

Capacidad coagulante del extracto enzimático crudo de *Rhizomucor miehei* sobre leche de vaca.

Castañon-Camarena, H^a*, Vásquez-Arroyo, J^a.

^a Universidad Juárez del Estado de Durango. Facultad de Ciencias Químicas. Av. Artículo 123 s/n. Fracc. Filadelfia, C.P. 35015, Gómez Palacio, Durango, México. hram.castanoncamarena@gmail.com

RESUMEN:

La coagulación de la leche es de alto interés mundial debido a que se producen 19 millones de toneladas de queso por año, el coagulante por excelencia ha sido la renina, el cual es tejido abomaso caprino, sin embargo, el sacrificio animal no cubre la demanda del producto lácteo en cuestión. Los estudios en torno a las alternativas de coagulantes han ido creciendo, comprobando que las enzimas de origen vegetal no son específicas y las de origen microbiano son las más viables. Se pretende encontrar una eficiencia de enzimas proteolíticas provenientes de *Rhizomucor miehei* que logre, al fin, sustituir a la renina superándolo en producción, fuerza de cuajo e incluso en costos. La actividad coagulante se le determina a extractos enzimáticos sin purificar producidos por medios de cultivo fermentativos en estado líquido. Asimismo, se determina capacidad productiva, índice de actividad coagulante así como las actividades proteolítica y específica. El ensayo de coagulación, para evaluar la capacidad coagulante de la enzima, se realiza a extractos crudos con 15, 16 y 20 días en fermentación. Los resultados preliminares sugieren que a los 20 días es ideal (FC=618.73) para la obtención de cuajada..

Palabras clave:

Coagulación, leche, capacidad coagulante, *Rhizomucor miehei*, enzimas proteolíticas, actividad proteolítica.

ABSTRACT:

Milk clotting is worldwide important because every year cheese production is of 19 million tons. The most common coagulant used in cheese industry is the rennet which is goat abomasal tissue, nevertheless, animal sacrifice is not enough in order to achieve cheese production throughout the world. Studies related with alternatives of milk clotting have been increasing, and those studies have indicated that vegetal enzymes are not specific, unlike microbial enzymes, which are the best option. This study intends to find the best performance and efficiency of proteolytic enzymes from *Rhizomucor miehei* trying to, finally, overcome the implementation of rennet on cheese production, clotting force's efficiency and even in production cost. Coagulant activity is determined onto crude enzymatic extracts produced by liquid fermentative growth mediums. Moreover, productive capacity, coagulant activity index, proteolytic and specific activity are determined. The milk clotting essay, which evaluates enzymes' clotting activity, is made to crude extracts with 15, 16, and 20 days in fermentation. Preliminary results suggest that 20 days (CF=618.73) is the best treatment to curd obtention..

Keywords:

Clotting, milk, *Rhizomucor miehei*, coagulant capacity, proteolytic enzymes, proteolytic activity

Área: Microbiología y Biotecnología

INTRODUCCIÓN

La leche se puede definir como la secreción natural proveniente de las glándulas mamarias de especies domésticas, en algunos casos se utiliza como producto de consumo humano (DOF, 2002), en este caso proviene de la vaca. Se estima que la población mundial consume anualmente cerca de 500 millones de toneladas en equivalente leche en diversas presentaciones para alimento humano (SE, 2012).

La importancia de los productos lácteos es tanta que el queso, producto de la coagulación láctica, es consumido en una totalidad de 19 millones de toneladas cada año, es decir, el 35 % de la producción mundial de leche va destinada al queso. Se estima que existe tanta variedad de productos lácteos que se han identificado más de 2000 variedades de queso, lo cual nos habla de la gran demanda e importancia de los productos de esta índole (Badgular y Mahajan 2014; Nasr *et al.*, 2016; Fox *et al.* 2017).

La coagulación de la leche consiste en la desnaturalización, mediante una proteólisis, de la k-caseína, fosfoproteína presente como conglomerado coloidal, la proteína sufre una ruptura causada entre los residuos fenilalanina (Phe) 105 y metionina (Met) 106. Al formarse dos cadenas peptídicas, la p-k-caseína, residuos 1-105, es el precipitado llamado *cuajada* y caseinmacropéptido, residuos 106-169, se queda disuelto en el suero (Dalglish, 1992; Zimmermann y Ruiz, 2010; Kumar *et al.*, 2010; Rodríguez *et al.*, 2016).

El primer coagulante utilizado es el llamado *cuajo* o renina, el cual es la división del estómago de terneros en solución acuosa (Zhang, 2002; Guerrero *et al.*, 2003; Ramírez, 2014). Un sustituto de enzima coagulante de leche de fuente microbiana sería más interesante teniendo en cuenta su disponibilidad estable y bajo costo debido a la posibilidad de utilizar sustratos baratos para la fermentación (Yu y Chou, 2005; Merheb *et al.*, 2010).

Los hongos termófilos tales como el *Rhizomucor miehei* son productores importantes de enzimas utilizadas a nivel industrial por un largo tiempo, la proteasa aspártica de dicho microorganismo ha sido utilizada como coagulante en la elaboración de queso (Sternberg, 1972). Estudios como el de Osorio *et al.* (2008) y Morillo *et al.* (2015) marcan la pauta para el estudio de la capacidad coagulante de las enzimas caseinólíticas producidas por la cepa fúngica en cuestión, creando una fórmula matemática para calcular la fuerza de cuajo.

El presente estudio tiene como objetivo el determinar la actividad coagulante de extractos crudos enzimáticos provenientes de una fermentación en estado líquido utilizando esporas de *Rhizomucor miehei*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Microorganismo

Se utilizó la cepa *Rhizomucor miehei* obtenida en el cepario de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Juárez del Estado de Durango. Se sembró en Agar Papa Dextrosa incubado por 96 h a 37 °C.

Suspensión de esporas

Se obtuvieron suspensiones de esporas utilizando el método modificado de Osorio *et al.*, (2008) con ligeras modificaciones. Se adicionaron 25 mL de Tween 80 (0.1% p/p) estéril con 25 perlas de vidrio al cultivo del *Rhizomucor miehei* y se agitaron manualmente. Una vez recuperada la suspensión, la concentración de esporas se determinó mediante recuento en Cámara Neubauer.

Fermentación en estado líquido

En matraz Erlenmeyer de 500 ml, por triplicado, se preparó 150 ml del medio de cultivo, formulado con caseína (4 g/l), glucosa (20 g/l), sacarosa (4 g/l), peptona bacteriológica (4 g/l) y KH₂PO₄ (2 g/l), se inocularon con 8x10⁶ esporas para su posterior incubación a 37 °C durante 15, 16 y 20 días. Se tomó una muestra de 1 mL de cada medio, se centrifugaron y al sobrenadante obtenido se le determinó actividad coagulante de la leche a los 15, 16 y 20 días en fermentación.

Actividad coagulante de leche

La actividad coagulante de la leche, se midió por el método de 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 0,01 M de cloruro de calcio) al adicionarle 0,5 ml de sobrenadante del cultivo proveniente de la fermentación. Esta determinación se logró haciendo rotar de manera manual las muestras en un baño maría a una temperatura de 37 °C.

La lectura del tiempo de coagulación se hizo justo cuando el aspecto de la película de leche sobre la pared interna del tubo de ensayo cambia de fluido laminar a viscoso cumpliendo con el requisito que al voltear el tubo 180°, no sufra derrames, tal como se muestra en la Figura 1 (Fig. 1).

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 calcula mediante la siguiente relación:

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

Dónde: FC: fuerza de cuajo, V: cantidad de leche (ml), C: cantidad de sobrenadante del cultivo (ml), t: tiempo de coagulación de la muestra (s), 2.400: tiempo en que normalmente cuaja la leche a 37 °C con un cuajo estándar (s).

La capacidad productiva se evaluó a través de la siguiente relación mencionada por Morillo-piña *et al.* (2015):

$$Productividad = \frac{FC_{max}}{t_{FC\ max}} \quad (2)$$

Dónde: FCmax: máxima fuerza de cuajo alcanzada; tFCmax: tiempo en que se alcanza la máxima fuerza de cuajo.



Figura 1. Coagulación completa de la película de leche después del ensayo de coagulación.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de la actividad coagulante fueron sometidos a un análisis de varianza unifactorial y un método de análisis de medias de Tukey. A continuación, se muestran los resultados del ANOVA (Tabla I).

Tabla I. Análisis de varianza para la actividad coagulante medida en FC.

	SC	GL	MC	F	p
Tratamiento	836854	3	278951	14.4870	0.002186
Error	134787	7	19255		

Los resultados de la actividad coagulante del extracto crudo enzimático (realizados por triplicado), medidos en Fuerza de Cuajo (FC), obtenidos en el ensayo de coagulación con los días de fermentación como variable, se muestran a continuación:

Tabla II. Fuerza de Cuajo obtenida bajo diferentes días de fermentación.

Fuerza de Cuajo (FC)			
15 días	16 días	20 días	Renina (Control)
202.44 ^a ± 60.03	229.34 ^a ± 33.13	765.71 ^b ± 252.72	775 ^b ± 35.35

Se puede observar claramente los resultados de la Tabla II, la desviación estándar tiende a ser elevada, y si bien, se presenta este fenómeno en todos los experimentos se nota una tendencia a aumentar la actividad al pasar los días de fermentación.

En cuanto a los resultados de FC, los resultados obtenidos superan a lo obtenido por Morillo *et al.* (2015) quienes apenas obtuvieron valores de 200 como máximo y sólo con una cepa de *Rhizomucor* sp. Sin embargo, en el

estudio realizado por Osorio *et al.* (2008) se pueden observar resultados de hasta 1764 en valores de FC, además de otros valores por encima de los 1000 en los medios que cambiaron las fuentes de nitrógeno del microorganismo. Cabe mencionar que ambos estudios citados, a diferencia del estudio en cuestión, utilizaron una filtración en papel Whatman N° 41 al extracto después de la centrifugación además de contar el tiempo de coagulación de la muestra en cuanto la película de leche comienza a presentar grumos, es decir, en tiempos menores a los de la coagulación total, lo cual aporta mayores valores de fuerza de cuajo. Sin embargo, este estudio presenta la coagulación total, como el tiempo dentro de la Ecuación 1 debido a que es el tiempo que en verdad se registra a nivel industrial.

En comparación con estudios de FC de enzimas provenientes de otras cepas fúngicas como el *Aspergillus favus* reportado por Alecrim *et al.* (2014), los resultados de dicho experimento tienen como FC máxima valores de 116.19 lo cual indica que la cepa de *Rhizomucor miehei* está por encima en cuanto a capacidad coagulante.

La aplicación y escala del proyecto a necesidades reales es algo que se pretende en un futuro, para lo cual podemos obtener una eficiencia de producción al tener una relación entre la masa del queso producido con la masa de la leche utilizada, tal como lo hizo Nasr *et al.* (2016) reportando hasta 21% de rendimiento sobre leche de vaca utilizando proteasas de semillas de girasol.

La capacidad productiva la calculamos mediante la Ec. 2. Por lo tanto, en la Tabla III mostrada enseguida, se reportan los resultados de FC_{max} y el tiempo en que esta FC_{max} que presentaron los diferentes extractos.

Tabla III. Resultados de FC_{max} y el tiempo en que esta se presentó.

Días de fermentación	15	16	20
FC _{max}	244.89	266.67	960
t _{FCmax}	98 s	90 s	25 s

Teniendo estos valores, se puede determinar la capacidad productiva la cual, como su nombre lo dice, nos permite observar la productividad del extracto crudo enzimático. Esta característica calculada se muestra a continuación en la Figura 2 (Fig. 2).

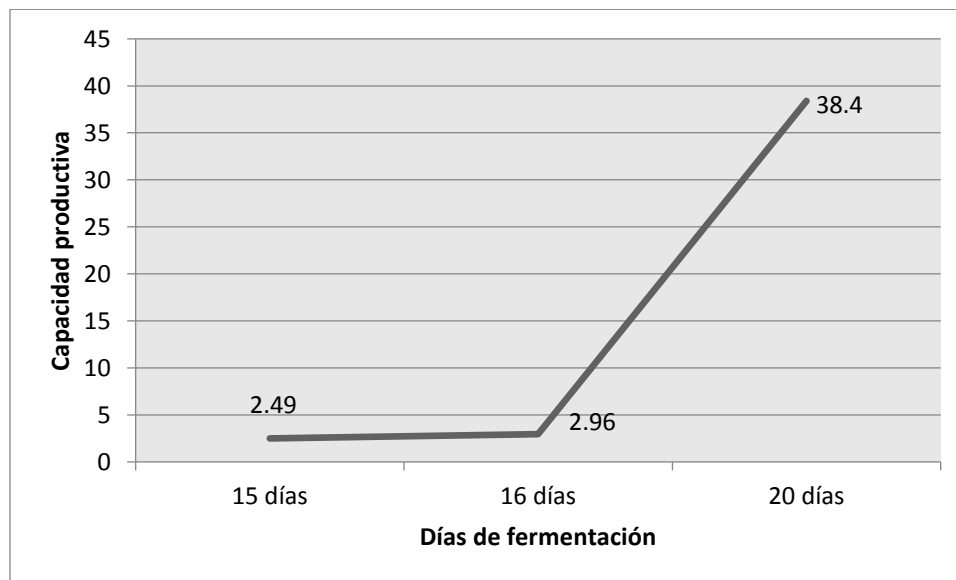


Figura 2. Capacidad productiva de los extractos enzimáticos crudos en diferentes días de fermentación.

CONCLUSIÓN

Al llevar a cabo la técnica analítica de actividad coagulante cada 24 horas se observó que el extracto enzimático crudo proveniente de *Rhizomucor miehei* funciona mejor con una fermentación de al menos 15 días. Lo dicho

anteriormente se corrobora por pruebas preliminares donde se logró establecer el tiempo de fermentación que obtenía una mayor fuerza de cuajo.

Con base en los resultados presentados en la Tabla III podemos observar que la FC_{max} alcanzada en los 20 días de coagulación supera a la renina comercial, lo cual es lo más destacable del estudio ya que marca el inicio para poder llevar la producción de este tipo de enzimas a nivel industrial, cumpliendo con el objetivo y expectativas del proyecto.

Además, se demuestra estadísticamente que no existe diferencia significativa entre los extractos crudos enzimáticos fermentados durante 20 días y la renina comercial (Tabla II), lo cual demuestra un gran avance para lograr, en un futuro no lejano, la sustitución de la renina.

A diferencia de otros trabajos relacionados, la enzima no se purifica ya que se busca obtener una eficiencia en cuanto a costos y ser la pauta para posteriores estudios que evalúen la eficiencia en cuanto a masas de queso y leche.

BIBLIOGRAFÍA

Badgujar, S. B., Mahajan, R. T., (2014). Nivulian-II a new milk-clotting cysteine protease of *Euphorbia nivulia* latex. *Inter J Biol Macromol*, 70 (1), 391-398.

Dalgleish, D. G., (1992). The enzymatic coagulation of milk. *Advanced Dairy Chemistry. Proteins*. Elsevier Applied Science, London. pp 579-619.

Diario Oficial de la Federación (DOF), (2002). “Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado”. **NOM-184-SSA1-2002**. Productos y servicios.

Fox, P. F., Guinee, T. P., Cogan, T. M., McSweeney, P. L. H., (2017). *Fundamentals of cheese science*, second edition. Springer. New York.

Kumar, A., Grover, S., Sharma, J., Batish, V.K., (2010). Chymosin and other milk coagulants: sources and biotechnological interventions. *Crit Rev Biotechnol*, 30 (1), 243-258.

Merheb, D. C., Gomes, E., Boscolo, M., da Silva, R., (2010). Production and characterization of a milk-clotting protease in the crude enzymatic extract from the newly isolated *Thermomucor indicae-seudaticae* N31. *Food Chemistry*, 120 (1), 87-93.

Morillo-Piña, O. T., García, L. P.J., Guerrero, C. B. R., Torres, V. Y., Castañeda, R. R. F., (2015). Evaluación de la producción experimental de enzimas coagulantes de leche utilizando cepas de *Rhizomucor spp*. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 17 (1), 54-60.

Nasr, A. I. A., Mohamed, A. I. A., Hamid, O. I. A., (2016). Characterization of partially purified milk-clotting enzyme from sunflower (*Helianthus annuus*) sedes. *Food Science and Nutrition*, 4 (5), 733-741.

Osorio, A., Gómez, N., Sánchez, C., (2008). Evaluación de diferentes fuentes de carbono y de nitrógeno para la producción de renina a partir del moho *Mucor miehei*. *Rev. Fac. Ing. Univ. Antioquia*, 45 (1), 17-26

Rodríguez, S. R., Beltramini, S. T., Brito, O. T., Goncalves, O. L. C., Karcher, D., Aparecida, J. M., Juliano, L., Oliveira, A. H. C., Rodrigues, A., Rosa, J. C., Cabral. H., (2016). Evaluation of the catalytic specificity, biochemical properties, and milk clotting abilities of an aspartic peptidase from *Rhizomucor miehei*. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 43 (8), 1059-1069.

Secretaría de Economía, (2012). Análisis del sector lácteo en México. Dirección General de Industrias Básicas.

Sternberg, M., (1972). Bond specificity, active site and milk clotting mechanism of the *Mucor miehei* protease. *Biochimica et biophysica acta* 285, 383-392.

Yu, P. J., Chou, C. C., (2005). Factors affecting the growth and production of milk-clotting enzyme by *Amylomyces rouxli* in rice liquid médium. *Food Technology and Biotechnology*, 43 (1), 283-288.

Zimmermann, S. K., Ruiz, E. H., (2010). Estructura y funcionalidad de proteínas lácteas. Efecto de modificaciones inducidas por medios físicos, químicos y enzimáticos. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*. 4 (2). pp 24-37.