



Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos. 5 (1): 043-056. Enero-Junio, 2014
http://www.rvcta.org
ISSN: 2218-4384 (versión en línea)
© Asociación RVCTA, 2014. RIF: J-29910863-4. Depósito Legal: ppi201002CA3536.

Comunicación

Efectos del pH, NaCl, CaCl₂ y la temperatura sobre la fuerza de cuajo de tres coagulantes/cuajos

Effects of pH, NaCl, CaCl₂ and temperature on the rennet strength of three types of coagulant/rennet

Osmar Thomas **Morillo Piña**^{1*}, Pablo José **García Lugo**², Balmore Ruizdael **Guerrero**²,
Carmen Amelia **Borregales Torres**³, José Gonzalo **Barrios**³

¹Fundación Centro de Investigaciones del Estado para la Producción Experimental Agroindustrial (Fundación CIEPE). Av. Principal, Zona Industrial “Agustín Rivero”, Municipio Independencia, San Felipe, Estado Yaracuy, Venezuela.

²Universidad de Los Andes (ULA), Facultad de Ciencias, Departamento de Biología, Laboratorio de Biotecnología de Microorganismos “Sixto David Rojo”. Sector La Hechicera, Estado Mérida, Venezuela.

³Productora de Alimentos Universitaria Lácteos Santa Rosa de la Universidad de Los Andes (ULA). Mérida, Estado Mérida, Venezuela.

*Autor para correspondencia: omorillo@ciepe.gob.ve, osmthom@yahoo.com

Aceptado 29-Mayo-2014

Resumen

El cuajo y los coagulantes juegan un papel fundamental en el proceso de elaboración de queso y su actividad se ve afectada por diversos parámetros tecnológicos. En este sentido se determinó el efecto del pH, concentración de NaCl, CaCl₂ y de la temperatura sobre la fuerza de cuajo de un coagulante microbiano experimental (BIOMI-13), una quimosina recombinante comercial (Maxiren®) y un cuajo comercial de origen animal (BIOVEN), preparados a concentraciones de 0,05 g/mL; 0,0004 g/mL y

0,0008 g/mL, respectivamente. El efecto del pH fue evaluado en un intervalo de 5,0 a 7,5 y la concentración de NaCl y CaCl₂ en la leche entre 0,02 y 0,16 M. El efecto de los iones de Na y Ca en las soluciones enzimáticas fue evaluado entre 0,04 y 0,80 M y la temperatura de incubación entre 20 y 70 °C. Se determinó que los cambios de pH tienen un efecto inversamente proporcional sobre la actividad coagulante de la leche y la máxima actividad fue a pH 5 para los tres coagulantes evaluados. La concentración de NaCl en la leche tuvo un efecto adverso sobre la actividad coagulante, mientras que el incremento de la [CaCl₂] aumentó la actividad alcanzando valores máximos a 0,04 M. La presencia iones de Na en las soluciones enzimáticas tuvo el mismo efecto observado en las pruebas de concentración de NaCl en la leche y se observó un aumento de la actividad relativa conforme se incrementó la concentración de iones de Ca en la solución. Los tres coagulantes/cuajos evaluados exhibieron la máxima fuerza de cuajo a 45 °C y tuvieron una acción catalítica muy específica sobre la leche con una marcada dependencia a los parámetros evaluados, presentando algunas diferencias entre ellos debido posiblemente a la fuente y forma de obtención.

Palabras claves: aspártico proteasas, actividad catalítica, actividad coagulante de la leche, fuerza de cuajo, quimosina.

Abstract

Rennet and coagulants play a fundamental role in the process of cheese making and its activity is affected by various technological parameters. In this sense, the effect of pH, NaCl and CaCl₂ concentration and temperature on the rennet strength of an experimental microbial coagulant (BIOMI-13), a commercial recombinant chymosin (Maxiren®) and commercial animal rennet (BIOVEN) was determined, prepared at concentrations of 0.05 g/mL; 0.0004 g/mL and 0.0008 g/mL, respectively. The effect of the pH was tested in a range from 5.0 to 7.5 and concentration of NaCl and CaCl₂ in milk was evaluated between 0.02 and 0.16 M. The effect of the Na and Ca ions in the enzyme solutions was evaluated between from 0.04 and 0.80 M and incubation temperature between 20 and 70 °C. It was determined that changes in pH have an inverse effect on milk-clotting activity and maximum rennet strength at pH 5 for the three coagulants evaluated. The concentration of NaCl in milk had an adverse effect on milk-clotting activity, while increasing [CaCl₂] increased relative activity peaking at concentration of 0.04 M. The Na ions present in the enzyme solutions had the same effect observed in the tests of NaCl concentration in milk and also was observed that increasing the Ca ions resulted in an increase in relative activity. The three tested coagulant/rennet exhibited high rennet strength at 45 °C and had a very specific catalytic action on milk with a strong dependence on the parameters evaluated, showing some differences between them possibly due to the source and method of production.

Keywords: aspartic proteases, catalytic activity, chymosin, milk-clotting activity, rennet strength.

INTRODUCCIÓN

El cuajo juega un papel fundamental en el proceso de elaboración de queso, tradicionalmente es extraído del cuarto estómago de los terneros entre 10 y 30 días de

nacidos, como mezclas de quimosina (88 a 94 %) y pepsina (6 a 12 %) (Ruiz-Rojas, 2005). Está compuesto principalmente por la enzima quimosina (EC 3.4.23.4), organizada por el Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología

Molecular en la clase hidrolasa (EC 3.), subclase que actúa sobre enlaces peptídicos (peptidasa) (EC 3.4), sub-subclase aspártico endopeptidasa (EC 3.4.23); la cual cataliza la hidrólisis específica de la κ -caseína de la leche en el enlace Ser-Phe¹⁰⁵†Met-Ala (NC-IUBMB, 2013), tiene un peso molecular de 35,6 kDa y un punto isoeléctrico de 4,65 (Mohanty *et al.*, 2003; Kaewphuak, 2011). Su acción hidrolítica es responsable de la desestabilización de los agregados solubles dentro de la leche, dando inicio a la agregación de las micelas desestabilizadas que forman una red tridimensional que va endureciéndose hasta dar lugar al gel definitivo denominada cuajada (Castillo-Zambudio, 2001).

La limitada disponibilidad de estómagos de terneros para la fabricación del cuajo, los problemas asociados con el sacrificio de animales (Jacob *et al.*, 2011) y los altos precios de este producto en el mercado (Merheb-Dini *et al.*, 2012), son algunas de las razones que han generado problemas para satisfacer esta demanda; por lo que ha sido necesaria la introducción de otros coagulantes como sustitutos del tradicional cuajo de ternero, específicamente aspártico proteasas similares a la quimosina de ternero. Un adecuado sustituto debe garantizar altos rendimientos en quesería y productos con características sensoriales aceptables, es decir, debe tener alta capacidad de atacar el enlace peptídico Phe¹⁰⁵†Met¹⁰⁶ de κ -caseína y una baja actividad proteolítica a pH y temperatura de fabricación del queso, además de poseer una termoestabilidad suficientemente baja para asegurar productos de suero de leche sin restos de coagulante activo. Se ha hecho mucho énfasis en introducir coagulantes provenientes de otros rumiantes extraídas de tejido del estómago de cordero (Moschopoulou *et al.*, 2007; Jacob *et al.*, 2011), cabra, búfalo (Kumar *et al.*, 2006; Jacob *et al.*, 2011), cerdo (Houen *et al.*, 1996), entre otros. Pero estos son poco comercializados debido a que su uso está dirigido a la elaboración de variedades de

quesos típicos como el Provolone o Valpadana (Jacob *et al.*, 2011); también están los coagulantes de origen vegetal (Ruiz-Rojas, 2005; Jacob *et al.*, 2011), estos son menos comercializados que los de origen animal, debido a que la relación entre la actividad coagulante y la actividad proteolítica no es lo suficientemente alta para su comercialización, además de exhibir alta especificidad hacia la caseína caprina y ovina, limitando su uso a solo aquellos quesos de regiones específicas del mundo (Raposo y Domingos, 2008) como el Serra da Estrela (Portugal) y Manchego (España) elaborados con coagulantes provenientes de especies de *Cynara* (Prados *et al.*, 2007; Jacob *et al.*, 2011). Otros tipos de coagulantes de leche utilizados como sustitutos del cuajo, son aquellos provenientes de microorganismos. Esto ha generado la evaluación de especies de hongos como el *Aspergillus versicolor* (Abdel-Fattah y Saleh, 1988), *Penicillium oxalicum* (Hashem, 1999), *Rhizopus oryzae* (Kumar *et al.*, 2005), *Mucor circinelloides* (Sathya *et al.*, 2009), *Mucor mucedo* DSM 809 (Yegin *et al.*, 2010), *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 (Merheb-Dini *et al.*, 2012) y *Rhizomucor nainitalensis* (Khademi *et al.*, 2013), entre otros. La especie de bacterias del género *Bacillus* también han sido objeto de estudios (El-Bendary *et al.*, 2007; Shieh *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2013), su aptitud para quesería, acorde a Ruiz-Rojas (2005), es mejor que la de las enzimas vegetales, pero sensiblemente menos satisfactoria que la de las enzimas producidas por los hongos. Este autor afirma que dentro de todos los microorganismos evaluados destacan el *Rhizomucor miehei*, *Rhizomucor pusillus* y *Cryphonectria parasitica*, de los que son extraídas proteasas comercializadas por distintas firmas a nivel mundial. La proteasas de *R. miehei* son las más utilizadas, dando resultados satisfactorios. Fox y McSweeney (1997) y Mistry (2012) han señalado que los coagulantes provenientes de organismos

modificados genéticamente también son utilizados, dado que su uso permite obtener productos similares a la quimosina de ternero, estos han sido comercializados bajo las marcas: Maxiren, secretada por *Kluyveromyces marxianus* var. *lactis* (Gist-Brocades, Países Bajos); Chymogen (Chr. Hansen, Dinamarca) y Chymostar (Rhône-Poulenc; ahora por Danisco), secretadas por *Aspergillus niger* var. *awamori*; y Chy-max, secretada por *Escherichia coli* K-12 (Pfizer, USA; ahora por Chr. Hansen). El producto registrado bajo la marca Marzyme GM por Novo Nordisk A/S (Dinamarca), fue el resultado de expresar el gen de proteasas de *Rhizomucor miehei* en *Aspergillus oryzae*.

Las enzimas coagulantes de la leche tienen una acción catalítica que varía entre los tipos de coagulantes, en gran medida por la fuente de obtención, por lo que se han propuesto diversos métodos donde varían fundamentalmente las condiciones de pH de la leche y temperatura en que se realizan los ensayos, sin embargo, todos ellos se basan en determinar el tiempo que tarda la fase de desestabilización de las micelas de caseína, es decir, tiempo desde el contacto de los coagulantes con la leche hasta la aparición de los primeros coágulos de leche (inicio de la fase de agregación y formación del gel o cuajada), esto es lo que se conoce como fuerza de cuajo (FC), es la medida indirecta de la acción hidrolítica de las aspártico proteasas sobre las moléculas de κ -caseína. Independientemente del origen, la FC se ve afectada por diversos factores, tales como, la composición química de la leche principalmente por el contenido de proteína, esta varía entre las especies de animales de origen. La fracción de las proteínas que intervienen en la elaboración de los quesos pertenece al grupo de proteínas insolubles llamadas caseína entera, formadas por α -caseína, β -caseína, ν -caseína y κ -caseína, esta última es la responsable de la formación de agregados solubles dentro de la leche, tiene la forma de una partícula coloidal conformada por caseína agregada envuelta en una molécula de

κ -caseína soluble (Park *et al.*, 2007). Otras características de la leche que afectan la acción catalítica son la concentración de fosfato cálcico coloidal (CCP), relación Ca/(fosfato + citrato), relación Ca/nitrógeno, concentración de caseína, dimensión de las micelas, presencia/ausencia de mastitis y presencia/ausencia de calostros (Castillo-Zambudio, 2001). Además de las características físico-químicas de la leche, existen otros factores que afectan la actividad catalítica de las enzimas coagulantes, denominadas factores tecnológicos asociados al proceso de elaboración de queso: temperatura, concentración, tipo de enzima, adición de cloruro de calcio (CaCl_2), pH de la leche y la concentración de NaCl (Castillo-Zambudio, 2001; Awad, 2007). Estos factores pueden modificar la cinética de la hidrólisis de las enzimas coagulantes de la leche provocando cambios en la firmeza del gel (textura de la cuajada), bajos rendimientos, pueden intensificar la actividad proteolítica y disminuir la especificidad originando la aparición de sabores extraños y en general características sensoriales no deseadas en los quesos (Cavalcanti *et al.*, 2004; Kumar *et al.*, 2006; Awad, 2007). En este sentido es imprescindible conocer el efecto de estos parámetros sobre la fuerza de los cuajos y coagulantes empleados en la elaboración de quesos. Bajo esta premisa, se presenta la evaluación del efecto del pH, concentración de iones de Na^+ y Ca^{2+} y de la temperatura, sobre la fuerza de cuajo de los coagulantes: BIOMI-13, microbiano experimental producido por una cepa de *Rhizomucor* spp.; Maxiren®, microbiano comercial proveniente de organismos modificados; y BIOVEN, un cuajo comercial de origen animal.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron tubos de ensayo de capacidad 12 mL, marca PYREX® (Corning Incorporated, Corning, NY, USA) y las incubaciones se realizaron en un baño

termostatizado con agitación marca Grant, modelo GLS400 (Grant Instruments Ltd, Shepreth, Cambridgeshire, UK).

Cuajo y coagulantes

Se utilizó un coagulante de leche microbiano liofilizado producido por cultivo sumergido de una cepa de *Rhizomucor* spp. (BIOMI-13) de la colección de cultivos del Laboratorio de Biotecnología de Microorganismos “Sixto David Rojo” de la Universidad de Los Andes (Estado Mérida, Venezuela). Una quimosina recombinante (coagulante de organismo modificado) comercial marca Maxiren®, producida por *Kluyveromyces lactis* (DSM Food Specialties B.V. - Gist-Brocades) y un cuajo de origen animal marca BIOVEN provisto por la Productora de Alimentos Universitaria Lácteos Santa Rosa de la Universidad de Los Andes (Estado Mérida, Venezuela).

Se utilizó como sustrato leche descremada Difco™ Skim Milk (Becton, Dickinson and Company, New Jersey, USA - Difco™ Laboratories, Inc., Michigan, USA) y para la incorporación de iones, cloruro de sodio (NaCl) y cloruro de calcio (CaCl₂) grado analítico.

Preparación de las soluciones de cuajo y coagulantes

Se prepararon 3 soluciones enzimáticas, una a partir del coagulante microbiano experimental BIOMI-13 a concentración de 0,05 g/mL, una con el coagulante microbiano comercial Maxiren® a 0,0004 g/mL y otra con el cuajo comercial de origen animal BIOVEN a 0,0008 g/mL, preparadas con agua destilada. Las 3 concentraciones fueron seleccionadas en función al tiempo de coagulación, comprendido entre 60 y 120 segundos, esto permitió obtener registros precisos del tiempo de aparición de los primeros coágulos durante la determinación de la FC.

Determinación de la fuerza de cuajo

La actividad coagulante de la leche, se midió por el método comentado por Osorio *et al.* (2008); consistió en tomar el tiempo que tarda en coagular una muestra de 5,0 mL de leche descremada (al 10 % en CaCl₂ 0,01 M) al adicionarle 0,5 mL de sobrenadante del cultivo proveniente de la fermentación. Esta determinación se logra haciendo rotar de manera manual las muestras en un baño de maría a temperatura de 37 °C. La lectura del tiempo de coagulación se hace justo cuando el aspecto de la película de leche sobre la pared interna del tubo de ensayo cambia de fluido laminar a viscoso formándose pequeños grumos. La actividad enzimática se expresó como la fuerza de cuajo (FC) definida como la cantidad de leche cuajada en mililitros por gramo o mililitro de sobrenadante del cultivo en 40 minutos a 37 °C y se calculó mediante la Ec. 1:

$$\text{Ecuación (1)} \quad FC = \frac{V \cdot 2400}{C \cdot t}$$

Donde:

FC : fuerza de cuajo

V : cantidad de leche, mL

2400: tiempo en que normalmente cuaja la leche a 37 °C con un cuajo estándar, s.

C : cantidad de sobrenadante del cultivo, mL

t : tiempo de coagulación de la muestra, s

Determinación del efecto del pH, concentraciones de iones de Na, Ca y la temperatura

A cada solución enzimática se le determinó la fuerza de cuajo (FC) bajo condiciones estándar del método comentado por Osorio *et al.* (2008) y bajo diferentes valores de pH, concentraciones de iones de Na, Ca y de temperatura en la leche. A continuación se describen las pruebas realizadas:

El efecto del pH de la leche fue evaluado en un intervalo de 5,0 a 7,5. La leche descremada fue preparada al 10 % y CaCl_2 0,01 M en buffer de fosfato de sodio a 20 mM para el intervalo de pH 5,0 - 5,5 y en buffer Tris-HCL a 20 mM para el intervalo de pH 6 - 7,5.

Para evaluar el efecto de la concentración de iones de Na y Ca en la leche, se preparó leche descremada al 10 % y CaCl_2 0,01 M en agua destilada y adicionalmente se agregó NaCl para obtener concentraciones de 0,02; 0,04; 0,06; 0,08; 0,10; 0,12; 0,16 M y una muestra sin Na. El CaCl_2 fue agregado en las mismas proporciones descritas para las pruebas con Na; adicionalmente se preparó una muestra sin Ca y otra con 0,01 M de concentración.

Para determinar el efecto de los iones de Na y Ca en las soluciones enzimáticas, a cada una de ellas se agregó NaCl para obtener concentraciones de 0,04; 0,08; 0,12; 0,16; 0,24; 0,40 y 0,80 M. Para el CaCl_2 , las soluciones fueron preparadas en el mismo orden de concentraciones descritas para el Na. Posteriormente, a cada solución enzimática preparada se le determinó la fuerza de cuajo.

En el caso de la temperatura, el efecto fue determinado preparando muestras de leche descremada al 10 % en una solución de CaCl_2 0,01 M. Cada determinación de fuerza de cuajo se realizó a diferentes temperaturas de incubación de la reacción: 20, 25, 30, 37, 40, 45, 50, 60 y 70 °C.

Expresión de los resultados

Los resultados fueron expresados en términos de la actividad relativa (AR), la cual se estima según la Ec. 2, tomando como referencia la fuerza de cuajo determinada a 37 °C según el método comentado por Osorio *et al.* (2008).

Ecuación (2):

$$AR = \frac{FC_{\text{parámetro modificado}}}{FC_{\text{método Osorio}}} \times 100$$

Donde:

AR : actividad relativa expresada en porcentaje
 $FC_{\text{parámetro modificado}}$: fuerza de cuajo determinada a la condición a evaluar

$FC_{\text{método Osorio}}$: fuerza de cuajo determinada según el método estándar comentado por Osorio *et al.* (2008)

Cada determinación de AR fue estimada por triplicado y promediada para graficarla por separado en función a las variables pH, concentraciones de NaCl, CaCl_2 y temperatura, según fue el caso.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Fuerza de cuajo (FC) bajo condiciones estándar

En el Cuadro 1 se muestran los valores de la fuerza de cuajo de cada solución enzimática preparada a las concentraciones descritas en la metodología. Fueron determinadas bajo las condiciones estándar del método seleccionado y servirán de referencia para el cálculo de la actividad relativa (AR) bajo las demás condiciones de estudio.

Cuadro 1.- Actividad coagulante de las soluciones enzimáticas evaluadas.

Solución enzimática cuajo/coagulante	FC \pm D. S.
BIOMI-13	260,87 \pm 0,23
Maxiren®	213,34 \pm 0,91
BIOVEN	195,95 \pm 0,50

FC: fuerza de cuajo. D. S.: desviación estándar.

La actividad registrada por cada solución enzimática está asociada a las concentraciones a las que fueron preparadas, debido a que permite tiempos de lectura promedio de 122, 112,5 y 92 segundos de

tiempo de coagulación para BIOVEN, Maxiren® y BIOMI-13, respectivamente. Tiempo suficiente para las determinaciones de la FC en las evaluaciones que se discuten a continuación.

Factores que afectan la actividad coagulante de la leche en los cuajos

Efectos del pH

Se determinó que los cambios de pH tienen un efecto inversamente proporcional sobre la actividad coagulante de la leche del cuajo y coagulantes evaluados, tal como se observa en la Fig. 1. La mayor sensibilidad a los cambios de pH fue para el cuajo comercial de origen animal (BIOVEN), que registró una AR de 225 % a pH 5 y de 36,1 % a pH 7,5.

Mientras que el menor efecto se observó sobre el coagulante microbiano experimental BIOMI-13, alcanzando 165,79 % a pH 5,0; descendiendo proporcionalmente hasta registrar 54,99 % de la AR a pH 7,5. El coagulante microbiano comercial Maxiren®, registró valores similares al microbiano experimental (BIOMI-13).

Foda *et al.* (2012) observaron que a pH mayores a 5, la actividad de coagulación de la leche expresada como actividad relativa (AR) de enzimas producidas por *Rhizomucor miehei* NRRL 2034 bajo fermentación en estado sólido, disminuyó hasta alcanzar 40 % a pH 7. En la coagulación de la leche, entre tipos de cuajos y coagulantes, la dependencia del pH de las enzimas empleadas es diferente (Harboe *et al.*, 2010).

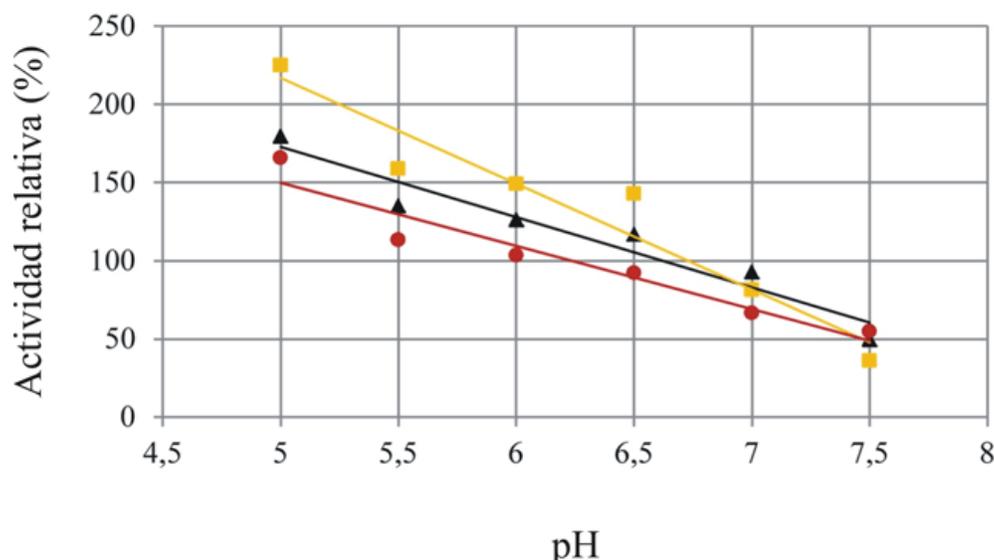


Figura 1.- Efectos del pH sobre la fuerza de cuajo de los coagulantes ▲Maxiren®, ■BIOVEN y ●BIOMI-13, determinados en muestras de leche descremada al 10 % y $[CaCl_2]$ de 0,01 M, incubadas a 37 °C.

Efectos de la concentración de NaCl y $CaCl_2$ en la leche

La concentración de iones de sodio en la leche tuvo un efecto adverso sobre la actividad

coagulante de la leche (Fig. 2), fue inversamente proporcional a la concentración de NaCl en la leche, disminuyendo hasta valores de ≈ 60 % de AR para el coagulante microbiano experimental (BIOMI-13) y ≈ 40 %

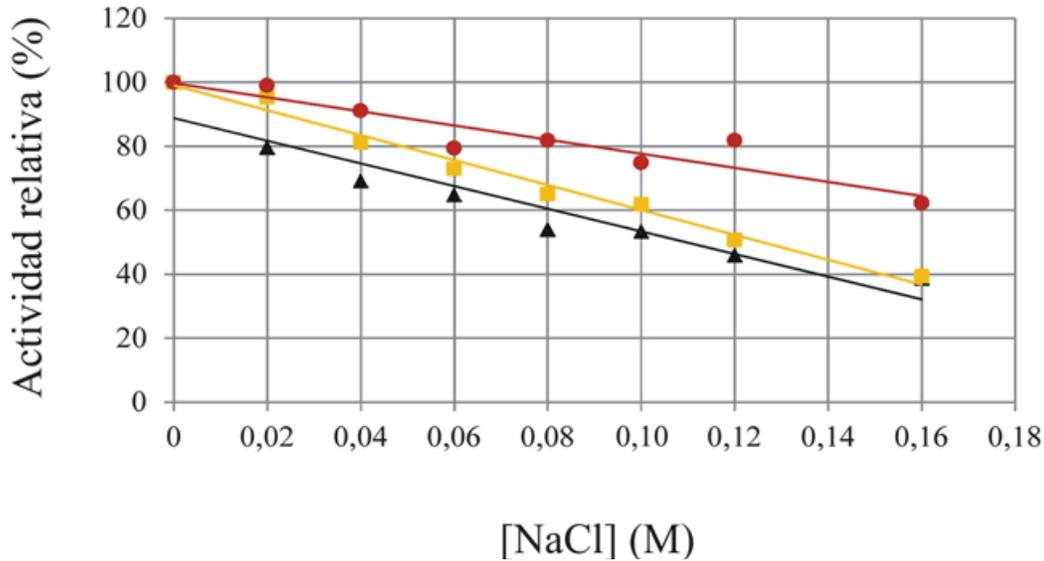


Figura 2.- Efectos de la [NaCl] en la leche sobre la fuerza de cuajo de los coagulantes ▲Maxiren®, ■BIOVEN y ●BIOMI-13, determinados en muestras de leche descremada al 10 % y [CaCl₂] de 0,01 M, incubadas a 37 °C.

para los comerciales (Maxiren® y BIOVEN) a concentración de 0,16 M.

Inhibición progresiva de la AR por incremento de la concentración de NaCl, desde ≈ 100 % (a concentración de ≈ 3 % de NaCl) hasta ≈ 40 % (a concentraciones de 9 hasta 12 % de NaCl) fue estimada por Foda *et al.* (2012) para enzimas producidas por *R. miehei* NRRL 2034. Harboe *et al.* (2010) sostienen que la adición de NaCl se limita a < 0,5 g/100 g; ya que aumenta la formación de cuajada, mientras que a concentraciones mayores tiene un efecto contrario. Por otra parte, la sensibilidad de las enzimas de coagulación de la leche de varias fuentes al NaCl no es la misma (Foda *et al.*, 2012). Ramet (2001) describe que el efecto del NaCl en leche de vaca no es el mismo en presencia de diferentes tipos de enzimas de coagulación de la leche y agrega que, en leche de *Camelus dromedarius*, la pepsina bovina parece ser menos sensible al NaCl que el cuajo de ternera, particularmente a altas concentraciones de la sal.

En la Fig. 3 se observa el aumento en la

FC al incrementar el contenido CaCl₂ en la leche, alcanzando valores máximos de AR de 310 % para BIOVEN y 264 % para Maxiren® a concentración de 0,04 M. El coagulante microbiano experimental (BIOMI-13) solo alcanzó una actividad relativa máxima de 140 %, a la misma concentración, mostrando menor sensibilidad al incremento de las concentraciones de Ca en la leche. En las muestras de leche sin adición de calcio, se observó una baja significativa en la FC de ambos coagulantes comerciales (Maxiren® y BIOVEN), mientras que el coagulante microbiano experimental (BIOMI-13) no mostró una dependencia tan marcada.

Similar comportamiento al de la Fig. 3 fue apreciado por Foda *et al.* (2012), quienes mostraron que la AR fue mayor con la adición de CaCl₂ a concentración de 0,05 M; y que, mayores concentraciones resultaron en una marcada disminución en la actividad de coagulación de la leche, la cual se redujo a 37,5 % a concentración 0,2 M de CaCl₂. Asimismo, incrementos de las concentraciones de CaCl₂ de

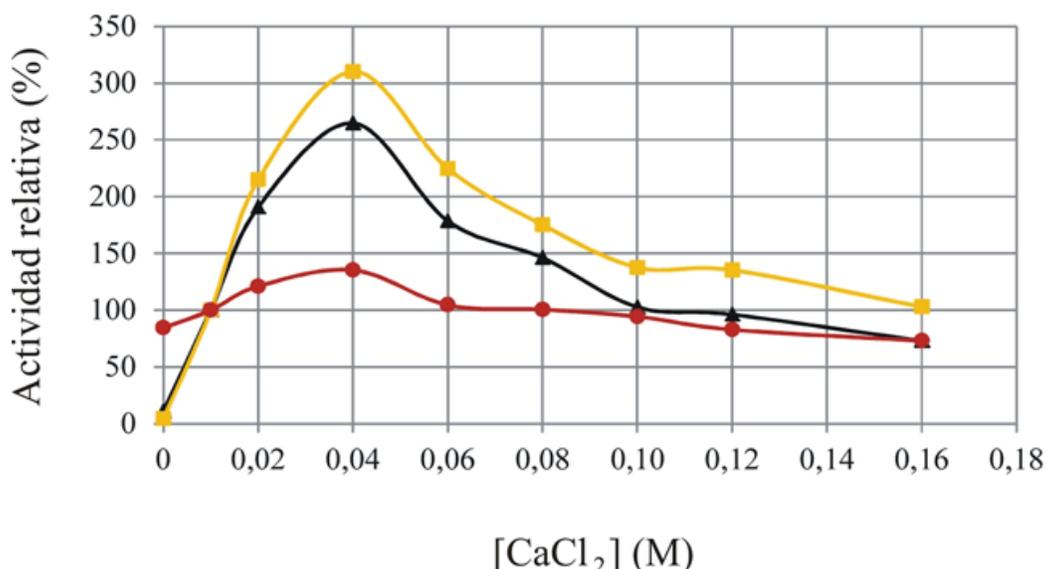


Figura 3.- Efectos de la $[CaCl_2]$ en la leche sobre la fuerza de cuajo de los coagulantes \blacktriangle Maxiren®, \blacksquare BIOVEN y \bullet BIOMI-13, determinados en muestras de leche descremada al 10 % e incubadas a 37 °C.

10 a 50 mM produjeron incrementos de la actividad de coagulación de la leche, cuando fue utilizada una proteasa extraída de flores de *Scolymus maculatus* en leche descremada (Benchiheub *et al.*, 2014).

Es conocido que el Ca^{+2} combinado con la ρ -caseína forma firmes coágulos durante la segunda fase del proceso de coagulación. La adición de $CaCl_2$ durante la coagulación de la leche reduce el tiempo e incrementa la tasa de coagulación (El-Bendary *et al.*, 2007; Mohamed *et al.*, 1988 y Balcones *et al.*, 1996 cp Ahmed y Helmy, 2012).

Efectos de la concentración de NaCl y $CaCl_2$ en las soluciones enzimáticas

La presencia iones de sodio en las soluciones enzimáticas tuvo el mismo efecto adverso sobre la actividad coagulante de la leche (Fig. 4) describiendo la misma tendencia que la observada en las pruebas de concentración de Na en la leche; sin embargo, el coagulante microbiano comercial Maxiren® presentó menor sensibilidad a los niveles de Na en las solución enzimática en comparación con

el cuajo comercial de origen animal BIOVEN, contrario a lo ocurrido en las pruebas de leche.

En la Fig. 5 se observa el aumento de la actividad relativa conforme se incrementó la concentración de $CaCl_2$ en las soluciones enzimáticas, sin embargo, los valores máximos alcanzados por los coagulantes comerciales (Maxiren® y BIOVEN) estuvieron por debajo de los obtenidos en las prueba de Ca en leche, en especial para el Maxiren® que solo alcanzó ≈ 150 % de AR, mientras que a concentraciones de 0,80 M, la AR del cuajo comercial BIOVEN fue inhibida casi en totalidad.

En el caso del coagulante microbiano experimental (BIOMI-13), mostró un aumento de la actividad por encima de los comerciales y mayor que el registrado en las pruebas de Ca en leche, alcanzando aproximadamente una AR de 250 % a concentraciones en el intervalo 0,40 M - 0,80 M.

Estos resultados podrían sugerir que la presencia de Ca en las soluciones enzimáticas induce algún tipo de modificaciones en las enzimas coagulantes contenidas en el cuajo microbiano que podría ser de tipo estructural o de modificaciones en el sitio activo.

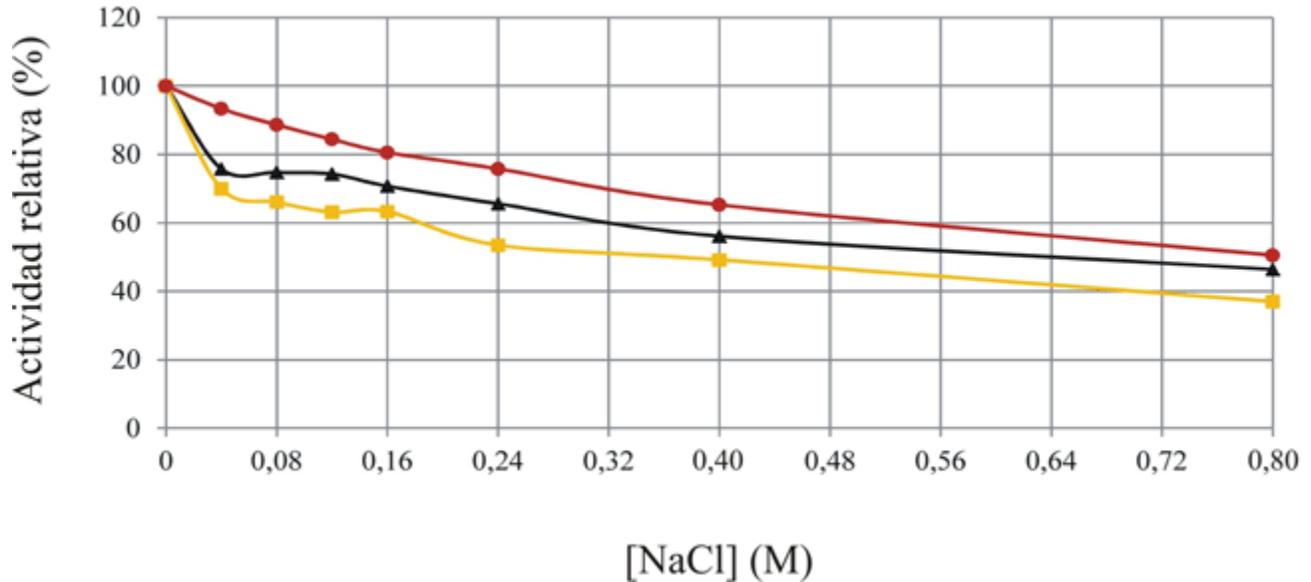


Figura 4.- Efectos de la [NaCl] en las soluciones enzimáticas sobre la fuerza de cuajo de los coagulantes ▲Maxiren®, ■BIOVEN y ●BIOMI-13, determinados en muestras de leche descremada al 10 % y [CaCl₂] de 0,01 M, incubadas a 37 °C.

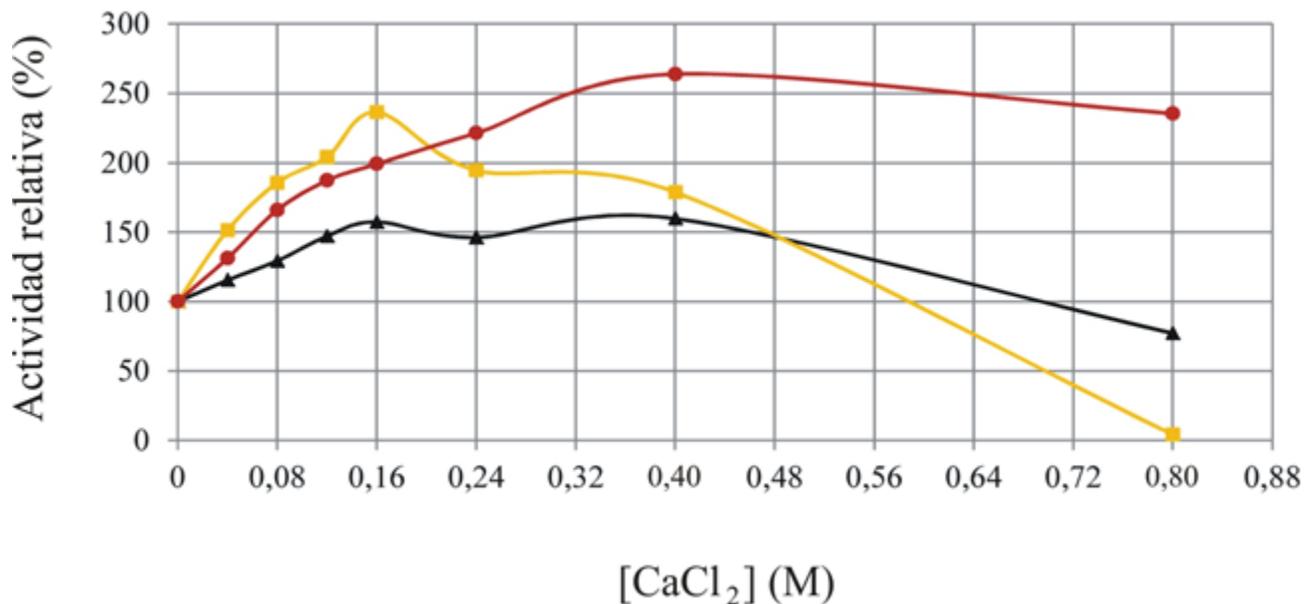


Figura 5.- Efectos de la [CaCl₂] en las soluciones enzimáticas sobre la fuerza de cuajo de los coagulantes ▲Maxiren®, ■BIOVEN y ●BIOMI-13, determinados en muestras de leche descremada al 10 % y [CaCl₂] de 0,01 M, incubadas a 37 °C.

Ahmed y Helmy (2012) evaluaron el efecto de los iones Mn^{+2} , Ca^{+2} , Mg^{+2} , Zn^{+2} , Fe^{+2} y Cu^{+2} , en las preparaciones enzimáticas de coagulantes provenientes de *Bacillus licheniformis* y *Aloe variegata*, demostrando que el Mn^{+2} , Ca^{+2} , Zn^{+2} y el Fe^{+2} tuvieron un efecto activador sobre ambos coagulantes. Un estudio similar fue publicado por El-Tanboly *et al.* (2013), donde demostraron que al aumentar las concentraciones de iones de Ca durante la coagulación de la leche (mezcla de reacción) con una enzima de *Mucor pusillus* QM 436 incrementó la actividad coagulante, al igual que el Mg^{+2} y el Fe^{+3} , mientras los iones Mn^{+2} y Zn^{+2} no tuvieron un efecto significativo sobre el mencionado coagulante.

Efectos de la temperatura de incubación (coagulación)

De acuerdo al gráfico de la Fig. 6, los 3 coagulantes evaluados exhibieron la máxima AR a 45 °C (160 % para Maxiren® y BIOVEN y 200 % para BIOMI-13). El coagulante

microbiano experimental BIOMI-13 conservó más del 50 % de la actividad a temperatura de 70 °C y los 2 comerciales fueron casi totalmente inhibidos.

Foda *et al.* (2012) para un coagulante producido por *Rhizomucor miehei*, observaron incremento progresivo de la actividad coagulante de la leche al aumentar la temperatura de incubación, alcanzando la máxima AR a 60 °C, resultado mayor a los obtenidos para los coagulantes evaluados en este trabajo. Entre tipos de coagulantes, algunos no influyen significativamente en la proteólisis secundaria (Sheehan *et al.*, 2004), coagulantes en la producción de quesos donde la gelificación tiene lugar a baja temperatura, mientras que a temperaturas más altas puede ocurrir proteólisis excesiva afectando negativamente la textura y el sabor de los quesos (Esteves *et al.*, 2003). La termoestabilidad del coagulante microbiano experimental (BIOMI-13) implica posibles problemas por efecto de proteólisis secundarias en quesos en etapa de maduración.

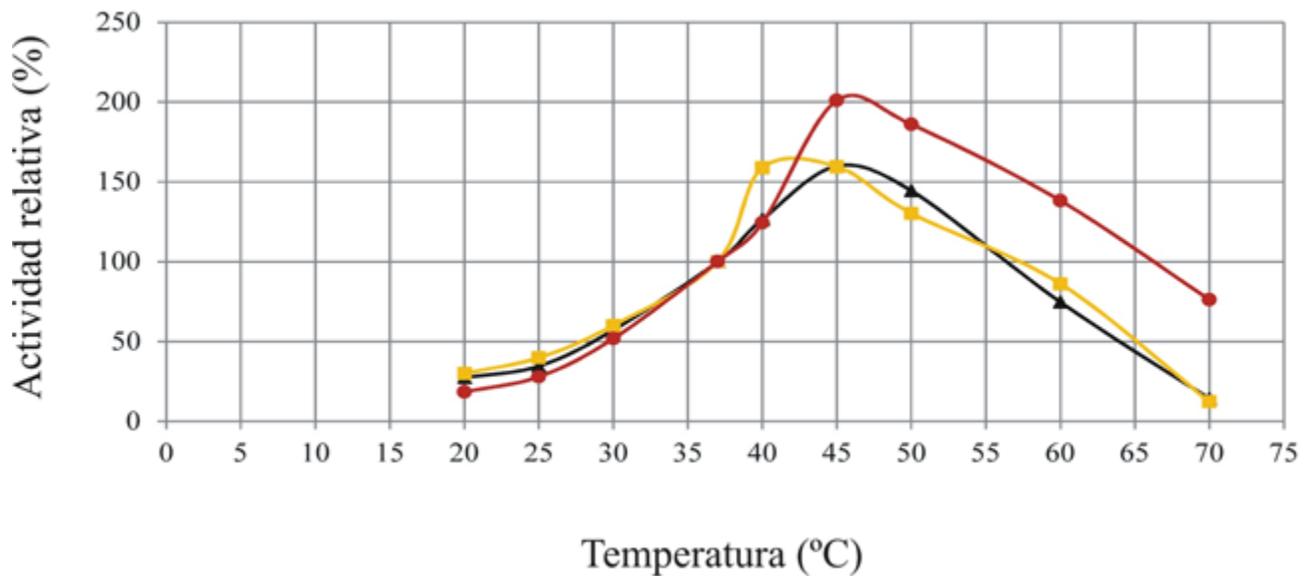


Figura 6.- Efectos de la temperatura de incubación sobre la fuerza de cuajo de los coagulantes ▲Maxiren®, ■BIOVEN y ●BIOMI-13, determinados en muestras de leche descremada al 10 % y $[CaCl_2]$ de 0,01 M.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIÓN

- El cuajo y coagulantes evaluados tuvieron una acción catalítica muy específica sobre la leche con una marcada dependencia al pH, concentraciones de iones de Na, Ca y temperaturas como era de esperarse, presentando algunas diferencias entre ellos debido posiblemente a la fuente y forma de obtención.
- El cuajo comercial de origen animal (BIOVEN) y el coagulante microbiano comercial (Maxiren®) mostraron mayor sensibilidad a los cambios de los parámetros evaluados y similitud entre ellos, excepto en el pH, donde Maxiren® registró valores similares al coagulante microbiano experimental (BIOMI-13) y ambos menor sensibilidad.
- El coagulante microbiano experimental (BIOMI-13) presentó mayor sensibilidad a la presencia de Ca en solución y mayor estabilidad térmica.
- Es necesario evaluar con ensayos de mayor amplitud para el coagulante microbiano experimental (BIOMI-13), los efectos del Ca en la solución enzimática y de estabilidad térmica observados.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Fundación CIEPE (Estado Yaracuy, Venezuela), al Laboratorio de Biotecnología de Microorganismos “Sixto David Rojo” de la Universidad de Los Andes (ULA) y a la Productora de Alimentos Universitaria Lácteos Santa Rosa de la ULA (Estado Mérida, Venezuela) por el apoyo brindado durante la ejecución de este trabajo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdel-Fattah, Ahmed F. and Saleh, Soad A. 1988. Properties of milk-clotting enzyme from *Aspergillus versicolor* and isolation of rennin-like enzyme. *Biological Wastes*. 25(2):109-115.
- Ahmed, S.A. and Helmy, W.A. 2012. Comparative evaluation of *Bacillus licheniformis* 5A5 and *Aloe variegata* milk-clotting enzymes. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*. 29(1):69-76.
- Awad, Sameh. 2007. Effect of sodium chloride and pH on the rennet coagulation and gel firmness. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie (LWT) - Food Science and Technology*. 40(2):220-224.
- Benchiheub, Meriem; Benkahoul, Malika; Bellil, Ines and Mechakra-Maza, Aicha. 2014. Milk-clotting properties and specific hydrolysis of caseins of the acid protease extracted from *Scolymus maculatus* flowers. *International Journal of Advanced Research*. 2(1):357-365.
- Castillo-Zambudio, Manuel. 2001. Predicción del tiempo de corte en la elaboración de queso mediante dispersión de radiación de infrarrojo próximo. Tesis Doctoral. Departamento de Tecnología de Alimentos, Nutrición y Bromatología, Facultad de Veterinaria, Universidad de Murcia, Murcia, España. pp. 62, 68.
- Cavalcanti, M.T.H.; Teixeira, M.F.S.; Lima-Filho, J.L. and Porto, A.L.F. 2004. Partial purification of new milk-clotting enzyme produced by *Nocardiosis* sp. *Bioresource Technology*. 93(1):29-35.
- El-Bendary, Magda A.; Moharam, Maysa E. and Ali, Thanaa H. 2007. Purification and characterization of milk clotting enzyme produced by *Bacillus sphaericus*. *Journal of Applied Sciences Research*. 3(8):695-699.
- El-Tanboly, El-Sayed; El-Hofi, Mahmoud; Youssef, Youssef Bahr; El-Desoki, Wahed

- and Ismail, Azza. 2013. Utilization of salt whey from Egyptian Ras (Cephalotyre) cheese in microbial milk clotting enzymes production. *Acta Scientiarum Polonorum, Technologia Alimentaria*. 12(1):9-20.
- Esteves, Cristina L.C.; Lucey, John A.; Hyslopa, Douglas B. and Pires, Euclides M.V. 2003. Effect of gelation temperature on the properties of skim milk gels made from plant coagulants and chymosin. *International Dairy Journal*. 13(11):877-885.
- Foda, Mohamed S.; Moharam, Maysa E.; Ramadan, Amal and El-Bendary, Magda A. 2012. Over production of milk clotting enzyme from *Rhizomucor miehei* through adjustment of growth under Solid state fermentation conditions. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*. 6(8):579-589.
- Fox, P.F. and McSweeney, P.L.H. 1997. Rennets: their role in milk coagulation and cheese ripening. In *Microbiology and biochemistry of cheese and fermented milk*. (pp. 9, 10). London, UK: Chapman & Hall.
- Harboe, M.; Broe, M.L. and Qvist, K.B. 2010. The production, action and application of rennet and coagulants. In *Technology of cheesemaking*. (2nd. ed.). (pp. 98-129). United Kingdom: Wiley-Blackwell.
- Hashem, Amal M. 1999. Optimization of milk-clotting enzyme productivity by *Penicillium oxalicum*. *Bioresource Technology*. 70(2):203-207.
- Houen, Gunnar; Madsen, Mads T.; Harlow, Kenneth W.; Lønblad, Peter and Foltmann, Bent. 1996. The primary structure and enzymic properties of porcine prochymosin and chymosin. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 28(6):667-675.
- Jacob, Mandy; Jaros, Doris and Rohm, Harald. 2011. Recent advances in milk clotting enzymes. *International Journal of Dairy Technology*. 64 (1):14-33.
- Kaewphuak, Sasitorn. 2011. Characterization of milk-clotting enzymes from bacteria isolated from fish sauce fermentation. Master Thesis. Suranaree University of Technology, Thailand.
- Khademi, F.; Abachi, S.; Mortazavi, A.; Ehsani, M.A.; Tabatabaei, M.R. and Malekzadeh, F.A. 2013. Optimization of fungal rennet production by local isolate of *Rhizomucor nainitalensis* under solid substrate fermentation system. *IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences*. 5(2):115-121.
- Kumar, Ashwani; Sharma, Jitender; Mohanty, Ashok Kumar; Grover, Sunita and Batish, Virender Kumar. 2006. Purification and characterization of milk clotting enzyme from goat (*Capra hircus*). *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B: Biochemistry and Molecular Biology*. 145(1):108-113.
- Kumar, Sushil; Sharma, Neeru S.; Saharan, Mukh R and Singh, Randhir. 2005. Extracellular acid protease from *Rhizopus oryzae*: purification and characterization. *Process Biochemistry*. 40(5):1701-1705.
- Merheb-Dini, Carolina; Gomes E.; Boscolo M. and Da Silva, R. 2012. Use of a new milk-clotting protease from *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 as coagulant and changes during ripening of Prato cheese. *Food Chemistry*. 130(4):859-865.
- Mistry, V.V. 2012. Chymosin in cheese making. In *Food Biochemistry and Food Processing*. (pp. 225). Ames, Iowa, USA: Wiley-Blackwell.
- Mohanty, Ashok K.; Mukhopadhyay, Utpal K.; Kaushik, Jai K.; Grover, Sunita and Batish, Virender K. 2003. Isolation, purification and characterization of chymosin from riverine buffalo (*Bubalus bubalis*). *Journal of Dairy Research*. 70(1):37-43.
- Moschopoulou, E.; Kandarakis, I. and

- Anifantakis, E. 2007. Characteristics of lamb and kid artisanal liquid rennet used for traditional Feta cheese manufacture. *Small Ruminant Research*. 72(2-3):237-241.
- NC-IUBMB. 2013. Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology. Enzyme nomenclature. Recommendations. EC 3. Hydrolase nomenclature. <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC3/>
- Osorio, Adriana; Gómez, Natalia y Sánchez, Claudia. 2008. Evaluación de diferentes fuentes de carbono y de nitrógeno para la producción de renina a partir del moho *Mucor miehei*. *Revista Facultad de Ingeniería, Universidad de Antioquia*. 45:17-26.
- Park, Y.W.; Juárez, M.; Ramos, M. and Haenlein, G.F.W. 2007. Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk. *Small Ruminant Research*. 68(1-2):88-113.
- Prados, Francisco; Pino, Antonio and Fernández-Salguero, José. 2007. Effect of a powdered vegetable coagulant from cardoon *Cynara cardunculus* in the accelerated ripening of Manchego cheese. *International Journal of Food Science & Technology*. 42(5):556-561.
- Ramet, J.P. 2001. The technology of making cheese from camel milk (*Camelus dromedarius*). *FAO Animal Production and Health Paper*, N° 113. Rome.
- Raposo, Sara and Domingos, Ana. 2008. Purification and characterization milk-clotting aspartic proteinases from *Centaurea calcitrapa* cell suspension cultures. *Process Biochemistry*. 43(2):139-144.
- Ruiz-Rojas, José. 2005. Extracción y caracterización de proteasas de especies vegetales nativas y su potencial utilización en quesería. Tesis. Escuela de Ingeniería en Alimentos, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile.
- Sathya, R.; Pradeep, B.V.; Angayarkanni, J. and Palaniswamy, M. 2009. Production of milk clotting protease by a local isolate of *Mucor circinelloides* under SSF using agro-industrial wastes. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 14(6):788-794.
- Sheehan, Jeremiah J.; O'Sullivan, Kathleen and Guinee, Timothy P. 2004. Effect of coagulant type and storage temperature on the functionality of reduced-fat Mozzarella cheese. *Lait*. 84(6):551-566.
- Shieh, Chwen Jen; Phan-Thi, Lan Anh and Shih, Ing Lung. 2009. Milk-clotting enzymes produced by culture of *Bacillus subtilis* natto. *Biochemical Engineering Journal*. 43(1):85-91.
- Wu, Fang Chen; Chang, Chen Wei and Shih, Ing Lung. 2013. Optimization of the production and characterization of milk clotting enzymes by *Bacillus subtilis* natto. *SpringerPlus*. 2:33(31 January).
- Yegin, Sirma; Fernández-Lahore, Marcelo; Guvenc, Ulgar and Goksungur, Yekta. 2010. Production of extracellular aspartic protease in submerged fermentation with *Mucor mucedo* DSM 809. *African Journal of Biotechnology*. 9(38):6380-6386.