

# UTILIZACION DE LA PEPSINA DE POLLO COMO COAGULANTE DE LA LECHE

Rene Martinez G.\*

Alfonso Botero P.\*

Aurora Peña R. \*\*

## COMPENDIO

Se molieron el proventrículo y la mezcla de proventrículo más intestino y se sometieron a tres condiciones microambientales (fuente enzimática, acidulante y antioxidante) y a tres condiciones macroambientales: tiempo de almacenamiento (35, 70 y 105 días), temperatura de almacenamiento (4, 25 y 35°C) y temperatura del sustrato (35 y 45°C). Se utilizó un diseño completamente al azar con dos repeticiones por tratamiento empleando un estándar de pepsina de cerdo con actividad enzimática conocida. Las variables de respuesta evaluadas fueron: actividad enzimática (en segundos), poder o fuerza de coagulación (ml de leche por gramo de enzima) y rendimiento quesero (o/o). El análisis de varianza fue significativo al 1 o/o, obteniéndose los mejores resultados con la mezcla proventrículos más intestino adicionado de HCl y antioxidante 35 días, almacenado a 4°C y 45°C de temperatura del sustrato. Los análisis microbiológicos fueron negativos para la presencia de Salmonella y Clostridium. Los rendimientos queseros fueron mayores en las muestras experimentales.

## ABSTRACT

Utilization of chicken pepsine as milk coagulant. Ground of proventricule and proventricule more gut mix were subjected three microenvironments conditions (enzimatic source, acidulant and antioxidating) under macroenvironments conditions: storing time (35, 70 and 105 days), storing temperature (4, 25 and 35°C) and substrate temperature (35 and 45°C). Absolutely aleatory design with two replications by treatment was used employing a pig pepsine standard with enzymatic activity known, responses variables evaluated were enzymatic activity (seconds) coagulation power or force (ml milk by enzyme gram) and cheese yield (o/o). Variance analysis was significant at 1 o/o obtaining better results mixing proventricule more gut added with HCl and antioxidating when its enzymatic activity was measured to 35 days, with 4°C storing temperature and 45°C substrate temperature. Microbiological analysis were negative for Salmonella and Clostridium. Cheese yield were greater in experimental samples.

\* Estudiante de pre-grado. Universidad Nacional de Colombia. Palmira

\*\* Universidad Nacional de Colombia. Palmira.

## 1. INTRODUCCION

Actualmente en nuestro país la principal enzima comercial empleada en la elaboración de quesos es la renina de bovinos, la cual en su mayoría es importada debido a su escasez y a la ausencia de sustitutos eficaces, pero principalmente a la carencia absoluta de tecnología apropiada en la obtención y utilización de cuajares. El intestino y proventrículo como fuente de la pepsina puede ser una excelente alternativa como coagulante de la leche aún inexplorada en nuestro medio, máxime si se tiene en cuenta que a dichos subproductos de la industria avícola no se le ha dado adecuada utilización.

La pepsina de pollo se viene utilizando desde los años sesenta en la producción de quesos en Israel (Bohak, 1; Cogan, 2). Se podría asegurar que en Latinoamérica en general no existe comercialmente la pepsina de pollo y los trabajos a nivel experimental son escasos.

La pepsina de pollo actualmente se ha aislado y purificado; también se conoce su peso molecular y su composición en aminoácidos, lo mismo que su pH y temperatura de óptima actividad (2.8 y 55°C respectivamente). Se han estudiado y clarificado algunos parámetros críticos en la elaboración de quesos que influyen en la actividad enzimática de la pepsina (acidez, temperatura, presencia de iones calcio y concentración del sustrato en los tiempos de coagulación).

El principal objetivo del presente trabajo es determinar la forma más sencilla de utilizar la pepsina de pollo en la elaboración de quesos y evaluar los rendimientos queseros comparados con un cuajo comercial.

## 2. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

Ante la ausencia de trabajos experimentales se realizaron ensayos exploratorios sobre métodos de selección, limpieza general y eliminación de tejido adiposo del intestino y proventrículo; determinaciones de actividad enzimática a diversas temperaturas, influencia del pH y tipo de leche en los tiempos de coagulación; entrenamiento en las observaciones visuales de la precipitación de la caseína; evaluaciones de las combinaciones de intestino (I), proventrículo (P) y molleja como fuente enzimática, etc.

Las actividades coagulantes de la pepsina se determinaron siguiendo el método empleado por el Department of Food Engineering and Biotechnology Technion, Israel Institute of Technology (Cogan, 2) ligeramente modificado. Para ello se estudiaron simultáneamente (mediante un diseño de tratamientos), seis factores los cuales generaron un total de 144 combinaciones o tratamientos provenientes de un factorial  $3^2 \times 2^4$ . El tiempo de almacenamiento

to (35, 70 y 105 días), la temperatura de almacenamiento (4, 25 y 35 °C) y la temperatura del sustrato (35 y 45 °C), se consideraron como factores macroambientales ya que hacen referencia al entorno exterior. Los otros tres factores (fuente de la enzima, acidulación y antioxidante) se denotaron como microambientales, porque hacen referencia a las condiciones bioquímicas dentro de los tubos de vidrio en el rotador de botellas. La precipitación de la caseína se determinó visualmente ya que se forma una película de leche en las paredes de los tubos, colocados en el rotador a 24 rpm y sumergidas en baño María.

El diseño experimental empleado fue completo al azar, con dos repeticiones por tratamiento. Se empleó un patrón estándar (de actividad enzimática conocida) a base de pepsina de cerdo suministrado por Laboratorios Miles Internacional. Por razones de espacio, tiempo, material disponible, etc, las repeticiones se realizaron en el tiempo. Se consideró que dos repeticiones por tratamiento eran suficientes para evaluar la actividad enzimática de acuerdo con la experiencia de manejo acumulada durante los ensayos exploratorios.

Las principales variables de respuesta cuantificadas fueron: actividad enzimática a diferentes períodos y temperatura de almacenamiento, poder o fuerza de coagulación y rendimientos queseros.

### 3. RESULTADOS Y DISCUSION

Existió diferencia significativa entre tratamientos empleando un nivel de significancia del 1 o/o (Cuadro 1) y hubo diferencia significativa entre las condiciones microambientales (o tratamientos) y entre éstas y cada una de las condiciones macroambientales (Cuadro 2).

La condición macroambiental que presentó menor variabilidad para todas las condiciones microambientales es la 2 (C.M. = 445.14 segundos), que correspondió a 35 días de almacenamiento a 4°C y 45°C de temperatura del sustrato. La mayor variabilidad se encuentra en la condición macroambiental 15 (26.070 segundos) que corresponde a 105 días de almacenamiento a 25°C y 35°C de temperatura del sustrato.

La mayor actividad enzimática (menores tiempos de coagulación) se observó en la combinación de intestino más proventrículo (Fig. 1). Los tiempos promedios totales del ensayo donde actúa como fuente enzimática el proventrículo fue de 108.08 segundos, mientras que en la mezcla intestino más proventrículo fue de 50.93 segundos.

Cuadro 1

Análisis de varianza para la variable tiempo de coagulación en segundos

Fuentes de variación	G. L.	S. C.	C. M.	Fc.	F <sub>t</sub> 0.01
Entre tratamientos	141	935913.680	6637.6854	8.17	1.0
Dentro tratamientos	142	1153.5146	8.1233		
Total (c)	283				

Cuadro 2

Análisis de varianza para la variable tiempo de coagulación (segundos) debido a la interacción de los factores microambientales y macroambientales

Fuentes de variación		G. L.	S. C.	C. M.	Fc	F <sub>t</sub> <sup>0.01</sup>
Entre tratamientos		141	935913.680			
Entre condiciones macroambientales		17	441375.150			
Entre condiciones microambientales dentro de cada condición macroam.		124	494538.530			
Entre condiciones microambientales dentro de la condición macroam.	(1)	7	20519.750	2931.390	361.000	2.76
	(2)	7	3116.000	445.142	54.820	2.76
	(3)	7	27981.940	3997.420	492.290	2.76
	(4)	7	6131.438	875.919	107.870	2.76
	(5)	7	21841.438	3120.205	348.260	2.76
	(6)	7	6942.750	991.821	122.140	2.76
	(7)	7	14832.938	2118.991	260.959	2.76
	(8)	7	7816.438	1116.634	137.510	2.76
	(9)	7	23762.940	3394.705	418.060	2.76
	(10)	7	11450.938	1635.848	201.450	2.76
	(11)	7	18148.440	2592.634	319.289	2.76
	(12)	7	8773.750	1253.392	154.350	2.76
	(13)	7	18695.080	2670.725	328.900	2.76
	(14)	7	7387.000	1055.285	130.000	2.76
	(15)	6	156421.860	26070.310	3210.630	2.92
	(16)	6	73672.430	12278.673	1512.150	2.92
	(17)	7	49979.000	7139.857	879.290	2.92
	(18)	7	17064.440	2437.780	300.210	2.92

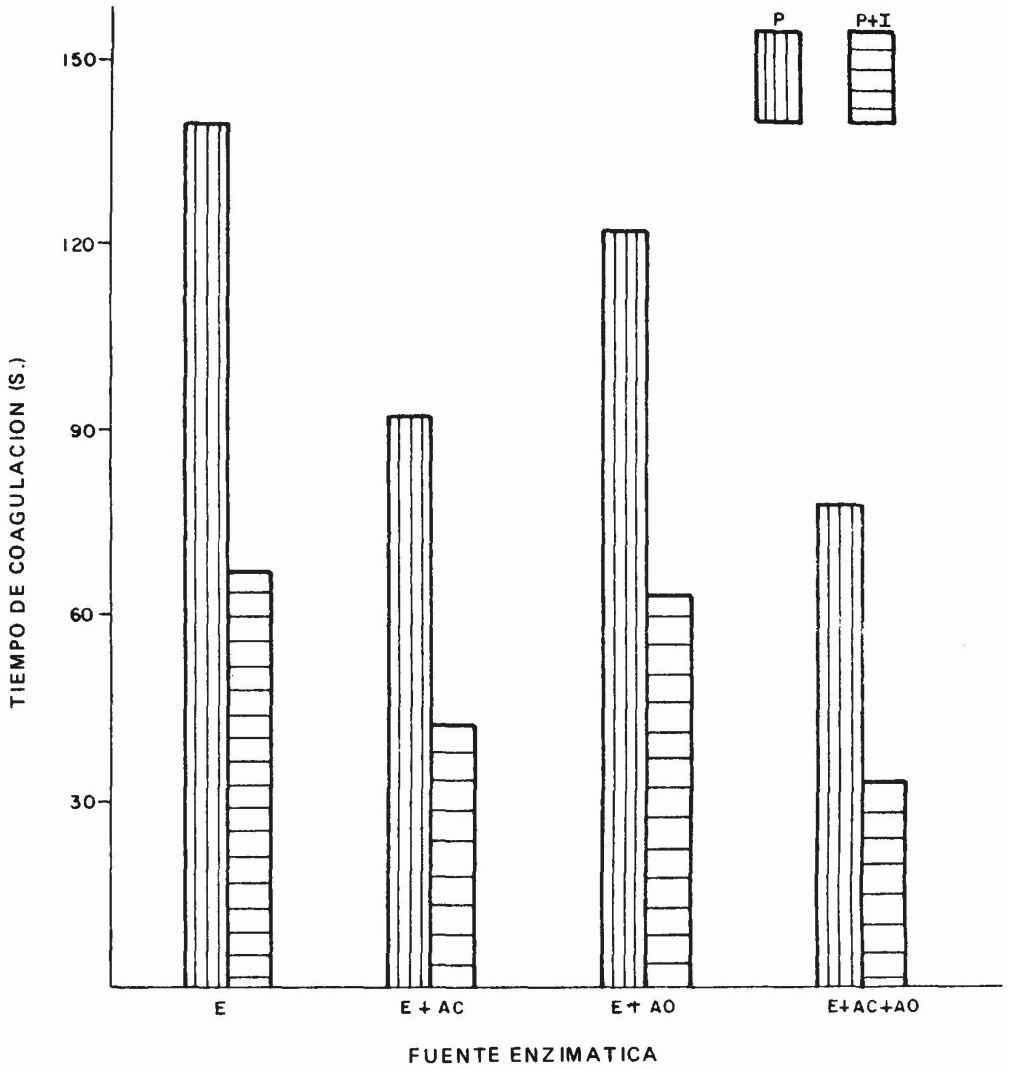


Fig. 1. Interacción de los factores microambientales y macroambientales en los tiempos de coagulación.

La menor actividad enzimática del proventrículo se debe a que la pepsina se encuentra en forma de pepsinógeno, así éste posee el pH óptimo de actividad enzimática; al mezclar I + P el ácido clorhídrico contribuye a acidificar el intestino (que es alcalino debido al efecto de la bilis y el jugo pancreático) y por lo tanto a activar la enzima. Otro de los factores que pudo haber incidido en los menores tiempos de coagulación en la mezcla es el ayuno practicado a los pollos antes del sacrificio, puesto que la secreción de jugos gástricos es menor en un ave ayunada. Existen otras variables (difíciles de controlar en las condiciones en las cuales se realizó este ensayo) que inciden en una u otra forma en la actividad enzimática de la pepsina en el canal digestivo, como es la composición nutritiva del alimento utilizado durante el engorde, tipo de drogas aplicadas, edad de las aves, etc. Hay que tener en cuenta que los anteriores comportamientos bioquímicos suceden en aves recién sacrificadas, ya que cuando el ave está viva la mayor actividad enzimática de la pepsina se presenta en el intestino a pesar de poseer el pH óptimo; en este caso la acidez no juega un papel tan importante como si la temperatura orgánica, el metabolismo y el tiempo de circulación, que es mucho más alta en las aves que en los mamíferos.

Se observó pérdida progresiva de actividad enzimática a medida que aumentaba el tiempo de almacenamiento de la pepsina. La inactivación se acentuó cuando se almacenó a 25°C, debido a que fue una temperatura promedio del medio ambiente presentándose variación en el día y en la noche. Las menores pérdidas se obtuvieron a los 4 y a los 35°C. Al incrementarse la temperatura del sustrato de 35°C a 45°C se presentaron menores tiempos de coagulación para todos los tratamientos o combinaciones, corroborando estos resultados la estabilidad térmica de la pepsina (Gordin, 3; Kopelman, 4).

Las condiciones microambientales (ácido, antioxidante) o tratamientos que recibieron ácido clorhídrico presentaron los menores tiempos de coagulación, siendo éstos más bajos si interactúan conjuntamente el intestino y proventrículo más el ácido y el antioxidante (Fig. 1). Lo anterior se debe posiblemente a una reacción bioquímica sinérgica del antioxidante, del HCl, o de estos dos conjuntamente con la pepsina.

La pérdida de actividad enzimática de la pepsina a medida que se incrementan los días de almacenamiento se hace más notoria en aquellas condiciones microambientales que recibieron ácido (sin interactuar con el antioxidante). La explicación a este fenómeno se debe quizás a autólisis de la pepsina por encontrarse a pH óptimo, ya que la degradación se hace más manifiesta a partir de los 70 días de almacenamiento. La mayor fuerza de coagulación (menor tiempo) se presentó a los 35 días de almacenamiento a 4°C y para una temperatura del sustrato de 45°C.

Los rendimientos queseros se realizaron con las condiciones microambientales que presentaron mayores fuerzas de coagulación, excepto para los días de almacenamiento (70), la cual se escogió con el fin de corregir por pérdida de actividad de la enzima a través del tiempo. Los rendimientos fueron mayores en todos los casos donde se emplearon las muestras experimentales que en las del cuajo comercial. Los rendimientos fueron mayores del 15 o/o. En nuestro medio en un queso campesino (con el cual se trabajó) se considera el 14 o/o como rendimiento excelente. Los porcentajes promedios de humedad y grasa determinados a los quesos fue de 65 o/o y 19 o/o respectivamente.

Los análisis bacteriológicos para la presencia de Salmonella y Clostridium resultaron negativos para todas las muestras experimentales. Así mismo el contenido de coliformes se encuentra dentro de los límites normales.

#### 4. CONCLUSIONES

- 4.1. Los menores tiempos de coagulación (mayor fuerza) se obtuvieron utilizando como fuente enzimática la combinación intestino más proventrículo.
- 4.2. La adición de HCl a las muestras incide notoriamente en la mayor actividad enzimática de la pepsina. En el mismo sentido (pero en menor magnitud) el antioxidante tuvo efecto en la mayor actividad enzimática. Los tiempos de coagulación son menores al agregar simultáneamente ácido y antioxidante al proventrículo o a la mezcla I + P.
- 4.3. Existe pérdida de actividad enzimática a medida que se incrementan los días de almacenamiento.
- 4.4. La mayor actividad funcional de la pepsina se obtuvo cuando se almacenó a 4 y 35°C, siendo menores los tiempos de coagulación en la primera temperatura. La actividad enzimática se duplicó cuando las determinaciones se realizaron a 45°C que a 35°C de temperatura del substrato.

#### 5. BIBLIOGRAFIA

1. BOHAK, Z. Purification and characterization of chicken pepsinogen and chicken pepsin. J. Biol. Chem. n. 244, p. 46-48. 1969.
2. COGAN, U; KOPELMAN, I. J. Combined temperature - concentration effects on the clotting rate of chicken pepsin. J. Dairy Sci. v. 65, p. 1130 - 1134. 1982.
3. GORDIN, S. Efficacy of chicken pepsin as a milk clotting enzyme. J. Food Protection. v. 41, p. 684 - 688. 1978.
4. KOPELMAN, I. Determination of clotting power of milk clotting enzymes. J. Dairy Sci. v. 59, n. 2, p. 196-198. 1975.