

Evaluación de parámetros físico-químicos y microbiológicos de un coagulante lácteo de estómago de cerdo



Evaluation of physical-chemical and microbiological parameters of a rennet from pig

<http://opn.to/a/MDIzF>

Marisney Martínez-Alvarez ¹, Dianys Remón-Díaz ¹, Aldo Hernández Monzón ², Yamilka Riverón-Alemán ¹, Ailin Martínez-Vasallo ^{1*}

¹Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria, CENSA, Apartado 10, CP 32 700, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba.

²Instituto de Farmacia y Alimentos. Universidad de La Habana, La Habana, Cuba.

RESUMEN: Se evaluaron los parámetros físico-químicos y microbiológicos de un coagulante lácteo proveniente de estómagos de cerdo. Los estómagos fueron lavados, salados y deshidratados naturalmente. El contenido de humedad de los estómagos de cerdos se determinó en días alternos. Se evaluaron el pH, la fuerza de cuajo, los recuentos de microorganismos a 30°C, coliformes totales, *Escherichia coli*, Enterobacterias, *Staphylococcus* coagulasa positivo, hongos y levaduras. Al evaluar el comportamiento de los estómagos, en cuanto al contenido de agua por gramos de materia seca por los dos métodos de secado con adición de cloruro de sodio, no se observaron diferencias significativas en el primer día mediante el análisis de varianza. Para los días cuatro, seis y ocho, los valores fueron estadísticamente diferentes. Los valores de pH se encontraron en el intervalo de 4,44 a 4,90 y los de la fuerza de cuajo entre 1:840 a 1:4706 para las 15 corridas evaluadas. La media del conteo de microorganismos a 30°C fue de $2,05 \pm 0,76$ log ufc/mL. Los conteos de coliformes totales, enterobacterias, hongos y levaduras fueron inferiores a 10 ufc/mL. No se detectó la presencia de *Staphylococcus* coagulasa positivo ni *Escherichia coli*. La obtención del coagulante lácteo a partir de estómago de cerdo brinda una alternativa para la mejora del proceso de producción de queso fresco artesanal, al comprobarse que los parámetros físico-químicos y microbiológicos se encuentran en correspondencia con lo establecido para coagulantes líquidos.

Palabras clave: coagulante lácteo, método de secado, parámetros físico-químicos, parámetros microbiológicos.

ABSTRACT: The physical-chemical and microbiological parameters of a rennet from pig stomachs were evaluated. The stomachs were washed, salted and dehydrated naturally. The moisture content of stomachs was determined on alternate days. The pH, rennet strength, microorganism counts at 30°C, total coliforms, *Escherichia coli*, Enterobacteria, *Staphylococcus coagulase positive*, fungi, and yeasts, were evaluated. No significant differences were observed on the first day through the analysis of variance when evaluating the behavior of the stomachs, in terms of water content per gram of dry matter by the two drying methods with the addition of sodium chloride. The pH values were in the range of 4.44 to 4.90 and those of rennet strength between 1: 840 to 1: 4706 for the 15 runs evaluated. The mean microorganism count at 30°C was 2.05 ± 0.76 log cfu / mL. The counts of total coliforms, enterobacteria, fungi, and yeast were less than 10 cfu / ml. The presence of positive coagulase *Staphylococcus* or *Escherichia coli* was not detected. Obtaining the milk coagulant from pig stomach provides an alternative to improve the production process of artisan fresh cheese, when it is verified that the physical-chemical and microbiological parameters are in correspondence with what established for rennet.

Key words: rennet, drying method, physical-chemical parameters, microbiological parameters.

*Autor para la correspondencia: Ailin Martínez-Vasallo: E-mail: ailin@censa.edu.cu

Recibido: 05/11/2018

Aceptado: 06/01/2019

INTRODUCCIÓN

Tradicionalmente, en la coagulación enzimática de la leche para la elaboración de quesos se ha utilizado cuajo animal. Este cuajo está constituido, principalmente, por la quimosina, una enzima proteolítica que se extrae del cuarto estómago de los rumiantes jóvenes. La escasez de los abomasos de los rumiantes jóvenes y el aumento de los precios de las preparaciones enzimáticas permitieron el desarrollo de otras enzimas coagulantes (1).

Entre las enzimas más estudiadas se encuentran las de origen animal (pepsinas bovinas y porcinas), microbiano (proteasas fúngicas) y vegetal (proteasas de flores de *Cynara cardunculus*) (1). Estas enzimas son proteinasas ácidas y las secuencias de aminoácidos y las estructuras tridimensionales presentan una elevada homología estructural con la quimosina y se les denominan coagulantes lácteos (2).

Para la extracción enzimática en coagulantes de origen animal, la calidad microbiológica puede verse afectada, debido a la carga microbiana inicial de los estómagos. Para disminuir la presencia de microorganismos y garantizar la inocuidad del producto final, se deshidratan los estómagos con adición de sal y diferentes métodos de secado (3,4).

En Cuba, los productores de quesos frescos artesanales elaboran su coagulante por vía enzimática de manera artesanal. Una desventaja de los cuajos que elaboran los productores es la calidad microbiológica, esta afecta la inocuidad de los quesos que se elaboran (5). Con la obtención de una metodología para producir un coagulante lácteo a partir de estómago porcino, se tendría una materia prima para la elaboración de quesos artesanales con mejor calidad, por lo que el objetivo de esta investigación fue evaluar los parámetros físico-químicos y microbiológicos del coagulante lácteo obtenido a partir de estómagos de cerdos.

Para la extracción de enzimas se utilizaron estómagos de cerdos sanos de ambos sexos y de aproximadamente 25 kg de masa corporal, de la categoría preceba, de la raza Yorkland y sus cruces, y de 9 a 10 semanas de edad. El sistema de crianza empleado fue en Flat-Deck. Se

procedió al lavado con abundante agua, se les retiró la grasa presente y se salaron por ambos lados con sal común (6,7). El secado se realizó bajo condiciones naturales, al sol (HR = 76±2 %; T = 30±3°C) y a la sombra (HR = 82±11 %; T = 22±4°C) (4,6).

El contenido de humedad de los estómagos de cerdos se determinó por el método descrito en la norma cubana (8), en días alternos hasta que los mismos presentaron un porcentaje de humedad por debajo de 25 %, equivalente a 0,33 g de agua/g materia seca. Los estómagos de cerdos deshidratados se cortaron en tiras y se rehidrataron en solución salina. Se realizaron tres extracciones de 48 h cada una y se reguló el pH a 4,5 con ácido acético (Merck) al 8 %. Se obtuvieron 15 mezclas enzimáticas, que se filtraron al vacío con bomba de agua y papel de filtro Sartorius (AG 37037) para obtener los coagulantes lácteos (9).

A los coagulantes se les determinó el pH por método potenciométrico (10) y la fuerza de cuajo se cuantificó mediante la adición de 1 mL del coagulante en 100 mL de leche (11). La fórmula empleada para el cálculo fue la propuesta por Spreer *et al.* (12):

$$FC = \frac{v \cdot 2400/t}{c}$$

Donde:

- Fc - fuerza del cuajo
- V - volumen de leche
- t - tiempo de coagulación
- C - cantidad de cuajo

Para los análisis microbiológicos se tomó 1 mL del coagulante lácteo obtenido, a los cuales se le adicionó 9 mL de solución salina peptonada y se homogenizaron en Stomacher Seward®. Las diluciones decimales seriadas (1:10) se utilizaron para los recuentos de microorganismos a 30°C en agar para conteo en placa (BIOCEN), acorde a la norma ISO 4833: 2011 (13); coliformes totales en agar violeta rojo bilis (BIOCEN) según ISO 4832: 2006 (14); *Escherichia coli* en agar TBX (Biolife Italiana) en correspondencia con ISO 16649: 2001 (15); Enterobacterias en agar violeta rojo bilis glucosa según ISO 21528-2: 2017 (Biolife Italiana) (16); *Staphylococcus* coagulasa positivo en agar Baird Parker acorde a ISO 6888-2: 2003 (Biolife Italiana) (17); hongos y

levaduras en agar extracto de levadura dextrosa cloranfenicol acorde a ISO 21527-2: 2013 (18).

Para el análisis de los resultados se realizó un análisis de varianza simple (SC tipo III) y una dócima de comparación de rangos múltiples de Duncan (InfoStat, versión 2.0) (19).

Se observó que el contenido de agua por gramos de materia seca disminuyó en función del tiempo, para el secado de los estómagos de cerdos al sol y a la sombra (Figura 1).

En el primer día, el contenido de agua de los estómagos para el secado al sol y a la sombra no presentaron diferencias significativas ($p > 0,05$); sin embargo, para el caso de los días cuatro, seis y ocho, los valores del contenido de agua de los estómagos fueron estadísticamente diferentes ($p < 0,05$) entre las variantes de secado. Entre los valores de humedad correspondientes al día seis y al día ocho de la variante al sol no existieron diferencias, por lo que el secado ocurre en seis días. No obstante, según criterio de Coronel *et al.* (4), con el valor medio de contenido de agua por gramos de materia seca obtenido en el día cuatro, los estómagos podían considerarse como secos. Para el caso de la variante a la sombra, siguiendo el mismo criterio, el tiempo de secado fue de ocho días. Estos resultados sugieren que la velocidad de secado para la variante al sol es mayor que la variante a la sombra.

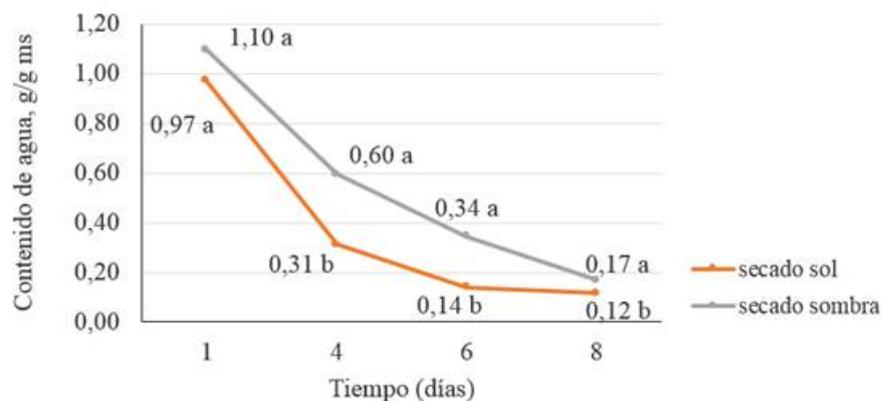
El cloruro de sodio produjo un efecto deshidratador en los estómagos, lo cual evitó el deterioro del producto y previno la proliferación de los microorganismos (4,6). Por otra parte, Sheehan (20) y Cruz *et al.* (21) determinaron que

la adición de sal incrementa la presión osmótica en la fase acuosa de los alimentos y causa la deshidratación de las bacterias. La deshidratación de los estómagos en este estudio contribuyó a disminuir la carga microbiana inicial. La introducción del método de secado de los estómagos de cerdo para la obtención del coagulante lácteo es una forma de garantizar su calidad e inocuidad.

En la Tabla 1 se muestran los resultados del pH y la fuerza de cuajo de las 15 corridas.

Tabla 1. Valores de pH y fuerza de cuajo de las 15 corridas del coagulante lácteo de estómago de cerdo/ *Values of pH and rennet strength of the 15 runs of the rennet from pig*

Corridas	pH	Fuerza cuajo
1	4,87	1: 4000
2	4,57	1: 4200
3	4,82	1: 4706
4	4,55	1: 840
5	4,44	1: 1388
6	4,79	1: 3250
7	4,80	1: 1600
8	4,51	1: 4210
9	4,73	1: 4389
10	4,53	1: 3200
11	4,49	1: 3200
12	4,53	1: 3200
13	4,59	1: 1860
14	4,61	1: 4250
15	4,90	1: 4137
Media	4,65	1: 3228,67
Error Estándar	0,07	21,82



Letras diferentes indican diferencias significativas
 Leyenda: ms (materia seca)

Figura 1. Curva de secado natural para los estómagos de cerdos / *Natural drying curve for pig stomachs*

Los valores obtenidos de pH se presentaron en el intervalo de 4,44 a 4,90. Estos resultados coinciden con el rango (4,5-5,5) establecido para los cuajos líquidos por Gorreta (22). Dobler *et al.* (23) reportaron que los estómagos de conejo contienen enzimas coagulantes que se pueden extraer con soluciones que contengan de 1 a 5 % de cloruro de sodio y pH 4.

Según Mahler y Cordes (24), la pepsina se desnaturaliza a valores de pH superiores a 5,0 y parte de la fuerza de coagulación se pierde. Los resultados obtenidos de pH evitan que ocurra la desnaturalización ácida de esta enzima e impiden la interacción electrostática que produce desnaturalización y provoca que las enzimas coagulantes pierdan su fuerza de coagulación (25).

La fuerza de cuajo se encontró en el intervalo de 1:840 a 1:4706 para las 15 corridas (Tabla 1). El valor máximo de fuerza de cuajo obtenido fue superior a lo reportado por Córdova y Paitan (26) y por Coronel *et al.* (4), quienes utilizaron estómagos de animales adultos. Este resultado puede atribuirse a que en esta investigación se emplearon estómagos de animales jóvenes. La fuerza de cuajo se ve afectada por la edad del animal, tipo de alimentación, métodos de extracción, manipulación y forma de conservación de los estómagos (25).

La media del conteo de microorganismos a 30°C de las 15 corridas fue de $2,05 \pm 0,76$ log ufc/mL (Figura 2). Se puede observar que para cada una de las corridas los resultados de este indicador fueron inferiores a 3,3 log ufc/mL. Palladino *et al.* (27), informaron recuentos

superiores a $7,65 \pm 0,34$ log ufc/mL, en la elaboración de diferentes sueros coagulantes a partir de estómagos de cabra, cordero, oveja, chivito y chivo.

Los conteos de coliformes totales, enterobacterias, hongos y levaduras fueron inferiores a 10 ufc/mL. No se detectó la presencia de *Staphylococcus* coagulasa positivo ni de *Escherichia coli*. Estos valores fueron inferiores a los obtenidos por Bonafede *et al.* (6) quienes, al emplear estómagos de cabritos deshidratados con sal para elaborar coagulante con solución salina, obtuvieron conteos de coliformes, enterobacterias y hongos y levaduras con valores de 4,8 log ufc/mL, 2,3 log ufc/mL y 4,2 log ufc/mL, respectivamente, resultados que fueron superiores a los obtenidos en este estudio.

El conteo de microorganismos a 30°C y coliformes totales obtenidos en este estudio está en correspondencia con lo que reportan varios autores para los coagulantes líquidos. Gorreta (22) refiere que el conteo de microorganismos aerobios mesófilos viables debe ser de 2×10^3 ufc/mL, mientras que el de coliformes totales debe estar ausente o como máximo en 10^2 ufc/mL.

Un estudio similar, realizado en el Instituto Nacional de Tecnología Industrial (INTI-Lácteos) de Argentina, reportó el recuento de microorganismos a 30°C con valores medios de 3,0 log ufc/mL, de enterobacterias, coliformes totales y *Escherichia coli* inferiores a 1 log ufc/mL así como de *Staphylococcus* coagulasa positivos, hongos y levaduras menores a 2 log ufc/mL (6). El conteo de los microorganismos

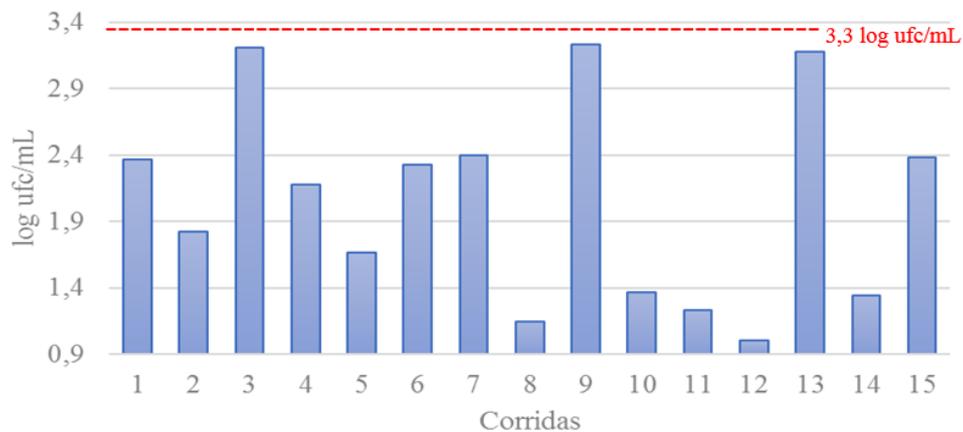


Figura 2. Conteo de microorganismos a 30°C posterior a la extracción final de enzimas por cada corrida/ *Counting of microorganisms at 30 ° C after the final extraction of enzymes for each run.*

indicadores de la calidad higiénico-sanitaria del coagulante obtenido en esta investigación fue inferior a los descritos por el Instituto Nacional de Tecnología Industrial.

La obtención de un coagulante lácteo a partir de estómago de cerdo brinda una alternativa para la mejora del proceso de producción de queso fresco artesanal, al comprobarse que los parámetros físico-químicos y microbiológicos se encuentran en correspondencia con lo establecido para coagulantes lácteos líquidos.

REFERENCIAS

1. González M. Tecnología para la elaboración de queso blanco, amarillo y yogurt. Ciencia y Tecnologías de Alimentos Secretaria Nacional de Ciencias, Tecnología e Innovación Veraguas, Panamá. 2002.
2. De Jong L. Nuevo cuajo estándar. Alimentación, equipos y tecnología. 1990;9(3):123-131.
3. Acevedo RM, Vasek OF, Fusco AJV. Optimización de un secadero de cuajares para la producción de agente coagulante correntino. Universidad Nacional del nordeste, Comunicaciones Científicas y Tecnológicas, Argentina. 2006.
4. Coronel GJ, Fusco AJV, Olga M, López MB. Quesos artesanales de Corrientes: Caracterización del agente coagulante. Comunicaciones Científicas y Tecnológicas, Universidad Nacional del Nordeste. 2014;8(8):77-80.
5. Martínez A, Ribot A, Villoch A, Montes de Oca N, Remón D, Ponce P. Calidad e inocuidad de la leche cruda en las condiciones actuales de Cuba. Rev Salud Anim. 2017;39(1):51-61.
6. Bonafede M, Aimar B, Nieto I, Picotti J, Molina S. Determinación de parámetros físicoquímicos y microbiológicos para la elaboración y conservación artesanal de cuajo fermento de cabrito. 2016. Consultado: 25 marzo 2018. Disponible en: <https://www.inti.gob.ar/lacteos/pdf/cuajoCabrito.pdf>.
7. Moschopoulou E, Kandarakisa I, Anifantakis E. Characteristics of Lamb and kid artisanal liquid rennet used for traditional feta cheese manufacture. Small Ruminant Res. 2006;72:237-241.
8. NC 275. Carne y productos cárnicos. Determinación del contenido de humedad. Método rápido. Norma Cubana (NC). La Habana. 2003. pp 7.
9. Dardas R, inventor; Google Patents, assignee. Preservation of bovine stomachs for rennet extraction. US3766015A. United States. 1973.
10. ISO 10523. Water quality. Determination of pH. 2008. 13 p
11. Chazarra S, Sidrach L, López D, Rodríguez J. Characterization of the milk-clotting properties of extracts from artichoke (*Cynara scolymus* L.) flowers. Int. Dairy J. 2007;17:1393-1400.
12. Spreer E. Lactología industrial: leche, preparación y elaboración, máquinas, instalaciones y aparatos, productos lácteos. Zaragoza. España. Acribia, DL, 2 ed 1991. 626p. ISBN: 978-84-200-0715-1.
13. ISO 4833-1. Microbiology of the food chain- Horizontal method for the enumeration of microorganisms-Part 1: Colony count at 30 degrees C by the pour plate technique. 2013. 9 p.
14. Norma ISO 4832. Microbiology of food and animal feeding stuffs-Horizontal method for the enumeration of coliforms. Colony-count technique. 2006. 6p.
15. Norma ISO 16649-2. Microbiology of food and animal feeding stuffs-Horizontal method for the enumeration of a-glucuronidase-positive *Escherichia coli*-Part 2: Colony-count technique at 44°C using 5-bromo-4-chloro-3-indolyl a-D-glucuronide. 2001. 8p.
16. ISO 21528-2. Microbiology of the food chain - Horizontal method for the detection and enumeration of Enterobacteriaceae Part 2: Colony-count technique. 2017. 15p.
17. ISO 6888-1. Microbiology of food and animal feeding stuffs-Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (*Staphylococcus aureus* and other species). Part 1: Technique using Agar Baird Parker medium. 2003. 6p.

18. ISO 21527-2. Microbiology of food and animal feeding stuffs-Horizontal method for the enumeration of yeasts and moulds-Part 2: Colony count technique in products with water activity less than or equal to 0,95. 2008. 9p.
19. Di Rienzo JA, Balzarini MG, Gonzalez L, Tablada M, Robledo CW. InfoStat versión 2.0. 2010. Grupo InfoStat, FCA. Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. 2010.
20. Sheehan JJ. How does NaCl affect the microbiology of cheese? In: P.L. McSweeney, editor, Cheese problems solved. Woodhead Publishing Limited, and CRC Press LLC, Cambridge, GBR. 2007:96-97.
21. Cruz AG, Faria JA, Pollonio MA, Bolini HM, Celeghini RM, Granato D. Cheeses with reduced sodium content: Effects on functionality, public health benefits and sensory properties. *Trends in Food Science & Technology*. 2011;22(6):276-291.
22. Gorreta L. Coahlo e coagulantes. *Revista do Instituto do Lactínicos Candido Tostes*. 2000; 222 (47): 19-24.
23. Dobler J, Espinosa E, Hernández PA, López LX, Márquez O. Extracto coagulante de leche proveniente del estómago de conejo (*Oryctolagus cuniculus* sp.). *Agrociencia*. 2016; 5 (50): 583-593.
24. Mahler HR, Cordes EH. *Química Biológica*. 4 ed. Barcelona. Omega. 1990. 893p.
25. Moschopoulou E. Characteristics of rennet and other enzymes from small ruminants used in cheese production. *Small Ruminant Research*. 2011;101:188-195.
26. Córdova JS, Paitan E. Determinación de parámetros para obtención y conservación de cuajo de bovino adulto. *Ciencia e Investigación*. 2013;16(1):9-11.
27. Palladino PM, Rodríguez HR, Molina RA, Ortigoza G, Moreno K, Chavez M. Inocuidad microbiológica de cuajos utilizados en la elaboración de quesos de cabra artesanales en el valle de amblayo, provincia de Salta, Argentina. *Jornada de Actualización Técnica en el Instituto de Tecnología de Alimentos*, 23 de Septiembre de 2012. Hurlingham, Buenos Aires AR. 2012.

Los autores de este trabajo declaran no presentar conflicto de intereses.

Este artículo se encuentra bajo licencia [Creative Commons Reconocimiento-NoComercial 4.0 Internacional \(CC BY-NC 4.0\)](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/)