientes como las que contienen los medicamentos comerciales; lo que pudiese representar una alternativa en aquellos casos donde el paciente tenga algún tipo de alergia a la carne de cerdo o por motivos de índole religiosa, no pueda ingerir nada que provenga de este animal.

Si se lograra demostrar que el *Lactobacillus casei* posee actividad amilolítica y lipolítica, pudiese proponerse como una segunda alternativa para las personas que no pueden usar los digestivos convencionales.

En conclusión, se pueden sustituir componentes de un medio de cultivo estándar por otros para crear un

medio alternativo, logrando la obtención de un extracto proteolítico a partir del *Lactobacillus casei*, en presencia de sustratos complejos como la caseína. Las proteasas obtenidas a partir del extracto de *L. casei*, poseen su máxima actividad enzimática a intervalo de pH entre 6 y 8 y temperatura de 40 °C. El extracto enzimático obtenido posee actividad catalítica comparable con las proteasas de los fármacos eupépticos sintetizados a partir del páncreas de ganado porcino.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por el Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico (CDCH) de la Universidad de Carabobo por una ayuda menor. Agradecemos muy especialmente al personal de la sección de Bioquímica y Ácidos Nucleicos del Instituto de Investigaciones Biomédicas "Dr. Francisco Javier Triana Alonso" de la Universidad de Carabobo (BIOMED-UC), Lic. David Torres, Lic. Dayana Requena, Técnico Antonio Yépez, Técnico Reynaldo Martínez por toda su colaboración prestada durante la realización de este trabajo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Plaza A. Alergia a proteínas de leche de vaca. *Pediatrics* 2002; 206 (2); 55-62.
2. Rodríguez M. Alergia Alimentaria a las proteínas de la leche. *AEPED* 2003; 108 (60); 22-29.
3. Mendoza A. Intolerancia a las proteínas de la leche de vaca. *Rev. Bol. Ped.* 2002; 41(3); 215-9.
4. Manzur J. Enzimas pancreáticas que actúan en la digestión. *Rev. RAFFO* 2003; 53; 85-96.
5. Cilian A. Uso de enzimas obtenidas de ciliados como medicamentos que fomentan la digestión. [Tesis en Línea]. Oficina española de patentes y marcas, Madrid 2001, 23-25.
6. Cala A. Probiotics plus antibiotics. Regulating our bacterial environment. *J Pediatr* 2011; 135: 535-7
7. Nelson F. Proteolysis by *Lactobacillus casei*. *Clin. Microbiol.* 1995; 7; 63-73.
8. Warburg O., Christian W. Isolierung and kristallisation des garungs ferments enolase. *Biochem.* 1941. 310:348-421.
9. Rocha G., Fernández G. y Parisi M. Estudio de caracterización cinética y fisicoquímica de una proteinasa aspártica aislada de frutos maduros de *Salpichroaorganifolia*. *Información Tecnológica.* 2010; 21(2): 21-28.
10. Rodríguez-Henríquez F. Establecimiento de un protocolo experimental para el aprovechamiento de

enzimas contenidas en páncreas de pollo desechado por beneficiadoras comerciales. Trabajo presentado para ascender a la categoría de profesor Asociado en el escalafón universitario de la Universidad de Carabobo. 2002.

11. Ojeda L. Obtención de extractos de las enzimas glucosa oxidasa y catalasa a partir del cultivo del *Aspergillus niger* y su potencial como aditivo para la conservación de alimentos. Tesis de Grado para optar al título de Magister Scientiarum. Universidad Nacional Experimental de Los Llanos Occidentales "Ezequiel Zamora" (UNELLEZ).2009.

12. Pimentel-González D., Caro-Canales I., Meza-Nieto M., Campos-Montiel R., y Vernon-Carter J. Crecimiento de la bacteria probiótica *Lactobacillus rhamnosus* en lactosuero dulce. Memorias del XII congreso nacional de Biotecnología y Bioingeniería. 2005. México D.F.

13. Jakymec M., Moran H., Páez G., Ferrer J., Marmol Z. y Ramones E. Cinética de la producción de ácido láctico por fermentación sumergida con lactosuero como sustrato. Revista Científica FCV-LUZ. 2001; 11(1): 53-59

14. Brandsaeter E. y Nelson F. Proteolysis by *Lactobacillus casei*. Iowa Agricultural Experiment Station 1955; 72(Pt 2): 73-78

15. Khalid N., Marth E. Purification and partial characterization of a prolyl-dipeptidyl Aminopeptidase from *Lactobacillus helveticus* CNRZ 32. Appl. Environ. Microbiol. 1990; 56(2):381-388.

16. Eggimann B. y Bachmann M. Purification y partial characterization of aminopeptidase from *Lactobacillus lactis*. Appl. Environ. Microbiol. 1980; 40(5) 876-882.

17. Hernández M., Hernández F., Reboloso O., Iliná A., Ruelas X. Obtención y caracterización de proteasas con aplicación en la industria quesera a partir del cardo (*Cynara cardunculus* L.). 338-344