



INFORME FINAL

“DESARROLLO DE CUAJOS DE FLORES DEL BOSQUE NATIVO PARA LA ELABORACIÓN DE QUESOS DIFERENCIADOS”

PYT-2014-011

Llanquihue 2016

OFICINA DE PARTES 2 FIA	
RECEPCIONADO	
Fecha	12 FEB. 2016
Hora	13:15
Nº Ingreso	29510



I. ANTECEDENTES GENERALES

- Nombre del Proyecto: “Desarrollo de cuajos de flores del bosque nativo para la elaboración de quesos diferenciados”.
- Código: PYT-2014-011
- Región: De Los Lagos
- Fecha de aprobación o adjudicación: 19-12-2013
- Forma de Ingreso al FIA: Convocatoria Innovación Agraria
- Agente Ejecutor: Universidad de Santiago de Chile
- Asociados Carlos Galaz; Sociedad Comercial los Radales; PRODESAL Frutillar.; PRODESAL Fresia; PRODESAL Los Muermos.
- Coordinador del Proyecto: Astrid Seperiza Wittwer
- Costo Total:
- Aporte del FIA (en pesos; porcentaje del costo total):
- Período de Ejecución: 2 de mayo de 2014 a 30 de abril de 2016.



II. RESUMEN EJECUTIVO

El objetivo principal de este proyecto fue el de producir cuajos vegetales para la elaboración de quesos diferenciados, aprovechando la gran diversidad de especies nativas con la que cuenta el sur de Chile, especialmente la Región de Los Lagos. Esto, con la finalidad de apoyar a la pequeña industria quesera elaborando productos innovadores, naturales y únicos.

Con respecto a los resultados obtenidos, el 55,6% de las especies estudiadas durante el periodo de recolección primavera 2014 (ANEXO 2) fueron potenciales alternativas para producir cuajo de origen vegetal; en cambio para las especies recolectadas durante la primavera 2015 solo el 33,33% de ellas produjeron al menos un cambio en la consistencia de la leche (desestabilización), pero baja o nula presencia coagulante (ANEXO 5).

Se realizaron una serie de determinaciones analíticas para determinar cuáles fueron las causales de la baja presencia coagulante para las especies recolectadas durante la primavera 2015. Donde los resultados analíticos obtenidos; demostraron un cambio significativo en la proteína bruta presente en los extractos los que van desde un -97,3% (zarzaparrilla) con respecto al año 2014, hasta un -100% en el caso de matico. Además, se realizaron pruebas de electroforesis, donde, ninguna especie de las seleccionadas presentó proteínas de igual o similar peso molecular en comparación a las que usualmente se utilizan, siendo las que tienen la capacidad de romper los enlaces aminoacídicos (Fen 105 – Met 106) (ANEXO 7).

La disminución de la concentración de proteínas, se debió a cambios climáticos presentes en la Región de los Lagos; sequía registrada a fines del año 2014 y primer trimestre 2015 (ANEXO 12 Y 13), heladas registradas en primavera y la erupción Volcánica del año 2015. Las especies vegetales estuvieron sometidas a un constante estrés ambiental, como consecuencia de esto, se produjo el adelantamiento de los periodos de floración; por consiguiente, no hubo un desarrollo óptimo de la composición química de las especies seleccionadas.

Si bien los resultados finales no fueron los esperados según lo planificado en el plan operativo inicial, se pudo comparar resultados obtenidos en dos periodos de recolección de primavera 2014 y 2015. Según estos resultados, se evidenció que los efectos climáticos (sequía, heladas, eventos naturales) afectan de manera directa la composición química de las plantas y por ende su capacidad de coagulación de la leche y ser formadoras de cuajo vegetal.



Aún cuando, no se logró elaborar quesos con cuajo vegetal, los resultados de este proyecto son un aporte al conocimiento generando dos grandes conclusiones.

La obtención de cuajos vegetales es posible de obtener según:

1. La composición química del material vegetal, el que está asociado directamente a la zona geográfica, las condiciones del suelo y sobre todo a las condiciones climáticas y eventos naturales existentes.
2. Con los resultados del año 2014 si es posible obtener cuajos vegetales en plantas nativas chilenas; considerando los resultados finales como un hallazgo científico, ya que generó la base de una nueva línea investigativa no desarrollada en nuestro país.

Estas dos grandes conclusiones dejan abierta la necesidad de continuar estos estudios usando como base todo el aprendizaje y resultados de este proyecto, donde el equipo de este estudio está convencido de que es posible obtener cuajos vegetales de plantas nativas chilenas y ser capaces de generar quesos únicos potenciando a los pequeños productores de queso de la zona y del país.

TEXTO PRINCIPAL

El objetivo principal de este estudio fue el de generar cuajo vegetal a partir de caracterización de plantas nativas típicas de la Región de los Lagos como sustituto del cuajo sintético. Dado que esto generaría un queso diferente y único, con características organolépticas diferenciadas, difíciles de reproducir en otras latitudes, por el carácter exclusivo de la vegetación nativa de nuestra región.

En Chile se produce leche de alta calidad, pero su elaboración de quesos se concentra en solo dos variedades, donde gouda y chanco suman el 97% de la producción nacional. En la elaboración de quesos en Chile a nivel formal, no se utilizan cuajos vegetales, puesto que todo el cuajo que utiliza la industria quesera es un cuajo sintético o genético, fabricado mediante la síntesis artificial del cuajo animal. A nivel vegetal, el coagulante más utilizado es el cardo (España), el cual tiene una actividad proteolítica mayor frente a otros cuajos lo que favorece a obtención de pastas más blandas y naturales, principalmente es utilizado para maduraciones cortas, permitiendo elaborar variedades de quesos con características organolépticas diferenciadas. Estas variaciones están relacionadas directamente con los agentes empleados en la coagulación y el periodo de maduración. De lo anterior y dada la situación actual del queso en Chile, donde, la producción y exportación ha ido en aumento en estos últimos años, se evaluó sustitutos del cuajo en plantas nativas para lograr un queso diferenciado, único e innovador.

Se recolectó una amplia serie de especies vegetales nativas de la Región de los Lagos, las cuales se congelaron, liofilizaron, se obtuvieron los extracto enzimático y se analizaron para determinar las características químicas (concentración de proteínas), donde, finalmente solo algunas especies obtuvieron el poder coagulante en la leche, presentando algún tipo de acción sobre ésta (matico, pelú, zarzaparrilla, nalca y maitén).

El principal impacto es producir de quesos diferentes a los existentes y totalmente naturales. Por otra parte, otros impactos del proyecto están dados a nivel ambiental y social:

- El componente ambiental está relacionado a la recolección en el bosque de “*productos forestales no maderables*”, actividad que ayudaría a disminuir la presión por la tala tradicional del bosque, puesto que al otorgarle, a través de este proyecto, un valor agregado y económico a estas especies nativas, se podrá traducir en un apoyo a su sobrevida en el largo plazo.



Fundación para la
Innovación Agraria

- El componente social se potenció a través de diversas capacitaciones, y la creación de una nueva fuente de ingresos para pequeños agricultores (agricultura familiar, bajo nivel socioeconómico); esta fuente de ingresos hace referencia a la posibilidad de venta del material vegetal, para el proyecto en primera instancia, o bien posteriormente para la producción industrial.

1. Cumplimiento de los objetivos del proyecto:

*El periodo en el cual se llevó a cabo la recolección de las muestras vegetales, corresponde a la estación de primavera, específicamente entre los meses de Octubre a enero para 2014 y Octubre a Diciembre 2015 (ANEXO 2).

Cabe mencionar, que si bien se obtuvieron exitosos resultados de coagulación para las especies recolectadas en el 2014, para las pruebas realizadas con 2015 no fueron las óptimas, por lo tanto no se pudo continuar con algunos avances esperados del proyecto.

- ✓ **El RE N°1 “gr. de proteína vegetal” del OE N°1 “Determinar contenido de proteínas en hojas y tallos de arbustos nativos”:** se cumplió en un 100%, ya que en la recolección de material vegetal para la primavera de 2014 se obtuvieron los gramos de proteína vegetal de cada una de las especies que resultaron positivas coagulando la leche. Las tres especies que presentaron mayor cantidad de proteína fueron: Flor de Pelú (21,72 g/100g), Flor Zarzaparrilla (18,47 g/100g) ambas de la comuna de Fresia y Flor Zarzaparrilla (17,82 g/100g) de la comuna de Los Muermos (ANEXO 7). Para la recolección de material vegetal comprendido en la primavera de 2015, se determinaron el nivel de proteínas para las especies Flor de Pelú (6,41 g/100g), Flor Zarzaparrilla (15,02 g/100g) ambas de la comuna de Fresia. Hubo una disminución del contenido de proteínas en las mismas especies de un 70,5% y 18,7% respectivamente. La diferencia entre los resultados de ambos años se debe principalmente a los cambios climáticos que afectaron la región de los Lagos (ANEXO 12).
- ✓ **El RE N°2 “Cuantificar el % de proteínas del material vegetal (extracto)” del OE N°1 “Determinar contenido de proteínas en hojas y tallos de arbustos nativos”:** se cumplió en un 100% ya que se cuantificó el porcentaje de proteína vegetal de cada extracto de las especies vegetales recolectadas en primavera 2014. Los tres extractos que presentaron mayor cantidad de proteína fueron los obtenidos a partir de: Flor de Pelú (7,2%), Flor Zarzaparrilla (5,6%) ambas de la comuna de Fresia y Flor Zarzaparrilla (5,5%) de la comuna de Los Muermos. Para los extractos de las especies recolectadas en primavera 2015 los porcentajes de proteínas fueron Flor de Pelú (no detectado), Flor Zarzaparrilla (0,15%) ambas de la comuna de Fresia. Existiendo una disminución del contenido de proteínas en las mismas especies de un 100% y 97,3% respectivamente (ANEXO 7).

- **En el RE N°3 “Cuantificar peso molecular del cuajo” del OE N°2 “Determinar el peso molecular de las proteínas de la preparación enzimática por medio de electroforesis y separación por cromatografía”:** El avance es de 80%. Una vez finalizada la revisión bibliográfica relacionada a este resultado (septiembre 2015), se desarrolló el protocolo para identificar el Peso Molecular de las proteínas de los extractos vegetales a través de una electroforesis (ANEXO 6). Dicha metodología fue aplicada con el objetivo de identificar si las proteínas de las especies vegetales Matico, Pelú y Zarzaparrilla (aquellas que presentaron cambios de su consistencia) presentaban pesos moleculares similares a los estándares utilizados en la industria para la elaboración de quesos. Con estos resultados podemos evidenciar cual es el nivel de las proteínas encontradas y si estas son cercanas a las proteínas usadas comúnmente para coagular leche. En relación a las pruebas de electroforesis realizadas con extractos de las especies vegetales recolectadas en primavera 2015, ninguna de éstas presentó proteínas de igual o similar peso molecular en comparación a las que usualmente se utilizan y tienen la capacidad de romper los enlaces entre los aminoácidos fenilalanina y metionina (Fen-105 y Met 106) presentes en la κ -caseína para formar la cuajada. La discrepancia obtenida entre lo realizado y lo esperado, se debe principalmente a que no fue posible realizar la separación de proteínas mediante cromatografía, puesto que no se identificaron proteínas mediante electroforesis en las especies seleccionadas (ANEXO 9).
- ✓ **En el RE N°4 “Cuantificar fuerza del cuajo” del OE N°3 “Determinar y comparar la fuerza de cuajo de las preparaciones enzimáticas”:** al término de este informe se alcanzó el 67% de este resultado esperado. En la etapa de recolección correspondiente a la primavera 2014 (ANEXO 2) se realizaron las pruebas de coagulación con todos los extractos preparados a partir de cada una de las especies vegetales obtenidas; de esta forma se establecieron las condiciones óptimas de trabajo, las cuales se repitieron de igual manera (en cuanto a equipos, analistas, protocolos) para el periodo de recolección de la primavera 2015; una vez recolectado el material vegetal, se procedió a repetir el protocolo utilizado anteriormente de una manera óptima y eficiente para cada una de las especies seleccionadas, las cuales, al momento de realizar las pruebas de coagulación presentaron una disminución en el cambio de consistencia que ejercían sobre la leche (ANEXO 5). De acuerdo a la discrepancia obtenida entre los resultados obtenidos y los esperados, es que se evaluaron los posibles factores que pudieron haber incidido en la baja cantidad de proteínas presentes en el material vegetal, así como otros factores o compuestos presentes en las plantas que de cierta forma pueden inhibir las proteínas propias de la leche (ANEXO 13).

- ✓ **En el RE N°5 “Selección de especie con mayor coagulación” del OE N°4 “Seleccionar la especie que presenta las mejores propiedades de coagulación y compararlos con un coagulante estándar”:** Se cumplió en un 100% para el periodo de recolección de primavera 2014, puesto que se seleccionaron las especies vegetales que coagularon la leche (ANEXO 5). Pese al escenario alentador obtenido en la coagulación de las muestras recolectadas (2014), para las muestras recolectadas en primavera 2015 el contexto es muy distante, esto se debe a que las muestras seleccionadas presentaron una coagulación baja; solo se logró un leve cambio de consistencia de la leche (para las especies pelú, matico y zarzaparrilla), no presentando una coagulación óptima debido a la baja cantidad de proteínas presentes en las especies vegetales; esto se debe principalmente producto de efectos climáticos (erupción volcánica, sequía 2014 o heladas registradas en la primavera de 2015), también producto de compuestos propios de las plantas que inhiben la coagulación (alcaloides, taninos o proteasas) (ANEXO 13), los cuales aumentan la concentración producto del estrés en que las especies vegetales fueron sometidas; interfiriendo también en la coagulación láctea, utilizados incluso en conjunto con cuajos sintéticos (ANEXO 10).

- ✓ **En el RE N°6 “Productos inocuos” del OE N°5 “Garantizar que el producto sea inocuo al consumidor”:** El cumplimiento de esta etapa es de un 0%. No se obtuvieron quesos a partir de cuajos vegetales debido a que en este periodo de recolección, la coagulación de la leche fue significativamente baja. Debido a esto, no se obtuvo el producto “Queso elaborado a partir de cuajos vegetales” por lo que no fue posible evaluar su inocuidad. La discrepancia observada se debe esencialmente a que las proteínas de las especies seleccionadas tuvieron una baja considerable, esto se atribuye directamente al periodo de sequía producida a fines del año 2014 y primer trimestre del 2015; existen estudios y conversaciones con investigadora de INIA Remehue Dra. Marta Alfaro sobre los efectos de la baja concentración de proteínas en praderas y forraje de la región de los Lagos producto de la sequía registrada fines del año 2014 y primer trimestre del 2015 (ANEXO 12). Por otro lado, el experto Carlos Lizana (Cooprinsem) nos confirmó que las diferencias de crecimientos en praderas y forraje entre un mismo productor 2014-2015 fueron decrecientes en las comunas de la Región de los Lagos. Otros eventos como Erupción del volcán Calbuco y heladas en primavera 2015, generaron cambios en el medio ambiente, produciendo como consecuencia de esto, estrés en las plantas, por ende una baja significativa en la concentración de las proteínas (entre un -97% y -100%)

- ✓ **En el RE N°7 “Quesos a partir de cuajos vegetales” del OE N°5 “Garantizar que el producto sea inocuo al consumidor”:** Al igual que en RE N°6 del OE N°5 “Productos inocuos” el cumplimiento de esta etapa es de un 0%. Debido principalmente a que después de realizar diversas pruebas a nivel experimental, no fue posible realizar quesos con cuajos vegetales, ya que estos no presentaron coagulación según lo esperado. Además, se realizaron pruebas alternativas utilizando cuajo sintético en conjunto con el extracto vegetal, ya sea en forma líquida y liofilizada, así como también utilizando el cuajo vegetal como aditivo al final del proceso de elaboración del queso en base al cuajo sintético (ANEXO 10). Donde, para todos los ensayos y combinaciones el resultado no fue satisfactorio, puesto que el cuajo sintético se inhibe, con la presencia de algunos compuestos propios de las plantas (alcaloides, taninos o proteasas) (ANEXO 13).

- descripción breve de los impactos obtenidos

Además de los impactos ambientales donde se logró establecer pautas de recolección del material vegetal de tal forma de no dañar el ecosistema, la creación de una nueva fuente de ingreso para los pequeños agricultores en remplazo de la tala recolectando el material vegetal durante el periodo de ejecución del proyecto; uno de los principales impactos de este estudio es referente a la generación de nuevos conocimientos y hallazgos obtenidos.

Si bien, se obtuvieron óptimos resultados con las especies recolectadas en primavera 2014, no fue posible obtener iguales resultados con las especies recolectadas durante la primavera 2015. Esto genera de forma inmediata la base para buscar las causales directas que intervienen en la discrepancia de resultados y así contar con datos efectivos para encontrar la solución a lo acontecido. Se considera necesario tener en cuenta todos los antecedentes y resultados aportados en este proyecto como una línea base para continuar la investigación, ya que, con los hallazgos realizados durante las pruebas experimentales realizadas durante el periodo de recolección 2014 y 2015 se abren nuevas alternativas para continuar indagando en cuanto a caracterizar las potenciales especies vegetales capaces de producir cuajo vegetal, considerando factores que interfieren en la composición química de las plantas (condiciones climáticas y geográficas), cabe destacar además que, tanto los datos, como los resultados analíticos y experimentales obtenidos se realizaron de acuerdo a protocolos definidos, precisos y adecuados para su fin; utilizando estándares de calidad analítica y patrones previamente calibrados.

2. Aspectos metodológicos del proyecto:

- descripción de la metodología efectivamente utilizada.

Liofilización:

En la industria alimentaria se llevan a cabo diversos métodos de conservación de alimentos con el fin de preservarlos por tiempos prolongados. En nuestro estudio para lograr este objetivo, y asegurarnos de que nuestro material vegetal a la hora de ser estudiado esté en perfectas condiciones, es que hemos optado por el método de la congelación, el cual retrasa el deterioro de los alimentos y evita que se desarrollen microorganismos patógenos y por un método alternativo de deshidratación llamado liofilización, proceso en el cual el agua del alimento es extraída mediante sublimación; de manera que el agua del material vegetal sea eliminada pasando directamente desde el estado sólido al gaseoso sin pasar por el estado líquido, evitándose así los problemas de endurecimiento de la piel y el daño celular interno.



Extracciones enzimáticas:

Las enzimas Desde el punto de vista bioquímico son proteínas que actúan como aceleradores de las reacciones químicas, de síntesis y degradación de compuestos. La extracción y purificación de las enzimas utilizadas para nuestro estudio se logra mediante la adición de un solvente orgánico (acetato de sodio) a bajas temperaturas y a un pH determinado.

Pruebas de Coagulación:

Se seleccionara la especie que presente mejores propiedades de coagulación. Definida como los litros de leche que es capaz de coagular un gramo de cuajo en un tiempo de 40 minutos a una temperatura de 30°C. Consiste en agregar leche cruda (pH 5,5) con CaCl₂ al 0,02% a un vaso, para luego adicionar el coagulante y dejar escurrir la leche por un orificio de 1 mm que posee el vaso en el fondo. Una vez coagulada la leche se detiene el flujo.

Determinación de proteínas por Kjeldahl:

Se determinara en contenido de proteínas mediante el método de Kjeldahl, el método se basa en la destrucción de la materia orgánica con ácido sulfúrico concentrado, formándose sulfato de amonio que en exceso de hidróxido de sodio libera amoníaco. Según lo descrito en A.O.A.C. Official Methods of Analysis 13 th Edition, 1984

Determinación de proteínas por Bradford:

Se basa en el Método de Bradford: (Bradford, M. Anal. Biochem., 72:248, 1976) o Metodo LOWRY et al., (1951). Se basa en el cambio de color del colorante en respuesta a diferentes concentraciones de proteínas, Para la determinación se realiza una curva estándar con seroalbúmina de bovino (BSA) y se lee la absorbancia a 750 nm.

Identificación Proteínas por electroforesis:

Se basa en el uso de sistemas discontinuos en geles en presencia de SDS, para separar las proteínas con una masa molecular relativa no menor de 10 KD.

Dicha metodología se aplicada con el objetivo de identificar si las proteínas de las especies vegetales presentan pesos moleculares similares a los estándares utilizados en la industria para la elaboración de quesos. Con estos resultados se puede evidenciar cual es el nivel de las proteínas encontradas y si estas son cercanas a las proteínas usadas comúnmente para coagular leche.



- principales problemas metodológicos enfrentados

En relación a las metodologías analíticas aplicadas en este proyecto, no existió dificultad en llevarla a cabo. Puesto que los protocolos de trabajo fueron definidos desde el comienzo del proyecto.

Aun así, hubo problemas durante las pruebas experimentales de coagulación y elaboración del queso. Las cuales fueron:

- Baja actividad proteica de los extractos obtenidos.
- No obtención de la cuajada.
- Interferencias entre cuajo sintético y cuajo vegetal.
- La no disgregación completa del cuajo vegetal liofilizado en la etapa final de elaboración del queso.

Para todos los problemas encontrados, se buscaron soluciones a nivel experimental y de laboratorio, respaldando cada problema enfrentado con una revisión bibliográfica y antecedentes otorgados por investigadores e instituciones a nivel nacional.

- adaptaciones o modificaciones introducidas durante la ejecución del proyecto, y razones que explican las discrepancias con la metodología originalmente propuesta

Se adaptaron metodologías analíticas en cuanto a obtener resultados óptimos por especie vegetal; extracciones enzimáticas, determinaciones proteicas (ANEXO 4).

Se adaptaron metodologías experimentales y se buscaron nuevas alternativas con la finalidad de obtener el producto esperado.

a) Se utilizó una mezcla de cuajo estándar (sintético) con cuajo vegetal en una etapa inicial; agregándose directamente a la leche en diferentes concentraciones y porcentajes de composición. El objetivo de este ensayo fue el de evidenciar cambios a nivel organoléptico, que fueran diferentes a los encontrados en un queso elaborado con cuajo estándar (ANEXO 10). De acuerdo a los resultados obtenidos en las pruebas experimentales no se logró una coagulación óptima para formar el queso, debido a la baja concentración de proteínas en comparación al año 2014, fenómeno que potencia debido a la inhibición de las proteínas por parte de los compuestos mencionados anteriormente (producto del estrés ambiental)

b) Se utilizó el extracto liofilizado como aditivo, agregado en la etapa final del proceso (queso ya elaborado a partir de cuajo estándar), con el objetivo de potenciar los sabores y aromas del queso resultante. El resultado de este ensayo evidenció que este extracto no se logra integrar con el cuajo sintético de manera homogénea a la pasta ya formada, por ende, afecta la textura y apariencia obtenida del queso.

- descripción detallada de los protocolos y métodos utilizados, de manera que sea fácil su comprensión y replicabilidad.

Las metodologías utilizadas a nivel de laboratorio tuvieron relación a:

Liofilización:

- El material vegetal seleccionado es pesado y almacenado en bolsas plásticas.
- Una vez distribuidos en las bolsas plásticas es congelado.
- Una vez congelados se distribuyen de manera uniforme en las bandejas del liofilizador.
- Se verificar que la bomba del liofilizador este encendida.
- Se verificar que la manguera de salida de líquidos se encuentre tapada.
- Una vez verificados todos los compartimentos encender el equipo (POWER - ON) posteriormente oprimir (START).
- Dejar en funcionamiento el equipo por 48 horas o hasta que el material vegetal no se observe congelado.
- Una vez finalizada la liofilización, el material vegetal es guardado en desecadores con silica gel para evitar la captación de humedad ambiental.

Protocolos extracciones enzimáticas

- Preparar Acetato de Sodio 0,01M ph 5,5.
- Codificar tubos falcon, todas las muestras se realizan por duplicado
- Pesar 2 gramos de la muestra.
- Macerar en mortero 2 gramos de muestra más acetato de sodio hasta que la muestra esté totalmente molida.
- Vaciar a tubo falcon y completar con acetato de sodio hasta 45 ml.
- Colocar las muestras en agitador por 12 horas a 100 rpm con gel pack.
- Mantener las muestras en hielo hasta bajar entre 4 - 10°C.
- Al día siguiente filtrar la muestra con gaza o filtros Whatmann en un nuevo tubo falcón.
- Centrifugar por 15 minutos a una temperatura de 4°C a 9000 rpm.
- Rescatar el sobrenadante para obtener del extracto enzimático purificado.
- Importante mantener el extracto a temperaturas de refrigeración.

Protocolo de Pruebas experimentales de Coagulación

- Tomar 1 ml del sobrenadante y agregar un tubo de vidrio que contenga 5ml de leche a 30°C.
- Dejar incubar la muestra a 35°C por 12 horas y observar si el extracto logró coagular la leche.

Medición de la fuerza de cuajo del extracto enzimático.

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

Protocolo Determinación de proteínas por Kjeldalh. Según lo descrito en A.O.A.C. Official Methods of Analysis 13 th Edition, 1984.

- Se pesan de 200 a 500 mg de material vegetal picado o molido y se depositan en el tubo digestor
- Se agregan 1 pastilla catalizadora y 20 ml de ácido sulfúrico concentrado y se agita cuidadosamente
- Colocar en el digestor que debe estar a lo menos a 80°C y digerir la muestra a 350°C por 90 minutos extrayendo constantemente los gases producidos
- Enfriar a temperatura ambiente y agregar 40 ml de agua destilada al tubo digestor
- Agregar 60 ml de NaOH al 32% y conectar al destilador
- Recibir el destilado en 50 ml de ácido bórico al 4% que se le ha adicionado 0,2 ml del indicador kjeldahl (hasta un volumen de destilado de 200 ml)
- Titular el destilado con solución HCl 0,1N hasta viraje de color del indicador (de azul a rosáceo)
- El contenido de proteína se obtiene con la siguiente fórmula:
- $(\%) \text{Proteínas} = (V \text{ (ml) HCl} \cdot 0,1 \cdot 1400 \cdot 6,25) / \text{peso de la muestra (mg)}$

Protocolo determinación de proteínas por Bradford

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

Protocolo Identificación Proteínas por electroforesis

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

3. Descripción de las actividades y tareas ejecutadas para la consecución de los objetivos, comparación con las programadas, y razones que explican las discrepancias.

Todas las actividades que se describen a continuación, son aquellas descritas en el plan operativo inicial

Actividad 1.

Revisión Bibliográfica: Esta actividad fue programada y realizada durante el inicio del proyecto, la cual se encuentra registrada en el informe técnico número 1; actividad realizada por investigadora Dra. Verónica García de departamento de Tecnología de los Alimentos de la Universidad de Santiago de Chile, donde se revisó los tipos de cuajos existentes en Chile y el mundo, las especies de flores de bosque nativo chileno y los protocolos de preparación de cuajos vegetales. Además, se realizaron revisiones bibliográficas en cuanto a la determinación de Peso Molecular de los extractos obtenidos y factores climáticos asociados a la concentración de proteínas presentes en las especies vegetales (ANEXO 13).

Actividad 2.

Elaboración Planes de Manejo para Productos Forestales No Maderables (para recolectores): Esta actividad fue Programada y Realizada de acuerdo al plan operativo, en un comienzo se planteo elaborar un plan de manejo para productos forestales no maderables, el cual no se consideró necesario implementar, puesto que, dentro de las 9 especies que se consideraron en el estudio, ninguna de ellas está en la categoría de "peligro de extinción". Teniendo en cuenta además, que se trata de un procedimiento no invasivo, ya que las cantidades que se recolectaron de tallo, hoja y flor de cada especie son muy pequeñas. A modo de reemplazo de dicho plan de manejo, y con el propósito de intervenir lo menos posible el ambiente en el cual crecen las especies que se recolectarán, es que se realizó un protocolo de recolección y de capacitación para las personas que estarán en terreno (ANEXO 2a).

Actividad 3

Formación de recolectores: Esta actividad fue programada y realizada, considerando que la correcta recolección de las especies vegetales es crítico, y su calidad uno de los factores más importantes del estudio, es que se ideó una estrategia de enseñanza y de transferencia de conocimientos hacia las personas encargadas de llevar a cabo esta tarea. Para esto, se confeccionó material expositivo, en dicho material se resumió cada uno de los aspectos técnicos y a tener en cuenta en la recolección (ANEXO 2c).

Actividad 4.

Implementación planta Láctea: Esta actividad fue programada y realizada. Para resultados a nivel de laboratorio, experimental y obtener el producto esperado, se implementó la Planta Piloto Láctea de CEUS Llanquihue de la Universidad de Santiago de Chile, esta implementación consistió en adquirir equipos fundamentales para la realización de actividades planteadas, los principales equipos adquiridos fueron: Liofilizador, centrifuga, tina quesera, prensa, sala de maduración (ANEXO 11).

Actividad 5.

Recolección material vegetal: Esta actividad fue programada y realizada. De acuerdo a las reuniones sostenidas con los encargados de PRODESAL, Fomento productivo y con los recolectores de cada una de las comunas, la recolección del material vegetal fue realizada en la estación de primavera para los años 2014 y 2015 (ANEXO 2b).

Las especies recolectadas en primavera 2014, en las comunas de Frutillar, Flesia y los Muermos fueron:

Hola – Tallo - Flor
Maqui (<i>Aristotelia chilensis</i>)
Mosqueta (<i>rosa rubiginosa</i> L.)
Maitén (<i>Maytenus boaria</i>)
Pelú (<i>Sophora microphylla</i>)
Zarzaparrilla (<i>Ribes magellanicum</i>)
Matico (<i>Buddleja globosa</i>)
Ulmo (<i>Eucryphia cordifolia</i>)
Meli (<i>Amomyrtus meli</i>)
Nalca (<i>Gunnera tinctoria</i>)

Se recolectaron las siguientes especies en primavera 2015

• Comuna de Fresia • Comuna de los Muermos • Comuna de Frutillar		
Flor de maitén	Flor zarzaparrilla	Flor matico
Flor de pelú	Hoja zarzaparrilla	Hoja matico
Hoja de pelú	Hojas de matico	Hoja maitén
Flor zarzaparrilla	Flor nalca	Flor maitén
Hoja zarzaparrilla	Tallo de nalca	
Flor matico		
Hoja matico		

El seguimiento de la recolección fue muy específico y localizado, puesto que el periodo de floración de una especie puede verse acortado drásticamente producto de las condiciones climáticas; de modo que era fundamental contar con el conocimiento de los habitantes de cada una de las localidades, más aún, teniendo en cuenta que a pesar de la cercanía que presentan estas comunas pueden llegar a tener condiciones de temperatura y precipitaciones distintas.

Actividad 6.

Congelación y liofilización material vegetal: Esta actividad fue programada y realizada. En la industria alimentaria se llevan a cabo diversos métodos de conservación de alimentos con el fin de preservarlos por tiempos prolongados. En este estudio para lograr este objetivo, y asegurarnos de que nuestro material vegetal a la hora de ser estudiado esté en perfectas condiciones, es que hemos optado por el método de la congelación, el cual retrasa el deterioro de los alimentos y evita que se desarrollen microorganismos patógenos y por un método alternativo de deshidratación llamado liofilización, proceso en el cual el agua del alimento es extraída mediante sublimación; de manera que el agua del material vegetal sea eliminada pasando directamente desde el estado sólido al gaseoso sin pasar por el estado líquido, evitándose así los problemas de endurecimiento de la piel y el daño celular interno.

Se liofilizó la mayor parte de cada especie vegetales por cada una de sus partes, el resto se mantuvo en condiciones de congelación hasta su análisis en el laboratorio (ANEXO 3).

Actividad 7.

Extracción enzimática del material vegetal y prueba de cuajo: Esta actividad fue programada y realizada. Se realizaron extracciones enzimáticas de acuerdo lo dispuesto en el anexo 4, donde, después de una extensa revisión bibliográfica se adaptó el protocolo de extracción que finalmente fue el que se desarrolló para el presente estudio. Se realizaron extracciones enzimáticas tanto para especies vegetales congeladas y liofilizadas.

Para tener un producto comparativo, los extractos obtenidos se sometieron a diálisis (ANEXO 4). La diálisis fue usada para separar las moléculas grandes de las pequeñas y se basa en el hecho de que la membrana semipermeable permite pasar pequeñas moléculas a través de ella, pero previene el paso de las moléculas grandes. De esta forma se concentraron las moléculas que son de nuestro interés.

La actividad enzimática del cuajo hace que la leche coagule en un gel sólido conocido como coágulo. Por lo que para las primeras pruebas realizadas con el material vegetal recolectado en la primavera de 2014 fue de vital importancia, ya que permitió en primer lugar, identificar si algunas de las plantas seleccionadas para el proyecto tenían dicha capacidad (formar coágulo). De acuerdo a los resultados obtenidos (recolección 2014), el 55,56% de las especies son potenciales alternativas de producir cuajo y en segundo lugar, generó el conocimiento suficiente como para poder discriminar con cuál de ellas son potenciales cuajos vegetales en función de su fuerza de acción.

Para las especies recolectadas en 2015, se sometieron a extracciones enzimáticas y a pruebas de coagulación láctea siguiendo el protocolo descrito (ANEXO 4 y 5), donde en este periodo, no se obtuvieron los mismos resultados, es decir, solo se observó una desestabilización de la leche de las especies zarzaparrilla, pelú y matico, siendo incapaz el extracto líquido y liofilizado de formar el coágulo.

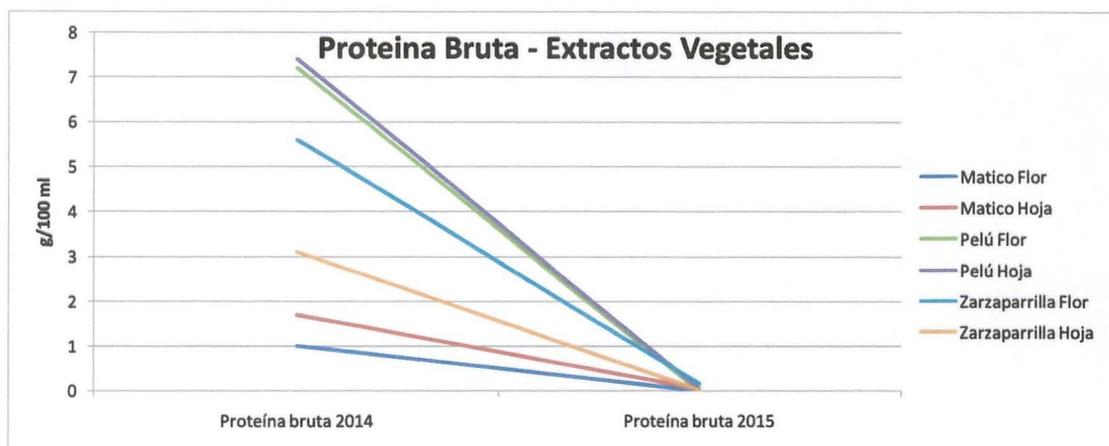
Actividad 8.

Análisis laboratorio material vegetal: Esta actividad fue programada y realizada. Se realizaron determinaciones analíticas de proteína bruta según el método Kjeldahl en las especies vegetales como también en sus extractos, que son los cuales, interactúan con la leche para conseguir la coagulación láctea del periodo de recolección primavera 2014 y 2015,. Este método consiste en la destrucción de la materia orgánica con ácido sulfúrico concentrado, formándose sulfato de amonio que en exceso de hidróxido de sodio libera amoníaco. Según lo descrito en A.O.A.C. Official Methods of Analysis 13 th Edition, 1984.

Los resultados obtenidos de las especies recolectadas en primavera 2015 fueron significativamente más bajos que los reportados en las determinaciones analíticas del

material vegetal recolectado durante la primavera 2014 (ANEXO 7), además, según otras determinaciones realizadas tampoco es posible identificar la presencia de proteínas durante la electroforesis (ANEXO 9).

En cuanto a la concentración de proteína bruta encontrada en el extracto vegetal, existe una baja significativa en las muestras del año 2015 en comparación con muestras extraídas en el año 2014, donde estas disminuyeron en todos los casos hasta en un 100%.



Esta baja se debió a las condiciones climáticas que afectaron la zona durante el periodo previo a la recolección, según lo informado por el boletín agrometeorológico de INIA, la región presentó prolongadas sequías durante el periodo estival (fines del año 2014 y primer trimestre del 2015) y heladas durante la primavera 2015, lo que llevo a adelantar la floración y a la vez, esta se vio expuesta a una situación de estrés (ANEXO 12 y 13).

Se identificaron proteínas por electroforesis de los extractos de especies vegetales para las recolecciones realizada en el año 2015. La metodología aplicada se describe en el anexo 6. Uno de los métodos de electroforesis más comúnmente aplicado para proteínas es el que emplea geles de poliacrilamida (PAGE = polyacrylamide gel electrophoresis) en presencia del detergente aniónico dodecilsulfato sódico (SDS). Esta técnica es conocida como SDS-PAGE. Para ello se prepara un gel en placa vertical.

Los métodos electroforéticos son de alta sensibilidad, poder de resolución y versatilidad, y sirven como método de separación de mezclas complejas de ácidos nucleicos, proteínas y otras biomoléculas, donde aportan un potente criterio de pureza (García, 2000).

Según los resultados obtenidos (ANEXO 9) y según los patrones con los cuales los extractos fueron comparados (Ovoalbumina, tripsina y Citocromo C), no se observaron

proteínas en las bandas utilizadas en la electroforesis. Esto se debe a la baja presencia de proteína bruta encontrada en los extractos obtenidos, y por ende, no existe presencia de proteínas capaces de romper los enlaces entre los aminoácidos fenilalanina y metionina (Fen-105 y Met 106) presentes en la κ -caseína,

Actividad 9.

Pruebas experimentales elaboración de quesos: Esta actividad fue programada y realizada. Para llevar a cabo esta actividad, primero se realizaron curvas de calibración de los extractos en diferentes concentraciones y porcentajes (ANEXO 10). Para posteriormente ser aplicados a nivel experimental.

Los volúmenes ensayados para realizar la curva de calibración fueron los siguientes.

- Leche con un 50% de la cantidad de cuajo utilizado en la industria.
- Leche con un 65% de la cantidad de cuajo utilizado en la industria.
- Leche con un 75% de la cantidad de cuajo utilizado en la industria.
- Leche con un 80% de la cantidad de cuajo utilizado en la industria.
- Leche control con 100% de la cantidad de cuajo utilizado en la industria.

Resultados curva de calibración:

Cantidad de cuajo utilizado	Efecto
Leche + 50% de cuajo sintético	Sin efecto
Leche + 65% de cuajo sintético	Sin efecto
Leche + 75% de cuajo sintético	Sin efecto
Leche + 80% de cuajo sintético	Sin efecto
Leche + 100% de cuajo sintético (0,08 ml) (Control)	Efecto

Se realizó una curva de calibración desarrollada a partir de extracto vegetal para especies recolectadas en primavera 2014 y 2015.

Los ensayos se realizaron en condiciones que simulan la elaboración de queso; por lo que se llevaron a cabo en un baño maría. La cantidad de cuajo vegetal fue adicionado sobre 500 ml de leche, la cual presentaba una temperatura de 33°C. La materia prima más el cuajo vegetal fue dejada en reposo por un tiempo de 40 min.

Muestra vegetal 2015	Cantidad de cuajo vegetal utilizado (grs)	Efecto
Matico	1,5	Sin efecto
Matico	2,5	Sin efecto
Pelú	1,5	Sin efecto
Pelú	2,5	Sin efecto
Matico + Pelú	5	Sin efecto
Leche + 100% de cuajo sintético (Control)	0,08 ml (80 ul)	Efecto

Muestra vegetal 2014	Cantidad de cuajo utilizado (grs)	Efecto
Pelú	1,0	Sin efecto
Pelú	2,2	Sin efecto
Zarzaparrilla	1,0	Sin efecto
Zarzaparrilla	2,0	Sin efecto
Pelú + Zarzaparrilla	4,6	Sin efecto
Leche + 100% de cuajo (Control)	0,08 ml (80 ul)	Efecto

Se desarrolló una curva de calibración utilizando un mix de cuajo vegetal mas cuajo sintético.

Muestra vegetal 2015	Cantidad de cuajo vegetal y sintético utilizado (grs/ml)	Efecto
Matico + Cuajo sintético 75%	3,0 + 60ul	Sin efecto
Matico + Cuajo sintético 80%	2,0 + 64 ul	Sin efecto
Pelú + Cuajo sintético 75%	2,0 + 60ul	Sin efecto
Pelú + Cuajo sintético 80%	2,0 + 64 ul	Sin efecto
Matico + Pelú + Cuajo sintético 80%	4,8 + 64 ul	Sin efecto
Leche + 100% de cuajo sintético (Control)	0,08 ml (80 ul)	Efecto

Pese a no lograr formar el coagulo para la elaboración de quesos; se buscaron alternativas dentro de las cuales se contempló la realización de pruebas experimentales.

a) Se utilizó una mezcla de cuajo estándar con cuajo vegetal en una etapa inicial; agregándose directamente a la leche en diferentes concentraciones y porcentajes de composición. El objetivo de este ensayo fue el de evidenciar cambios a nivel organoléptico, que fueran diferentes a los encontrados en un queso elaborado con cuajo estándar. Cabe mencionar que se usó cuajo de cardo recolectado en la localidad de Concepción para ser usado como control (ANEXO 10).

Materia Prima	de cuajo vegetal y/o sintético utilizado	Efecto
Leche	cuajo sintético al 100%	Efecto
Leche	cuajo vegetal líquido	Sin efecto
Leche	cuajo vegetal liofilizado en diferentes concentraciones (0,5g; 0,8g; 1g)	Sin efecto
Leche	Cardo	Sin efecto
Leche	cuajo sintético al 100% + cuajo vegetal en diferentes concentraciones	Sin efecto
Leche+ buffer	cuajo sintético	Efecto

De acuerdo a los **resultados** obtenidos en las pruebas experimentales no se logró una coagulación óptima para formar el queso, debido a la inhibición de las proteínas por parte de los compuestos mencionados anteriormente.

b) Se utilizó el extracto liofilizado como aditivo, agregado en la etapa final del proceso (queso ya elaborado a partir de cuajo estándar), con el objetivo de potenciar los sabores y aromas del queso resultante. El resultado de este ensayo evidenció que este extracto no se logra integrar de manera homogénea a la pasta ya formada, por ende, afecta la textura y apariencia obtenida del queso (ANEXO 10).

Pese a que la actividad fue programada y realizada, no se pudieron obtener los resultados esperados debido a la baja concentración proteica de las especies recolectadas durante la primavera 2014 (ANEXO 12 Y 13).

Actividad 10. Revisión Bibliográfica

Se realizó una revisión bibliográfica con la final de recabar antecedentes sobre los factores que influyen en la baja de proteínas encontrada el material vegetal recolectado durante la primavera 2015 "Factores climáticos que inciden en la disminución de proteínas de las especies vegetales e Inhibición proteica compuestos propios de las plantas (ANEXO 12 y 13).

4. Resultados del proyecto:

Resultados experimentales analíticos periodo recolección 2014

Una vez recolectadas las especies vegetales, se procedió a realizar las pruebas de coagulación con los extractos obtenidos por comuna.

	Especie	Parte	Coagulación	Comuna/Coagulación
1	maqui (<i>Aristotelia chilensis</i>)	Flor	No	Fresia / no Los Muermos /no Frutillar /no
		tallo	no	Fresia / no Los Muermos /no Frutillar /no
		hojas	no	Fresia / no Los Muermos /no Frutillar /no
2	mosqueta (<i>rosa rubiginosa L.</i>)	Flor	no	Fresia / no Los Muermos /no Frutillar /no
		tallo	no	Fresia / no Los Muermos /no Frutillar /no
		hojas	no	Fresia / no Los Muermos /no Frutillar /no
3	maitén (<i>Maytenus boaria</i>)	Flor	si	Fresia / si Los Muermos /no Frutillar /no
		tallo	no	Fresia / no Los Muermos /no Frutillar /no
		hojas	no	Fresia / no Los Muermos /no Frutillar /no
4	pelú (<i>Sophora microphylla</i>)	Flor	si	Fresia / si Los Muermos /no Frutillar /no
		tallo	no	Fresia / no Los Muermos /no Frutillar /no
		hojas	si	Fresia / si Los Muermos /no Frutillar /no



Fundación para la
Innovación Agraria

5	zarzaparrilla (<i>Ribes magellanicum</i>)	Flor	si	Fresia / si Los Muermos /si Frutillar /no
		tallo	no	Fresia / no Los Muermos /no Frutillar /no
		hojas	si	Fresia / si Los Muermos /si Frutillar /no
6	matico (<i>Buddleja globosa</i>)	Flor	si	Fresia / si Los Muermos /no Frutillar /si
		tallo	no	Fresia / no Los Muermos /no Frutillar /no
		hojas	si	Fresia / si Los Muermos /si Frutillar /no
7	ulmo (<i>Eucryphia cordifolia</i>)	Flor	no	Fresia / no Los Muermos /no Frutillar /no
		tallo	no	Fresia / no Los Muermos /no Frutillar /no
		hojas	no	Fresia / no Los Muermos /no Frutillar /no
8	meli (<i>Amomyrtus meli</i>)	Flor	no	Fresia / no Los Muermos /no Frutillar /no
		tallo	no	Fresia / no Los Muermos /no Frutillar /no
		hojas	no	Fresia / no Los Muermos /no Frutillar /no
9	nalca (<i>Gunnera tinctoria</i>)	Flor	no	Fresia / no Los Muermos /si Frutillar /no
		tallo	no	Fresia / no Los Muermos / si Frutillar /no
		hojas	no	Fresia / no Los Muermos /no Frutillar /no

Tras las pruebas de coagulación, el 55,56% de las especies son potenciales alternativas de producir cuajo (Maitén, Matico, Nalca, Pelú y Zarzaparrilla). Considerando como un resultado exitoso para el periodo de recolección 2014, además, se vio como una gran oportunidad de innovación y exclusividad en la elaboración de quesos con denominación de origen, puesto que se superó satisfactoriamente las expectativas planteadas inicialmente.

Las 9 especies fueron analizadas en flor, tallo y hoja, obteniendo como diseño experimental un total de 63 muestras, de las cuales 13 de ellas coagularon.

Determinación de Proteína bruta por especie que dio positiva a la coagulación láctea.

Los Muermos.

Especie	Parte	Proteína bruta (g/100g)
Matico	Hoja	13,1
Nalca	Flor	13,75
Nalca	Tallo	2,6
Zarzaparrilla	Flor	17,82
Zarzaparrilla	Hoja	16,19

Fresia.

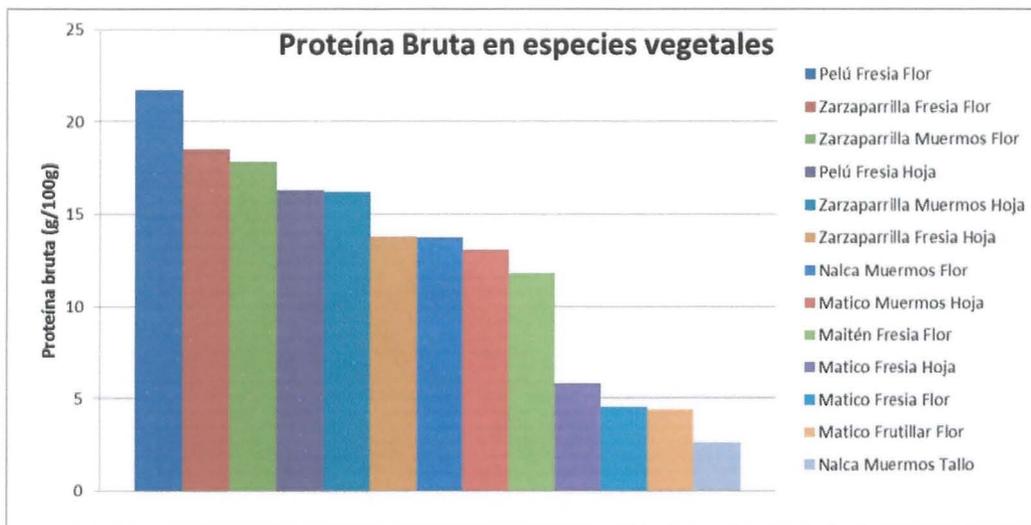
Especie	Parte	Proteína bruta (g/100g)
Maitén	Flor	11,84
Matico	Flor	4,5
Matico	Hoja	5,8
Pelú	Flor	21,72
Pelú	Hoja	16,29
Zarzaparrilla	Flor	18,47
Zarzaparrilla	Hoja	13,79

Frutillar.

Especie	Parte	Proteína bruta (g/100g)
Matico	Flor	4,4

* La determinación de proteína bruta se realizó mediante la metodología Kjeldalh descrita anteriormente.

Gráfico. Concentración proteínas brutas según comuna y parte de la especie vegetal (2014)



Según los resultados de proteína bruta obtenidos, después de dar positiva la coagulación de la leche, podemos observar que la concentración de proteínas no solo depende de la parte de la especie vegetal de la cual fue analizada, sino que también de la comuna en la cual fue recolectada, siendo en la comuna de Fresia las especies que dieron mayor concentración de proteínas.

Además de cuantificar proteína bruta en cada especie vegetal, es indispensable cuantificar también las proteínas presentes en los extractos enzimáticos obtenidos, ya que son estos los que interfieren directamente con la materia prima "leche" para formar a cuajada.

Cuantificación el % de proteínas del material vegetal en el extracto

Los Muermos.

Especie	Parte	Proteína en extracto (%)
Matico	Hoja	1,3
Nalca	Flor	2,5
Nalca	Tallo	1,2
Zarzaparrilla	Flor	5,5
Zarzaparrilla	Hoja	2,8

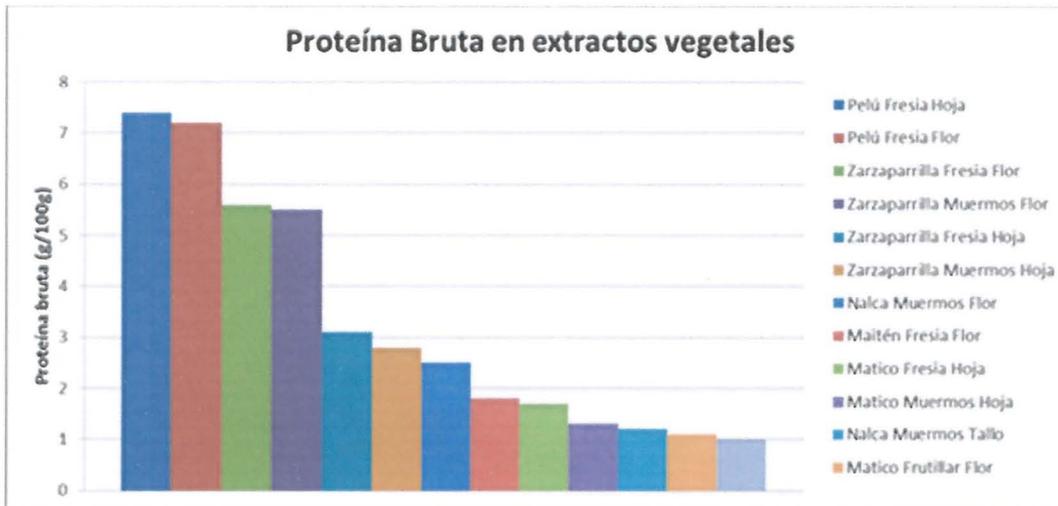
Fresia.

Especie	Parte	Proteína en extracto (%)
Maitén	Flor	1,8
Matico	Flor	1,0
Matico	Hoja	1,7
Pelú	Flor	7,2
Pelú	Hoja	7,4
Zarzaparrilla	Flor	5,6
Zarzaparrilla	Hoja	3,1

Frutillar.

Especie	Parte	Proteína en extracto (%)
Matico	Flor	1,1

Gráfico. Concentración proteínas brutas en extractos según comuna y parte de la especie vegetal (2014).



Según los resultados de proteína bruta de los extractos vegetales, podemos observar que los extractos provenientes de las especies vegetales recolectadas en la comuna de Fresia dieron mayor concentración de proteínas, siendo el pelú y zarzaparrilla las principales especies vegetales que contienen proteínas potenciales formadoras de cuajo vegetal.

Resultados experimentales analíticos periodo recolección 2015

Para el periodo de recolección en primavera 2015, se recolectaron solo las especies que dieron coagulación positiva en el periodo anterior.

Los Muermos.

Especie	Parte	Coagulación
Matico	Hoja	Negativa
Nalca	Flor	Negativa
Nalca	Tallo	Negativa
Zarzaparrilla	Flor	Débil
Zarzaparrilla	Hoja	Débil

Fresia.

Especie	Parte	Coagulación
Maitén	Flor	Negativa
Matico	Flor	Débil
Matico	Hoja	Débil
Pelú	Flor	Débil
Pelú	Hoja	Débil
Zarzaparrilla	Flor	Débil
Zarzaparrilla	Hoja	Débil

Frutillar.

Especie	Parte	Coagulación
Matico	Flor	Débil

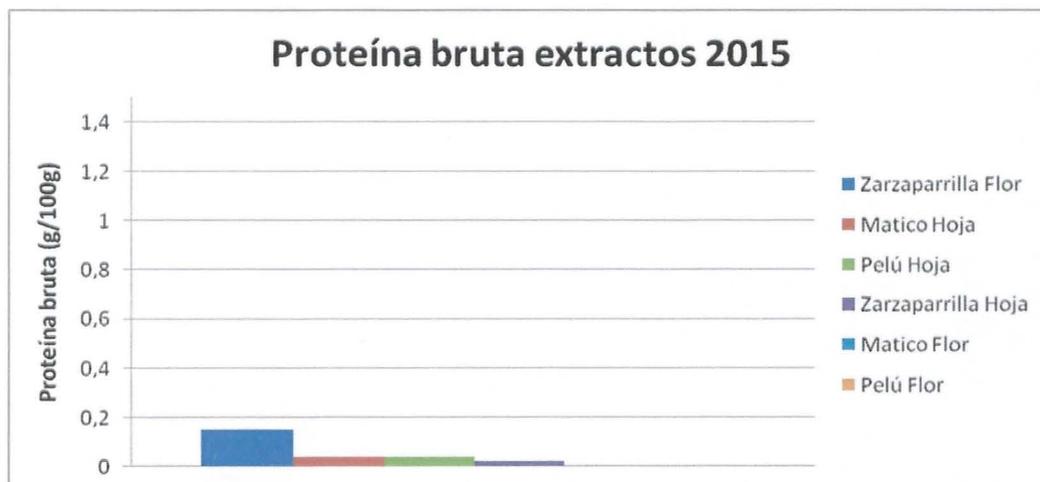
Tras realizar las pruebas de coagulación de las especies recolectadas durante el periodo de primavera 2015 (octubre a diciembre) solo las especies matico, pelú y zarzaparrilla lograron un cambio de consistencia en la leche, no se observó coagulación como la ocurrida en el periodo de floración anterior. Por lo que, se realizaron todas las determinaciones analíticas necesarias para evaluar las causas de este hecho, además, de realizar una revisión bibliográfica de los acontecido.

Determinación de Proteínas en extracto (gramos de proteína vegetal)

* Todas las determinaciones analíticas se realizaron en las especies recolectadas en la comuna de Fresia.

Especie	Parte	Proteína bruta extractos 2015
Matico	Flor	0
Matico	Hoja	0,04
Pelú	Flor	nd
Pelú	Hoja	0,04
Zarzaparrilla	Flor	0,15
Zarzaparrilla	Hoja	0,02

Gráfico. Proteína bruta de los extractos vegetales obtenidos de la recolección 2015

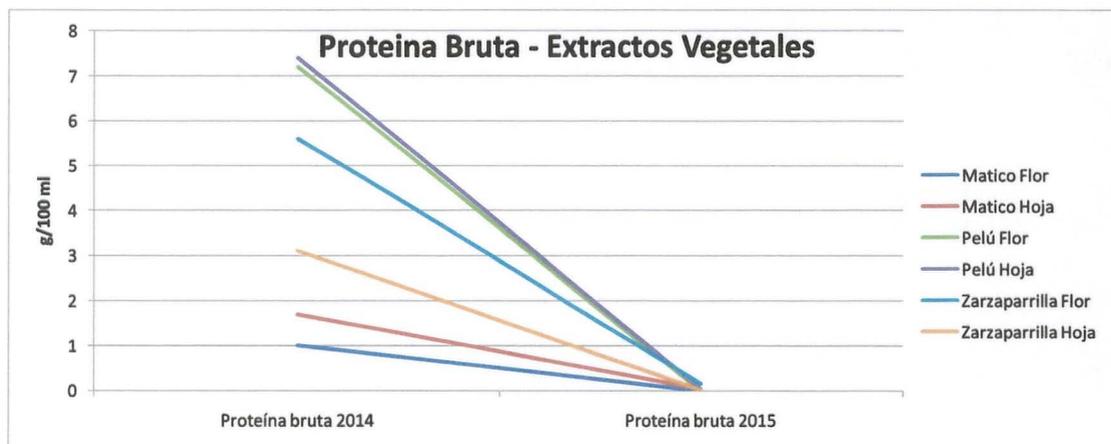


El extracto de la especie vegetal zarzaparrilla fue el que contiene una mayor cantidad de proteínas en comparación con los otros extractos, aun así, la cantidad de proteínas es insuficiente para formar una cuajada en leche.

Comparación resultados analíticos recolección 2014 – 2015

Especie	Parte	Proteína bruta extracto 2014	Proteína bruta extracto 2015	% Aumento / Disminución
Matico	Flor	1	0	-100,00
Matico	Hoja	1,7	0,04	-97,65
Pelú	Flor	7,2	nd	nd
Pelú	Hoja	7,4	0,04	-99,46
Zarzaparrilla	Flor	5,6	0,15	-97,32
Zarzaparrilla	Hoja	3,1	0,02	-99,35

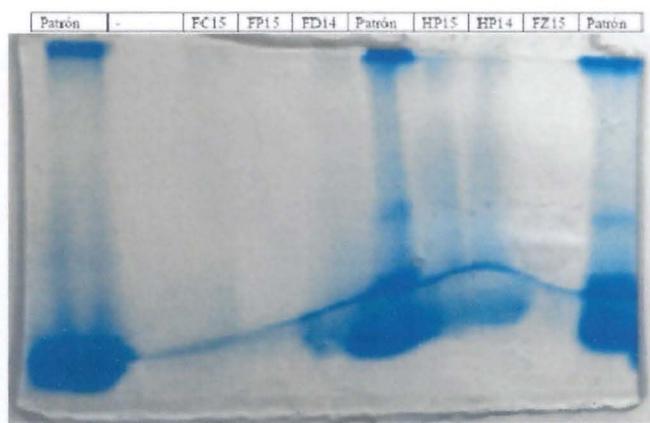
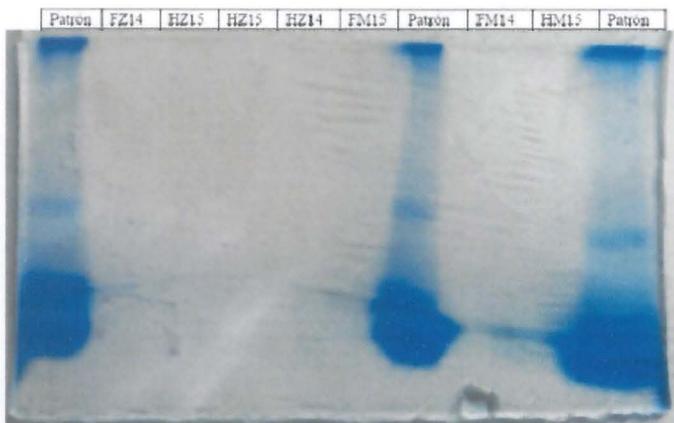
Gráfico. Disminución proteínas brutas en extractos según comuna y parte de la especie vegetal (2014 vs 2015).



La baja concentración de proteínas tanto en especies vegetal como en extractos obtenidos de la recolección de la primavera 2015 se debió a las condiciones climáticas que afectaron la zona durante el periodo previo a la recolección, según lo informado por el boletín agrometeorológico de INIA, la región presentó prolongadas sequías durante el periodo estival y heladas durante la primavera 2015, lo que llevo a adelantar la floración y a la vez, esta se vio expuesta a una situación de estrés (ANEXO 12).

Cabe mencionar que CEUS Llanquihue no estudió en forma analítica los factores que se atribuyen a la baja significativa en proteínas en forrajes y praderas, si otras instituciones como INIA y Cooprinsem e investigadores Dra. Marta Alfaro y Carlos Lizana .

Identificación de proteínas por electroforesis



Según los resultados obtenidos y según los patrones con los cuales los extractos fueron comparados (Ovoalbumina, tripsina y Citocromo C), no se observaron proteínas en las bandas utilizadas en la electroforesis. Esto se debe a la baja presencia de proteína bruta encontrada en los extractos obtenidos, y por ende, no existe presencia de proteínas capaces de romper los enlaces entre los aminoácidos fenilalanina y metionina (Fen-105 y Met 106) presentes en la κ -caseína,

Resultados Pruebas experimentales:

Pese a no lograr formar el coagulo para la elaboración de quesos. Se buscaron alternativas dentro de las cuales se contempló la realización de pruebas experimentales.

- a) Utilización de un MIX elaborado a partir de cuajo sintético y extracto líquido obtenido a partir de cuajo vegetal liofilizado.

Se utilizó una mezcla de cuajo estándar con cuajo vegetal en una etapa inicial; agregándose directamente a la leche en diferentes concentraciones y porcentajes de composición. El objetivo de este ensayo fue el de evidenciar cambios a nivel organoléptico, que fueran diferentes a los encontrados en un queso elaborado con cuajo estándar (ANEXO 10).

Los ensayos se realizaron en condiciones que simulan la elaboración de queso; por lo que se llevaron a cabo en un baño maría.

Muestra vegetal 2015	Cantidad de cuajo vegetal y Efecto sintético utilizado (grs/ml)	Efecto
Matico + Cuajo 75%	3,0 + 60ul	Sin efecto
Matico + Cuajo 80%	2,0 + 64 ul	Sin efecto
Pelú + Cuajo 75%	2,0 + 60ul	Sin efecto
Pelú + Cuajo 80%	2,0 + 64 ul	Sin efecto
Matico + Pelú + Cuajo 80%	4,8 + 64 ul	Sin efecto
Leche + 100% de cuajo (Control)	0,08 ml (80 ul)	Efecto

De acuerdo a los resultados obtenidos en las pruebas experimentales no se logró una coagulación óptima para formar el queso, debido a la baja concentración de proteínas en comparación al año 2014, fenómeno que se puede haber potenciado debido a la inhibición de las proteínas por parte de los compuestos que se potencian en las plantas producto del estrés ambiental (taninos, alcaloides y proteasas) (ANEXO 13).

b) Elaboración de quesos a nivel experimental utilizando cuajo estándar y extracto liofilizado

Se utilizó el extracto liofilizado como aditivo, agregado en la etapa final del proceso (queso ya elaborado a partir de cuajo estándar), con el objetivo de potenciar los sabores y aromas del queso resultante.

	Nombre	
1	Pelú	
2	Matico	
3	Zarzaparrilla	
4	Cardo	

Materia Prima	de cuajo vegetal y/o sintético utilizado	Efecto
Leche	cuajo sintético al 100%	Efecto
Leche	cuajo vegetal liquido	Sin efecto
Leche	cuajo vegetal liofilizado en diferentes concentraciones (0,5g; 0,8g; 1g)	Sin efecto
Leche	Cuajo de cardo	Sin efecto
Leche	cuajo sintético al 100% + cuajo vegetal en diferentes concentraciones	Sin efecto
Leche+ buffer	cuajo sintético	Efecto

El resultado de este ensayo evidenció que este extracto no se logra integrar de manera homogénea a la pasta ya formada, por ende, afecta la textura y apariencia obtenida del queso. Solo se logra formar una masa inestable, incapaz de soportar presión para formar el queso.



También se realizaron pruebas adicionando el extracto liofilizado al final de proceso de elaboración del queso, donde, los resultados visuales y de textura no son atractivos, ya que el polvo liofilizado es incapaz de disolverse e integrarse en la masa ya coagulada.



5. Fichas técnicas y análisis económico

En relación al análisis económico, los principales costos del “cuajo vegetal”, en la etapa comercial son:

- Adquisición del material vegetal
- Costo de proceso industrial (para aislar las proteínas coagulantes)
- Costos de distribución y comercialización

Selección de indicador	Indicador	Descripción del indicador	Fórmula de indicador (Cuajo sintético)	Línea base del indicador (Cuajo vegetal)	Meta del indicador al término del proyecto
	Ventas	producción de cuajo			
	Costos	venta de cuajo			
	Empleo				
	Variedad de quesos	Numero de tipos quesos de leche bovina disponible en el mercado Chileno.			

De acuerdo al cuadro anterior, la perspectiva económica fue la de producir y vender el cuajo vegetal al mismo valor del que se encuentra en el mercado, con la finalidad de competir de manera igualitaria frente a lo que se usa habitualmente para la elaboración de quesos.

Perspectivas del rubro:

Leche y productos derivados. La situación nacional indica una reducción de 4,5% en la disponibilidad para procesamiento industrial en el primer semestre de 2015. De acuerdo a la proyección anual que realizaron las autoridades incluyeron la estimación de una disminución de la producción total del año de un 2,4%; en la recepción de la industria láctea mayor una baja cercana a un 4%; y un crecimiento de un 6% para la industria menor.

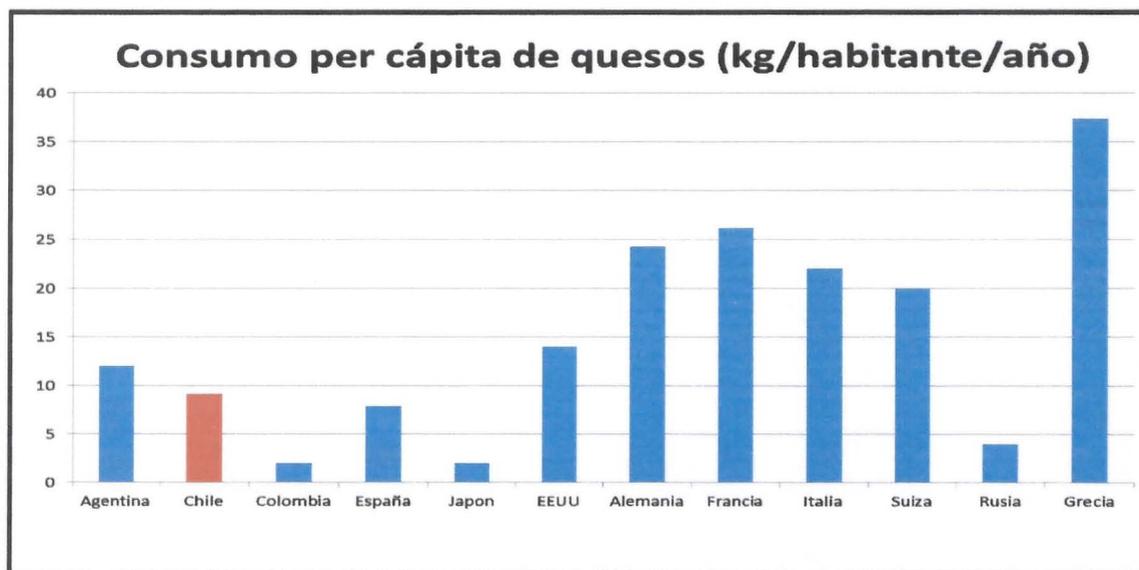
Elaboración de Quesos. Con respecto a lo que ocurre a nivel nacional por parte de la industria. El boletín publicado durante el mes de Noviembre (periodo enero – Junio 2015 versus el mismo periodo año 2014), la elaboración de quesos nacional aumentó en un



Fundación para la
Innovación Agraria

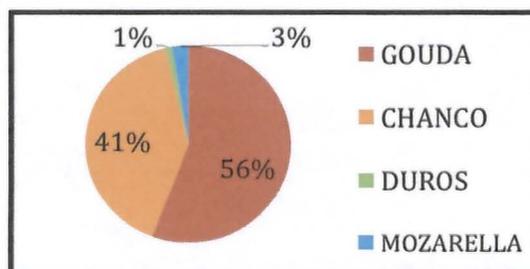
0,5% (de 38.934.020 kg. a 39.147.516 kg). En la Región de los Lagos en cambio la elaboración de queso aumentó desde 11.311.362 kg (enero a mayo 1014) a 12.121.082 kg, lo que equivale a un aumento de 7,16%.

Consumo per cápita. La región de los Lagos recibe el 44,24% de leche a nivel nacional y a pesar de que el consumo de quesos per cápita en Chile ha aumentado en un 67% en los últimos cinco años (9,1 kg per cápita) (ODEPA, 2014), y que en la Región de Los Lagos se produce el 30,4% de quesos de la producción nacional (ODEPA, 2015), predominan los tipos Gouda, que ocupan el primer lugar en el mercado. Los siguen los llamados quesos chanco, que corresponden al producto nacional y que presenta grandes variaciones de color, composición y humedad



Tipos de quesos producidos en Chile

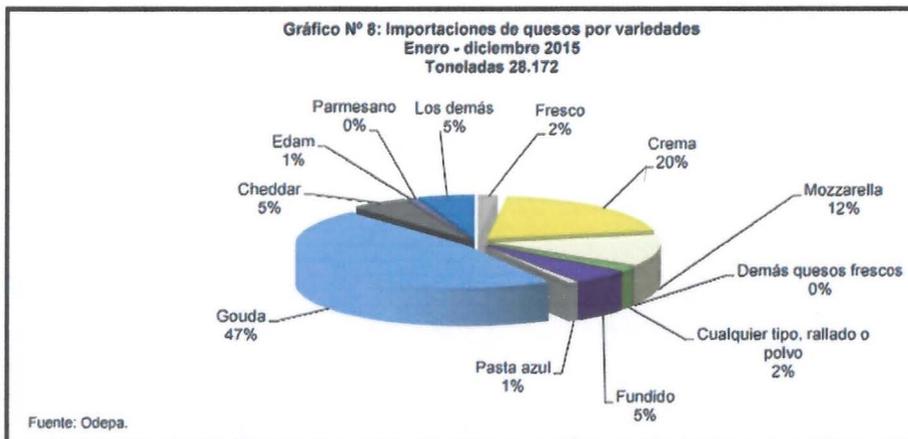
- ❖ Solo dos tipos de quesos dominan el mercado (tipos Gouda y Chanco)
- ❖ Solo el tipo chanco se le podría llamar un queso chileno.
- ❖ Dado el aumento del consumo per cápita, existe una brecha a satisfacer



En el país se producen y comercializan distintos tipos de quesos, pero predominan los tipos gouda o gauda, que ocupan el primer lugar en el mercado. Los siguen los llamados quesos chanco, que corresponden al producto nacional que se ha consumido tradicionalmente en el país y que presenta grandes variaciones de color, composición y humedad.

Producto final a partir de cuajo vegetal. A nivel nacional no se observan datos oficiales por parte de la industria, con respecto a la utilización de cuajos vegetales en la elaboración de quesos; lo cual no asegura el que no se estén desarrollando de manera particular o independiente pruebas o ensayos en los cuales se utilizan dichas enzimas extraídas de material vegetal (En Casablanca se utiliza leche cruda de oveja, sin pasteurizar, y cuajo vegetal de pestilios de cardo silvestre).

En relación al comercio exterior (exportaciones e importaciones) tampoco se refleja la incorporación al mercado de cuajos vegetales producidos en otras latitudes.



Las proyecciones del crecimiento en la industria láctea, principalmente quesera dependerán, evidentemente, de condiciones políticas y de mercado, así como del forraje (disponibilidad, calidad, concentración proteica) y de la leche. No se puede obviar el efecto sobre la producción que tendrá el uso de praderas, las cuales se ven directamente afectadas por el cambio climático instaurado en nuestra Región.

6. Problemas enfrentados durante la ejecución proyecto:

Dentro de los problemas asociados a la ejecución técnica, podemos mencionar:

a) Los cambios en el entorno ocurridos durante el periodo 2014-2015 con respecto a la baja concentración proteica de las especies en estudio.

Precipitaciones y temperatura

Las lluvias de abril, reforzadas en mayo y continuadas en junio, sumadas a buenas temperaturas del suelo, permitieron una sorprendente recuperación de las pasturas, que durante el sexto mes del año aportaron volúmenes de forraje verde que, junto con forrajes conservados y otros suplementos, provocaron una mejoría importante en la producción de leche (Oficina de Estudios y Políticas Agrarias, 2015).

En cuanto al comportamiento térmico, las temperaturas efectivas de crecimiento del forraje durante Junio se mantuvieron en rangos cercanos a la media histórica. Respecto a la predicción climática estacional para nuestro país, según los pronósticos estacionales de la DMC, basados en las observaciones de la temperatura superficial del mar en Junio, se proyectaban precipitaciones para las regiones de Los Ríos y de Los Lagos por sobre lo normal para los tres meses siguientes.

En general, se produjo una normalización paulatina de las precipitaciones desde Bío Bío al sur, lo que permitió un alivio a los productores lecheros, ya que, al disponer de recursos forrajeros, se priorizó en el corto plazo el consumo de praderas y se postergó la utilización de forraje conservado, disminuyendo el riesgo de agotamiento de los inventarios forrajeros, los cuales se habían consumido parcialmente en forma prematura, producto de la condición restrictiva del verano (Oficina de Estudios y Políticas Agrarias, 2015).

Fenómenos climáticos específicos en el mes (Octubre) de inicio de la floración. Según el Centro de Predicciones Climáticas (CPC) y el Centro Internacional para la Investigación del Fenómeno de El Niño (CIIFEN), durante el mes de octubre, periodo en que comienza el periodo de floración de las especies estudiadas, las anomalías de las temperaturas de la superficie oceánica se encontraron sobre lo normal a través del Océano Pacífico central



Fundación para la
Innovación Agraria

y oriental. En general los índices de El Niño aumentaron. En general, las condiciones atmosféricas y oceánicas indicaron un fenómeno de El Niño fortalecido. De esta manera para los próximos meses del año 2015, el Océano Pacífico tropical mantuvo temperaturas sobre lo normal; advirtiéndose que el fenómeno de El Niño alcanzará su máximo durante el verano 2015-16, y una probabilidad de debilitamiento gradual, anticipando la transición a un ENSO neutral recién a fines del otoño o inicio del invierno del año 2016 (Ministerio de Agricultura, 2015).

Región de Los Lagos: precipitaciones y temperaturas específicas en inicio de la floración (Octubre). Las precipitaciones registradas en el mes de octubre en la provincia de Osorno, periodo en el cual comienza la floración de las especies vegetales seleccionadas, se presentaron similar al mes de Septiembre con un importante déficit respecto a los promedios históricos, el nivel de déficit meteorológico alcanzó a un 49,9% en Remehue (Osorno), un 48,0% en La Pampa (Purranque), un 26,3% en Octay (Puerto Octay) y de un 43,5% en el Desagüe Rupanco (Puyehue). La temperatura media que se registró en el mes de octubre en Remehue fue de 9,8°C, con una diferencia de 0,9°C más baja que el promedio normal que es 10,7°C. Las precipitaciones en la provincia de Llanquihue durante el mes de octubre registraron también un importante déficit, con un déficit meteorológico en Quilanto (Frutillar) de 35,5%, en Colegual (Llanquihue) de 42,7%, en Polizonas (Fresia) de 36,7%, en Los Canelos (Los Muermos) de 45,9% y en Ensenada (Puerto Varas) de 36,7%(Ministerio de Agricultura, 2015).

Erupción Volcán Calbuco. De acuerdo a lo entregado por el Ministerio de Agricultura y en relación a la situación del volcán Calbuco, la presencia de fluoruro, selenio, y azufre contenido en las cenizas luego de un proceso eruptivo causa efectos principalmente a nivel del consumo de forraje yagua con cenizas, así como también la caída misma de esta sobre los animales se puede volver dañino para los distintos tipos de ganado; siendo las vacas uno de los grupos más afectados; También son amenazados los accesos al agua, las praderas (dependiendo de su composición de fertilidad al momento de la erupción), vegetación y especies vegetales de la zona (incluyendo las que forman parte de este estudio). Las plantas estudiadas, de acuerdo a esto han sufrido una clara situación de estrés en comparación a lo que se reportó en el informe técnico anterior (que incluía el periodo de floración 2014).

Comportamiento climático general- Sequía 2014-2015. Durante el primer semestre de 2015 se mantuvo un importante déficit de producción, a raíz de la sequía de finales de 2014 y el verano de 2015. En marzo 2015 se había alcanzado una baja de 13,5% en la venta de leche a las industrias, que se redujo a 10,4% en abril y a 3,7% en mayo.

En términos generales, en el sector de Osorno y de las comunas de la región de Los Lagos, el comportamiento climático, medido a través de la acumulación normal de precipitaciones (Mayo y Junio), debió estar sobre 350 mm, pero la precipitación real



Fundación para la
Innovación Agraria

acumulada fue de 250 mm. Lo anterior de acuerdo a lo reportado por las autoridades, implicó una condición de subnormalidad, que no es crítica para la época del año (Dirección Meteorológica de Chile –DMC- y el Instituto de Investigaciones Agropecuarias –INIA- 2015).

Por la sequía registrada produjo **una pérdida de la calidad en la pradera, queda demostrada principalmente en el bajo nivel de proteína y digestibilidad que presenta**, lo que también afecta el consumo y el aprovechamiento del forraje ingerido por la vaca. Esto, a su vez, genera que la digestibilidad del forraje se reduzca desde 65% o más a niveles cercanos al 50%. Si bien, esto parece un cambio menor, en realidad significa un gran impacto en la capacidad de consumo del ganado, pues hace que disminuya en más de 24 horas la velocidad de paso del alimento por el tracto digestivo. El resultado inevitable es la pérdida de peso y una significativa baja en la producción de leche en el caso de las vacas lactantes (Revista Campo, febrero 2015).

Existen estudios relacionados con la disminución de la concentración de proteínas en praderas dependiendo del clima, según lo expuesto por el informe de Pérez (2010), donde señala que el pasto en las praderas ubicadas en regiones con clima cálido, presenta problemas de deficiencia de proteína y energía, y su digestibilidad es baja, lo cual genera problemas al productor, porque el ganado tiene menor ganancia de peso y producción de leche.

b) Problemas experimentales

Durante la ejecución de las actividades experimentales en cuanto a “Pruebas de coagulación y elaboración del queso”. El equipo técnico se enfrentó a los siguientes problemas:

- Baja actividad proteica de los extractos obtenidos
- No obtención de la cuajada
- Interferencias entre cuajo sintético y cuajo vegetal
- La no disgregación completa del cuajo vegetal liofilizado en la etapa final de elaboración del queso.

Para todos los problemas encontrados, se buscaron soluciones a nivel experimental y de laboratorio, respaldando cada problema enfrentado con una revisión bibliográfica y antecedentes otorgados por investigadores e instituciones a nivel nacional.

Se adaptaron metodologías analíticas en cuanto a obtener resultados óptimos por especie vegetal; extracciones enzimáticas, determinaciones proteicas (ANEXO 4).



Se adaptaron metodologías experimentales y se buscaron nuevas alternativas con la finalidad de obtener el producto esperado.

- i. Se utilizó una mezcla de cuajo estándar con cuajo vegetal en una etapa inicial; agregándose directamente a la leche en diferentes concentraciones y porcentajes de composición. El objetivo de este ensayo fue el de evidenciar cambios a nivel organoléptico, que fueran diferentes a los encontrados en un queso elaborado con cuajo estándar (ANEXO 10). De acuerdo a los resultados obtenidos en las pruebas experimentales no se logró una coagulación óptima para formar el queso, debido a la baja concentración de proteínas en comparación al año 2014, fenómeno que se puede haber potenciado debido a la inhibición de las proteínas por parte de los compuestos mencionados anteriormente (producto del estrés ambiental)
- ii. Se utilizó el extracto liofilizado como aditivo, agregado en la etapa final del proceso (queso ya elaborado a partir de cuajo estándar), con el objetivo de potenciar los sabores y aromas del queso resultante. El resultado de este ensayo evidenció que este extracto no se logra integrar de manera homogénea a la pasta ya formada, por ende, afecta la textura y apariencia obtenida del queso.

c) Presupuestario y administrativo.

Problemas en ejecución presupuestarios durante el año 2014 e inicios del año 2015, debido a que no se contaba con un profesional contable que tuviera dedicación exclusiva al proyecto, por lo que se decidió contratar a un profesional para dar apoyo al sistema presupuestario y administrativo. Lo anterior no consideró modificaciones presupuestarias en el proyecto, ya que la contratación realizada fue a honorarios y con recursos de CEUS Llanquihue de la Universidad de Santiago de Chile.

Se realizaron modificaciones en el equipo de trabajo, donde se reorganización funciones; reemplazando al coordinador alterno Sr. Guillermo Seguel por Srta. Corina Flores quien formó parte desde el inicio del proyecto como profesional y encargada técnica. Lo anterior, no consideró modificaciones presupuestarias.

d) Adquisición de equipos.

Excesivo tiempo y desgaste asociado a la compra y adquisición de equipos, debido que las compras se realizan a través del sistema ChileCompra. Todas las compras se realizaron a través de este medio, pero bajo la modalidad de trato directo con la empresa seleccionada, de modo que el tiempo de espera asociado se reduce a menos de la mitad de lo que habitualmente se espera a través de la licitación tradicional.



Difusión de los resultados obtenidos:

En el presente proyecto no se realizaron actividades de difusión ya que no se logró elaborar el producto final.

7. Impactos del proyecto:

Aún cuando el objetivo principal del proyecto no se cumplió y no se logró elaborar quesos con cuajo vegetal con las especies vegetales recolectadas en primavera 2015, producto que no tenían cantidad mínima de proteína para poder coagular la leche por la sequía registrada a fines del año 2014 y primer trimestre del año 2015. Con los hallazgos encontrados al inicio del proyecto (datos 2014), sabemos que las especies vegetales contienen las proteínas necesarias para realizar la coagulación, con esta información sabemos que si se pudo haber cumplido el objetivo del proyecto; la baja cantidad de proteínas encontradas en las especies vegetales recolectadas en primavera 2015, nos indican que se debe redireccionar el estudio, según el tipo de planta, asociadas a las condiciones climáticas, zona geográfica y el tipo de suelo donde se encuentren.

Los resultados obtenidos después de finalizado el proyecto son un aporte al conocimiento y son la línea base fundamental para encontrar las especies vegetales que contengan las proteínas necesarias para formar el cuajo vegetal. Este estudio deja abierta la necesidad de continuar investigando el cambio de composición química presente en las plantas según los factores externos que pudiesen intervenir (cambio climático, estrés, eventos naturales, etc.) y así, aumentar las posibilidades en base al conocimiento y hallazgos adquiridos en lograr quesos únicos en Chile potenciando a los pequeños productores de quesos de la zona y el país

Dentro de los principales impactos obtenidos se puede indicar que son:

- Los resultados obtenidos después de cada determinación analítica realizada, las cuales demuestran y fundamentan lo hallado en revisiones bibliográfica en relación a la baja en concentración de proteínas como consecuencia de las sequía.
- Como los factores climáticos, zona geográfica, calidad del suelo y eventos naturales tienen directa relación con la composición química de las plantas.
- Implementar una nueva línea de investigación asociado al estudio de especies vegetales de otras zonas geográficas del país para la obtención de aquellas que sean potenciales formadoras de cuajo vegetal, para la elaboración de una diversificación de quesos únicos del país.



Fundación para la
Innovación Agraria

- Las especies vegetales son capaces de producir cuajo vegetal, siempre que sus concentraciones de proteína estén dentro de los rangos óptimos.

Pese a la discrepancia entre los objetivos planteados y los obtenidos, se asegura que estos serán cumplidos se realizan estudios de composición química de las especies vegetales en diversas zonas del país, sobre todo en zonas donde no haya habido problemas de sequía extrema.

8. Conclusiones

- Presupuestariamente podemos concluir que se utilizó el de los aportes otorgados por FIA, estos aportes fueron fundamentales para la recopilación de todos los antecedentes necesarios para la obtención de resultados, los cuales son una gran contribución a los conocimientos para la investigación Chilena. Además, gracias a estos aportes se adquirieron equipos (liofilizador, centrifuga y equipo de aire acondicionado) esenciales para realizar el proceso completo desde la liofilización, obtención de los extractos enzimáticos y maduración del queso, para ser realizados en las dependencias de CEUS Llanquihue de la Universidad de Santiago de Chile, generando una instancia concreta de investigación en la Región de los Lagos.
- La información recabada por parte del equipo, ha considerado aspectos y variables relacionadas al diseño y etapas en las metodologías, que se han adaptado específicamente a las especies vegetales seleccionadas. Las metodologías realizadas, pueden ser aplicadas a la preparación de extractos enzimáticos de otras especies de plantas nativas de cualquier zona geográfica del país; y de esta manera estar en condiciones de determinar si otras especies (bajo otras condiciones climáticas) son potenciales formadoras de cuajo vegetal para elaborar quesos naturales, innovadores y únicos.
- El 55,56% de las especies vegetales recolectadas en primavera 2014, son potenciales alternativas para producir cuajo (Maitén, Matico, Nalca, Pelú y Zarzaparrilla); para las especies recolectadas en primavera 2015 solo el 33,33% (matico, Zarzaparrilla y Pelú) produjeron un leve cambio de consistencia sobre la leche, sin lograr la formación del coagulo necesario para la posterior elaboración de quesos. La diferencia entre ambas recolecciones se debió a los cambios en el entorno que afectaron a la composición química (disminución de proteínas) en el periodo de recolección 2015. El bajo nivel de composición proteica, se debió a la sequía registrada a fines del año 2014 y primer trimestre 2015; en la actualidad existen estudios en desarrollo realizados por el Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA) y Cooprinsem (Osorno), los cuales en sus resultados preliminares demuestran que hubo una considerable disminución de proteínas en forraje, praderas y otras especies vegetales. Además, junto con las heladas registradas en primavera y la erupción Volcánica del año 2015, las especies vegetales estuvieron sometidas a un constante estrés ambiental; como consecuencia de esto, se produjo el adelantamiento de los periodos de floración, lo que se tradujo en que no hubo un desarrollo óptimo en la composición química de las especies seleccionadas.

- En cuanto a las determinaciones analíticas realizadas en el material vegetal de este estudio; la proteína bruta presente en los extractos de las especies vegetales recolectadas en primavera 2014 mostraron tener la cantidad suficiente para lograr una óptima coagulación 7,2% para Flor de Pelú y 5,6% para flor de zarzaparrilla; para los extractos de las especies recolectadas en primavera 2015 las concentraciones de proteínas mostraron bajas significativas. Para el Pelú se encontró un 0% de proteína bruta, y un un 0,15% para zarzaparrilla; disminuyendo en 100% y 97,3% respectivamente en comparación al mismo periodo del año 2014. Como consecuencia de esto, no fue posible lograr coagular de una manera óptima la leche para la posterior elaboración de quesos. Lo que genero no poder concluir de forma exitosa el proyecto.
- Aún cuando, no se logró elaborar quesos con cuajo vegetal, los resultados de este proyecto son un aporte al conocimiento y dejan abierta las posibilidades de continuar investigando el cambio de composición química presente en las plantas de la Región según los factores externos que pudiesen intervenir. Podemos establecer que los cuajos provenientes de especies vegetales no solo dependen de la planta utilizada, sino que también de la zona geográfica, de las condiciones del suelo y sobre todo de las condiciones climáticas y eventos naturales existentes.
- Con los resultados del año 2014, podemos concluir que si es posible obtener cuajo vegetal de plantas nativas chilenas. Este proyecto considera los resultados finales como un hallazgo científico, ya que generó la base de una nueva línea investigativa no desarrollada en nuestro país; este estudio genera nuevos antecedentes sobre los factores asociados a tener en consideración para la búsqueda de material vegetal relacionada a la obtención de extractos enzimáticos que puedan generar cuajos capaces de formar un queso diferenciado, innovador y único para nuestro país.

9. Recomendaciones

- Asociada a toda la información recabada y a los hallazgos encontrados en este proyecto es que se recomienda utilizar como base y punto de partida para futuras investigaciones los resultados obtenidos en este proyecto. Cabe destacar que, previo a este proyecto no se contaba con información relacionada a la proteínas de las especies nativas de la Región; así como tampoco la interferencia de factores climáticos y la relación de las zonas geográficas con las concentraciones de proteína en las especies vegetales. Esta información es un aporte al conocimientos y es de gran importancia continuarla, además, recomendamos realizar un screening inicial según las condiciones y factores asociados al crecimiento de las especies vegetales, para obtener así, las concentraciones de proteína por especie.
- Resulta estratégico para el desarrollo de la zona trabajar de forma colaborativa, lo que queda demostrado en este proyecto mediante la red creada entre CEUS Llanquihue de la Universidad de Santiago de Chile con la Municipalidad Fresia, la Municipalidad de Frutillar y con los pequeños agricultores de la Región de los Lagos, pudiendo aportar de forma significativa al medio ambiente y a grupos socio-económicos de alta vulnerabilidad.
- El sur de Chile cuenta con un “petróleo blanco” casi único en el mundo: leche de vacas a pastoreo y sanitariamente óptimas. Tenemos el deber de apoyar la industria láctea fomentando la investigación, innovación y desarrollo productivo, a través del desarrollo de nuevos productos a base de materias primas naturales, además, incrementar y perfeccionar el capital humano, como también, promover la sostenibilidad ambiental en la pequeña y mediana industria láctea.
- Presupuestariamente recomendamos ampliar los plazos para compras mayores (equipamiento) para entidades públicas que están sujetas al sistema de ChileCompra.
- El equipo técnico y de investigación está seguro que la información recabada en este proyecto es un gran aporte y es de vital importancia para continuar investigando las causales en cuanto a la diferencia de proteínas encontradas. Con los avances realizados y con una continua investigación se podrán dar óptimas y efectivas soluciones para obtener el producto “cuajo vegetal”; compuestos esenciales para obtener productos naturales, innovadores y diferenciados para los pequeños y medianos productores de queso de la Región y del país.

10. Otros aspectos de interés

Producto del cierre anticipado del proyecto, debido a que no fue posible llevar a cabo la actividad que incluía la elaboración de queso a partir de cuajo vegetal (nivel prototipos), es que algunas de las actividades establecidas inicialmente en el plan operativo no fueron realizadas. Siendo estas:

- Determinación del proceso óptimo para la elaboración del queso.
- Análisis sensorial al queso elaborado a partir de cuajo vegetal.
- Elaboración de quesos para prueba comercial.
- Análisis que confirmaran la inocuidad del queso elaborado a partir de cuajo vegetal.
- Difusión de los resultados finales.
- Cata de quesos.
- Propiedad intelectual.

Estas actividades no se llevaron a cabo debido a la sequía registrada en el verano del 2014 y el primer trimestre de 2015 (explicado anteriormente).

Aunque no se llevaron a cabo las actividades antes mencionadas, si se desarrollaron de una manera optimas otras actividades fundamentales para ampliar el conocimiento respecto a las variables de búsqueda de especies vegetales con respecto a factores extremos que puedan intervenir, para así, obtener los resultados esperados.

Dentro de las principales actividades realizadas podemos mencionar:

- Se desarrollaron exitosamente protocolos de recolección y de conservación del material vegetal.
- Se determinaron las especies que son potenciales alternativas para producir cuajo (Maitén, Matico, Nalca, Pelú, Zarzaparrilla).
- Se desarrollaron metodologías específicas para la cuantificación de peso molecular, cuantificación de la fuerza del cuajo, y separación enzimática a través de membranas de diálisis que podrían incluso ser utilizadas en otros estudios que incluyan la extracción de enzimas a partir de especies vegetales.
- Se realizaron exitosamente ensayos preliminares utilizando las metodologías diseñadas a nivel cualitativo y cuantitativo.
- Se implemento a nivel piloto una línea completa de elaboración de cuajos y quesos para futuras investigaciones que apoyen a producción láctea del país y principalmente de la Región de los Lagos.



11. Anexos

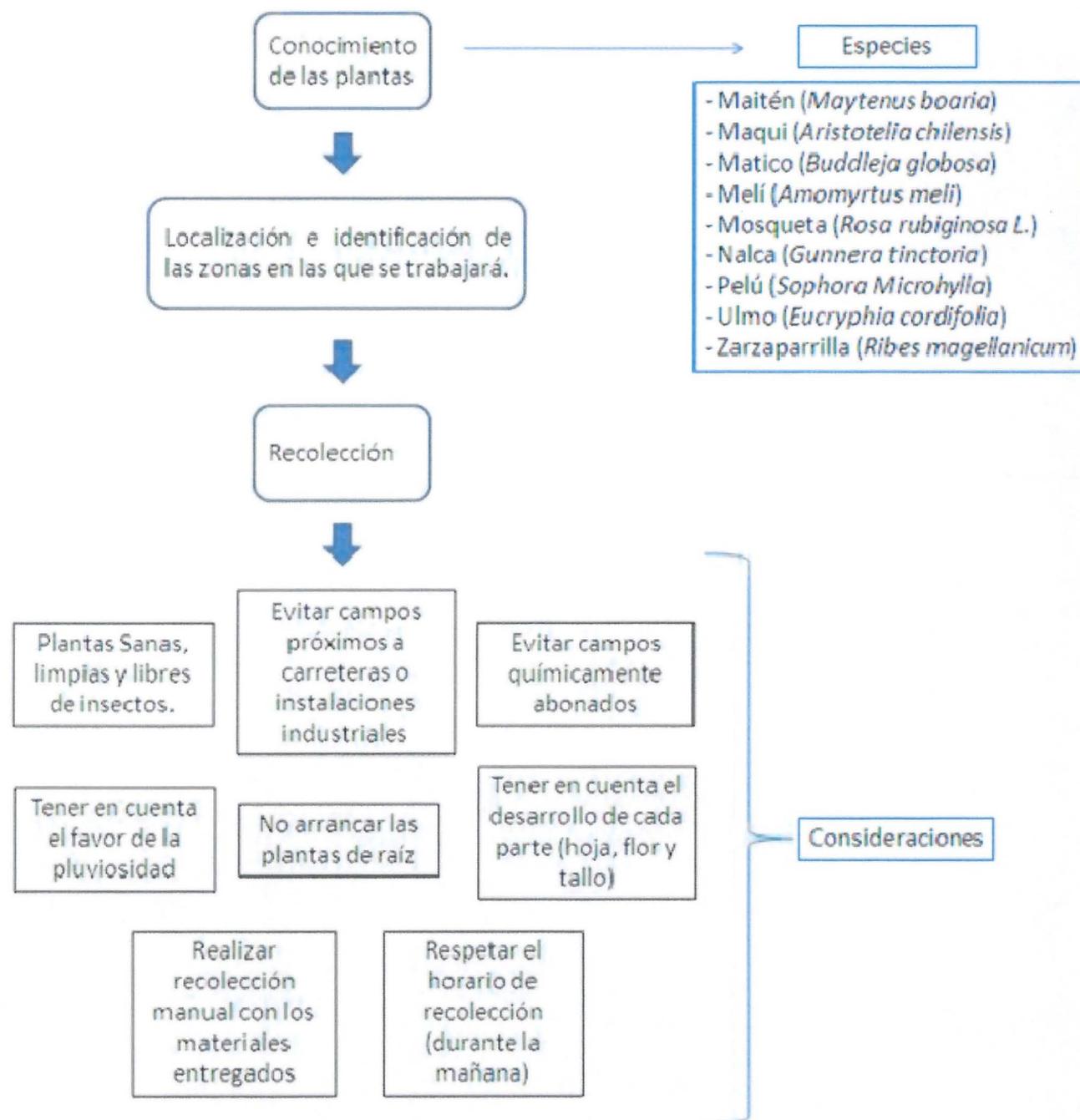
- ANEXO 1. Resumen total de aportes FIA
- ANEXO 2. Recolección material vegetal (2014 – 2015)
- ANEXO 3. Liofilización material vegetal y extractos
- ANEXO 4. Protocolo extracciones enzimáticas
- ANEXO 5 Prueba coagulación extractos de material vegetal liofilizado.
- ANEXO 6 Protocolo Electroforesis
- ANEXO 7. Resultados Determinación Proteína Bruta del material vegetal y extracto liofilizado.
- ANEXO 8 Resultados Proteína Soluble del extracto
- ANEXO 9 Resultados electroforesis extracto
- ANEXO 10 Pruebas experimentales en elaboración de quesos con cuajo vegetal.
- ANEXO 11. Equipos adquiridos
- ANEXO 12. Efectos de la sequía Región de los Lagos
- ANEXO 13. Revisión Bibliográfica

ANEXO 1. Resumen total de aportes FIA gastados.

RESUMEN PLANILLA DE COSTOS POR TIPO DE APORTE						
Ítems de costos	Subítems	Tipo aporte	ENTREGADO X FIA	TOTAL GASTADO HASTA 31 ENERO 2016	PENDIENTE PAGO (Abril 2016)	SALDO
1. Recursos humanos		Pecuniario				
2. Equipamiento		Pecuniario				
3. Infraestructura		Pecuniario				
4. Viáticos y movilización		Pecuniario				
5. Materiales e Insumos		Pecuniario				
6. Servicio de terceros		Pecuniario				
7. Difusión		Pecuniario				
8. Capacitación		Pecuniario				
9. Gastos generales		Pecuniario				
10. Gastos de administración		Pecuniario				
11. Imprevistos		Pecuniario				
Total \$						

ANEXO 2. Recolección material vegetal (2014 – 2015)

a) Protocolo recolección material vegetal



b) Ejemplo recolección primavera 2014

Fig. Tallo, hoja y flor de Zarzaparrilla (*Ribes magellanicum*).



Ejemplo recolección primavera 2015



c) presentación formación de recolectores

“Desarrollo de cuajos de flores del bosque nativo para la elaboración de quesos diferenciados”.

Universidad de Santiago de Chile
CEUS Llanquihue
PYT-2014-011

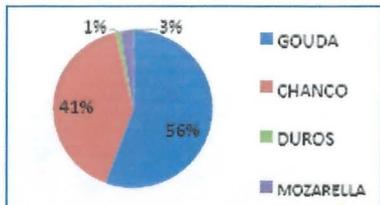
Años	Total
1990	24.613.441
1991	27.177.884
1992	32.193.142
1993	25.825.138
1994	28.568.896
1995	40.815.660
1996	42.177.005
1997	43.711.621
1998	46.528.131
1999	44.777.139
2000	44.717.662
2001	50.416.509
2002	53.074.751
2003	53.037.176
2004	55.849.030
2005	67.175.674
2006	62.071.547
2007	61.744.935
2008	57.268.616
2009	56.525.522
2010	64.668.359
2011	80.810.684
2012	82.907.190
2013	89.045.939

Situación en Chile



Resumen nacional de la elaboración anual de quesos en plantas lecheras (ODEPA).

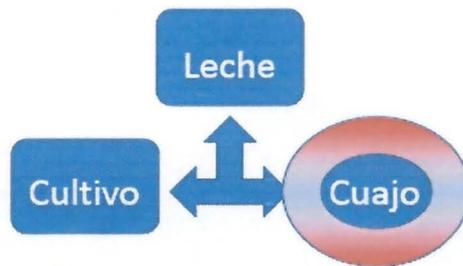
Situación en Chile



- Solo dos tipos de quesos dominan el mercado (tipos Gouda y Chanco)

- Solo el tipo chanco se le podría llamar un queso chileno.

- Dado el aumento del consumo per cápita, existe una brecha a satisfacer





Fundación para la Innovación Agraria

Métodos de recolección

- Para su recolección, debemos conocer muy bien las plantas.
- Localizar e Identificar que especies se encuentran en la comuna.



- No arrancar las plantas de raíz.

CEIS LLANQUIHUE

Métodos de recolección

- Hojas: antes y durante la floración, descartar las hojas amarillas o manchadas.
- Flor: al principio de la floración. Antes que la corola se encuentre completamente abierta.
- Tallos: Se cortan después que hayan botado las hojas.



Manual

Madurez de la planta

Pluviosidad

Desarrollo estacional

Horas de sol

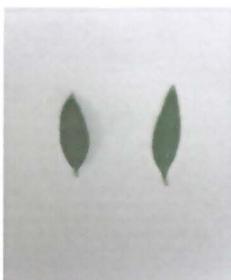
CEIS LLANQUIHUE

Recolección

→ Hoja.

→ Tallo.

→ Flor.



Maitén

CEIS LLANQUIHUE

Recolección

→ Hoja.

→ Tallo.

→ Flor.



Maitén

CEIS LLANQUIHUE



Fundación para la
Innovación Agraria



No se utiliza
cuajo vegetal.

Cuajo
Sintético

Cuajo
genético



Cuajo Vegetal

Mayor actividad
proteolítica.



"De lo anterior y dada la situación actual del queso en Chile, donde, en los últimos años la producción y exportación ha ido en aumento; se propone evaluar sustitutos del cuajo en plantas nativas para lograr un queso característico de nuestra zona".

Propósito del
estudio

Generar cuajo
vegetal

Queso único y
diferente.

Variedad de quesos
(diferentes texturas
y sabores).

A partir de la
caracterización de
plantas nativas
típicas del bosque
valdiviano.



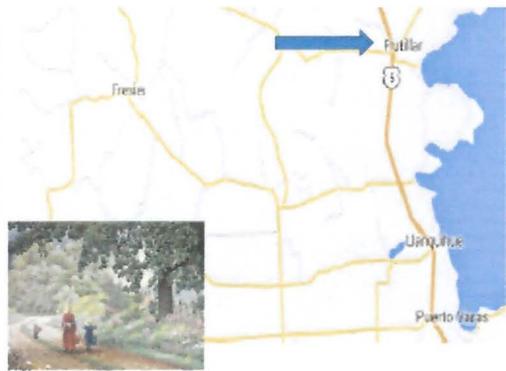
Objetivo General

"Extraer y caracterizar enzimas coagulantes de plantas nativas y estudiar su utilización como coagulante (cuajo) en la fabricación de quesos".



Fundación para la Innovación Agraria

Recolección material vegetal



ETAPA 1 PRODESAL Frutillar



Especies a recolectar

Nº	Especie
1	Maqui (<i>Aristotelia chilensis</i>)
2	Mosqueta (<i>Rosa rubiginosa</i> L.)
3	Maitén (<i>Maytenus boaria</i>)
4	Pelú (<i>Sophora Microphylla</i>)
5	Zarzaparrilla (<i>Ribes magellanicum</i>)
6	Matico (<i>Buddleja globosa</i>)
7	Ulmo (<i>Eucryphia cordifolia</i>)
8	Meli (<i>Amomyrtus meli</i>)
9	Nalca (<i>Gunnera tinctoria</i>)

Métodos de recolección

- Para su recolección, debemos conocer muy bien las plantas.
- Localizar e Identificar que especies se encuentran en la comuna.

- Plantas sanas.
- Plantas limpias, sin gusanos e insectos.



Métodos de recolección

- Para su recolección, debemos conocer muy bien las plantas.
- Localizar e Identificar que especies se encuentran en la comuna.

- Evitar campos químicamente abonados.
- Campos próximos a carreteras o a instalaciones industriales.



<p>Recolección</p> <ul style="list-style-type: none"> → Hoja. → Tallo. → Flor. <p>Maitén</p>   <p>usach</p> <p>CEIS LLANQUIHUE</p>	<p>Recolección</p> <ul style="list-style-type: none"> → Hoja. → Tallo. → Flor. <p>Zarzaparrilla</p>   <p>usach</p> <p>CEIS LLANQUIHUE</p>
<p>Recolección</p> <ul style="list-style-type: none"> → Hoja. → Tallo. → Flor. <p>Zarzaparrilla</p>   <p>usach</p> <p>CEIS LLANQUIHUE</p>	<p>Recolección</p> <ul style="list-style-type: none"> → Hoja. → Tallo. → Flor. <p>Zarzaparrilla</p>   <p>usach</p> <p>CEIS LLANQUIHUE</p>

<p>Recolección</p> <p>→ Hoja. → Tallo. → Flor.</p> <p>Nalca</p> <p>usach</p> <p>CEIS LLANQUIHUE</p>	<p>Recolección</p> <p>→ Hoja. → Tallo. → Flor.</p> <p>Nalca</p> <p>usach</p> <p>CEIS LLANQUIHUE</p>
<p>Recolección</p> <p>→ Hoja. → Tallo. → Flor.</p> <p>Nalca</p> <p>usach</p> <p>CEIS LLANQUIHUE</p>	<p>Métodos de Recepción</p> <p>usach</p> <p>CEIS LLANQUIHUE</p>

ANEXO 3. Liofilización material vegetal y extractos

A.- Liofilización Material Vegetal Congelado.

- El material vegetal recolectado (fresco) es pesado e inmediatamente congelado (Figura A).
- El material vegetal congelado es liofilizado durante 3 días (Figura B).

Figura A. Liofilización especies vegetales frescas (recolectadas recientemente).



Figura B. Proceso de liofilización (tiempo aproximado: 3 días).



B.- Liofilización extracto congelado (segunda liofilización).

- El extracto líquido obtenido a partir del material vegetal liofilizado, es congelado y nuevamente liofilizado.
- Objetivo: Concentración enzimática.
- Tiempo requerido para dicha operación 7 días.



ANEXO 4. Protocolo extracciones enzimáticas

Previamente Preparar Acetato de Sodio 0,01M pH 5,5

1. Codificar tubos falcon, todas las muestras se realizan por duplicado
2. Pesar 2 gramos de la muestra.
3. Macerar en mortero 2 gramos de muestra más acetato de sodio hasta que la muestra esté totalmente molida (Figura A).

Figura A. Molienda material vegetal



4. Vaciar a tubo falcon y completar con acetato de sodio hasta 45 ml (Figura B).
5. Colocar las muestras en agitador por 12 horas a 100 rpm con gel pack (Figura C).
6. Mantener las muestras en hielo hasta bajar a 10°C.

Figura B. Sumersión en Acetato de Sodio.

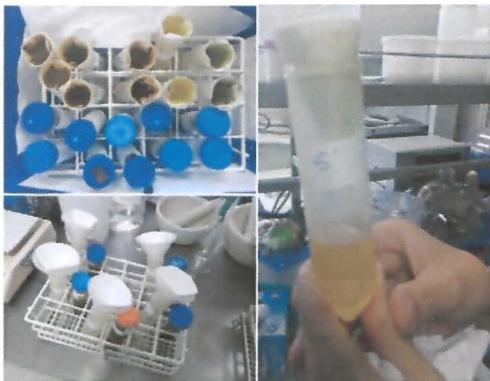


Figura C. Agitación en Acetato de Sodio.



7. Al día siguiente filtrar la muestra con gaza y filtros Whatmann en un nuevo tubo falcón (Figura D).

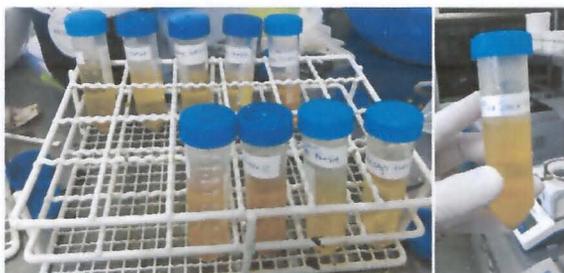
Figura D. Filtrado y purificación del extracto.



8. Centrifugar por 15 minutos a una temperatura de 4°C a 9000 rpm (Figura E).
- Figura E.** Centrifugación y purificación del extracto.



9. Obtención del extracto enzimático purificado.



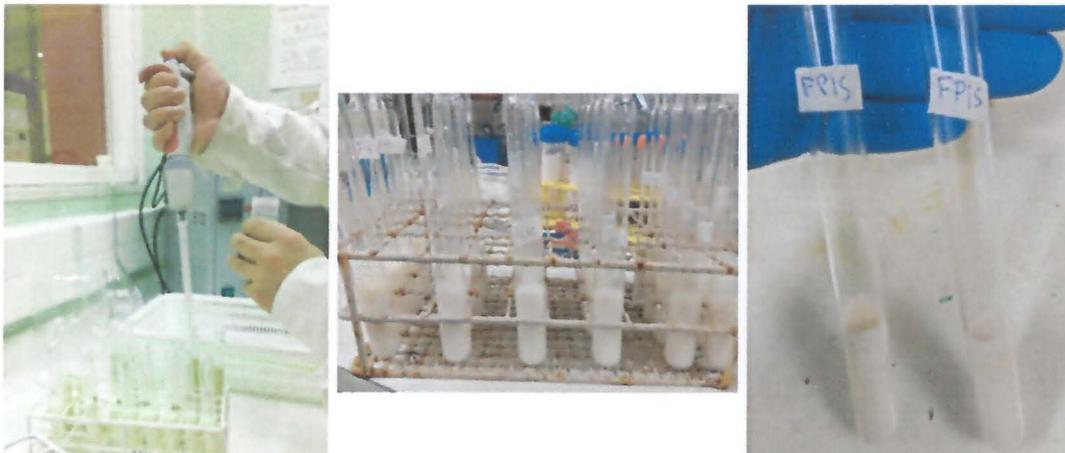
ANEXO 5 Prueba coagulación extractos de material vegetal liofilizado

Prueba de coagulación a través de la utilización de material vegetal

Tomar 1 ml del sobrenadante y agregar un tubo de vidrio que contenga 5ml de leche a 30°C (Figura A).

*Previamente calentar leche en baño maría hasta que alcance una temperatura entre 25 a 30°C).

Figura A. Solución de 1 ml de sobrenadante + 5 ml de leche.



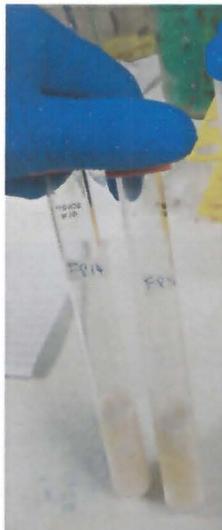
1. Dejar incubar la muestra a 35°C por 12 horas y observar resultados.



Resultados.

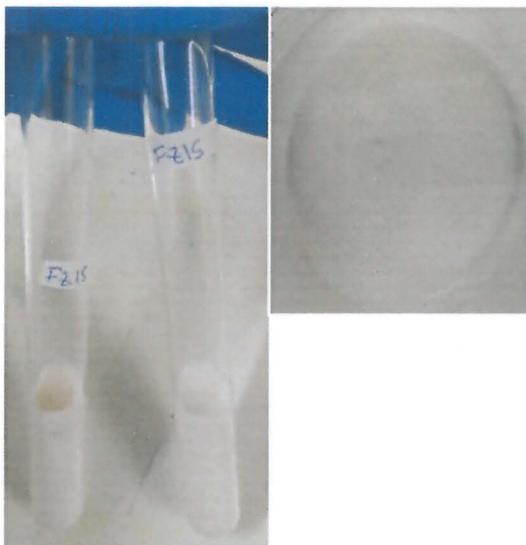
	Espece	Coagulación	Comuna/Coagulación
1	Pelú 2014 (<i>Sophora microphylla</i>)	No	Fresia: No Frutillar: No
2	Pelú 2015 (<i>Sophora microphylla</i>)	No	Fresia: No Frutillar: No
3	Zarzaparrilla 2014 (<i>Ribes magellanicum</i>)	No	Fresia: No Frutillar: No
4	Zarzaparrilla 2015 (<i>Ribes magellanicum</i>)	No	Fresia: No Frutillar: No
5	Matico 2014 (<i>Buddleja globosa</i>)	No	Fresia: No Frutillar: No
6	Matico 2015 (<i>Buddleja globosa</i>)	No	Fresia: No Frutillar: No
7	Cardo 2015 (<i>Cynara cardunculus</i>)	No	Concepción: No

Pelú año 2015 (*Sophora microphylla*). **Matico año 2015 (*Buddleja globosa*).**



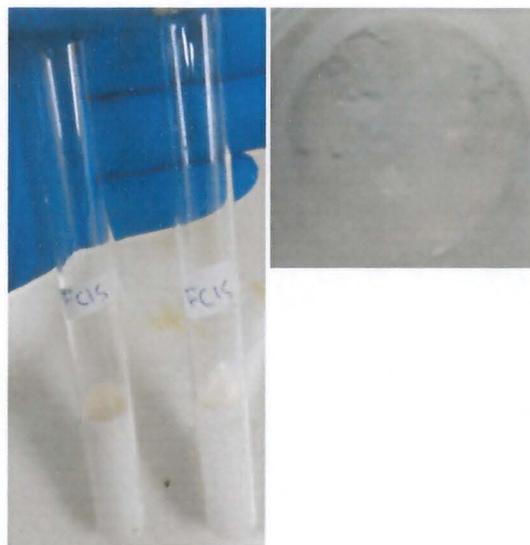
Zarzaparrilla año 2015

(*Ribes magellanicum*).



Cardo año 2015

(*Cynara cardunculus*)



*La prueba de coagulación se realizó bajo las mismas condiciones en dependencias de CEUS Llanquihue, y en el Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos (ICYTAL) de la Universidad Austral de Chile. El objetivo de realizar los experimentos en ambos laboratorios fue el de validar la metodología y los resultados que se obtuviesen.

**Todos los ensayos realizados tanto en la ciudad de Llanquihue, como en la ciudad de Valdivia fueron hechos en duplicado.

***A la lista flores seleccionadas, se adicionó la flor de Cardo (*Cynara cardunculus*).

***No se observó coagulación en ninguna de las muestras ensayadas. Aún así, cabe destacar que la especie vegetal que presentó una mayor desestabilización, y por ende un leve cambio en la consistencia de la materia prima fue el Matico año 2015.

ANEXO 6 Protocolo Electroforesis

SDS PAGE-Preparation:

An intact SDS PAGE electrophoresis system should include: a tank, lid with power cables, electrode assembly, cell buffer dam, casting stands, casting frames, combs(usually 10-well or 15-well), and glass plates (thickness 0.75mm or 1.0mm or 1.5mm). (Bio-rad brand one is recommended)

The SDS PAGE gel in a single electrophoresis run can be divided into stacking gel and separating gel. Stacking gel (acrylamide 5%) is poured on top of the separating gel (after solidification) and a gel comb is inserted in the stacking gel. The acrylamide percentage in SDS PAGE gel depends on the size of the target protein in the sample. (details shown below)

Acrylamide % M.W. Range

7%	50 kDa - 500 kDa
10%	20 kDa - 300 kDa
12%	10 kDa - 200 kDa
15%	3 kDa - 100 kDa

Volumes of stacking gel and separating gel differ according to the thickness of gel casting:

Thickness of the gel	Vol. of stacking gel	Vol. of separating gel
0.75mm	2ml	4ml
1.0mm	3ml	6ml
1.5mm	4ml	8ml

- **For a 5 ml stacking gel:**

H ₂ O	2.975 ml
0.5 M Tris-HCl, pH 6.8	1.25 ml
10% (w/v) SDS	0.05 ml
Acrylamide/Bis-acrylamide (30%/0.8% w/v)	0.67 ml
10% (w/v) ammonium persulfate (AP)	0.05 ml
TEMED	0.005 ml

- **For a 10ml separating gel:**

Acylamide percentage	6%	8%	10%	12%	15%
H ₂ O	5.2ml	4.6ml	3.8ml	3.2ml	2.2ml
Acrylamide/Bis-acrylamide (30%/0.8% w/v)	2ml	2.6ml	3.4ml	4ml	5ml
1.5M Tris(pH=8.8)	2.6ml	2.6ml	2.6ml	2.6ml	2.6ml
10% (w/v)SDS	0.1ml	0.1ml	0.1ml	0.1ml	0.1ml
10% (w/v) ammonium persulfate (AP)	100µ l				
TEMED	10µ l				

Note: AP and TEMED must be added right before each use.

- **5X Sample buffer (loading buffer):**

10% w/v	SDS
10 mM	Dithiothreitol, or beta-mercapto-ethanol
20 % v/v	Glycerol
0.2 M	Tris-HCl, pH 6.8
0.05% w/v	Bromophenolblue

Make sure your target protein dissolved in the liquid phase, and no inappropriate ingredients present (e.g. guanidine hydrochloride can interact with SDS and cause precipitation) Generally, to treat your unprepared sample, you can use sonicator, lysis buffer or both to sufficiently make your target protein released, and centrifuge to make supernatant and pellet separated.

- **1x Running Buffer:**

25 mM	Tris-HCl
200 mM	Glycine
0.1% (w/v)	SDS

(Approximately vol. of less than 1 liter is needed depending on the type of your electrophoresis system.)



SDS PAGE Protocol:

1. Make the **separating gel**:

Set the casting frames (clamp two glass plates in the casting frames) on the casting stands.

Prepare the gel solution (as described above) in a separate small beaker.

Swirl the solution gently but thoroughly.

Pipet appropriate amount of separating gel solution (listed above) into the gap between the glass plates.

To make the top of the separating gel be horizontal, fill in water (either isopropanol) into the gap until a overflow.

Wait for 20-30min to let it gelate.

Make the **stacking gel**:

Discard the water and you can see separating gel left.

Pipet in stacking gel until a overflow.

Insert the well-forming comb without trapping air under the teeth. Wait for 20-30min to let it gelate.

2. Make sure a complete gelation of the stacking gel and take out the comb. Take the glass plates out of the casting frame and set them in the cell buffer dam. Pour the running buffer (electrophoresis buffer) into the inner chamber and keep pouring after overflow until the buffer surface reaches the required level in the outer chamber.

3. Prepare the samples:

Mix your samples with sample buffer (loading buffer).

Heat them in boiling water for 5-10 min.

4. Load prepared samples into wells and make sure not to overflow. Don't forget loading protein marker into the first lane. Then cover the top and connect the anodes.

5. Set an appropriate volt and run the electrophoresis when everything's done.

6. As for the total running time, stop SDS-PAGE running when the downmost sign of the protein marker (if no visible sign, inquire the manufacturer) almost reaches the foot line of the glass plate. Generally, about 1 hour for a 120V voltage and a 12% separating gel. For a separating gel possessing higher percentage of acylamide, the time will be longer.

Note: Various factors affect the properties of the resulting gel.

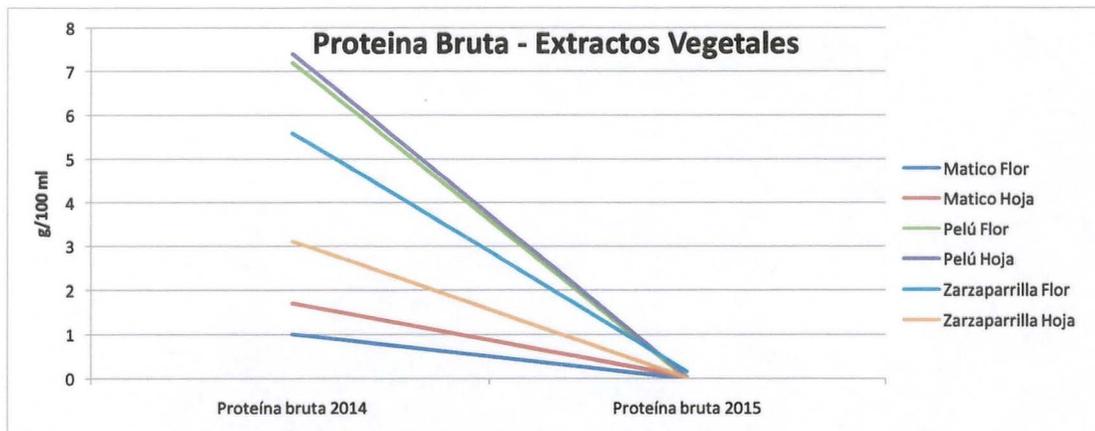
Higher concentration of ammonium persulfate and TEMED will lead to a faster gelation, on the other hand, a lower stability and elasticity.

- The optimal temperature for gel gelation is 23°C-25°C. Low temperature will lead to turbid, porous and inelastic gels.
- **The pH is better to be neutral and the gelation time should be limited in 20-30 min.**

ANEXO 7. Resultados Determinación Proteína Bruta

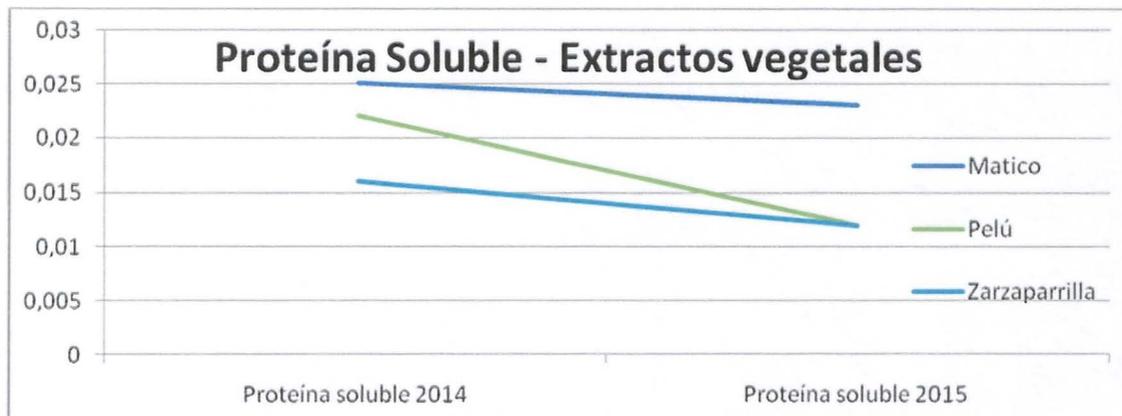
Del extracto liofilizado recolección 2014 - 2015.

Especie	Parte	Proteína bruta extractos 2014	Proteína bruta extractos 2015	% Aumento / Disminución
Matico	Flor	1	0	-100,00
Matico	Hoja	1,7	0,04	-97,65
Pelú	Flor	7,2	nd	nd
Pelú	Hoja	7,4	0,04	-99,46
Zarzaparrilla	Flor	5,6	0,15	-97,32
Zarzaparrilla	Hoja	3,1	0,02	-99,35

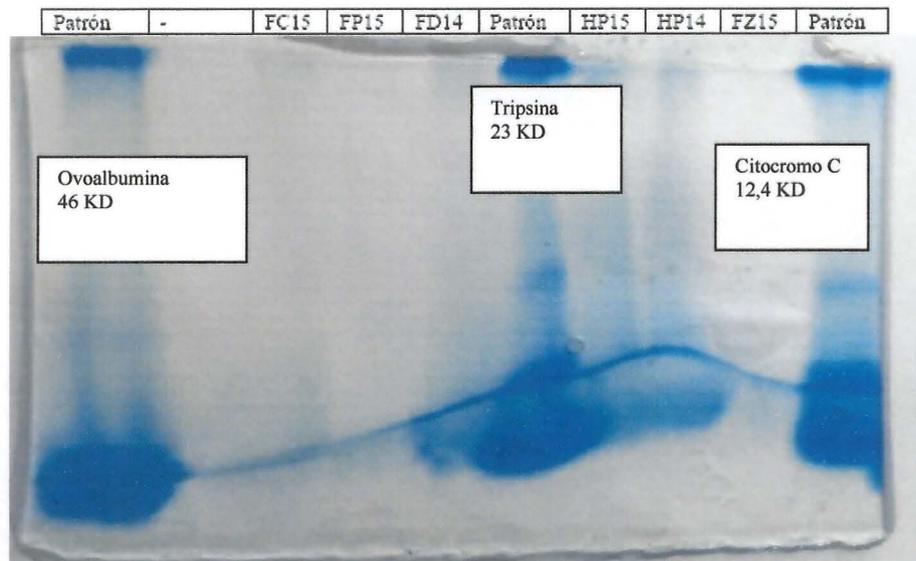
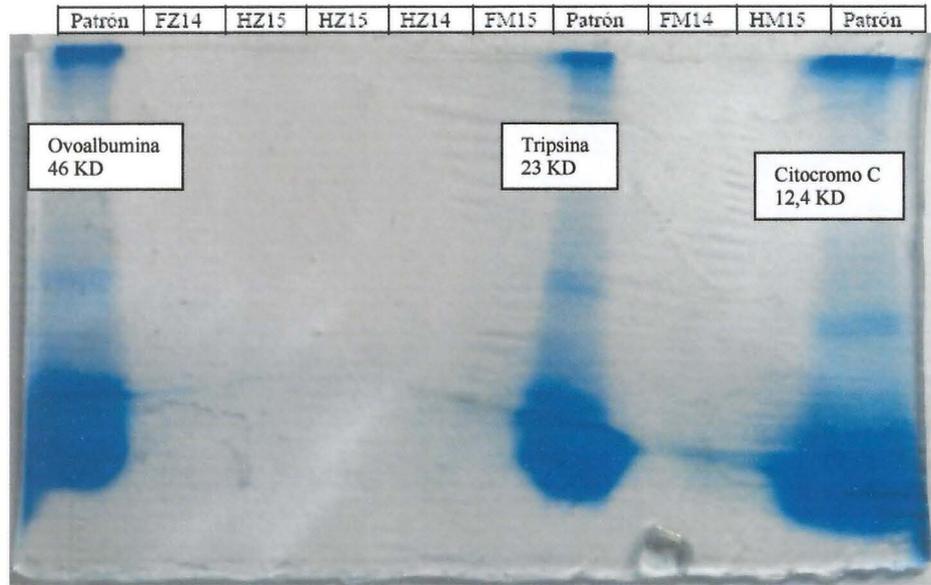


ANEXO 8. Resultados Proteína Soluble del extracto

Especie	Proteína soluble 2014	Proteína soluble 2015	% Aumento / Disminución
Matico	0,025	0,023	-8,00
Pelú	0,022	0,012	-45,45
Zarzaparrilla	0,016	0,012	-25,00



ANEXO 9. Resultados electroforesis extracto



ANEXO 10 Pruebas experimentales en elaboración de quesos con cuajo vegetal.

A.- Curva de calibración de cuajo sintético.

Se realizó una curva de calibración del cuajo sintético requerido para coagular la leche. Siendo el 100% la cantidad de volumen recomendado y utilizado en la industria para la elaboración de queso (Rodrigo Gacitúa); dicho volumen corresponde a 8 ml de cuajo sobre 50 Litros de leche (0,08 ml sobre 500 ml).

Los volúmenes ensayados fueron los siguientes.

- Leche control con 100% de la cantidad de cuajo utilizado en la industria.
- Leche con un 80% de la cantidad de cuajo utilizado en la industria.
- Leche con un 75% de la cantidad de cuajo utilizado en la industria.
- Leche con un 65% de la cantidad de cuajo utilizado en la industria.
- Leche con un 50% de la cantidad de cuajo utilizado en la industria.

B.- Diseño de un MIX elaborado a partir de cuajo sintético y extracto líquido obtenido a partir de cuajo vegetal liofilizado.

Los ensayos se realizaron en condiciones que simulan la elaboración de queso; por lo que se llevaron a cabo en un baño maría. El % cuajo fue adicionado a 500 ml de leche, la cual presentaba una temperatura de 33°C. La materia prima más el cuajo fue dejada en reposo por un tiempo de 40 min.

La leche control (misma cantidad del cuajo utilizado en la industria -100%-) logró coagular normalmente la leche. Por lo que las condiciones del experimento fueron las adecuadas.

Cantidad de cuajo utilizado	Efecto
Leche + 50% de cuajo	Sin efecto
Leche + 65% de cuajo	Sin efecto
Leche + 75% de cuajo	Sin efecto
Leche + 80% de cuajo	Sin efecto
Leche + 100% de cuajo (0,08 ml) (Control)	Efecto

Ejemplo de lectura. Leche + 75% de cuajo: 500 ml de leche + el 75% de cuajo que se ocupa normalmente en la industria para la elaboración de queso.



Cuajo sintético al 80%



Cuajo sintético al 100% (Se observa coagulación y cambio de consistencia).

C.- Curva de calibración desarrollada a partir de extracto vegetal, el cual fue liofilizado en dos oportunidades.

Material vegetal liofilizado (primera liofilización) → Obtención extracto líquido a partir de plantas liofilizadas → Extracto líquido liofilizado (segunda liofilización).

Los ensayos se realizaron en condiciones que simulan la elaboración de queso; por lo que se llevaron a cabo en un baño maría. La cantidad de cuajo vegetal fue adicionado sobre 500 ml de leche, la cual presentaba una temperatura de 33°C. La materia prima más el cuajo vegetal fue dejada en reposo por un tiempo de 40 min.

La leche control (misma cantidad del cuajo sintético utilizado en la industria -100%-) logró coagular normalmente la leche. Por lo que las condiciones del experimento fueron las adecuadas.

Muestra vegetal 2015	Cantidad de cuajo utilizado (grs)	Efecto
Matico	1,5	Sin efecto
Matico	2,5	Sin efecto
Pelú	1,5	Sin efecto
Pelú	2,5	Sin efecto
Matico + Pelú	5	Sin efecto
Leche + 100% de cuajo (Control)	0,08 ml (80 ul)	Efecto

Muestra vegetal 2014	Cantidad de cuajo utilizado (grs)	Efecto
Pelú	1,0	Sin efecto
Pelú	2,2	Sin efecto
Zarzaparrilla	1,0	Sin efecto
Zarzaparrilla	2,0	Sin efecto
Pelú + Zarzaparrilla	4,6	Sin efecto
Leche + 100% de cuajo (Control)	0,08 ml (80 ul)	Efecto

D.- Desarrollo de un Mix (cuajo vegetal + cuajo sintético).

Los ensayos se realizaron en condiciones que simulan la elaboración de queso; por lo que se llevaron a cabo en un baño maría. La cantidad de cuajo vegetal y sintético fue adicionado sobre 500 ml de leche, la cual presentaba una temperatura de 33°C. La materia prima más el cuajo vegetal y sintético fue dejada en reposo por un tiempo de 40 min.

La leche control (misma cantidad del cuajo sintético utilizado en la industria -100%-) logró coagular normalmente la leche. Por lo que las condiciones del experimento fueron las adecuadas.

Muestra vegetal 2015	Cantidad de cuajo vegetal y sintético utilizado (grs/ml)	Efecto
Matico + Cuajo 75%	3,0 + 60ul	Sin efecto
Matico + Cuajo 80%	2,0 + 64 ul	Sin efecto
Pelú + Cuajo 75%	2,0 + 60ul	Sin efecto
Pelú + Cuajo 80%	2,0 + 64 ul	Sin efecto
Matico + Pelú + Cuajo 80%	4,8 + 64 ul	Sin efecto
Leche + 100% de cuajo (Control)	0,08 ml (80 ul)	Efecto



E. Elaboración de quesos a nivel experimental utilizando cuajo estándar y extracto liofilizado

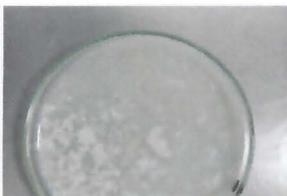
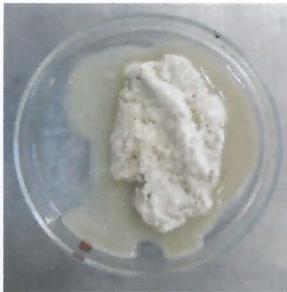
Se liofilizaron 4 muestras de material vegetal previamente extraídas correspondiente a:

	Nombre	Peso final
1	Pelú	1.9562
2	Matico	2.4354
3	Zarzaparrilla	3.4856
4	Cardo	1.9939



Se realizaron pruebas de elaboración experimental de quesos según diferentes factores:

Materia Prima	de cuajo vegetal y/o sintético utilizado	Efecto
Leche	cuajo sintético al 100%	Efecto
Leche	cuajo vegetal liquido	Sin efecto
Leche	cuajo vegetal liofilizado en diferentes concentraciones (0,5g; 0,8g; 1g)	Sin efecto
Leche	cuajo sintético al 100% + cuajo vegetal en diferentes concentraciones	Sin efecto
Leche+ buffer	cuajo sintético	Efecto



Como se observa en las imágenes anteriores, al agregar cuajo liofilizado en conjunto con cuajo sintético, existe una inhibición hacia las proteína, el cuajo vegetal presenta compuestos polifenólicos que inactivan las proteínas del cuajo estándar (se explica más adelante). Solo se logra formar una masa inestable, incapaz de soportar presión para formar el queso.

También se realizaron pruebas adicionando el extracto liofilizado al final de proceso, donde, los resultados visuales y de textura no son atractivos, ya que el polvo liofilizado es incapaz de disolverse en la masa ya coagulada, presentando un rendimiento de un 8,3%.





Fundación para la
Innovación Agraria

ANEXO 11. Equipos

Equipo	Fotografía	Observaciones
Autoclave		<p>Autoclave marca Daihan Scientific modelo WAC-47.</p> <ul style="list-style-type: none">-Controlada por microprocesador Digital Fuzzy.-Controla la operación de esterilización totalmente automática.-Equipo sin sistema de secado.-Mecanismo válvula de seguridad de presión.-Resistente y seguro manejo de la puerta.-Capacidad de protección de corriente, presión, y sobret temperatura.-Capacidad: 47 lts .-Rango de temperatura: Ambiente + 5°C hasta 132°C.-Exactitud: + 0.5°C a 121°C.-Display: Digital LCD.
TINA QUESERA		<p>Equipo rectangular construido en acero inoxidable AISI 304.</p> <p>Válvulas de entrada y de salida de agua caliente / fría con dimensiones de 2", con rejilla de acero inoxidable.</p> <p>Liras para corte de cuajada de acero inoxidable. Pala tipo suizo de agitación de acero inoxidable. Tapón de acero inoxidable abatible a la entrada de la válvula de salida de producto. Con sistema de desuerado.</p> <p>Válvula de descarga producto Ø2".</p> <p>Volumen de 50 Lts</p>



Fundación para la
Innovación Agraria

<p>Analizador de Humedad - HE53 - Mettler Toledo</p>		<p>Capacidad: 54 g - Legibilidad: 1 mg, 0.01% MC -Repetibilidad: 0.15% (2 g sample), 0.05% (10 g sample) -Temperatura: 50 - 160°C (1°C increments) - Heating Halogen -Result Display %MC, %DC, %ATRO MC, % ATRO DC, g -Display LCD back-lit - Display Functions User Guidance, Progress Indicator Weight 4.1 kg</p>
<p>Balanza digital</p>		<p>BALANZA PREC. DIGITAL CAP. 3000GR:0,1GR. MARCA JADEVER. Balanza de laboratorio, modelo SNUG III - 3000. De lectura digital instantánea controlada por microprocesador Sensibilidad 0,1 gr Capacidad 3000 gr</p>
<p>Destilador</p>		<p>DESTILADOR DE AGUA CAPACIDAD 3 A 4 L/H. MARCA POBEL Destilador de vidrio capacidad 3 a 4 lt/hora, 2200watts, 220 volts, libre de pirógeno - calefactor en cuarzo.</p>
<p>Equipo de frio</p>		<p>equipo para cámara de maduración 24.000 BTU refrigerante R410</p>



Fundación para la
Innovación Agraria

Agitador magnético		Agitador magnético placa MS-M-S10 18X45cm 0-1100rpm.
Liofilizador vertical marca OPERON (Corea) modelo FDU-8606		Liofilizador de sobremesa marca OPERON (Corea) modelo FDU-8606. Controlado por microprocesador automático para los procesos de enfriamiento, vacío y secado, con display digital de temperatura y vacío (2000 Omtorr). Cámara de frío y condensador en acero, inoxidable, exterior de acero recubierto de resina epóxica. Capacidad máxima de hielo 6L / 24 horas. Temperatura mínima del condensador: - 90°C Dimensiones del condensador: 315 mm diámetro x 300 mm largo
Centrífuga refrigerada de laboratorio marca HETTICH modelo Universal 320R		CENTRIFUGA DE LABORATORIO MARCA HETTICH 1 4.816.500 0 4.816.500 MODELO UNIVERSAL 320. CONTROLADA POR MICROPROCESADOR Y LECTURA DIGITAL. TAPA CON VISOR DE CIERRE ELECTRICO Y DESCONEX AUTOMATICA POR DESBALANCEO O ROTURA DE UNO DE LOS TUBOS DE VIDRIO



Fundación para la
Innovación Agraria

Aire acondicionado		Aire acondicionado portátil frigorifero portátil 12000 btu
--------------------	---	---

ANEXO 12. Efectos de la sequía Región de los Lagos

La agricultura está relacionada con variaciones en los climas locales más que en patrones mundiales. Las heladas y el aumento en la temperatura promedio de la superficie de la tierra han traído como consecuencia que las distintas zonas geográficas se vean afectadas de manera diferente.

Las causas del bajo nivel proteico de las plantas recolectadas en este proyecto durante la primavera 2015 y bajo nivel de coagulación láctea, se debió principalmente a la sequía registrada a fines del año 2014 y el primer trimestre 2015. En la Región de los Lagos, existiendo variados estudios y artículos que señalan las consecuencias negativas de este hecho, los que se detallan a continuación:

La pérdida de la calidad en la pradera queda demostrada principalmente en el bajo nivel de proteína y digestibilidad que presenta, lo que también afecta el consumo y el aprovechamiento del forraje ingerido por las vacas. Esto, a su vez, genera que la digestibilidad del forraje se reduzca desde 65% o más a niveles cercanos al 50% (Muñoz, 2009).

A finales de 2014 La Provincia de Llanquihue, presentó precipitaciones inferiores al promedio de años anteriores. Quilanto (Frutillar) se registraron 73,7 mm, siendo lo normal 82 mm, lo que representa un 10 % menos. En un nivel similar, el registro de Colehual (Llanquihue) señala 8,8 % menos, con 93 mm. Polizonos (Fresia) el déficit supera los anteriores con un 16 % menos, cayendo durante octubre 79 mm.

Las precipitaciones en la provincia de Llanquihue durante el mes de octubre 2015 registraron también un importante déficit, los valores de precipitación normales en Quilanto (Frutillar) es de 82,0 mm, en Colegual (Llanquihue) es de 102,0 mm, en Polizonos (Fresia) es de 95,0 mm, en Los Canelos (Los Muermos) es de 110,0 mm y en Ensenada (Puerto Varas) es de 119,0 mm (INIA, 2015).

El primer trimestre de 2015 se ha presentado como el periodo más seco en décadas. De hecho, sólo cayeron 26 milímetros (mm) entre enero y marzo 2015, lo que convierte a 2015 en el año menos lluvioso desde que se tenga registro; es decir, a partir del momento en que se comenzaron a tomar muestras pluviométricas en la zona en 1964 (Fedeleche, 2015).

Sin ir más lejos, la media trimestral en estos 56 años de estudio ha sido de 162.79 mm., lo que significa que el déficit caído es de 83%, lo que según los expertos, ha afectado a miles de agricultores que no han podido contar con un rendimiento y calidad de praderas adecuado para el ganado lechero y de carne, con el consiguiente daño para quienes trabajan con cierto tipo de praderas.

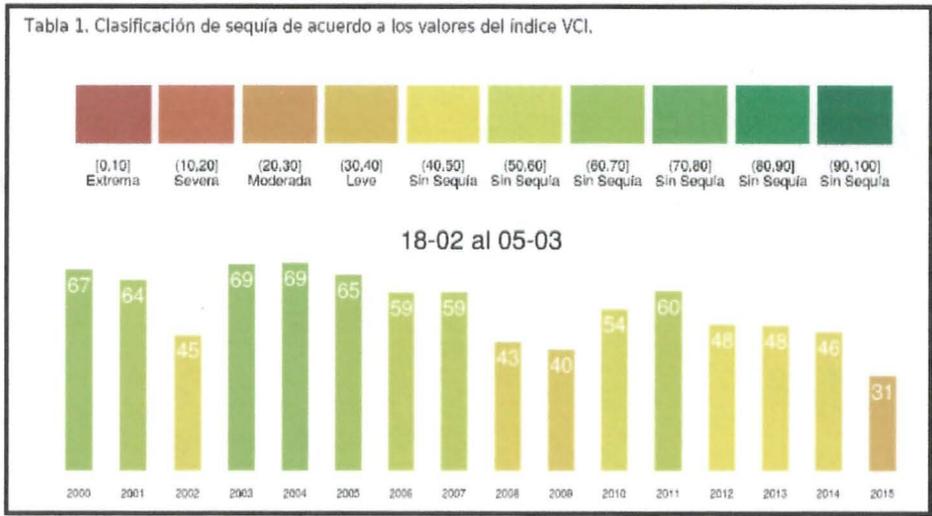


Fig. Valores del índice VCI para el mismo periodo entre los años 2000-2015 para la región de los lagos (INIA, 2015).

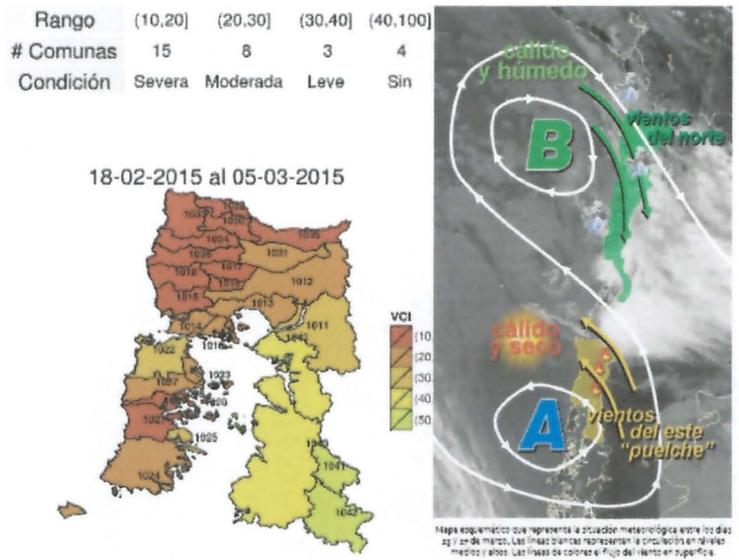


Fig 2. Valores comunales promedio de VCI en la Región de Los Lagos de acuerdo a la clasificación VCI (Boletín Agroclimático, 2015).



Según lo señalado por Cristian Moscoso, Ingeniero en Agricultura del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIA) Remehue de Osorno, Dra. Marta Alfaro (INIA) y el experto Carlos Lizana (cooprinsem), donde indicó que el suelo al menos debería recepcionar unos 40 milímetros de agua a fin de que pueda absorber por lo menos la mitad para que el líquido llegue a las plantas. Eso sí, no todo el suelo es susceptible de ser recuperado aunque caiga el agua suficiente para ello, ya que existen otros factores que hacen que un porcentaje de la pradera no vuelva a brotar más (Fedeleche, 2015).

Según lo señalado en la revista “Campo del Mercurio” (febrero 2015): El verde tradicional de las praderas de la zona sur del país ha cambiado (periodo estival 2014 - 2015) por el amarillo de la sequedad y la falta de agua. Lo concreto es que de acuerdo a los expertos la zona vive la peor sequía de los últimos 50 años, lo que está generando un sinnúmero de problemas para los productores lecheros, quienes se han visto en la obligación de, entre otras cosas, utilizar las reservas de forraje pensadas originalmente para invierno. “No es que las praderas hayan desaparecido, sino que se ven amarillentas, secas, producto de una sequía de verano. El mayor problema es que **ese pasto ha perdido calidad y no alcanza para cubrir los requerimientos nutricionales del ganado**”. La pérdida de la calidad en la pradera, **queda demostrada principalmente en el bajo nivel de proteína y digestibilidad que presenta**, lo que también afecta el consumo y el aprovechamiento del forraje ingerido por la vaca.

El agua es un agente químico que imparte estructura y orden a las moléculas biológicas así como a las interacciones entre ellas. El bajo aporte de agua causa deshidratación que se asocia con la degradación de las membranas celulares y de los organelos, desnaturalización de las proteínas, una disminución crítica en la síntesis de las proteínas e incluso modificaciones en el DNA que originan mutaciones (Pugnaire et. al. 1994; Hsaio et. al. 1976).

Existen estudios relacionados con la disminución de la concentración de proteínas en praderas dependiendo del clima, según lo expuesto por el informe de Pérez (2010), donde señala que el pasto en las praderas ubicadas en regiones con clima cálido, presenta problemas de deficiencia de proteína y energía, y su digestibilidad es baja, lo cual genera problemas al productor, porque el ganado tiene menor ganancia de peso y producción de leche.

Contenido de proteína

Sin sequía: excedente todo el año

Con sequía: contenido insuficiente 1-2 m

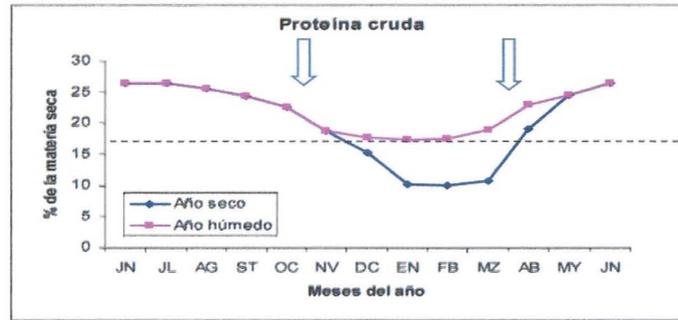


GRAFICO 1: Contenido de proteínas según precipitaciones.

FUENTE: Nutrición y alimentación de vacas lecheras en pastoreo René Anrique g.,
ing. Agr., ph.d universidad austral de chile.

Como se observa en la grafica el contenido de proteínas varía entre un año con precipitaciones normales a un año seco (diciembre - abril) temporada donde se realizan las recolecciones de material vegetal para posteriormente extraer el cuajo para la elaboración de quesos a nivel experimental.

Déficit Hídrico. Según la DGA (Dirección General de Aguas), la situación del país (agosto 2015) aún presenta un estado deficitario en recursos hídricos, a pesar de las últimas lluvias registradas. Los ríos muestran caudales bajos, cercanos a sus mínimos y, en la zona norte, bajo sus mínimos históricos. De Maipo al Sur, los caudales se ubican entre el mínimo histórico y el caudal promedio, siendo mayores progresivamente hacia el sur.

Región	Comunas totales región	Numero comunas declaradas en EA	Evento	Comunas	Resolución Exenta
ATACAMA	9	6	Déficit Hídrico	Tierra Amarilla, Copiapó, Alto del Carmen, Vellener, Freirina y Huasco.	Res. Ex. 73 - 23 febrero 2015
COQUIMBO	15	15	Déficit Hídrico	Canela, Los Vilos, Illapel, Salamanca, Punitaqui, Combarbalá, Andacollo, Coquimbo, La Higuera, La Serena, Pichuano, Vicuña, Monte Patria, Ovalte, Río Hurtado.	Res. Ex. 72 - 23 febrero 2015
VALPARAÍSO	36	33	Déficit Hídrico	Todas las comunas de la Región excepto los territorios insulares, y las comunas de Villa Alemana, Viña del Mar y Valparaíso.	Res. Ex. 74 - 23 febrero 2015
LA ARAUCANÍA	32	32	Déficit Hídrico	Cerros Hue, Cholchol, Cunco, Curamchue, Freire, Galvarino, Gorbea, Lautaro, Loncoche, Malleuco, Nueva Imperial, Padre Las Casas, Perquenco, Pitrufuén, Pucón, Puerto Saavedra, Temuco, Teodoro Schmidt, Tolén, Villcún, Villarrica, Angol, Collipulli, Curaceutín, Ercilla, Lonquimay, Los Sauces, Lumaquí, Purén, Renanco, Traiguén, Victoria.	Res. Ex. 96 - 06 marzo 2015
LOS RÍOS	12	12	Déficit Hídrico	Río Bueno, Paillico, Los Lagos, Miffl, Lago Ranco, Corral, La Unión, Valdivia, Panguipulli, Futrono, Mariquina, Lanco.	Res. Ex. 97 - 06 marzo 2015
LOS RÍOS			Erucción Volcan Villarica	Localidades Coñaribe Bajo, Mill Mill, Los Cajones, La Verde, Termas Rincón, Termas Geométricas, Termas Yergara, Pucura Bajo, Trautricó Alto, Pucura Alto, Coñaribe Alto y San José.	Res. Ex. 97 - 06 marzo 2015
LOS LAGOS	30	19	Déficit Hídrico	San Pablo, Osorno, San Juan de la Costa, Río Negro, Purránque, Puyehue, Puerto Octay, Frutillar, Llanquihue, Fresia, Los Muermos, Puerto Varas, Puerto Montt, Cochamó, Calbuco, Quemont, Castro, Chonchi, Quellón.	Res. Ex. 99 - 09 marzo 2015
METROPOLITANA	52	19	Déficit Hídrico	Lampa, Collina, Til Til, San José de Maipo, Pirque, Bulín, Calera de Tango, Paine, San Bernardo, Curacaví, Melipilla, Ahus, María Pinto, San Pedro, El Monte, Isla de Maipo, Padre Hurtado, Peñafiel, Telogante.	Res. Ex. 122 - 19 marzo 2015
BIOBÍO	54	47	Déficit Hídrico	CHILLÁN, Bulnes, Cobquecura, Coelemu, Coihueco, Chillán Viejo, El Carmen, Ninhue, Riñuén, Pemuco, Pinto, Portezuelo, Quillón, Quirihue, Ranquil, San Carlos, San Fabián, San Ignacio, San Nicolás, Treguaico, Yungay, Los Ángeles, Antuco, Cabrero, Laja, Mulchán, Nacimiento, Negrete, Cullaco, Quilico, San Rosendo, Santa Bárbara, Tucapel, Yumbel, Alto Biobío, Coronel, Florida, Hualqui, Santa Juana, Tomé, Arauco, Coñete, Contulmo, Curanilahue, Lebu, Los Álamos, Tirúa.	Res. Ex. 128 - 20 marzo 2015
LOS LAGOS		11	Déficit Hídrico	Maulín, Ancud, Dalcahue, Curaco de Vélez, Quinchao, Pudvelón, Quellón, Huelaihue, Chaitén, Futacufú, Paleno.	Res. Ex. 129 - 20 marzo 2015
TOTAL	282	194			

FUENTE: COYUNTURA AGROCLIMÁTICA. MINAGRI AGOSTO DE 2015.

Heladas primavera 2015. En Octubre 2015 RedAgricola pronosticó sobre efectos del FENÓMENO DEL NIÑO “Todo indica que Chile enfrentó 2 escenarios bastante distintos y extremos. Se estimó que la segunda o tercera semana de octubre, desde Curicó al Norte tuvieron una primavera en extremo seca, calurosa y con índices de radiación muy altos, es decir, se cambio bruscamente de una primavera invernal a un verano violento, con todos los daños a plantas y producción propios de estas extremas, con “heladas de septiembre y octubre”. Sin embargo existirá un cambio desde algún sector Talca-Linares hacia el Sur donde primavera-verano será lluviosa y templada, **con bastantes heladas en octubre y noviembre. Son estas condiciones tan extremas las que limitaron la floración**” (RedAgricola, 2015).

Un posible efecto sobre la composición química de las plantas es debido a las heladas registradas durante el periodo de primavera 2015, donde se registraron valores mínimos en la costa de las Regiones de Los Ríos y Los Lagos. Durante octubre de 2015, las heladas se extendieron desde la Región Metropolitana hasta la Región de Los Lagos, con valores que alcanzaron hasta los -3.2°C en la Región de Los Ríos. En el mes de octubre se observaron heladas matinales (temperatura menor o igual a 0°C) entre la Región Metropolitana y la Región de Los Lagos, siendo esta última la más fría, con 3 días con heladas. (Meteochile, 2015).

Tabla 1. Comportamiento de las temperaturas mínimas y máximas [$^{\circ}\text{C}$]. Incluyendo la media de octubre, la anomalía con respecto a un octubre normal, la condición térmica (Categorías: Muy frío, frío, normal, cálido y muy cálido) y la temperatura absoluta del mes. Se incluye la cantidad de días con heladas y temperaturas sobre los 30°C . Nota 1: s/i = sin información. Período climático base: 1981-2010. Datos: DMC-SERVIMET.

ESTACIÓN	TEMPERATURA MINIMA [$^{\circ}\text{C}$]				Días con heladas
	Media	Anomalía	Condición	Absoluta	
La Serena	10,6	+ 0,8	Cálido	7,2	0
Valparaíso	11,4	+ 0,5	Normal	8,0	0
Santiago	8,3	- 0,3	Normal	3,3	0
Curicó	7,5	- 0,1	Normal	2,1	0
Chillán	6,2	- 0,6	Normal	2,1	0
Concepción	7,8	+ 0,4	Normal	2,3	0
Temuco	5,2	- 0,5	Normal	-0,7	0
Valdivia	4,5	- 1,0	Frío	-0,4	0
Osorno	3,9	- 1,6	Frío	-2,1	0
Puerto Montt	4,5	- 1,1	Frío	-0,8	0

FUENTE: Meteochile, 2015.



ANEXO 12. Revisión Bibliográfica

I. El efecto del cambio climático

1. Erupción Volcánica

La erupción volcánica lleva consigo una columna de gases tóxicos para la población, el magma contiene gases disueltos que son liberados por las erupciones hacia la atmósfera, normalmente tóxicas y peligrosas para la vida vegetal y animal. Los gases pueden presentar efectos nocivos especialmente en el área cercana al macizo volcánico (5 kilómetros), aunque en algunos países se han provocado hasta a 30 kilómetros de distancia del punto de emisión. En ocasiones, las gotas de lluvia al mezclarse con los gases adheridos a las cenizas pueden causar la lluvia ácida, perjudicial tanto para las personas, animales y vegetación. La lluvia ácida afecta principalmente a la piel y al sistema respiratorio de las personas. También causa daños a cosechas y animales que comen la vegetación afectada.

Algunas erupciones emiten gases con cantidades elevadas de cloruros y/o sulfatos (Hudson 1991), los cuales precipitan junto con las cenizas formando costras salinas sobre los depósitos, alterando significativamente las propiedades de los suelos (Gradeweg et al., 1990).

2. Sequía

Producto de las sequías del verano 2014, la pérdida de la calidad en la pradera queda demostrada principalmente en el bajo nivel de proteína y digestibilidad que presenta, lo que también afecta el consumo y el aprovechamiento del forraje ingerido por la vaca. Esto, a su vez, genera que la digestibilidad del forraje se reduzca desde 65% o más a niveles cercanos al 50% (Muñoz, 2009).

El agua es un agente químico que imparte estructura y orden a las moléculas biológicas así como a las interacciones entre ellas. El bajo aporte de agua causa deshidratación que se asocia con la degradación de las membranas celulares y de los organelos, desnaturalización de las proteínas, una disminución crítica en la síntesis de las proteínas e incluso modificaciones en el DNA que originan mutaciones (Pugnaire et. al. 1994; Hsiao et. al. 1976).



*En círculos Frutillar y Fresa.

Las precipitaciones en la provincia de Llanquihue durante el mes de octubre 2015 registraron también un importante déficit, los valores de precipitación normales en Quilanto (Frutillar) es de 82,0 mm, en Colegual (Llanquihue) es de 102,0 mm, en Polizones (Fresa) es de 95,0 mm, en Los Canelos (Los Muermos) es de 110,0 mm y en Ensenada (Puerto Varas) es de 119,0 mm (INIA, 2014).

Como se observa en la grafica 1 el contenido de proteínas varía entre una año con precipitaciones normales a un año seco (diciembre – abril) temporada donde se realizan las recolecciones de material vegetal para posteriormente extraer el cuajo para la elaboración de quesos a nivel experimental.

3. Heladas primavera 2015

Un posible efecto sobre la composición química de las plantas es debido a las heladas registradas durante el periodo de primavera 2015, donde se registraron valores mínimos en la costa de las Regiones de Los Ríos y Los Lagos. Durante octubre de 2015, las heladas se extendieron desde la Región Metropolitana hasta la Región de Los Lagos, con valores que alcanzaron hasta los -3.2°C en la Región de Los Ríos. En el mes de octubre se observaron heladas matinales (temperatura menor o igual a 0°C) entre la Región Metropolitana y la Región de Los Lagos, siendo esta última la más fría, con 3 días con heladas. (Meteochile, 2015).

II. El efecto de otros compuestos

“Altos contenidos de compuestos medicinales en plantas nativas como son **alcaloides** y **taninos**, entre otros, pueden afectar la actividad enzimática al punto de inhibir la acción de ésta (Latorre y Calderón, 1998)”.

“El contenido de **proteasas** liberadas al momento de la ruptura de la célula vegetal pudiera disminuir el posible contenido de enzimas vegetales capaces de coagular la leche (MONTES et al., 1992)”.

1. Alcaloides.

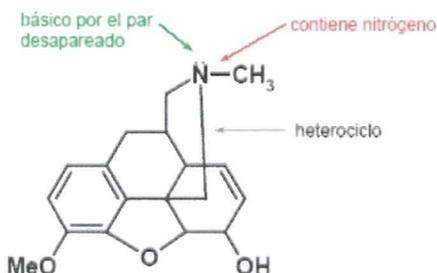
*“La presencia de **alcaloides** afecta en el contenido de proteínas al poseer en su estructura uno o más átomos de N, lo cual indica un contenido menor de proteínas”.*

Factores que influyen el patrón de almacenamiento de alcaloides.

Usualmente los patrones de alcaloides varían entre el sitio de síntesis y el sitio de acumulación debido a que un número de sustituciones secundarias se pueden llevar a cabo en otros tejidos. El patrón de alcaloides en semillas y plántulas difiere del de las plantas maduras. La formación y el almacenamiento de los alcaloides puede estar influenciado por el **estrés ambiental**, lesiones o infecciones. En general los niveles de alcaloides se reducen en forma marcada en tejidos senescentes, **por lo que las hojas a punto de caerse están prácticamente libres de alcaloides.**

Qué son los alcaloides?

Los alcaloides corresponden al grupo más numeroso de metabolitos secundarios; son compuestos orgánicos cíclicos que contienen nitrógeno (compuesto heterocíclico) en un estado de oxidación negativo con una distribución limitada entre los organismos vivos. En términos generales se describen como productos naturales que contienen nitrógeno, y que no son clasificados como péptidos, Aa no proteicos, aminas, glicósidos cianogénicos, glucosinolatos, cofactores, fitohormonas o metabolitos primarios (tales como bases púricas o pirimídicas). **Cabe destacar, que la mayoría de los alcaloides provienen del reino vegetal encontrándose principalmente en plantas.**



La morfina es un ejemplo de alcaloide.

Almacenamiento.

Los alcaloides son almacenados predominantemente en tejidos que son importantes para la supervivencia y reproducción, tejidos jóvenes en activo crecimiento, raíces, corteza de tallos, flores (especialmente semillas), plántulas y tejidos fotosintéticamente activos.

2. Taninos.

“Numerosos estudios han confirmado el efecto negativo de los taninos en las dietas para animales ya que estos forman complejos insolubles con las proteínas y otras macromoléculas, afectando negativamente la energía metabolizable y la disponibilidad de proteína”.

*“Este complejo tanino proteína es considerado responsable del bajo nivel de crecimiento, baja digestibilidad de proteína y disminución de aminoácidos aprovechados e incremento de nitrógeno excretado. Además, **las enzimas digestivas como la amilasa, lipasa y tripsina son fuertemente inhibidas, afectando en esta forma la digestibilidad de proteínas, grasas y almidones**”.*

Descripción.

Son un grupo complejo de compuestos polifenólicos que se encuentran en **numerosas especies vegetales**. Presentan una elevada afinidad por otras moléculas, esto se debe a su capacidad para unirse a macromoléculas como hidratos de carbono y **proteínas**. Poseen pesos moleculares superiores a 500 Daltons (Mueller-Harvey, 1999). En términos generales dentro de los vegetales suelen encontrarse en vacuolas celulares, combinados con alcaloides y proteínas.

Convencionalmente, se dividen en dos grandes grupo: taninos hidrolizables (TH) y taninos condensados (TC). Los TH están constituidos por un núcleo compuesto por un glúcido, cuyos grupos hidroxilo se encuentra nesterificados con ácidos fenólicos, tales como el ácido gálico o su dímero ácido elágico. Por su parte, los llamados taninos condensados (o proantocianidinas), son polímeros hidroxiflavonoides; estos están mucho más distribuidos en la naturaleza que los hidrolizables y se encuentran, principalmente, en hojas de árboles y leguminosas herbáceas (Aerst et al., 1999).

3. Taninos y proteínas.

La proteína bajo ciertas condiciones de concentración y pH forman complejos insolubles con los taninos, esta tendencia es atribuida a la fuerte atracción del hidrógeno con él oxígeno del grupo carboxilo del péptido con la posible formación de enlaces cruzados entre las cadenas de proteína (Boren, 1992), lo que induce la precipitación de las proteínas, disminuyendo la disponibilidad de esta y sus aminoácidos con posible inhibición enzimática (Butler; 1991). Por otro lado Hahn et al., 1984, sostienen que la capacidad de los taninos para unirse a las proteínas depende del grado de polimerización, el número de grupos fenólicos y también de la calidad de la proteína. El complejo tanino proteína es considerado responsable del bajo nivel de crecimiento, baja digestibilidad de proteína y disminución de aminoácidos aprovechados e incremento de nitrógeno excretado (Shang et al., 1990) por otra parte Jaramillo, (1991) encontró un efecto negativo de los taninos más resaltante sobre la proteína determinando una correlación negativa ($r = 0.88$; $P < 0.01$) para la digestibilidad aparente de nitrógeno. Reyes (1991), observó que a mayor contenido de taninos condensados disminuye la digestibilidad de la proteína acompañada de secreciones masivas de fluidos a nivel del tracto digestivo para contrarrestar el efecto tóxico, lo que indica valores más altos de nitrógeno proteico excretado y nitrógeno total excretado. Precipitación de las proteínas por los taninos es máximo a valores de pH cercano al punto isoelectrico de las proteínas en solución a un pH alto, los hidroxilos fenólicos son ionizados y las proteínas tienen cargas negativas netas, bajo estas condiciones la precipitación no ocurre porque las proteínas exponen fuerzas repulsivas. Fuertes complejos con taninos son formados por taninos y agentes atrapantes como el polivinilpirrolidona (PVP) y propilenglicol (PEG) y desnaturizantes de proteína como el fenol. Por tener alta afinidad por las proteínas los taninos pueden ser lo suficientemente pequeños para penetrar la región interfibrilar de las moléculas de proteína pero lo suficientemente largas para cruzar las cadenas peptídicas en más de un punto.



Efecto sobre las enzimas.

Las enzimas digestivas como la amilasa, lipasa, tripsina son fuertemente inhibidas por los taninos condensados afectando en esta forma la digestibilidad de proteínas grasas y almidones (Dale, 1985). Los taninos condensados inhiben más la tripsina que los taninos hidrolizables mientras que estos últimos inhiben la lipasa y ambos inhiben amilasa.

La magnitud del efecto inhibitorio de las enzimas digestivas por acción de los taninos se ha relacionado: a) La cantidad de la proteína dietaria. b) Formación de complejos tanino - proteína antes de la ingestión c) Inhibición de varias enzimas en el tracto digestivo. d) Diferencias de afinidad entre los taninos y las enzimas digestivas e) El pH del tracto digestivo. f) El tipo y fuente del tanino. g) Especie y edad del animal. Jaramillo et al, (1994) sugiere que los taninos condensados de muy bajo peso molecular o altamente polimerizados tendrían menor capacidad para precipitar proteínas y por ende menor efecto inhibitorio de las enzimas digestivas in vitro.



ANEXO 13 Bibliografía Consultada

- Aerst. R.J.; Barry. T. and McNabb, W. (1999). Polyphenols and agriculture: beneficial effects of proanthocyanidins in forages. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 75, 1-12.
- Butler, L.G. 1991. The role of tannin in sorghum nutritional quality. Trabajo presentado en el seminario : Sorgo para el futuro. Cali, enero 16-19 CIAT, Colombia. Mimeografiado.
- Dale, N. 1985. El problema de los taninos en nutrición aviar. *Avicultura Profesional*. Vol 3(1): 13-15
- García Pérez, Hilda Marilín. 2000. Electroforesis en geles de poliacrilamida: fundamentos, actualidad e importancia. *UNIV DIAG* 2000;1(2):31-41.
- Gradeweg; Moreno; Naranjo, 1990. Comportamiento del volcán Lonquimay en su fase eruptiva 1988 – 1990 y su influencia en el medio ambiente (Inédito), Servicio Nacional de Geología y Minería.
- Gupta, S., Eskin, N.1977. Potential use of vegetable rennet in production of cheese. *Food Technology* 31:61-64.
- Hahn, D .L Rooney, L.W. y Earp C.F. 1984. Tannins and phenols of sorghum. *Cereal Food World*. Vol 29 (12): 776-779
- Hsiao, T.C., E. Acevedo, E. Fereres and D.W. Henderson. 1976. Stress metabolism: water stress, growth, and osmotic adjustments. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*. 273:497-500
- INIA. Boletín nacional de análisis de riesgos agroclimáticos para las principales especies frutales y cultivos, y la ganadería noviembre 2014 región de los lagos
- Jaramillo M., 1991. Estudio nutricional de cultivares de sorgo granífero sorghum bicolor (L) moench altos en taninos condensados producidos en Venezuela. Trabajo de grado. Facultad de Agronomía de la UCV, Maracay, Venezuela.
- Luis Muñoz G.
<http://www.elmercurio.com/Campo/Noticias/Redes/2015/02/04/sequia.aspx> 09
de febrero de 2015. Visitada el 18 enero 2016.
- MINAGRI 2015. Evolución de la situación meteorológica, perspectiva estacional y su impacto en la actividad silvoagropecuaria.
- Muñoz, M. 1980. Flora del Parque Nacional Puyehue. Universitaria. Santiago, Chile. 557p.

- Mueller-Harvey, L. (1999). Tannins: their nature and biological significance. In: Secondary plants products. Antinutritional and beneficial actions in animal feeding. (Eds), pp. 17-70. Nottingham University Press (United Kingdom).
- ODEPA 2015. Boletín Sector lácteo: estadísticas de comercio exterior con información a diciembre 2015 Oficina de Estudios y Políticas Agrarias - ODEPA Ministerio de Agricultura, República de Chile.
- ODEPA, 2014. Evolución del consumo aparente de los principales alimentos en Chile (2003 – 2013). Departamento de políticas agrarias.
- ODEPA, 2014. Oficina de Estudios y Políticas Agrarias. Boletín de la Leche.
- Official methods of analysis of AOAC International, 923.03 C.F.R. (1998c).
- Official methods of analysis of AOAC International, 925.09 C.F.R. (1998d).
- Official methods of analysis of AOAC International, 991.20 C.F.R. (1998b).
- Official methods of analysis of AOAC International, 991.43 C.F.R. (1998a).
- Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists” (AOAC, 1990).
- Pérez, P. J. S/F. Establecimiento y manejo de bancos de proteína. SAGARPA-Subsecretaría de Desarrollo Rural-Dirección General de Apoyos para el Desarrollo Rural.
- Pugnaire, F.I., L. Serrano Endolz & J. Pardos. (1994). Constraints by stress on Plant Growth. In: Pessaraki, M. (ed), pp. 247-259. University of Arizona, Tucson, Arizona, USA.
- Reyes, Ramírez, Ramón, 1991. Evaluación y caracterización de los sorgos nacionales utilizados en la elaboración de alimentos balanceados para aves. Trabajo de grado. Facultad de agronomía de la UCV. Maracay, Venezuela.
- Udayarajan, C. 2007. Relating physicochemical characteristics of cheese to its functional performance. Tesis doctoral. (PhD of Philosophy Food Science). Universidad de Wisconsin-Madison, EE.UU. 29pp.

Páginas web visitadas

<http://www.fedeleche.cl/site/index.php/noticias1/1049-expertos-aconsejan-elegir-forrajeras-que-resistan-mejor-las-sequias> (visitada 11 enero 2016).

<http://www.elmercurio.com/Campo/Noticias/Redes/2015/02/04/sequia.aspx> (visitada el 16 enero 2016).

http://www.redagricola.com/sites/default/files/claves_para_programas_exitosos_con_s_creen_duotm_y_photon_50_sg.pdf (visitada el 6 febrero 2016).