

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIHUAHUA**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**

**SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE  
CHIHUAHUA**

**Aislamiento, caracterización y propiedades para gelificar la leche  
de la proteasa presente en los frutos maduros de  
*Solanum elaeagnifolium* Cavanilles**

**POR:**

**M. C. CAROLINA NÁJERA DOMÍNGUEZ**

**TESIS PRESENTADA COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE**

**DOCTOR EN CIENCIAS**

**CHIHUAHUA, CHIH., MÉXICO**

**MARZO 2022**



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE  
CHIHUAHUA

Chihuahua, Chih., a 24 de febrero de 2022.

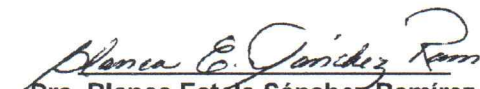
Oficio: 09/CA/SIP/22

**Dr. Ildebrando Pérez Reyes**  
**Secretario de Investigación y Posgrado**  
**Facultad de Ciencias Químicas**  
**Universidad Autónoma de Chihuahua**  
**P R E S E N T E**


Los integrantes del comité, informamos a Usted que efectuamos la revisión de la tesis intitulada: **“Aislamiento, caracterización y propiedades para gelificar la leche de la proteasa presente en los frutos maduros de *Solanum elaeagnifolium* Cavanilles”**, presentada por la **M.C. Carolina Nájera Domínguez**, alumna del programa de Doctorado en Ciencias.

Después de la revisión, indicamos a la tesista las correcciones que eran necesarias efectuar y habiéndolas realizado, manifestamos que la tesis, de la cual adjuntamos un ejemplar, ha cumplido con los objetivos señalados por el Comité de Tesis, por lo que puede ser considerada como adecuada para que se proceda con los trámites para la presentación de su Examen de Grado.

**A t e n t a m e n t e**  
**“Por la ciencia para bien del hombre”**

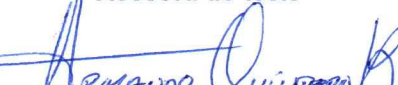
  
**Dra. Blanca Estéfa Sánchez Ramírez**  
**Asesora de tesis**

  
**Dra. Guadalupe Virginia Nevárez Moorillón**  
**Asesora de tesis**

  
**Dr. Antonio García Triana**  
**Asesor de tesis**

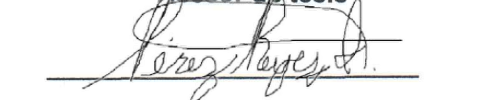
  
**Dr. Néstor Gutiérrez Méndez**  
**Director de tesis**

  
**Dra. María del Rosario Peralta Pérez**  
**Asesora de tesis**

  
**Dr. Armando Quintero Ramos**  
**Asesor de tesis**

**Efren Delgado**  
Digitally signed by Efren Delgado  
Date: 2022.02.24 14:37:48 -0700

**Ph.D. Efren Delgado**  
**Asesor de tesis**

  
**Dr. Ildebrando Pérez Reyes**  
**Secretario de Investigación y Posgrado**



**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**  
**SECRETARÍA**  
**INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

\*El que suscribe certifica que las firmas que aparecen en esta acta, son auténticas, y las mismas que utilizan los C. Profesores mencionados.

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS  
Circuito Universitario  
Campus Universitario #2 C.P. 31125  
Tel. +52 (614) 236 6000  
Chihuahua, Chihuahua, México  
<http://www.fcq.uach.mx>

---

22 de febrero de 2022

Dr. Ildebrando Pérez Reyes  
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO  
Facultad de Ciencias Químicas  
Universidad Autónoma de Chihuahua

Estimado Dr. Ildebrando por medio de este conducto le informo que la **M.C. Carolina Nájera Domínguez** estudiante del Doctorado en Ciencias, ha concluido satisfactoriamente el escrito de tesis del trabajo **“Aislamiento, caracterización y propiedades para gelificar la leche de la proteasa presente en los frutos maduros de *Solanum elaeagnifolium* Cavanilles”**  
Por lo que en mi carácter de Director de Tesis le liberó su escrito de tesis.

Atentamente,

  
**D.C. NESTOR GUTIÉRREZ MENDEZ**

Director de tesis

---

## **AGRADECIMIENTOS**

Si quieres resultados diferentes,  
No hagas siempre lo mismo  
- Albert Einstein

Al doctor Néstor Gutiérrez Méndez por haber abierto la puerta por tercera vez a esta tesista en un paso más de este camino de formación.

Gracias a todo el comité de asesores, quienes dedicaron parte de su valioso tiempo en la asesoría y revisión de este trabajo de investigación. En especial, al doctor Armando Quintero Ramos.

Gracias a la doctora Blanca Estela Sánchez Ramírez y a la doctora María del Rosario Peralta Pérez por guiarme desde el inicio y abrirme paso en este tema, que era totalmente nuevo para mí y que terminó por encantarme. Gracias doctoras por el apoyo brindado, tanto a nivel académico como personal.

Gracias a la doctora Erika Salas Muñoz, por el soporte que representó en esta travesía, por sus palabras de aliento y las pláticas amenas.

A la FCQ por abrirme las puertas una vez más y porque durante este tiempo pude conocer personas que me llevo en el corazón.

Gracias a mis amigas Rocío e Ivette, por su apoyo, sus ánimos, su presencia en este camino.

Gracias a Maylin y Danger, por todo su apoyo y buena compañía.



## DEDICATORIAS

Para Leonardo,  
Mi mayor inspiración,  
Sin ti mirándome esto hubiera sido imposible

Óscar y Leonardo: ¡Lo logramos! Los amo y les agradezco el  
esfuerzo que hicimos, por estar conmigo en medio de la dinámica  
que un paso como este representó para nosotros.

Gracias a mis papás, mis hermanos, mis abuelos...  
A toda mi familia por su presencia y apoyo,  
Un pedacito de todo esto es de todos

A mi abuelita Esther,  
Mi roble en el cielo

Perspectiva, Empatía, Confianza, Actitud,  
Gratitud, Conciencia, Congruencia...

TUDO PASA...



## ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS .....	4
ÍNDICE DE FIGURAS .....	5
RESUMEN.....	6
ABSTRACT.....	8
1. INTRODUCCIÓN .....	10
2. ANTECEDENTES .....	12
2.1 Enzimas en el procesamiento de alimentos .....	12
2.2 Proteasas utilizadas en la elaboración de queso .....	14
2.3 Proteasas vegetales en la elaboración de queso .....	16
2.4 Purificación de proteasas vegetales.....	17
2.5 <i>Solanum elaeagnifolium</i> Cavanilles.....	22
2.6 Usos de <i>Solanum elaeagnifolium</i> Cavanilles.....	25
2.7 Antecedentes particulares.....	25
3. JUSTIFICACIÓN.....	27
4. HIPÓTESIS.....	28
5. OBJETIVOS.....	28
5.1 Objetivo general.....	28
5.2 Objetivos particulares.....	28
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	29
6.1 Materia vegetal .....	29
6.2 Reactivos .....	29
6.3 Análisis proximal del polvo de bayas.....	30



6.4 Obtención de extracto crudo .....	30
6.5 Determinaciones químicas al extracto crudo .....	31
6.5.1 Cuantificación de proteína.....	31
6.5.2 Evaluación cualitativa de actividad enzimática .....	32
6.5.3 Cuantificación de actividad proteolítica .....	33
6.5.4 Cuantificación de actividad lipolítica .....	34
6.5.5 Cuantificación de actividad amilolítica .....	35
6.6 Electroforesis SDS-PAGE .....	36
6.7 Purificación de la proteasa .....	37
6.8 Caracterización de la trompillina .....	38
6.8.1 pH óptimo.....	38
6.8.2 Temperatura óptima .....	38
6.8.3 Tipo catalítico .....	39
6.9 Evaluación de la actividad coagulante .....	39
6.10 Hidrólisis de las caseínas de la leche por <i>Solanum elaeagnifolium</i> Cavanilles .....	43
6.11 Sinéresis de los geles de leche .....	43
6.12 Análisis estadístico .....	44
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	45
7.1 Análisis proximal .....	45
7.2 Evaluación cualitativa de la actividad enzimática de <i>Solanum elaeagnifolium</i> Cavanilles.....	48
7.3 Evaluación cuantitativa de la actividad enzimática de <i>Solanum elaeagnifolium</i> Cavanilles.....	51
7.4 Proteínas presentes en el extracto de <i>Solanum elaeagnifolium</i> Cavanilles.....	54



7.5 Purificación y caracterización de la proteasa de trompillo .....	56
7.6 Evaluación de la actividad coagulante de la trompillina .....	62
7.7 Hidrólisis de las caseínas de la leche por la trompillina.....	70
7.8 Sinéresis de los geles de leche .....	74
8. CONCLUSIÓN .....	78
9. BIBLIOGRAFÍA .....	79
Apéndice I. Reactivos, materiales y equipo .....	88
Apéndice II. Análisis proximal. ....	91
Apéndice III. Curva de calibración para cuantificación de proteína. ....	98
Apéndice IV. Curva de calibración de tirosina (cálculo de actividad proteolítica)...99	
Apéndice V. Curva de calibración de para-nitrofenol.....	100
Apéndice VI. Curva de calibración de almidón. ....	101
Apéndice VII. Protocolo SDS-PAGE. ....	102
Apéndice VIII. Curvas de calibración para cálculo de peso molecular en SDS- PAGE. ....	106
Apéndice IX. Saturación de sulfato de amonio considerando la solubilidad a 0°C. .....	108
Apéndice X. Solvente de proteína.....	109
Apéndice XI. Caracterización de las fracciones de elusión en Sephadex G-100. 110	
Apéndice XII. Composición de la leche comercial utilizada en el proyecto. ....	112
Apéndice XIII. Datos de la prueba de sinéresis.....	113
Apéndice XIV. Análisis de varianza (ANOVA) y análisis múltiple de medias (Tukey- Kramer). ....	114



## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Resumen de caracterización de proteasas de fuentes vegetales .....	20
Tabla 2. Análisis proximal de las bayas maduras de <i>Solanum elaeagnifolium</i> Cavanilles .....	46
Tabla 3. Actividad enzimática de <i>Solanum elaeagnifolium</i> Cavanilles.....	53
Tabla 4. Esquema de purificación de la trompillina .....	58
Tabla 5. Efecto de diferentes inhibidores de proteasa sobre la actividad proteolítica de la trompillina.....	62
Tabla 6. Comportamiento reológico de la leche coagulada con diferentes proteasas .....	65
Tabla 7. Actividad coagulante y proteolítica de las proteasas utilizadas durante la prueba de actividad coagulante .....	69
Tabla 8. Resultados de la prueba de sinéresis de los geles de leche.....	76
Tabla 9. Formulación para geles SDS-PAGE.....	104
Tabla 10. Cuantificación de actividad específica en las fracciones de purificación de la trompillina .....	110
Tabla 11. Composición de la leche utilizada en las pruebas de coagulación.....	112
Tabla 12. Composición de la leche utilizada en las pruebas de sinéresis .....	112



## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. <i>Solanum elaeagnifolium</i> Cavanilles.....	24
Figura 2. Representación gráfica de la ecuación sigmoideal de cuatro parámetros utilizada para analizar el comportamiento reológico de la leche .....	42
Figura 3. Bayas maduras y polvo de bayas de <i>Solanum elaeagnifolium</i> .....	47
Figura 4. Resultados de evaluación cualitativa de la actividad enzimática de <i>Solanum elaeagnifolium</i> Cavanilles.....	50
Figura 5. Electroforetograma SDS-PAGE del extracto de bayas de <i>Solanum elaeagnifolium</i> Cavanilles.....	55
Figura 6. Electroforetograma SDS-PAGE y zimograma de la trompillina .....	59
Figura 7. Efecto de la temperatura y pH sobre la actividad proteolítica de la trompillina .....	61
Figura 8. Representación gráfica del comportamiento de los geles durante la evaluación de la actividad coagulante a 37 °C .....	64
Figura 9. Hidrólisis de las proteínas de la leche durante la formación de un gel a 37 °C .....	72
Figura 10. Cinética de cuantificación de tirosina .....	73
Figura 11. Proteínas presentes en el suero liberado por geles de leche .....	77
Figura 12. Perfil de elusión del extracto crudo de trompillo en la columna de Sephadex G-100.....	108



## RESUMEN

Las proteasas son enzimas utilizadas en la industria de los alimentos, principalmente en la elaboración de queso. En años recientes se ha explorado la presencia de proteasas vegetales que tengan actividad coagulante para utilizarlas como sustitutos de la quimosina. En el norte de México se ha utilizado de manera artesanal el macerado de las bayas maduras de *Solanum elaeagnifolium* Cavanilles, conocido como trompillo, para elaborar queso asadero. Este hecho indicaba la presencia de una proteasa con actividad coagulante en las bayas de trompillo. Sin embargo, no se encontraba información sobre la enzima aislada ni las condiciones de máxima actividad. El objetivo de esta investigación fue el de aislar y caracterizar la proteasa presente en las bayas maduras de *Solanum elaeagnifolium* Cavanilles, así como evaluar su actividad coagulante y proteolítica en leche de vaca. El aislamiento de la enzima, a la que se nombró *trompillina*, se llevó a cabo a partir de un extracto crudo de polvo de bayas de trompillo que se sometió a precipitación con sulfato de amonio y filtración en gel utilizando Sephadex G-100. Se caracterizó la trompillina cuantificando su actividad enzimática por medio de la hidrólisis de caseína en diferentes condiciones de pH (5, 6, 7, 8 y 9) y temperatura (25, 30, 40, 50, 60, 70, 80 y 90 °C). Para clasificar la enzima se evaluó la actividad en presencia de inhibidores de proteasa. Adicionalmente, se estudió la dinámica de formación de geles de leche midiendo el cambio en la viscosidad de leche adicionada con trompillina y dos proteasas comerciales. Finalmente, se evaluó la forma en que la trompillina hidrolizaba las caseínas utilizando la técnica SDS-PAGE. Los resultados indican que la trompillina es una serina proteasa tipo cucumisina de 57 kDa, que exhibe su máxima actividad a 30 °C y pH 9. Durante el proceso se alcanzó un índice de purificación de 415, lo que es notable ya que otros autores reportan índices en el rango de 0.03 a 87. La trompillina tiene alta actividad proteolítica (535.47  $U_{Tir}/mL$ ), mayor a la que se encontró para las quimosinas comerciales (30.49  $U_{Tir}/mL$  y 24.89  $U_{Tir}/mL$ ). En las pruebas de actividad coagulante se observó que la trompillina tiene un radio de actividad coagulante/ actividad proteolítica considerablemente menor (6.83) que el de las quimosinas





comerciales (187.75 y 223.76). Esto se atribuye a la amplia actividad proteolítica dada por la acción de la trompillina sobre la kappa, alfa y beta caseínas. Esta relación entre actividad proteolítica y coagulante genera geles de leche débiles (7.03 mPa s), que requieren mayor tiempo para su formación (14.61 min) y donde hay pérdida de péptidos en el suero (contenido de proteína de 0.938 mg/mL) al compararlos con los formados por quimosinas que presentan una viscosidad de 9 a 10 mPa s, un tiempo medio de formación de 8.5 min y que tienen poca cantidad de proteínas en el suero (0.137 mg/mL). Sin embargo, la formación de geles de leche por la trompillina mejora al utilizarla junto a una quimosina comercial para lograr coagular la leche y disminuir la pérdida de proteínas en el suero. Con la información generada se concluye que la trompillina tiene amplia actividad sobre las proteínas de la leche. Este hallazgo se puede aplicar a la generación de hidrolizados de leche, por ejemplo, para disminuir la alergenicidad en fórmulas para infantes. Por otro lado, la mejora de las condiciones gelificantes al usarse junto a una quimosina comercial indican que esta proteasa vegetal es apta para usarse de manera binaria y generar un producto lácteo con buenas propiedades reológicas. Adicionalmente, se evaluó si el extracto crudo de trompillo presentaba actividad lipolítica y amilolítica. Estos resultados son de interés, ya que el extracto crudo al presentar tres actividades enzimáticas distintas, puede utilizarse sin purificación, por ejemplo, al aplicarse en productos de leche y de panadería.



## ABSTRACT

Proteases are enzymes used in the food industry, mainly to make cheese. Recently, the presence of plant proteases that can hydrolyze milk proteins and that have clotting activity has been explored to be used as chymosin substitutes. In northern Mexico, the maceration of ripe *Solanum elaeagnifolium* Cavanilles berries, known as trompillo, has been used in an artisanal way to make Asadero cheese. This information indicated the presence of a milk-clotting protease; however, no information was found on the isolated enzyme or the conditions of highest activity. The aim was to isolate and characterize the protease from ripe berries of *Solanum elaeagnifolium* Cavanilles, as well as to evaluate its milk-clotting and proteolytic activities in cow's milk. The isolation of the protease named *trompillin* was carried out from crude extract subjected to ammonium sulfate precipitation and gel filtration using Sephadex G-100. Trompillin was characterized by measuring its enzymatic activity by casein hydrolysis under different pH (5, 6, 7, 8 and 9) and temperature conditions (25, 30, 40, 50, 60, 70, 80 and 90 °C). To classify the enzyme, the activity was evaluated in the presence of protease inhibitors. Additionally, the dynamics of milk gel formation was studied by measuring the change in viscosity of milk added with trompillin and two commercial proteases. Finally, the way in which trompillin hydrolyzed caseins was evaluated using the SDS-PAGE. The results indicate that trompillin is a 57 kDa cucumisin-type serine protease, which exhibits its highest activity at 30 °C and pH 9. During the process, a purification index of 415 was achieved. This index is remarkable since other authors reports 0.03 to 87. Trompillin has high proteolytic activity (535.47 U<sub>Tir</sub>/mL), higher than that found for commercial chymosins (30.49 U<sub>Tir</sub>/mL and 24.89 U<sub>Tir</sub>/mL). In milk-clotting tests it was observed that trompillin has a lower ratio of milk-clotting activity/proteolytic activity (6.83) than that of commercial chymosins (187.75 and 223.76). This is attributed to the broad proteolytic activity given by the action of trompillin on kappa, alpha and beta caseins. This relationship between proteolytic and milk-clotting activity generates weak milk gels (7.03 mPa s), which require a longer time for their formation (14.61 min) and where there is loss of peptides in the whey (protein content of 0.938 mg/mL) when



compared to with those formed by chymosins that have a viscosity of 9 to 10 mPa s, an average formation time of 8.5 min and that have a low amount of protein in the whey (0.137 mg/mL). However, the formation of milk gels by trompillin is improved when used together with a commercial chymosin to milk-clotting and reduce protein loss in whey. With the information generated, it is concluded that trompillin has broad activity on milk proteins. This finding can be applied to the generation of milk hydrolysates, for example, to reduce allergenicity in infant formulas. On the other hand, the improvement of the gelling conditions when used together with a commercial chymosin indicate that this plant protease is suitable for use in a binary way and generate a dairy product with good rheological properties. Additionally, it was evaluated whether the crude trompillo extract had lipolytic and amylolytic activity. These results are of interest, since the crude extract has three different enzymatic activities, can be used without purification, for example, when applied in milk and bakery products.



## 1. INTRODUCCIÓN

Las enzimas son moléculas que llevan a cabo reacciones de manera rápida, selectiva y reproducible. En la industria del procesamiento de alimentos se utilizan diferentes enzimas. La búsqueda por nuevas fuentes de enzimas y de características especiales en ellas ha dirigido la atención hacia los vegetales (Gonzalez-Rabade, Badillo-Corona, Aranda-Barradas y Oliver-Salvador, 2011; Sarmah *et al.*, 2018; Zhang, He y Simpson, 2018).

En el mercado comercial, las proteasas cubren el 60% del total. La principal aplicación de las proteasas en la industria de los alimentos se encuentra en los productos lácteos, cárnicos y en productos de panificación (Guevara y Daleo, 2018). Las proteasas se encuentran en todas las partes de la planta: tallo, semilla, flores, raíces, etc. (Shah, Mir y Paray, 2014). La búsqueda de nuevas fuentes de proteasas vegetales tiene su mayor aplicación en la elaboración de queso. Algunas proteasas vegetales han mostrado actividad coagulante en leche de bovino. De manera general, una proteasa vegetal no tiene buena actividad coagulante, sin embargo, ésta mejora al purificarse al menos parcialmente (Hashim, Mingsheng, Iqbal y Xiaohong, 2011; Uchikoba y Kaneda, 1996).

Además de las proteasas, las lipasas y amilasas son importantes en la industria de los alimentos. Las lipasas son particulares, ya que catalizan reacciones en sistemas no acuosos. La principal fuente de lipasas vegetales son las semillas. Se ha probado que los extractos vegetales con actividad lipolítica catalizan reacciones de síntesis e hidrólisis (Sarmah *et al.*, 2018). Por su parte, las amilasas se encuentran en todos los vegetales y son activas principalmente, durante la germinación.

*Solanum elaeagnifolium* Cavanilles es una solanácea que crece en regiones semiáridas y es considerada maleza. En el Estado de Chihuahua se le conoce como “trompillo” y se ha utilizado su fruto como coagulante en la elaboración artesanal de



queso asadero (Gutiérrez-Méndez, Chávez-Garay y Jiménez-Campos, 2012). En investigaciones previas se encontró que el extracto de la baya de *S. elaeagnifolium* Cavanilles tiene actividad coagulante y mostró bandas en gel de electroforesis con un peso similar a otras proteinasas aspárticas usadas en la coagulación de leche (Gutiérrez *et al.*, 2012). Por comunicación personal, se sabe que la adición de un macerado acuoso de las bayas de trompillo, mejora la característica de la masa para elaborar buñuelos.

La actividad proteolítica de las bayas de trompillo se había demostrado utilizando un extracto crudo y sólo se tenía un dato aproximado sobre el peso molecular de la proteasa. No se tenía información sobre las condiciones óptimas para su funcionamiento, se desconocía el tipo de proteasa al que pertenecía y se tenía poca información sobre su actividad proteolítica sobre las caseínas de la leche de vaca. Conocer todas estas variables permitiría estandarizar las condiciones de uso de la proteasa como agente coagulante, por lo que el objetivo de este proyecto fue el de aislar la proteasa para obtener su peso molecular, condiciones ideales de pH y temperatura y el tipo catalítico, así como su actividad coagulante en leche de vaca. Adicionalmente, se evaluó si el extracto contaba con otro tipo de actividades menos estudiadas, como la lipolítica y amilolítica. Esta información permitiría ampliar las áreas de aplicación del trompillo.



## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Enzimas en el procesamiento de alimentos

Las enzimas son utilizadas en diversas áreas de la industria de los alimentos. Entre estas destacan el procesamiento de lácteos, productos de panadería, bebidas y elaboración de cerveza, grasas, aceites, carnes y para producir alimentos funcionales (Zhang *et al.*, 2018). Su amplio uso se debe a que son moléculas que llevan a cabo reacciones de manera eficiente, selectiva, rápida y reproducible. Por lo tanto, siempre se están buscando enzimas con características únicas, por ejemplo, que sean activas a elevadas temperaturas o que sean estables en un amplio rango de pH. El mercado mundial de enzimas se valoró en \$10.69 millones de dólares en 2020 y se proyectó un crecimiento anual del 6.5% entre el año 2021 y el 2028 (Enzymes Market Size, Share and Trends Analysis Report, 2021-2028). Este reporte se basa en la creciente demanda de los consumidores por alimentos y bebidas funcionales que se prevé desencadene la demanda de nuevas fuentes de enzimas en los próximos años. En la actualidad los microorganismos son la principal fuente de enzimas, pero las enzimas de origen vegetal están llamando la atención de la industria de los alimentos (Gonzalez-Rabade *et al.*, 2011; Sarmah *et al.*, 2018).

Las lipasas son versátiles en la industria del procesamiento ya que pueden catalizar reacciones en un amplio rango de valores de pH y temperaturas, en sistemas no acuosos y en solventes orgánicos. Las lipasas se han convertido en indispensables en la industria de los alimentos. Se utilizan en el desarrollo de grasas y sabor, para realzar la calidad de los alimentos, la vida de anaquel y mejorar las propiedades reológicas en lácteos, alimentos horneados, aceites, en el procesamiento de carne y pescado, en jugos de frutas y en el procesamiento de huevo, entre otros. En la industria de los lácteos las lipasas se usan para hidrolizar la grasa de la leche, para desarrollar sabor y aroma durante la maduración del queso y en la lipólisis de la mantequilla. Las lipasas se añaden también a los productos horneados para mejorar su textura y vida



de anaquel. Las fosfolipasas se usan para hacer mayonesa con yema de huevo y como emulsificantes. Un uso interesante es el que se da a las lipasas al usarlas para convertir lípidos de bajo valor en productos de alto valor (Seth, Chakravorty, Kumar y Patra, 2014).

Dentro de la fisiología de los vegetales, la mayor actividad lipolítica se encuentra en las semillas, especialmente durante la germinación. Las lipasas en extractos crudos vegetales pueden catalizar directamente reacciones de síntesis o hidrólisis (Sarmah *et al.*, 2018). Se espera que el mercado mundial de las lipasas alcance \$590.5 millones de dólares para el año 2020 (Javed *et al.*, 2018; Seth *et al.*, 2014).

Por su parte, las amilasas representan el 30% del mercado mundial de enzimas. Las amilasas son ampliamente utilizadas en la industria de los alimentos, pero de manera particular son importantes para la industria de la panificación. En esta área, se utilizan enzimas que modifican el almidón para mejorar la calidad y vida de anaquel de los productos. Esto es de gran importancia, por ejemplo, el desperdicio de pan representa más de un millón de dólares en Estados Unidos. La recristalización de la amilopectina es la principal causa de “endurecimiento” del pan, este es un efecto indeseable que limita la vida de anaquel de los productos horneados. Este efecto describe el endurecimiento de la corteza y la miga, disminución de humedad y pérdida de aroma y sabor. Las amilasas se agregan a la masa para generar compuestos fermentables a partir del almidón y para tener un efecto “antienviejecimiento” (Khemakhem, El Abed, Chakroun, Fendri y Smaoui, 2019; van der Maarel, 2002). Las amilasas se encuentran en diversas fuentes vegetales, pero los cereales como la cebada, soya, sorgo, maíz y mijo son quizás la mejor fuente, especialmente durante la germinación. Se han aislado amilasas vegetales de la papa, frijol, alfalfa y chícharo (Khemakhem *et al.*, 2019).

Dentro de la amplia variedad de enzimas que existen y que se aplican en diversas áreas de la industria de los alimentos, las proteasas tienen una larga historia. Las





proteasas se han convertido en opciones cada vez más atractivas dentro de la industria de los alimentos gracias a sus propiedades específicas, como el alto rendimiento de producción, especificidad de sustrato y alta actividad, además de que son amigables con el medio ambiente. Dentro de sus cualidades se encuentran el poder llevar a cabo reacciones en un amplio rango de temperatura (20-80 °C) y pH (3-13), lo que aumenta las áreas donde pueden aplicarse (Binod, Papamichael, Varjani y Sindhu, 2019).

Las proteasas son las enzimas de mayor comercialización en el mercado, con el 60% del total de la venta de enzimas. En el procesamiento de alimentos, las proteasas son ampliamente utilizadas en el ablandamiento de carnes, clarificación de bebidas, para remoción de sabores amargos, dar textura a los alimentos, eliminar proteínas, para producir moléculas que impartan sabor, para obtener péptidos bioactivos, en la modificación de masas y en la elaboración de queso (Zhang *et al.*, 2018, Guevara y Daleo, 2018; Shah *et al.*, 2014).

## 2.2 Proteasas utilizadas en la elaboración de queso

Las proteasas se han usado por décadas en la industria quesera como agentes coagulantes de la leche para producir distintos tipos de queso. La función de las proteasas en esta industria se debe a la actividad que presentan sobre las micelas de caseína en el proceso llamado coagulación enzimática de la leche.

Las micelas de caseína son agregados formados por  $\alpha_s$ -caseína,  $\beta$ -caseína y  $\kappa$ -caseína. La micela es estable debido a su carga neta y a la repulsión estérica de la región macropeptídica flexible de la  $\kappa$ -caseína, específicamente por el carbono terminal hidrofílico en su exterior que actúa como una “capa protectora” y una barrera contra la asociación con otras micelas. También se atribuye su estabilidad a interacciones inducidas por calcio entre moléculas de proteína, enlaces hidrógeno e interacciones electrostáticas e hidrofóbicas.



La coagulación enzimática tiene dos fases, en la primera se lleva a cabo la hidrólisis de la caseína y en la segunda la aglomeración de las proteínas generando una red (Ben Amira, Besbes, Attia y Blecker, 2017). A continuación, se describe a detalle cada una de las fases. En la primera, la hidrólisis del enlace Phe<sub>105</sub>-Met<sub>106</sub> de la  $\kappa$ -caseína desestabiliza la micela. La fracción C-terminal de la  $\kappa$ -caseína, que representa los residuos 106-169, también llamado glicomacropéptido o caseinomacropéptido (CMP) de carácter hidrofílico difunde hacia el suero. Cuando se libera el CMP se disminuye el potencial z ( $\sim 5-7\text{mV}$ ) de la micela reduciéndose también la repulsión electrostática entre las micelas afectadas por la acción de la proteasa. Las micelas desestabilizadas interactúan entre ellas cada vez más fuertemente aumentando también la extensión de la proteólisis. Cuando se ha dado una eliminación más extensa de la “capa protectora” de la  $\kappa$ -caseína se pierde la estabilización estérica y hay una disminución del diámetro de la micela es cuando se produce una verdadera agregación con la consecuente formación de un gel. Esto sucede cuando la hidrólisis enzimática llega a un 87%, pues cabe señalar que ambas fases de la coagulación enzimática se superponen. Aunque la naturaleza de las fuerzas de atracción durante la agregación de las micelas de caseína aún no está completamente clara, probablemente se trate de puentes de calcio (en presencia de calcio libre), fuerzas de van der Waals e interacciones hidrofóbicas. En cuanto a la viscosidad de la leche, en la fase inicial de la formación de la cuajada se observa una pequeña disminución debida a la desestabilización de las micelas de caseína, y es hasta que la fase enzimática casi ha terminado cuando la viscosidad de la leche incrementa, en condiciones normales de pH y contenido de proteína (Lucey, 2020).

La solución de proteasas utilizada desde la antigüedad para la elaboración de queso es el “cuajo”. Se trata de una salmuera extraída del abomaso de los terneros lactantes, que contiene quimosina como la principal proteasa, además de una cantidad menor de pepsina (Afsharnejhad, Shahangian y Sariri, 2019). Este coagulante también llamado renina, era utilizado para producir queso, pero entre los años 60’s y 70’s se incrementó la demanda de queso y con ello la de cuajo. Dada la dificultad



técnica para conseguir el cuajo tradicional, este incremento en la demanda de un agente coagulante llevó a la búsqueda de nuevas fuentes.

Entre las nuevas opciones que cubrieron bien la demanda se encuentran las proteasas de origen animal, vegetal, microbiano y recombinante. Los principales sustitutos del cuajo tradicional son la quimosina de origen microbiano producida por *Rhizomucor miehei*, *Rhizomucor pusillus* y *Cryphonectria parasítica*, y la quimosina recombinante. Se estima que el mercado de los coagulantes para leche pertenece en 70-80% a la quimosina recombinante de *Bos taurus* (Jacob, Jaros y Rohm, 2011). Estas enzimas habían cubierto de manera satisfactoria el mercado de los coagulantes para producir queso, pero la demanda de los consumidores por evitar el uso de organismos genéticamente modificados impulsó una nueva búsqueda que se ha dirigido a las proteasas de origen vegetal (Jacob *et al.*, 2011; Shah *et al.*, 2014).

### 2.3 Proteasas vegetales en la elaboración de queso

Todas las plantas contienen proteasas, éstas juegan un papel importante en funciones vitales como mecanismo de defensa, en la muerte celular programada, fotomorfogénesis y en el desarrollo de las semillas (Shah *et al.*, 2014; van der Hoorn, 2008).

Se sabe que algunas proteasas vegetales pueden coagular la caseína y se han utilizado por años de manera artesanal en la elaboración de quesos. En Portugal y en el sur de España se usa la flor de cardo *Cynara cardunculus* en la elaboración de quesos con denominación de origen. En Portugal se producen los quesos queijo de Azeitao, de Evora, de Nisa, Serpa, Serra da Estrela, de Castelo Branco, mestizo de Tolosa y en España el “Torta del Casar”, “La Serena”, “Serra da Estrela” y “Flor de Guía”. El coagulante vegetal se prepara de manera artesanal macerando los pistilos de la flor con agua y cuentan también con una variedad de cuajos vegetales con



cardosina, como el Cyzime, PVC, Cyprozime y VRen (Almeida y Simoes, 2018). Sin embargo, no todas las proteasas de origen vegetal pueden provocar la hidrólisis y coagulación de las caseínas.

Para que una proteasa sea útil en la elaboración de queso debe tener alta actividad coagulante (MCA, de milk-clotting activity) y baja actividad proteolítica (PA, de proteolytic activity), o un radio MCA/PA alto. Esta relación depende de la capacidad de la enzima para hidrolizar específicamente la  $\kappa$ -caseína y se asocia a alto rendimiento de la cuajada, buenas características de textura y sabor del queso. Por el contrario, una proporción baja MCA/PA da como resultado la formación de geles con textura suave y el desarrollo de sabores amargos (Ben Amira *et al.*, 2017), y bajo rendimiento con aumento de la pérdida de proteínas en el suero (Chávez-Garay, Gutiérrez-Méndez, Valenzuela-Soto y García-Triana, 2016). Ese fenómeno se observa en la mayoría de las proteasas vegetales ya que hidrolizan la  $\kappa$ -caseína, pero también otras caseínas. Esta hidrólisis inespecífica no favorece la formación de cuajada durante la elaboración de queso (Chávez *et al.*, 2016). De manera general, las proteasas vegetales tienen poca actividad coagulante y alta actividad proteolítica (Jacob *et al.*, 2011), por lo que solo pocas de ellas se han usado en la manufactura de queso. Sin embargo, se ha observado que este parámetro mejora cuando las proteasas se purifican parcialmente (Uchikoba y Kaneda, 1996).

## 2.4 Purificación de proteasas vegetales

La estrategia que seguirse en el aislamiento de una enzima son los métodos convencionales de purificación y determinación de actividad (Zhang *et al.*, 2018). Para comenzar la purificación de cualquier enzima se debe considerar qué información está disponible y cuáles son las interrogantes. Conviene responder algunas preguntas, como la cantidad de enzima necesaria, cómo se afectará la actividad biológica durante la purificación, y el grado de pureza requerido de acuerdo con el uso previsto (Doonan y Cutler, 2004).



En todos los protocolos que se diseñen para purificar enzimas se debe cuantificar la cantidad de proteína y la actividad enzimática. Estos dos parámetros se determinan en cada paso del proceso. Específicamente la actividad enzimática es importante para garantizar que se conserve la actividad durante todo el proceso. Los métodos más utilizados para cuantificar proteína son el método de Biuret y el de Bradford. Por otro lado, para cuantificar la actividad enzimática las técnicas disponibles son variadas y se debe elegir con base en el tipo de enzima que se desee purificar. Para monitorear la presencia y actividad de la enzima en cada paso del protocolo de purificación también se pueden utilizar técnicas electroforéticas como el SDS-PAGE y zimogramas (Harris y Angal, 1989).

Al iniciar el diseño del protocolo y para elegir las técnicas más adecuadas, en principio se debe saber si la enzima es intracelular o extracelular, esto añadirá un paso para romper los tejidos o aislar los organelos a partir de los cuales se extraerá la enzima. Para concentrar un extracto puede utilizarse la centrifugación, microfiltración, ultrafiltración, liofilización, remoción de sales y soluciones amortiguadoras de intercambio. También se pueden separar enzimas utilizando cambios en el pH del medio, cambiando la fuerza iónica con adición de sales (principalmente sulfato de amonio), usando solventes orgánicos o por desnaturalización. También se puede aislar usando como factor diferenciador su estructura, aplicando técnicas de cromatografía, distintos materiales en la fase estacionaria, tomando en cuenta la carga de la enzima, su hidrofobicidad, o en función de su actividad utilizando materiales adsorbentes y ligandos, o aprovechando las diferencias en el tamaño de las moléculas presentes en el extracto, por ejemplo, aplicando técnicas de cromatografía como la filtración en gel (Harris y Angal, 1989).

Se han usado extractos vegetales de proteasas como agentes coagulantes desde la antigüedad. Los métodos tradicionales para obtener un extracto de proteasas vegetales incluyen la maceración acuosa acompañada de filtrado y la maceración con



sal de mesa y posterior colado de la pasta y disolución en leche tibia. El resultado de estos procedimientos es un extracto crudo con actividad proteolítica que puede ser posteriormente purificado para obtener una solución con mayor grado de pureza, e incluso una enzima pura. Sin embargo, en su aplicación como agente coagulante no es necesario que las proteasas vegetales sean completamente aisladas de su fuente natural. La forma más común en su preparación es hacer una extracción acuosa utilizando cualquier parte de la planta, como flores (frescas o secas), semillas, raíces, hojas e incluso del látex de algunos árboles. Un ejemplo es el uso de las flores secas de cardo que se maceran en agua y posteriormente se filtra para obtener un extracto crudo que se utiliza directamente para la elaboración de queso (Shah *et al.*, 2014).

Diversos autores han reportado la purificación total o parcial de proteasas vegetales con capacidad coagulante. En la Tabla 1 se muestran algunos ejemplos de proteasas obtenidas de vegetales y su caracterización. Como se observa en el caso del extracto de *Bromelia pinguin* L (Moreno-Hernández *et al.*, 2017) y el de *Wrightia tinctoria* (Rajagopalan y Omana, 2018), la actividad coagulante se puede evaluar en un extracto parcialmente purificado. Es decir, en extractos que contienen más de una enzima sin que esto interfiera con su actividad coagulante. También se ha evaluado la actividad coagulante en extractos obtenidos de dátil (Beka *et al.*, 2014), papaya (Hafid *et al.*, 2020), jengibre (Hashim, Mingsheng, Iqbal y Xiaohong, 2011), uva (Felix da Silva, Matumoto-Pintro, Bazinet, Couillard y Britten, 2015), semilla de girasol (Egito *et al.*, 2007), melón (Mazorra-Manzano *et al.*, 2013), ficus (Kumari, Sharma y Jagannadham, 2012) e hinojo (Bey, Debbebi, Abidi, Nejib y Ben, 2018), entre otros.



Tabla 1. Resumen de caracterización de proteasas de fuentes vegetales.

Autor/año	Enzima	Fuente	Actividad proteolítica (U)	Actividad específica (U/mg)	pH óptimo	Temp (°C)	kDa	IP	Tipo
Ahmed <i>et al.</i> , 2009	Dubiumina	<i>Solanum dubium</i> Fresen	0.0407	91.7	11	70	66	2.9	Serina
Sharma, Kumari y Jagannadham, 2012	Reliogiosin C	Latex <i>Ficus religiosa</i>	400.1	55.01	6 a 8	45	80	2.29	Serina
Afsharnezhad <i>et al.</i> , 2019	-	<i>Ficus johannis</i>	8.6	10.48	6.5	60	25	8.73	Cisteína
Salehi, Aghamaali, Sajedi, Asghari y Jorjani, 2017	-	Fruto de <i>Withania coagulans</i>	12.61	19.64	5.5	65	31	6.98	Aspártica
Pontual <i>et al.</i> , 2012	-	Flores <i>Moringa oleifera</i>	37.5	0.078	4	50	-	-	Aspártica
Hafid <i>et al.</i> , 2020	Papaina de látex	<i>Carica papaya</i>	1.16	0.18	6	50	23.2	0.03	Cisteína
Guevara, Daleo y Olivia, 2001	-	<i>Solanum tuberosum</i> L. cv Pampeana	-	-	3	-	40	-	Aspártica
Lufrano <i>et al.</i> , 2012	Procirsina	Clonada de <i>Cirsium vulgare</i>	-	-	4	30	50	-	Aspártica
Moreno-Hernández <i>et al.</i> , 2017	Extracto	<i>Bromelia pinguin</i> L	3.2	1.3	2 y 7.5	45	22 y 24	-	Aspártica, Cisteína y Serina
Nadaroglu y Demir, 2012	Compositaina	<i>Scorzonera hispanica</i> L (Escorzonera)	41.9	32.2	8	50	30	87.11	Serina
Lo Piero, Puglisi y Petrone, 2011	Actinidina	Kiwi	-	129.6	6.5	55	24	2.4	Cisteína





Continuación

Rajagopalan y Omana, 2018	Extracto de 3	<i>Wrightia tinctoria</i>	6.62	16.01	7.5	50	95.62; 91.11 y 83.23	0.581	Serina
Tito, Pepe, Tonon, Daleo y Guevara, 2020	StAPs	<i>Solanum tuberosum</i> L.	-	-	5	30	-	-	Aspártica
Tripathi, Tomar y Jagannadham, 2011	Streblina	Látex de <i>Streblus asper</i>	-	6.92	9	65	64	4.6	Serina
Badgujar y Mahajan, 2014	Nuvuliana II	Látex de <i>Euphorbia nivulia</i> Buch-Ham	-	183.67	6.3	50	43.67	1.32	Cisteína
Somavarapu, Vemula y Reddy, 2017	Solanaina	Latex de <i>Vallisneria spiralis</i>	7552	4.34	9	65	28.9	4.96	Cisteína
Singh, Kumar, Rao y Jagannadham, 2010	Crinumina	Látex de <i>Crinum asiaticum</i>	-	79.9	8.5	70	67.7	-	Serina
Hashim <i>et al.</i> , 2011	-	Rizoma de gengibre	11940	217.09	5.5	60	36	34.9	Cisteína
Raposo y Domingos, 2008	-	<i>Centaurea calcitrapa</i>	439	93404	5.1	52	50	46.2	Aspártica
Singh, Shukla, Jagannadham y Dubey, 2010	Proceraina B	<i>Calotropis procera</i>	15750	212	6.5 a 8.5	40 a 60	25.7	2.05	Cisteína

Información obtenida de la bibliografía citada en la primer columna; información no disponible escrita con un guión.



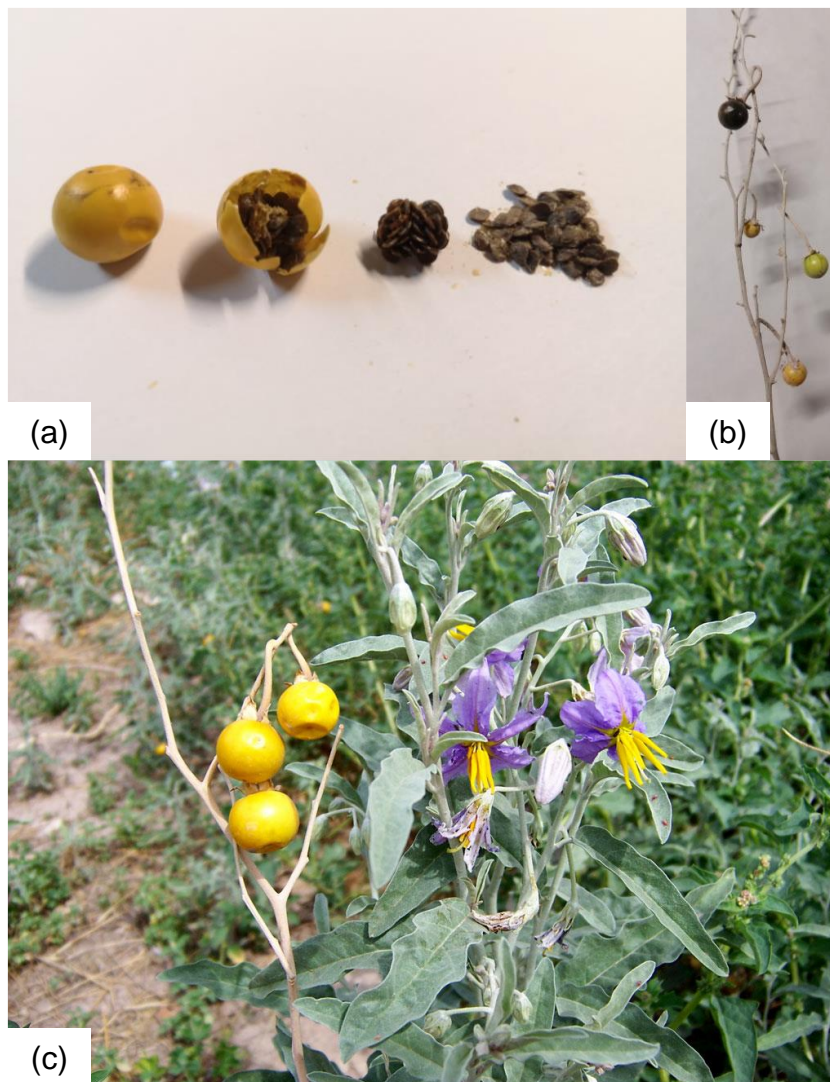
## 2.5 *Solanum elaeagnifolium* Cavanilles

*Solanum elaeagnifolium* Cavanilles es una solanácea perenne, el tallo tiene espinas, sus hojas son de color verde oscuro o grisáceo, y tiene características flores moradas, azules y raramente blancas. Tiene bayas esféricas que son verdes en estado inmaduro, amarillas al madurar y negras cuando pasan el estado de madurez. Una sola planta tiene de 40 a 60 bayas y éstas a su vez contienen de 60 a 120 semillas. Esta planta es conocida en el norte de México como “trompillo”. *Solanum elaeagnifolium* Cavanilles es nativo de América y se ha sugerido que el centro de origen geográfico más probable es el norte de México y el suroeste de los Estados Unidos (Gutiérrez-Méndez *et al.*, 2012). También se le puede encontrar en países como Australia, Egipto, Grecia, Sudáfrica y España.

*Solanum elaeagnifolium* Cavanilles es una planta que crece en regiones semiáridas, es considerada maleza y un gran problema para los cultivos de trigo, alfalfa y algodón ya que compite en territorio con los cultivos. También interfiere con la cría de animales y perturba las prácticas de recolección. Además, las especies de *Solanum*, contienen alcaloides tóxicos que al combinarse con azúcares forman glicoalcaloides, la solanina y solasonina. Estos glicoalcaloides son similares a las saponinas y causan irritación del tracto gastrointestinal. Dentro del tracto gastrointestinal, los glicoalcaloides pueden ser hidrolizados para liberar los alcaloides o alcalaminas, que son venenos para el sistema nervioso (Boyd, Murray y Tyrl, 1984). Se ha reportado que el envenenamiento se da al consumir la baya madura, por lo que es importante monitorear el contenido de los alcaloides tanto en la baya como en los extractos, para que su uso en alimentos sea seguro. Se han hecho algunos estudios sobre la toxicidad de los alcaloides a partir de los cuales se ha concluido por una parte que el consumo de 20 mg de alcaloide por 100 g de peso fresco del fruto que lo contiene es seguro (Milner *et al.*, 2011), y por otro lado se reportó un estudio toxicológico en extracto de *Solanum aethiopicum* que mostró ser inocuo a una dosis de 1 gramo por kilo de masa corporal por día (Guiama, Koube, Ngah, Beka y Bindzi, 2021). Considerando esta información, es importante que



se cuantifique el contenido de alcaloide en el extracto de trompillo y con esa información poder utilizarlo a mayor escala como un agente coagulante teniendo la seguridad de que no resultará dañino para quien consuma el producto elaborado.



**Figura 1.** *Solanum elaeagnifolium* Cavanilles. (a) Bayas maduras y semillas; (b) bayas sobremaduras (negras), maduras (amarillas) e inmaduras (verdes); (c) planta de trompillo con flores. (a y b, fotografías originales C. Nájera-Domínguez, 2019; c tomada de Serú y Tofi (s.f.).



## 2.6 Usos de *Solanum elaeagnifolium* Cavanilles

Existe información que indica que las bayas maduras de *S. elaeagnifolium* Cavanilles fueron utilizadas por los indios Pima del suroeste de los Estados Unidos como un agente de coagulación de la leche (Boyd *et al.*, 1984). Las propiedades coagulantes de *S. elaeagnifolium* Cavanilles fueron descritas por Bodansky en 1916 y 1924, quien reportó que la actividad coagulante se encontraba sólo en las bayas de la planta, en particular las bayas maduras (amarillas).

*Solanum elaeagnifolium* ha sido utilizada como coagulante de leche en Chihuahua, México por décadas de manera artesanal para elaborar queso. Este coagulante es preparado en una maceración acuosa que se añade a la leche para elaborar un queso artesanal tipo filata llamado “asadero” (Gutiérrez-Méndez *et al.*, 2012). Sin embargo, no existe un coagulante vegetal extraído de las bayas ni se tiene información sobre la enzima con actividad coagulante. No se ha reportado el uso de las bayas para la elaboración de otro tipo de queso.

Este extracto acuoso se ha usado también de manera tradicional para hacer buñuelos. La tradición transmitida de persona a persona indica que el extracto se prepara dejando por una noche las bayas en agua. Al día siguiente esa agua se agrega a harina de trigo para preparar buñuelos. En un proyecto reciente, también se evaluó la actividad amilolítica del extracto crudo en masas de harina de trigo (Piñón-Muñiz, 2021).

## 2.7 Antecedentes particulares

En investigaciones previas, Gutiérrez-Méndez *et al.* (2012) encontraron que el extracto vegetal de trompillo producía geles estables a partir de leche de bovino. Más adelante, Chávez-Garay *et al.* (2016) reportaron que las bayas contienen una enzima con capacidad coagulante. Además, encontró que tanto la piel como las semillas de



las bayas de *Solanum elaeagnifolium* Cavanilles tenían actividad enzimática. La enzima se encontró activa en las bayas amarillas (maduras) pero no en las verdes (inmaduras) ni en las sobre maduras (negras). También evaluó la actividad proteolítica y coagulante de extractos crudos obtenidos de las bayas. Encontró que el radio de coagulación/actividad proteolítica de la enzima extraída del trompillo era similar al de la renina o la quimosina. También encontró que la proteasa de trompillo efectuaba una hidrólisis inespecífica sobre las proteínas de la leche. Estos resultados llevaron a un posterior análisis del extracto en la elaboración de queso crema (Gutiérrez-Méndez *et al.*, 2019). Se encontró que una cantidad de 0.8 mL de extracto crudo por cada litro de leche producía queso crema con características similares al elaborado con quimosina comercial.

La información obtenida de la purificación y caracterización parcial hecha por Gutiérrez *et al.*, (2012), Chávez-Garay *et al.* (2016) y Ramírez (2016) indica un tamaño estimado de la enzima entre 50 y 70 kD (estimada por electroforesis SDS-PAGE) y que se trata de una serin-proteasa que actúa principalmente sobre la kappa- y beta-caseína. Se ha observado que la proteasa de *S. elaeagnifolium* Cavanilles produce péptidos de bajo peso molecular tras hidrolizar las caseínas de leche de bovino. Lo que nos lleva a suponer que podría generar una gran cantidad de péptidos de pequeño tamaño.



### 3. JUSTIFICACIÓN

De manera empírica por mucho tiempo se ha utilizado el extracto de bayas de *Solanum elaeagnifolium* Cavanilles como agente coagulante en la elaboración de queso. Esta actividad enzimática comenzó a estudiarse y se cuenta con el primer reporte en 1916, donde los resultados indicaban que las bayas de trompillo podían coagular la leche. La información que complementa este reporte es la generada por el equipo de trabajo donde se desarrolló esta investigación. Se estudiaron algunas variables de actividad enzimática a partir del extracto crudo de trompillo. Se ha encontrado que son las bayas maduras (amarillas) las que tienen la actividad coagulante, y no así las inmaduras ni las sobremaduras. Además, se había logrado establecer un peso aproximado de la proteasa y se logró la utilización del extracto como agente coagulante para producir un queso crema con características similares al que se produce utilizando quimosina. Sin embargo, no se contaba con la información de la enzima aislada ni se había podido caracterizar. No se conocían sus condiciones óptimas de funcionamiento, ni su tipo catalítico. Asimismo, se pensaba que se trataba de una enzima con actividad proteolítica distinta a la quimosina, pero esto no se había comprobado. Por lo tanto, en este trabajo de investigación se tuvo como objetivo principal aislar la enzima proteasa a partir de las bayas maduras de trompillo para posteriormente evaluar su actividad *in vitro* y en leche. La información generada a partir del aislamiento y caracterización de la enzima permitirá explicar las bases de su funcionamiento, así como su aplicación dentro de la industria de los alimentos, no solo como una fuente vegetal de cuajo para la elaboración de queso, sino que puede tener más aplicaciones en la tecnología de alimentos gracias a su elevada actividad proteolítica.





## 4. HIPÓTESIS

*Solanum elaeagnifolium* Cavanilles contiene una serina-proteasa con propiedades catalíticas diferentes a la quimosina, lo cual genera péptidos de bajo peso molecular al actuar sobre las caseínas de la leche de vaca. Esta hidrólisis inespecífica producida por la proteasa de *Solanum elaeagnifolium* también modificará la forma en la que se produce la gelificación de la leche.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1 Objetivo general

Aislar y caracterizar la proteasa de las bayas de *Solanum elaeagnifolium* Cavanilles y evaluar su actividad coagulante y proteolítica sobre las caseínas de leche de vaca.

### 5.2 Objetivos particulares

1. Evaluar la actividad enzimática de *Solanum elaeagnifolium* Cavanilles.
2. Aislar la proteasa a partir de bayas de *Solanum elaeagnifolium* Cavanilles.
3. Establecer el peso molecular y clase catalítica de la enzima purificada.
4. Obtener el pH y temperatura óptima de la proteasa aislada.
5. Evaluar la actividad coagulante y la hidrólisis de caseínas en leche de bovino.



## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 Materia vegetal

La materia primar utilizada para el presente estudio fueron mayas maduras de *Solanum elaeagnifolium* Cavanilles. Las bayas maduras (amarillas) se recolectaron durante el mes de enero del 2019 en diversos puntos de la Ciudad de Chihuahua (Chihuahua, México). Las bayas recolectadas se mantuvieron en bolsas de papel y se llevaron al laboratorio, donde se separaron de ramas y pedúnculo. Todas las bayas se molieron en un molino de cuchillas (Thomas Wiley Fisher, modelo 3383-L19, EUA) utilizando una malla número 20 (tamaño de partícula 0.841 mm). El polvo se almacenó en bolsas de plástico con cierre hermético, debidamente identificadas, a -20°C hasta su uso (Gutiérrez-Méndez *et al.*, 2019). El polvo de bayas se caracterizó determinando el contenido de cenizas, grasa, proteína, humedad y fibra utilizando los métodos oficiales de la AOAC, adicionalmente se midió su pH. Este polvo de bayas fue el material a partir del cual se obtuvo el extracto crudo.

### 6.2 Reactivos

El extracto crudo se preparó utilizando acetato de sodio, ácido acético y cloruro de sodio grado reactivo. El sulfato de amonio (CTR Scientific, N.L., México) y Sephadex G-100 (Sigma-Aldrich, St. Louis MO, EUA) se utilizaron para la purificación de la proteasa. Para las técnicas SDS-PAGE y zimograma se utilizaron los reactivos 2-mercaptoetanol, acrilamida, bisacrilamida, dodecil sulfato sódico, persulfato de amonio, N,N,N'.N'-tetrametiletilendiamina y trizma base, todos grado electroforesis de la marca Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA), además de marcador de peso molecular PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA) y Triton X-100 grado reactivo de Sigma Aldrich (St. Louis MO, EUA). Para la evaluación de actividad enzimática se utilizaron tributirina, 2-propanol, p-nitrofenol, p-nitrofenil butirato, reactivo de Folin-Ciocalteu y tirosina de Sigma-Aldrich (St. Louis MO, EUA);



almidón soluble y carbonato de sodio de CTR Scientific (N.L., México); Tween 80 (Faga Lab, Sin., México), albúmina bovina de suero, caseína (Hycl, Jal. México), yodo y yoduro de potasio (Fermont, N.L., México), todos de grado reactivo. Se utilizaron los inhibidores de proteasas E-64 ( $\geq 98\%$  pureza), EDTA ( $\geq 98\%$  pureza), fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF,  $\geq 98.5\%$  pureza) y pepstatina A ( $\geq 75\%$  pureza, grado HPLC) de Sigma-Aldrich (St. Louis MO, EUA). Se utilizaron las enzimas fosfolipasa A1 de *Thermomyces lanuginosus* (E.C. 3.1.1.21,  $\geq 10$  unidades/ mg de proteína,  $\alpha$ -amilasa de *Bacillus licheniformis* (E.C. 3.2.1.1,  $\geq 500$  unidades/mg de proteína), quimosina de bovino (E.C. 3.4.23.4,  $\geq 20$  unidades/ mg de proteína), de la marca Sigma-Aldrich (St. Louis MO, EUA) y quimosina recombinante de camello Chy-Max M1000 (E.C. 3.4.23.4, 1000 unidades/ml), de la marca Chr Hansen (Cd. México, México).

### 6.3 Análisis proximal del polvo de bayas

Se llevó a cabo el análisis proximal (Apéndice II) del polvo de bayas maduras, que incluyó: cenizas (AOAC 942.01, 1998), grasa (AOAC 920.39, 1998), proteína (AOAC 960.52, 1998), humedad (AOAC 934.01, 1998) y fibra soluble e insoluble (AOAC 991.43,1995). Adicionalmente, se determinó el pH del polvo de bayas de acuerdo con la norma mexicana NMX-F-317-S-1978 Determinación de pH en alimentos.

### 6.4 Obtención de extracto crudo

Tomando como base la metodología descrita por Chávez-Garay *et al.* (2016), se preparó una extracción acuosa en relación 1:10 p/v, de polvo de bayas en solución amortiguadora de acetato de sodio 50 mM, pH 5 adicionada con 5% de NaCl. La mezcla se mantuvo a temperatura ambiente por 24 h en agitación constante (600 rpm). El macerado se filtró con 4 capas de gasa para retirar los sólidos. Posteriormente, se centrifugó a 3200x g por 20 min a 4°C (Centrifuga Thermo IEC, Centra CL3R, EUA.). El sobrenadante resultante se consideró como el extracto crudo (EC) y se almacenó a



-20°C hasta su posterior uso. A este extracto crudo se le determinó la cantidad de proteína y se evaluó cualitativa y cuantitativamente su actividad proteolítica, lipolítica y amilolítica.

Adicionalmente, se preparó un EC de trompillo siguiendo el procedimiento descrito previamente, pero con mayor concentración de soluto. La extracción 1:3 p/v se preparó utilizando 240 g de polvo de bayas y 720 mL de solución amortiguadora de acetato de sodio 50 mM pH 5 adicionada con 5% de NaCl. Después de la centrifugación se recuperaron 400 mL, por lo que el rendimiento de maceración fue del 41.60%. Un volumen de extracto crudo se almacenó a -20 °C repartido en viales de 1.5 mL con el fin de utilizarse en los siguientes procedimientos. Este EC se analizó por medio de electroforesis SDS-PAGE y se sometió a purificación para obtener la proteasa de trompillo.

## **6.5 Determinaciones químicas al extracto crudo**

### *6.5.1 Cuantificación de proteína*

La cuantificación de proteína se llevó a cabo por el método de Bradford (1976). A temperatura ambiente, se depositaron 250  $\mu$ L de reactivo de Bradford y 5  $\mu$ L de la muestra a evaluar en un pocillo de una microplaca. La mezcla se dejó reaccionar por 5 min y se leyó la absorbancia a 595 nm en un lector de microplacas (Biotek, Lx808, EUA). Como blanco se utilizó reactivo de Bradford con 5  $\mu$ L de agua desionizada. Los resultados se expresaron en mg/mL interpolando los resultados en una curva de calibración realizada con estándares de albúmina sérica bovina (BSA) a concentraciones de 0.1 a 1.0 mg/mL (Apéndice III).



### 6.5.2 Evaluación cualitativa de actividad enzimática

La actividad proteolítica se evaluó en un agar con caseína. Se prepararon 40 mL de agar mezclando 40 mL de solución de acetato de sodio 1M que contenía 10 mM de cloruro de sodio y 0.75 g de agar bacteriológico. La mezcla se calentó hasta clarificar y se bajó la temperatura hasta 50 °C. Se preparó una solución de caseína al 10%, la solución se agitó por 2 h y posteriormente se filtró con papel filtro común. Se tomaron 10 mL de esta solución de caseína y se adicionaron a la solución de agar. Se homogenizó la mezcla, se vertió en cajas Petri y se dejó solidificar (Chávez-Garay, 2013).

La evaluación de la actividad lipolítica se llevó a cabo utilizando un agar de tributirina. Se preparó una mezcla con 2.25 g de agar bacteriológico, 0.15 mL de monoleato de sorbitán (Tween 80), 1.5 mL de tributirina y 150 mL de agua desionizada. El medio se clarificó, se vació en cajas Petri y se dejó solidificar (Carrasco-Palafox, Rivera-Chavira, Ramirez-Baca, Manzanares-Papayanopoulos y Nevarez-Moorillon, 2018).

Se evaluó la actividad amilolítica del extracto crudo en agar de almidón con base en la reacción del almidón con una solución de yodo (Lopez-Gonzalez *et al.*, 2014). Se preparó un agar con 30 mL de agua, 1% de almidón soluble, 100 µL de yodo Lugol y 1.5% de agar. La mezcla se clarificó, se vació en cajas Petri y se dejó solidificar.

Para evaluar la actividad en cada agar con sustrato se depositaron 30 µL de EC sobre el agar y se dejó que se absorbieran. Como control negativo se utilizó agua desionizada y como control positivo una enzima comercial:

- Actividad proteolítica: quimosina (Chy-Max M1000, Chr Hansen)
- Actividad lipolítica: fosfolipasa A1 de *Thermomyces lanuginosus* (PLA<sub>1</sub>, Sigma Aldrich)
- Actividad amilolítica: α-amilasa de *Bacillus licheniformis* (Sigma-Aldrich).



Cuando se habían colocado las gotas del control negativo, el control positivo y el EC, las cajas se incubaron a 37°C. Se revisaron las cajas con agar a intervalos de 30 min para verificar la formación de halos que indicaran hidrólisis en cada uno de los agares con sustrato. En el caso de los agares con caseína y tributirina, se buscaron halos cristalinos contra el agar opaco, blanquecino; en el caso del agar con almidón, se buscó un halo de color claro contra el agar de color negro.

### 6.5.3 Cuantificación de actividad proteolítica

La actividad proteolítica se llevó a cabo por el método de Lowry (McDonald, 1965) con modificaciones (Gutiérrez-Méndez *et al.*, 2019). En un microtubo se adicionaron 130 µL de una solución de caseína (0.66%) y 25 µL del extracto enzimático a evaluar (diluído 1:100). La solución se mezcló y se incubó a 37°C por 10 min. La reacción se detuvo agregando 130 µL de ácido tricloroacético (TCA) 100 mM. La mezcla se incubó a 37°C por 20 min. Después se centrifugó por 15 min a 10°C a 3000x *g* (Centrífuga 5702 R Eppendorf, EUA). En un microtubo limpio se depositaron 250 µL del sobrenadante, 625 µL de carbonato de sodio (500 mM) y 125 µL de solución de Folin-Ciocalteu (1:4). Esta mezcla se incubó a 37°C por 30 min en oscuridad. Después de la incubación, se tomaron 250 µL de la reacción y se depositaron en una microplaca. Se leyó la absorbancia de la muestra en un lector de microplacas (Biotek Lx808, EUA) a 750 nm. El blanco se preparó desde el inicio sustituyendo el extracto enzimático por agua desionizada. Se construyó una curva de calibración (Apéndice IV) usando estándares de tirosina a diferente concentración (11, 22, 33, 44 y 55 µM). Se calculó la velocidad de reacción (1), la actividad proteolítica (2) y la actividad proteolítica específica usando las siguientes ecuaciones:

$$V = \frac{[Tir_{proteasa}] - [Tir_{blanco}]}{t} \quad (1)$$

$$AP = \frac{V \times V_{reacción}}{V_{enzima}} \quad (2)$$



$$AE = \frac{AP}{\text{mg de proteína}} \quad (3)$$

Donde:

V= velocidad de reacción ( $\mu\text{M}_{\text{Tir}}/\text{min}$ )

$[\text{Tir}_{\text{proteasa}}]$  = concentración de tirosina en la solución de proteasa ( $\mu\text{M}$ )

$[\text{Tir}_{\text{blanco}}]$ = concentración de tirosina en el blanco ( $\mu\text{M}$ )

t= tiempo de reacción (min)

AP= actividad proteolítica ( $\mu\text{M}_{\text{Tir}}/\text{min}$ )

$V_{\text{enzima}}$ = volumen de enzima utilizado (25  $\mu\text{L}$ )

$V_{\text{reacción}}$ = volumen de la reacción (155  $\mu\text{L}$ )

AE= actividad proteolítica específica ( $\mu\text{M}_{\text{Tir}}/\text{min mg de proteína}$ )

Una unidad de actividad enzimática ( $U_{\text{Tir}}$ ) se definió como la cantidad de enzima que libera un micromol de tirosina por minuto de reacción.

Adicionalmente se siguió este procedimiento para conocer la cantidad de tirosina en una cinética de 80 min para estimar la actividad proteolítica a través del tiempo.

#### 6.5.4 Cuantificación de actividad lipolítica

Se cuantificó la actividad lipolítica del EC por cuantificación del p-nitrofenol liberado a partir de p-nitrofenil butirato (Margesin, 2002). Se colocó 1 mL de solución de EC (1:10 con agua desionizada) con 5 mL de solución amortiguadora  $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$  0.1 M, pH 7.25. La mezcla se pre-incubó a 30°C en baño de agua por 10 min. Después de la incubación se añadieron 50  $\mu\text{L}$  de solución de sustrato (0.1 M p-nitrofenil butirato (pNPB) diluida en 2-propanol y almacenada a -20°C). Se homogenizó el contenido y se incubó a 30 °C por 10 min. Se detuvo la reacción colocando el tubo en hielo por 10 mins. Se cuantificó la cantidad de p-nitrofenol (p-NP) liberado, leyendo la absorbancia de la muestra en un espectrofotómetro Lambda 25 (Perkin-Elmer, Buckinghamshire, UK) a 400 nm. Como blanco se usó solución



amortiguadora. Los resultados se expresaron como ppm de p-NP interpolando los resultados en una curva de calibración realizada con estándares de p-NP en concentraciones de 0 a 20 ppm (Apéndice V). Se calculó la actividad lipolítica (U/mL) por medio de la siguiente ecuación:

$$\text{Actividad} \left( \frac{U}{mL} \right) = \left( \frac{Y-b}{m} \frac{g \text{ p-NP}}{L} \right) \left( \frac{1 \text{ mol p-NP}}{139 \text{ g p-NP}} \right) \left( \frac{10^6 \mu\text{mol p-NP}}{1 \text{ mol p-NP}} \right) \left( \frac{1 L}{1000 \text{ mL}} \right) \left( \frac{1}{10 \text{ min}} \right) \quad (4)$$

Donde:

Y= valor y en la curva de calibración

b= valor del intercepto en la curva de calibración

m= pendiente de la curva de calibración

#### 6.5.5 Cuantificación de actividad amilolítica

Se determinó la actividad endoamilolítica del extracto crudo siguiendo la metodología de Machado de Castro y Días Ribeiro (2003) con algunas modificaciones. La reacción se llevó a cabo con 90  $\mu\text{L}$  de solución de sustrato (almidón soluble en buffer universal a pH 6.0) y 10  $\mu\text{L}$  de EC. La solución amortiguadora universal se preparó usando ácido fosfórico, ácido bórico y ácido acético, cada uno en concentración 40 mM y ajustando el pH a 6 con hidróxido de sodio 200 mM. La mezcla de reacción se incubó por 3 min a 40°C. Se detuvo la reacción agregando 90  $\mu\text{L}$  de reactivo de yodo y se diluyó toda la mezcla agregando 1 mL de agua desionizada. Una alícuota de 600  $\mu\text{L}$  se diluyó con 2.4 mL de agua desionizada y se leyó la absorbancia a 640 nm. Se preparó un blanco de reacción por cada réplica de EC mezclando 10  $\mu\text{L}$  de EC, 90  $\mu\text{L}$  de reactivo de yodo y 90  $\mu\text{L}$  de sustrato. El blanco se diluyó y leyó igual que la muestra. La curva de calibración (Apéndice VI) se preparó con soluciones estándar de almidón de 0.05 a 0.5 mg/mL mezclando 100  $\mu\text{L}$  del estándar con 90  $\mu\text{L}$  del reactivo de yodo. Para el cálculo de la actividad endoamilolítica se utilizó la siguiente ecuación:





$$\text{Actividad (U/mL)} = \frac{\alpha(\text{abs}_{\text{bco}} - \text{abs}_m) \times f_d}{3 \times 0.01} \quad (5)$$

Donde:

$\alpha$ = coeficiente angular de la curva de calibración

abs= absorbancia del blanco (bco) y de las muestras (m) a 640 nm

fd= factor de dilución

3= tiempo de la reacción enzimática (min)

0.01: volumen de extracto usado (solución enzimática)

Una unidad de actividad endoamilolítica se definió como la cantidad de enzima que cataliza la hidrólisis de 1.0 mg de almidón por minuto, bajo las condiciones del ensayo (U/mL·min).

## 6.6 Electroforesis SDS-PAGE

Se utilizó la técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones reductoras y desnaturalizantes para evaluar diferentes muestras a lo largo del todo el experimento. Siguiendo la metodología descrita por Gutiérrez-Méndez *et al.* (2012), se preparó el gel separador al 12% y el gel concentrador al 5%. La muestra que se inyectó al gel se preparó en proporción 1:1 diluyendo en solución amortiguadora de muestra. La mezcla se calentó por 4 min a 95°C. Posteriormente, en cada pocillo del gel se inyectaron 30  $\mu$ L de muestra ya desnaturalizada. En uno de los pocillos se colocaron 5  $\mu$ L de marcador de peso molecular (PageRuler Plus Prestained Protein Ladder, Thermo Scientific). Se fijó la corriente a 80 volts por 30 min y después se aumentó a 100 volts, por aproximadamente 2 h. Al término de este tiempo el gel se tiñó y se reveló (Apéndice VII). Para analizar los geles se usó el Software Image J. Se construyó una curva de calibración con el peso molecular de las bandas del marcador de peso molecular y la distancia recorrida en el gel (Apéndice VIII). A partir de la curva de



calibración se obtuvo una ecuación de regresión no lineal con la que se calculó el peso molecular de las bandas producidas por las muestras.

Se realizó un zimograma para confirmar la actividad de proteasas en gel de acrilamida usando caseína al 2% como comonomero (Afsharnejhad *et al.*, 2019). El gel se lavó con Tritón X-100 al 2.5% por 30 min. Después, para restaurar la actividad el gel se incubó por 48 h a 37 °C sumergido en solución amortiguadora de revelado (50 mM Tris buffer pH 7.0, 5mM CaCl<sub>2</sub>, y 200 mM NaCl). Por último, la caseína del gel se tiñó con azul de Comassie y se lavó ligeramente con solución de revelado. Una zona clara indicó la hidrólisis de la caseína indicando actividad proteolítica en el fondo azul.

## 6.7 Purificación de la proteasa

Se realizó una precipitación con sulfato de amonio del 10 al 50% incrementando cada paso en un 10%. Para la saturación se consideró la solubilidad del sulfato de amonio a 0 °C (Apéndice IX). Al extracto crudo se adicionó sulfato de amonio para alcanzar el 10% y se mantuvo en agitación (600 rpm) por 30 min, a 0 °C en un baño de agua con hielo. La fracción de proteínas se recuperó por centrifugación a 3200x *g*, 20 min a 4°C (Centrífuga Eppendorf 5702 R, EUA) (Nasr, Ahmed y Hamid, 2016). El sobrenadante se sometió a la siguiente saturación para lo cual se añadió la cantidad necesaria de sulfato de amonio para completar el porcentaje deseado. El precipitado se solubilizó usando un tercio de su volumen de solución amortiguadora de acetato de sodio 50 mM, pH 5. El procedimiento se repitió hasta completar la saturación al 50%.

Se evaluó la cantidad de proteína, actividad proteolítica y la actividad proteolítica específica de las fracciones obtenidas. Estos resultados indicaron que la precipitación con sulfato de amonio al 50% era la que permitió obtener mayor actividad proteolítica específica. Posteriormente se llevó a cabo la saturación directa al 50% utilizando las mismas condiciones de agitación, centrifugado y solubilización del precipitado. La



solución de proteínas que se recuperó se consideró como el extracto crudo concentrado (ECC) y se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

La purificación de la fracción proteolítica se llevó a cabo por medio de cromatografía de exclusión de tamaño. Como fase estacionaria se usó Sephadex G-100 y como fase móvil solución amortiguadora de acetato de amonio 50 mM, pH 5. En la columna se colocaron 3 mL de muestra (1 mL de ECC diluido en 2 mL de solución amortiguadora de acetato de amonio 50 mM, pH 5). A continuación, se inyectaron 18 mL de solución amortiguadora a la columna. Por medio de goteo se recuperaron fracciones de 1.5 mL. Posteriormente, se calculó la actividad proteolítica específica y se eligió la fracción con la mayor actividad proteolítica para caracterizarla (SDS-PAGE, zimograma, pH y temperatura óptimos, tipo catalítico).

## 6.8 Caracterización de la trompillina

### 6.8.1 pH óptimo

Se determinó el pH óptimo para la proteasa midiendo su actividad en un rango de pH de 5 a 9. Para el ensayo de pH 5 y pH 6 se utilizó una solución amortiguadora de citrato de sodio 50 mM y para el pH 7, 8 y 9 se utilizó una solución amortiguadora Tris-HCl 50 mM (Afsharnejhad *et al.*, 2019). Tanto el sustrato como la enzima se solubilizaron en la solución amortiguadora correspondiente. El ensayo se llevó a cabo de la misma manera que se ha descrito anteriormente para la cuantificación de actividad proteolítica (Sección 6.5.3).

### 6.8.2 Temperatura óptima

Se cuantificó la actividad proteolítica de la enzima en un rango de 20 a  $90^{\circ}\text{C}$  (Afsharnejhad *et al.*, 2019). La reacción se llevó a cabo teniendo como sustrato caseína en concentración de 0.7 mg/mL y un pH de 7. La temperatura de evaluación se utilizó durante los primeros 30 min del procedimiento de cuantificación de actividad proteolítica (Sección 6.6) y la reacción de color se llevó a cabo a  $37^{\circ}\text{C}$ . La temperatura



a la cual se alcanzó la máxima actividad se consideró la temperatura óptima de la enzima.

### 6.8.3 Tipo catalítico

Para determinar la clase catalítica de la proteasa se llevó a cabo la cuantificación de la actividad proteolítica en presencia de distintos inhibidores. Siguiendo la metodología descrita por Afsharnejad *et al.* (2019), se prepararon soluciones a concentración 10  $\mu$ M del EDTA (inhibidor de metaloproteasas) y PMSF (inhibidor de serin proteasas), y de 10 mM para el E-64 (inhibidor de cisteína proteasas) y Pepstatina A (inhibidor de proteasas aspárticas). Los ensayos de inhibición se prepararon mezclando 25  $\mu$ L de la trompillina (1:100, en solución amortiguadora Tris-HCl, pH 8.8) con 25  $\mu$ L del inhibidor correspondiente. El blanco de reacción se preparó mezclando 25  $\mu$ L de enzima inactiva (inactivada por calor a 95 °C por 5 min) y 25  $\mu$ L de amortiguador (en lugar de inhibidor). Todos los ensayos se pre-incubaron por 30 min a 37 °C. Posteriormente, a cada tubo se añadieron 105  $\mu$ L de caseína (0.66%) y se incubó por 10 min más a 37 °C. La reacción se detuvo con 105  $\mu$ L de TCA 100 mM y se incubó por 20 min a 37 °C. Luego se centrifugó por 15 min a 10 °C a 3000x *g*. La reacción de color se llevó a cabo como se describió anteriormente en la sección 6.6 cuantificación de actividad proteolítica.

### 6.9 Evaluación de la actividad coagulante

Se evaluó la actividad coagulante del extracto crudo de trompillo, de dos proteasas comerciales y de la mezcla de coagulantes (quimosina recombinante y extracto crudo de trompillo) sobre leche comercial de bovino. Las proteasas comerciales que se utilizaron fueron quimosina de bovino y quimosina recombinante de camello. La quimosina de bovino se preparó disolviendo 5 mg en 525  $\mu$ L de agua desionizada y posteriormente 1:10 para las pruebas de coagulación. La quimosina recombinante se utilizó haciendo una dilución 1:10 con agua desionizada a partir de su presentación comercial líquida. Como procedimiento preliminar se ajustó el volumen



necesario de las enzimas comerciales (quimosina recombinante y quimosina de bovino) y del EC de trompillo para iniciar la coagulación ( $t_0$ ) de la leche alrededor de los 40 min. Del extracto de trompillo se utilizaron 27  $\mu\text{L}$ , para la quimosina recombinante se utilizaron 15  $\mu\text{L}$  y para la quimosina de bovino 20  $\mu\text{L}$ . Adicionalmente, se hizo una prueba utilizando la combinación del extracto de trompillo junto con la quimosina recombinante, para observar cuál era su comportamiento y el efecto sobre la viscosidad de la leche. Para esta prueba se utilizaron 15  $\mu\text{L}$  de quimosina recombinante y 27  $\mu\text{L}$  del extracto de trompillo.

La actividad coagulante se evaluó midiendo los cambios en la viscosidad utilizando el método descrito por Beltrán *et al.* (2020). Se utilizó un reómetro rotatorio (Anton Paar QC, Austria) con una copa cilíndrica (C-CC39/QC-IM,  $\varnothing$  4.1 cm interno, 5.76 cm de altura real, volumen efectivo de 76  $\text{cm}^3$ ) y una geometría cilíndrica con punta cónica (CC39,  $\varnothing$  38.993 mm, longitud 60.023 mm, ángulo de la punta de  $132^\circ$ ). La leche se precalentó en baño de agua a  $37^\circ\text{C}$ . Posteriormente, se llenó la copa del reómetro con 76 mL de leche, se añadió  $\text{CaCl}_2$  para obtener una concentración de 0.02% y se añadió el volumen previamente establecido de la enzima coagulante. Se midió la viscosidad de la leche por 80 min (1200 puntos de lectura, uno cada 4 segundos) a una velocidad de corte constante de 50-s. La temperatura de la prueba se mantuvo a  $37^\circ\text{C}$ , monitoreando con un termómetro digital, utilizando un baño de agua y una parrilla de calentamiento. Los datos del análisis de viscosidad se recolectaron en el programa del reómetro (Rheoplus V3.20, Ostfildern, Alemania) y se analizaron ajustándolos a una ecuación sigmoideal de 4 parámetros (Esquematizada en la Figura 2):

$$\eta = \eta_0 + \frac{\Delta\eta_1}{1 + e^{-(t-t_c/b)}} \quad (6)$$

Donde:

$\eta_0$ = viscosidad inicial, o viscosidad de la leche ( $\text{mPa s}$ )

$\Delta\eta_1$ = incremento en la viscosidad durante la formación del gel ( $\text{mPa s}$ )



$t$ = tiempo de incubación (min)

$t_c$ = tiempo en que se alcanza la mitad de la viscosidad máxima (min)

$b$ = es el valor recíproco para la agregación de las caseínas,  $k$

A partir de los parámetros obtenidos con la ecuación 6, se calculó el tiempo para que iniciara la agregación de las caseínas ( $t_0$ ) y el tiempo en que se formó el gel ( $t_s$ ).

$$t_0 = t_c - 2b \quad (7)$$

$$t_s = t_c + 2b \quad (8)$$

La actividad coagulante (MCA, por sus siglas en inglés *milk-clotting activity*) de cada solución de proteasas se calculó usando la siguiente ecuación:

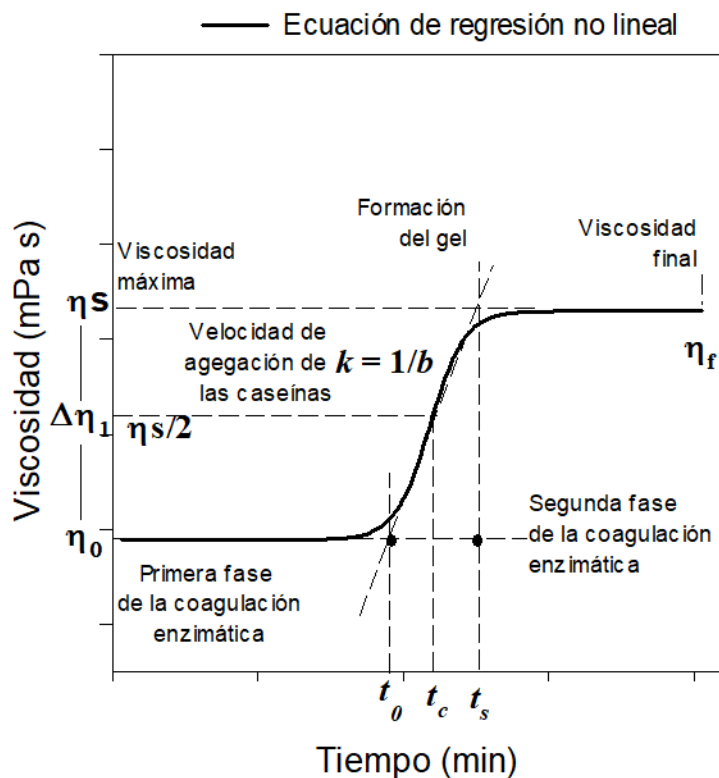
$$MCA = \frac{V_{leche}}{V_{proteasa}} \times \frac{1 \text{ ml de proteasa}}{40 \text{ minutos}} \times (t_c + 2b) \quad (9)$$

Donde:

$V_{leche}$ = volumen de leche de la copa del reómetro (76 mL)

$V_{proteasa}$ = volumen de proteasa utilizado (mL)

El término  $t_c + 2b$  representa el tiempo en que se alcanzó el punto de gelificación o viscosidad máxima y se obtuvo de la ecuación 6. Los valores de actividad coagulante se expresaron en unidades Soxhlet (US) por mililitro de solución de proteasa. Una US se definió como el volumen de leche (mL) que puede coagularse por un mililitro de solución de proteasa en 40 min a 37 °C.



**Figura 2.** Representación gráfica de la ecuación sigmoideal de cuatro parámetros utilizada para analizar el comportamiento reológico de la leche.  $\eta_s$ = viscosidad en el punto de gelificación,  $\Delta\eta_1$ = incremento en la viscosidad durante la formación del gel,  $\eta_0$ = viscosidad inicial,  $\eta_{s/2}$ = mitad de la viscosidad máxima,  $t_c$ = tiempo en que se alcanza la mitad de la viscosidad máxima,  $k$ = velocidad de agregación de las caseínas,  $t_0$ = tiempo para que empiece la agregación de las caseínas,  $t_s$ = tiempo en que se forma el gel.



## 6.10 Hidrólisis de las caseínas de la leche por *Solanum elaeagnifolium* Cavanilles

Para evaluar la hidrólisis de las proteínas de la leche por el EC se llevó a cabo una cinética de reacción por 80 min utilizando leche como sustrato. Se preparó un tubo con leche,  $\text{CaCl}_2$  (0.02%) y 27  $\mu\text{L}$  de EC. La mezcla se homogenizó y cada 10 min se tomaban alícuotas de 1 mL y se depositaron en microtubos con 1 mL de TCA 100 mM para detener la reacción. Al finalizar los 80 min de cada tubo se hizo una extracción mezclándola en partes iguales de gel de leche y solvente de proteínas (Apéndice X). Se homogenizó hasta que se solubilizó por completo el gel y se recuperó la parte proteica por centrifugación (3000x g, 5°C, 1 hora). Esta fracción proteica se analizó por SDS-PAGE siguiendo la metodología descrita previamente (Sección 6.6).

Adicionalmente se analizaron por SDS-PAGE los geles formados en 80 min durante la evaluación de la actividad coagulante (Sección 6.9).

## 6.11 Sinéresis de los geles de leche

De los resultados del estudio anterior se obtuvo el volumen necesario de EC, enzimas comerciales y de la mezcla de coagulantes para coagular la leche en 40 min. Para evaluar la sinéresis y capacidad de retención de agua de los geles de leche se utilizó la metodología propuesta por Beltrán *et al.* (2021). Por triplicado se colocaron 35 mL de leche en tubos de plástico y se adicionó  $\text{CaCl}_2$  (para tener una concentración de 0.02%) y el volumen de agente coagulante (7.8  $\mu\text{L}$  EC, 9.6  $\mu\text{L}$  quimosina de bovino, 7  $\mu\text{L}$  quimosina recombinante y 7.8  $\mu\text{L}$  EC + 7  $\mu\text{L}$  quimosina recombinante en el caso de la mezcla). Una vez homogenizado el contenido, los tubos se mantuvieron en baño de agua para mantener una temperatura de 37 °C por 80 min para que se gelificara la leche. Una vez transcurrido este tiempo, los tubos se centrifugaron por 10 min a 10 °C y 300x g. Después de la centrifugación, se midió el volumen de suero y la masa del gel obtenidos en cada caso. Los resultados se expresaron como porcentaje de





sinéresis y se hicieron además los cálculos de capacidad de retención de agua (CRA), masa del suero y la masa, densidad y volumen de los geles. Adicionalmente, se midió la cantidad de proteína presente en el suero y se hizo un análisis de las proteínas presentes en el suero por medio de SDS-PAGE (Sección 6.6).

## 6.12 Análisis estadístico

Los valores obtenidos en los diferentes procedimientos cuantitativos llevados a cabo durante la purificación se analizaron mediante análisis de varianza (ANOVA) de un factor, con un nivel de confianza del 95% ( $\alpha = 0.05$ ). La comparación múltiple de medias se calculó con el método Tukey-Kramer. Se utilizó el programa Minitab 17.1.0.

Para los resultados de la actividad coagulante y sinéresis se utilizó un diseño aleatorio de un factor para el análisis comparativo entre la proteasa de origen vegetal y las quimosinas. El factor experimental ( $\tau_i$ ) fue el tipo de proteasa con los siguientes niveles: 1) proteasa de origen vegetal, 2) quimosina recombinante y 3) quimosina de bovino. Cada tratamiento se repitió tres veces ( $n = 3$ ). Los datos recopilados se analizaron mediante análisis de varianza unidireccional (ANOVA) y prueba de rango múltiple de Tukey-Kramer ( $\alpha = 0,05$ ). Se utilizó el programa Minitab 17.1.0.



## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1 Análisis proximal

Los resultados del análisis proximal realizado al polvo de bayas de *Solanum elaeagnifolium* Cavanilles se muestran en la Tabla 2. Adicionalmente, se muestra el promedio del análisis proximal de polvo de bayas de trompillo realizado en trabajos anteriores (Gutiérrez-Méndez, López-Díaz, Chávez-Garay, Leal-Ramos y García-Triana, 2020). El mayor componente del polvo de bayas son carbohidratos, principalmente en forma de fibra. La cáscara de las bayas proporciona fibra mayormente insoluble. El contenido de proteína fue de 10.1, mientras que otros autores han reportado un contenido de 4.5 a 13.8% (Gutiérrez-Méndez *et al.*, 2020). Las diferencias en la composición de las bayas se puede atribuir al contenido de humedad de los frutos. Estos frutos son producidos por la planta durante el verano, donde su forma inmadura es verde y no presenta actividad proteolítica lo que sugiere que la proteasa de trompillo se encuentra en forma de zimógeno en este estado de maduración (Chávez-Garay *et al.*, 2016). En contraste, la actividad proteolítica se ha encontrado en los frutos maduros, de color amarillo (Figura 3) que se encuentran con menor cantidad de agua durante el verano (Chávez-Garay *et al.*, 2016).

Por otro lado, el pH del polvo de bayas fue de 5. Este parámetro sólo había sido determinado por Chávez-Garay (2013) quien encontró un pH de 4.94. Este parámetro es importante ya que nos indica el pH natural de la baya y el medio en el que se encuentran sus enzimas.

Tabla 2. Análisis proximal de las bayas maduras de *Solanum elaeagnifolium* Cavanilles.

Componente	Media $\pm$ DE <sup>1</sup> g 100g <sup>-1</sup>	Otros autores <sup>2</sup>
Humedad	6.3 $\pm$ 0.06	10.5
Grasa	6.2 $\pm$ 0.26	3.4
Cenizas	3.7 $\pm$ 0.01	5.6
Proteínas	10.1 $\pm$ 1.41	12.0
Carbohidratos <sup>3</sup>	73.7 $\pm$ 1.53	68.2
Fibra total	34.1 $\pm$ 1.42	48.4
Fibra insoluble	26.3 $\pm$ 1.52	53.8
Fibra soluble	7.8 $\pm$ 0.10	2.9

<sup>1</sup>Promedio de tres réplicas  $\pm$  desviación estándar; <sup>2</sup>Promedio de la composición reportada por otros autores (Gutiérrez-Méndez *et al.*, 2020); <sup>3</sup>Estimado por diferencia.



**Figura 3.** Bayas maduras y polvo de bayas de *Solanum elaeagnifolium* (Fotografías originales C. Nájera-Domínguez, 2021).



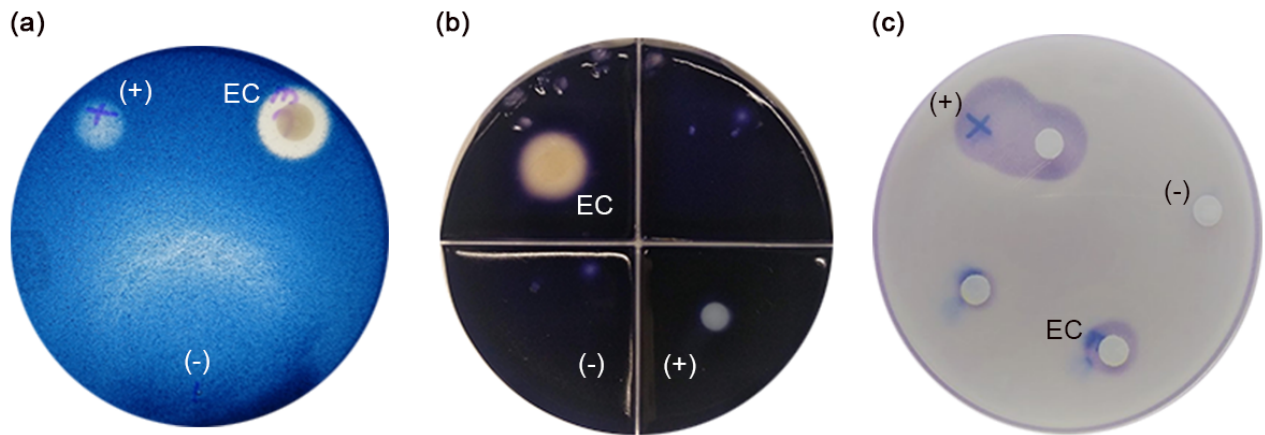
## 7.2 Evaluación cualitativa de la actividad enzimática de *Solanum elaeagnifolium* Cavanilles

El extracto crudo de trompillo (EC) tuvo una cantidad de proteína de 4.7 mg/mL. La actividad proteolítica del extracto se evaluó con la hidrólisis de caseína. El extracto formó un halo de color claro sobre el agar con caseína, lo que indica la hidrólisis de esta proteína (Figura 4a). Este resultado es coincidente con el reportado por Chávez (2013), quien comprobó la actividad proteolítica del EC de trompillo al preparar un gel nativo y colocarlo sobre un agar con caseína. Este antecedente avala el resultado obtenido en esta ocasión. Al comparar la actividad con el control positivo (quimosina, Chy-Max M1000, Chr Hansen), como se observa en la Figura 4a, el halo de hidrólisis de caseína fue de menor diámetro. Este análisis cualitativo indica que, a esta concentración de proteína, el extracto crudo tiene menor actividad proteolítica que la quimosina comercial.

El extracto de las bayas de *Solanum elaeagnifolium* Cavanilles tiene actividad lipolítica. En la Figura 4c se observa la hidrólisis de tributirina (Carrasco-Palafox *et al.*, 2018). En este caso la actividad del extracto crudo formó un halo de menor diámetro que el del control positivo (fosfolipasa A<sub>1</sub>). Al encontrar actividad lipolítica en el extracto crudo de bayas de trompillo se propone un estudio posterior donde se concentre la fracción lipolítica y se estudien sus propiedades catalíticas. Las lipasas de fuentes vegetales son fáciles de obtener, de bajo costo y pueden usarse directamente en procesos de biocatálisis. Estadísticamente, solo el 11% de las lipasas reportadas son de origen vegetal (Sankar y Ponnuraj, 2020), por lo que nuestros resultados abren la posibilidad para una nueva lipasa. Se propone una posterior evaluación en un extracto concentrado, ya que esto potenciaría su actividad y su aplicación en algún proceso no solo del área de los alimentos. En el caso de la elaboración de queso, la actividad lipolítica podría generar compuestos aromáticos agradables mejorando la percepción organoléptica de un queso elaborado con coagulantes vegetales.



La hidrólisis del almidón por el extracto crudo se observó por medio de la formación de un halo claro sobre el agar de color negro (Figura 4b). El halo formado por el extracto crudo fue de mayor diámetro que el del control positivo ( $\alpha$ -amilasa). Estos resultados sugieren que las bayas de *Solanum elaeagnifolium* Cavanilles tienen amplia actividad amilolítica. Las amilasas se encuentran en las semillas junto con el almidón que sirve como molécula de reserva, por lo que es posible que la alta cantidad de semillas en las bayas de trompillo favoreciera la presencia de alta actividad amilolítica (Balakrishnan, Kumar y Sugathan, 2019). Además, las amilasas juegan un papel importante en el metabolismo de las plantas, pues hidrolizan el almidón hacia otros sustratos solubles como la maltosa y la glucosa que proporcionan energía (Agoreyo y Fregene, 2014).



**Figura 4.** Resultados de evaluación cualitativa de la actividad enzimática de *Solanum elaeagnifolium* Cavanilles. (a) agar caseína, (+) control positivo quimosina, Chy-Max M1000, Chr Hansen; (b) agar almidón, (+)  $\alpha$ -amilasa de *Bacillus licheniformis*, Sigma-Aldrich; (c) agar tributirina, (+) fosfolipasa A1 de *Thermomyces lanuginosus*, Sigma-Aldrich; (-) control negativo en todos los casos se utilizó agua desionizada; (EC) extracto crudo de *Solanum elaeagnifolium* Cavanilles.



### 7.3 Evaluación cuantitativa de la actividad enzimática de *Solanum elaeagnifolium* Cavanilles

La actividad proteolítica del EC fue de  $404.04 \pm 17.14$  U<sub>Tir</sub>/mL y la actividad proteolítica específica fue de  $85.97 \pm 3.65$  U<sub>Tir</sub>/mg de proteína (Tabla 3). En la bibliografía se encuentra un amplio rango de actividades enzimáticas reportadas en extractos crudos obtenidos de vegetales. La actividad específica reportada en el extracto crudo de *Solanum dubium* es de 30.5 U/mg (Ahmed, Morishima, Babiker y Mori, 2009) mientras que en otros géneros se ha calculado en valores de 1.2 U/mg para la proteasa de *Ficus johannis* (Afsharnezhad *et al.*, 2019) y 39.6 U/mg para la proteasa de *Bromelia antiacantha* Bertol o Antiacantaína A (Valles y Cantera, 2018). Se comparó la actividad proteolítica del EC de trompillo con la quimosina recombinante Chy-Max M1000 (Chr Hansen), que tuvo una actividad proteolítica de  $19.213 \pm 0.559$  U<sub>Tir</sub>/mL y una actividad específica de  $30.50 \pm 0.89$  U<sub>Tir</sub>/mL. Para el extracto 1:10, tanto la actividad proteolítica como la actividad específica fueron mayores que la de la quimosina recombinante.

La actividad lipolítica fue de  $13.064 \pm 0.062$  U/mL y la actividad lipolítica específica fue de  $2.815 \pm 0.39$  U/mg proteína (Tabla 3). En contraste, la lipasa pura aislada de tomate (Teutschbein *et al.*, 2010) tiene una actividad lipolítica de 0.768 U/mL y una actividad específica de 1.542 U/mg de proteína, mientras que la lipasa pura aislada de plántulas de colza (canola) tiene una actividad lipolítica de 3.293 U/mL y una actividad específica de 8.28 U/mg de proteína (Clauss, Baumert, Nimtz, Milkowski y Strack, 2008). Con esta información se observó que el extracto de trompillo tiene una actividad lipolítica de prácticamente el doble que una lipasa aislada y pura. Las lipasas vegetales se encuentran principalmente en las semillas (Sarmah *et al.*, 2018), las bayas de *Solanum elaeagnifolium* Cavanilles tienen una gran cantidad de semillas lo que en consecuencia indicaría alta cantidad de lipasas vegetales. De manera general, las lipasas de fuentes vegetales son bien aceptadas en la industria de los alimentos y en el área farmacéutica, debido a su origen eucariota (Campillo-Alvarado





y Tovar-Miranda, 2013; Seth *et al.*, 2014). Este resultado es de interés pues en futuras investigaciones puede encontrarse una aplicación a la lipasa de *Solanum elaeagnifolium* Cavanilles.

La actividad amilolítica del extracto crudo fue de  $12.344 \pm 1.2$  U/mL, mientras que la actividad amilolítica específica fue de  $2.663 \pm 0.44$  U/mg de proteína (Tabla 3). Para otros extractos crudos de fuentes vegetales se han reportado actividades específicas de 0.96 U/mg (Kumari, Singh, Fitter, Polen y Kayastha, 2010) y 1.89 U/mg (Ben Elarbi, Khemiri, Jridi y Ben Hamida, 2009), en semillas de soya y cártamo, respectivamente. La actividad amilolítica específica del EC fue 2.7 veces mayor que en el extracto de semilla de soya y 1.4 veces mayor que en el extracto crudo de semillas de cártamo. Esto nos indica que el EC puede ser una excelente fuente de actividad amilolítica, incluso sin necesidad de llevar el proceso a una purificación mayor. Se espera que haya un alto contenido de actividad amilolítica en una fuente vegetal ya que estas enzimas hidrolizan el almidón del endospermo en la germinación de las semillas (Machado de Castro y Días-Ribeiro, 2013). Estos extractos se añaden a productos de panificación para mejorar su calidad. En algunos casos se ha probado con éxito, que la adición de amilasas extraídas de fuentes vegetales mejora su estructura física y propiedades sensoriales (Khemakhem *et al.*, 2019). Se sugiere la evaluación de las amilasas de *Solanum elaeagnifolium* Cavanilles sobre masas y productos horneados, ya que como se mencionó anteriormente, se utiliza de manera artesanal para elaborar buñuelos.

Tabla 3. Actividad enzimática de *Solanum elaeagnifolium* Cavanilles.

	Actividad enzimática (U/mL)	Actividad específica (U/mg de proteína)
Proteolítica <sup>1</sup>	404.04 ± 17.14	85.97 ± 3.65
Lipolítica <sup>2</sup>	13.064 ± 0.062	2.815 ± 0.39
Amilolítica <sup>3</sup>	12.344 ± 1.2	2.663 ± 0.44

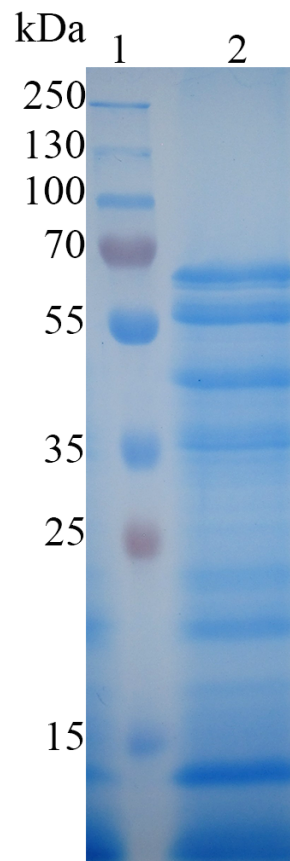
Los datos representan el promedio de tres réplicas ± desviación estándar; <sup>1</sup> U<sub>Tir</sub> = unidad enzimática, cantidad de enzima que libera un micromol de tirosina equivalente por minuto de reacción; <sup>2</sup> U = unidad enzimática, cantidad de enzima que libera un μmol de p-nitrofenol por minuto de reacción; <sup>3</sup> U = unidad enzimática, cantidad de enzima que hidroliza 1 mg de almidón por minuto de reacción.



#### 7.4 Proteínas presentes en el extracto de *Solanum elaeagnifolium* Cavanilles

En total se obtuvieron 11 bandas (Figura 5), con pesos moleculares de 66, 57, 45, 36, 34, 26, 22, 19, 15, 11 y 8 kDa. Esto es consistente con lo reportado previamente por Gutiérrez-Méndez *et al.* (2012), Chávez-Garay *et al.* (2016) y Gutiérrez-Méndez *et al.* (2019).

De acuerdo con lo reportado por Chávez-Garay *et al.* (2016), las semillas de *Solanum elaeagnifolium* Cavanilles contienen mayor cantidad de proteína que las cáscaras. Es altamente probable que las proteínas presentes en el extracto crudo provengan en su mayoría de las semillas, pues es su sitio de almacenamiento (González-Velázquez *et al.*, 2021). Además, estas proteínas son solubles en agua, y algunas de ellas son enzimas.



**Figura 5.** Electroforetograma SDS-PAGE del extracto de bayas de *Solanum elaeagnifolium* Cavanilles. Carril 1 marcador de peso molecular (PageRuler Plus Prestained Protein Ladder, Thermo Scientific), carril 2 extracto crudo de *Solanum elaeagnifolium* Cavanilles.

## 7.5 Purificación y caracterización de la proteasa de trompillo

La proteasa de trompillo fue aislada exitosamente por medio de precipitación con sulfato de amonio y cromatografía de exclusión de tamaño. De la columna de Sephadex G-100 se obtuvieron 12 fracciones diferentes a las que se les midió la actividad proteolítica específica. El perfil de elusión así como la cuantificación de actividad de cada fracción obtenida se pueden consultar en el Apéndice XI. La fracción 12 fue la de mayor actividad específica por lo que se seleccionó para su caracterización. En la Tabla 4 se muestra el resumen de purificación. El índice de purificación alcanzado fue de 415. Este valor fue mucho mayor al reportado para la purificación de otras proteasas vegetales (Tabla 1). El índice de purificación es el número de veces en que se concentra la actividad específica de una proteína durante cada paso en su purificación. Que este valor sea alto es favorable porque se puede usar una cantidad pequeña en los procesos donde se aplique la enzima purificada.

Para conocer el tamaño de la proteína presente en la fracción de mayor actividad se llevó a cabo un gel SDS-PAGE. El resultado del gel se muestra en la Figura 6a, donde se puede observar una banda de 57 kDa y trazas de otra proteína con peso molecular de 66 kDa. Los resultados de los antecedentes directos de la presente investigación (Chávez-Garay *et al.*, 2016; Gutiérrez-Méndez *et al.*, 2012) indican que la fracción que contiene la proteína de 57 kDa presentó la actividad proteolítica más alta. Adicionalmente, la actividad se comprobó por medio de un zimograma. En la Figura 6b se puede observar la hidrólisis de caseína como una region blanca en el gel de caseína-acrilamida teñido con azul de Coomassie. Por lo tanto, se concluye que la proteasa de trompillo tiene un peso molecular de 57 kDa, por lo que a partir de esta sección nos referiremos a ella como *trompillina*.

Otra proteasa de origen vegetal con actividad coagulante se aisló de las bayas de *Solanum dubium*. Se trata de una serin proteasa de 66 kDa a la que nombraron dubiumina (Ahmed *et al.*, 2009). Esta proteasa se utiliza en Sudán para hacer queso



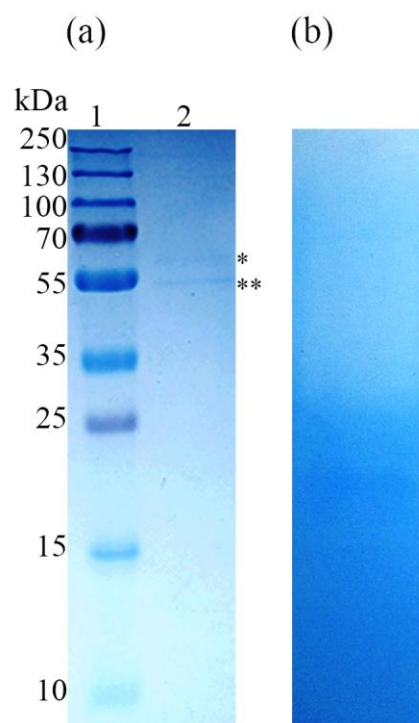
con leche de cabra y oveja, utilizando los frutos maduros que son de color amarillo, como sucede con las bayas de trompillo. *Solanum elaeagnifolium* Cavanilles y *Solanum dubium* son plantas relacionadas que comparten algunas características como el hecho de que se usan de manera tradicional como agente coagulante y que ambas son consideradas maleza. Una diferencia es que las bayas inmaduras (verdes) de *Solanum dubium* Fresen tienen espinas.

Se han hecho otros estudios para explorar la actividad coagulante de frutos pertenecientes al género *Solanum* (Guiama, Libouga, Ngah y Mbofung, 2010; Guiama *et al.*, 2021). Guiama *et al.* (2010) evaluaron la actividad coagulante de 9 especies del género *Solanum* endémicas de Camerún (*S. aculeastrum*, *S. aethiopicum*, *S. anomalum*, *S. cerasiferum*, *S. dasyphyllum*, *S. indicum*, *S. nigrum*, *S. nodiflorum* y *S. terminale*) haciendo extracciones acuosas adiconadas con NaCl. De las especies evaluadas, *S. aethiopicum* fue posteriormente analizada, pues fue la que presentó mayor actividad coagulante (Guiama *et al.*, 2021), sin embargo aún no hay reportes sobre el aislamiento de la enzima.

Tabla 4. Esquema de purificación de la trompillina.

Paso de purificación	Proteína (mg)	Actividad proteolítica (U <sub>Tir</sub> /mL)	Actividad específica (U <sub>Tir</sub> /mg)	R (%)	IP
EC	16.94 ± 0.876 <sup>a</sup>	3194.10 ± 62 <sup>a</sup>	188.90 ± 12.91 <sup>b</sup>	100	1
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> – 50%	23.63 ± 0.815 <sup>a</sup>	3161.8 ± 55 <sup>a</sup>	133.93 ± 5.47 <sup>b</sup>	139	0.7
Sephadex G-100	0.037 ± 0.004 <sup>c</sup>	2873.1 ± 105.6 <sup>b</sup>	78902 ± 8724 <sup>a</sup>	0.22	415

EC = extracto crudo de trompillo, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> – 50% = fracción del extracto crudo de trompillo obtenida por precipitación con sulfato de amonio al 50%; R = recuperación con respecto al contenido de proteína, IP = índice de purificación, a-c = medias seguidas de diferente letra en la misma columna son estadísticamente diferentes (ANOVA, Tukey-Kramer, p < 0.05). Los datos representan el promedio de tres réplicas ± desviación estándar; U<sub>Tir</sub> = unidad enzimática, cantidad de enzima que libera un micromol de tirosina equivalente por minuto de reacción.

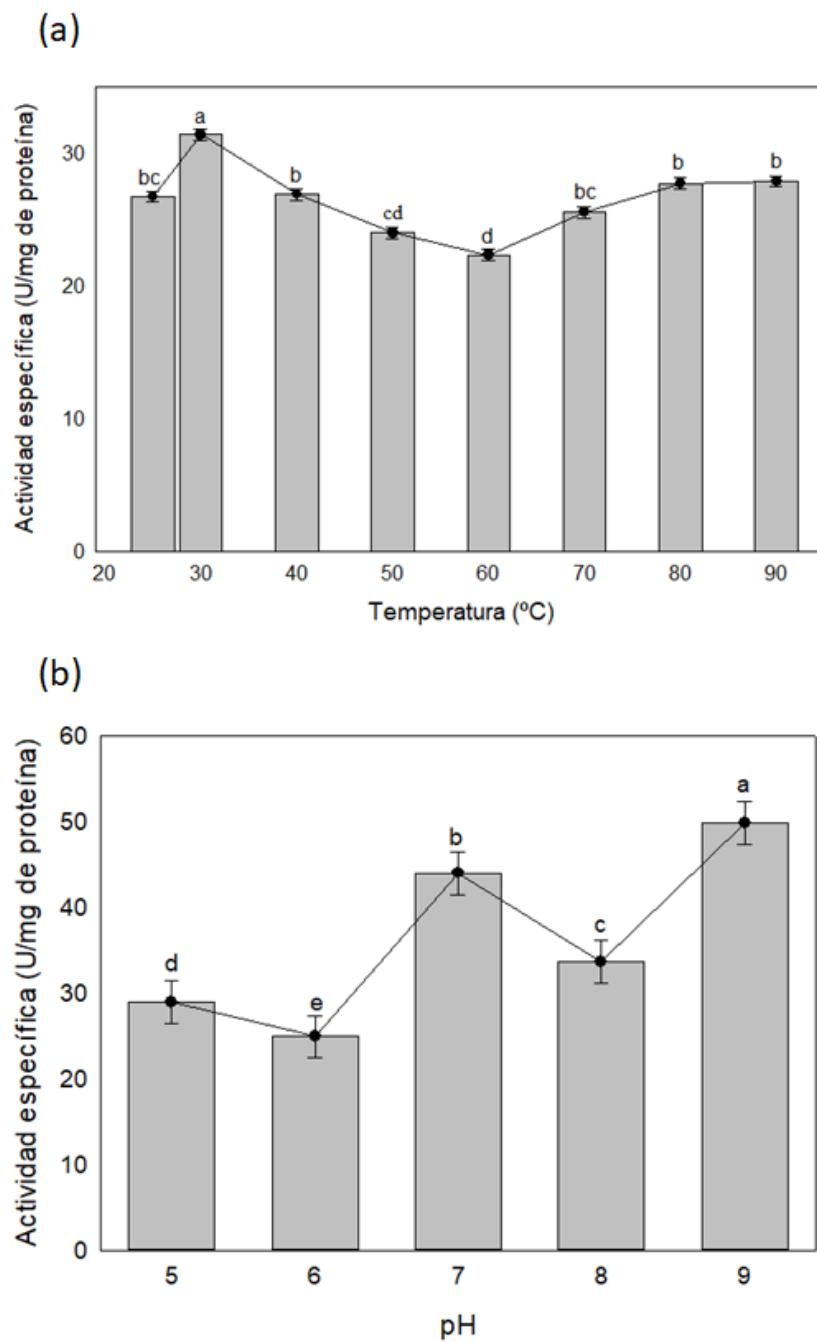


**Figura 6.** Electroforetograma SDS-PAGE y zimograma de la trompillina. (a) Carril 1 marcador de peso molecular (PageRuler Plus Prestained Protein Ladder, Thermo Scientific), carril 2 fracción proteolítica obtenida por precipitación con sulfato de amonio al 50% y filtración en gel Sephadex G-100; (b) zimograma de la trompillina.





La caracterización de la trompillina indicó que su mayor actividad se encontró a 30 °C y pH 9 (Figura 7). La máxima actividad proteolítica alcanzada se observó en la prueba de 30 °C, aunque la actividad decae a 60 °C se observó una recuperación a 70 – 90 °C (Figura 7a). Para el análisis de actividad a diferentes condiciones de pH, la máxima actividad se encontró a pH de 9 y alta actividad a pH 7 (Figura 7b). Por otro lado, la trompillina redujo su actividad en presencia de inhibidores de proteasas aspárticas, cisteína proteasas y de serin proteasas (Tabla 5). La mayor inhibición se alcanzó con la pepstatina A, que redujo la actividad hasta un 55%, con el inhibidor de cisteína proteasas (E-64) y el de serin proteasas (PMSF) no presentaron diferencia significativa en la inhibición alcanzada, y el inhibidor que menos afectó la actividad proteolítica fue el EDTA (inhibidor de metaloproteasas). Los resultados obtenidos de la caracterización nos permiten concluir que la trompillina es una serin proteasa tipo cucumisina, como se discute a continuación. Las serin proteasas de origen vegetal son estables y activas a altas temperaturas y condiciones de pH alcalino (Guevara y Daleo, 2018), las que son de tipo cucumisina presentan alta actividad caseinolítica y tienen un peso molecular cercano a los 60 kDa, además de que algunas de ellas tienen alta actividad coagulante en leche. Algunos ejemplos de serin proteasas vegetales de tipo cucumisina son la dubiumina (Ahmed *et al.*, 2009) aislada de *Solanum dubium* que presenta la mayor actividad a pH 11 y 70 °C (66 kDa), la Religiosina C (Sharma *et al.*, 2012) que tiene alta actividad a pH de 6 a 8 y de 45 a 60 °C (80 kDa), la tamarillina (Li, Scott, Hemar, Zhang y Otter, 2018) aislada de tamarillo que tiene alta actividad a pH 11 y 60°C (70 kDa) y la cucumisina aislada de *Cucumis melo* (Gagaoua *et al.*, 2017) cuya máxima actividad se presenta a pH 9 y 60-70 °C (66-68 kDa) . La referencia más directa y la primera hecha para la actividad proteolítica de *Solanum elaeagnifolium* Cavanilles por Bodansky (1916) establece que los extractos de las bayas de trompillo tuvieron alta actividad a pH 9 y a temperaturas de 70-90 °C, datos que corresponden a una serin proteasa. Por último, otros autores que han estudiado la actividad de la proteasa de *Solanum elaeagnifolium* la identifican como una serin proteasa (Gutiérrez-Méndez *et al.*, 2020; Vargas-Requena, Jiménez-Vega y López-Díaz, 2008).



**Figura 7.** Efecto de la temperatura (a) y pH (b) sobre la actividad proteolítica de la trompillina. (a) Rango de temperatura de 20 a 90 °C; rango de pH de 5 a 9. a-e Medias con diferente letra entre barras son estadísticamente diferentes (ANOVA, Tukey-Kramer,  $p < 0.05$ ). (ANOVA, Tukey-Kramer,  $p < 0.05$ ). Los datos representan el promedio de tres réplicas.

Tabla 5. Efecto de diferentes inhibidores de proteasa sobre la actividad proteolítica de la trompillina.

Inhibidor	Actividad residual (%)	Inhibición (%)
E-64	66 ± 2.04 <sup>b</sup>	34
Pepstatina A	55 ± 1.54 <sup>c</sup>	45
PMSF	70 ± 2.33 <sup>b</sup>	30
EDTA	79 ± 1.75 <sup>a</sup>	21

El porcentaje de actividad residual se calculó considerando la reacción sin inhibidor como el 100% de actividad; a-c Medias seguidas de diferente letra en la misma columna son estadísticamente diferentes (ANOVA, Tukey-Kramer,  $p < 0.05$ ). Los datos representan el promedio de tres réplicas ± desviación estándar.

## 7.6 Evaluación de la actividad coagulante de la trompillina

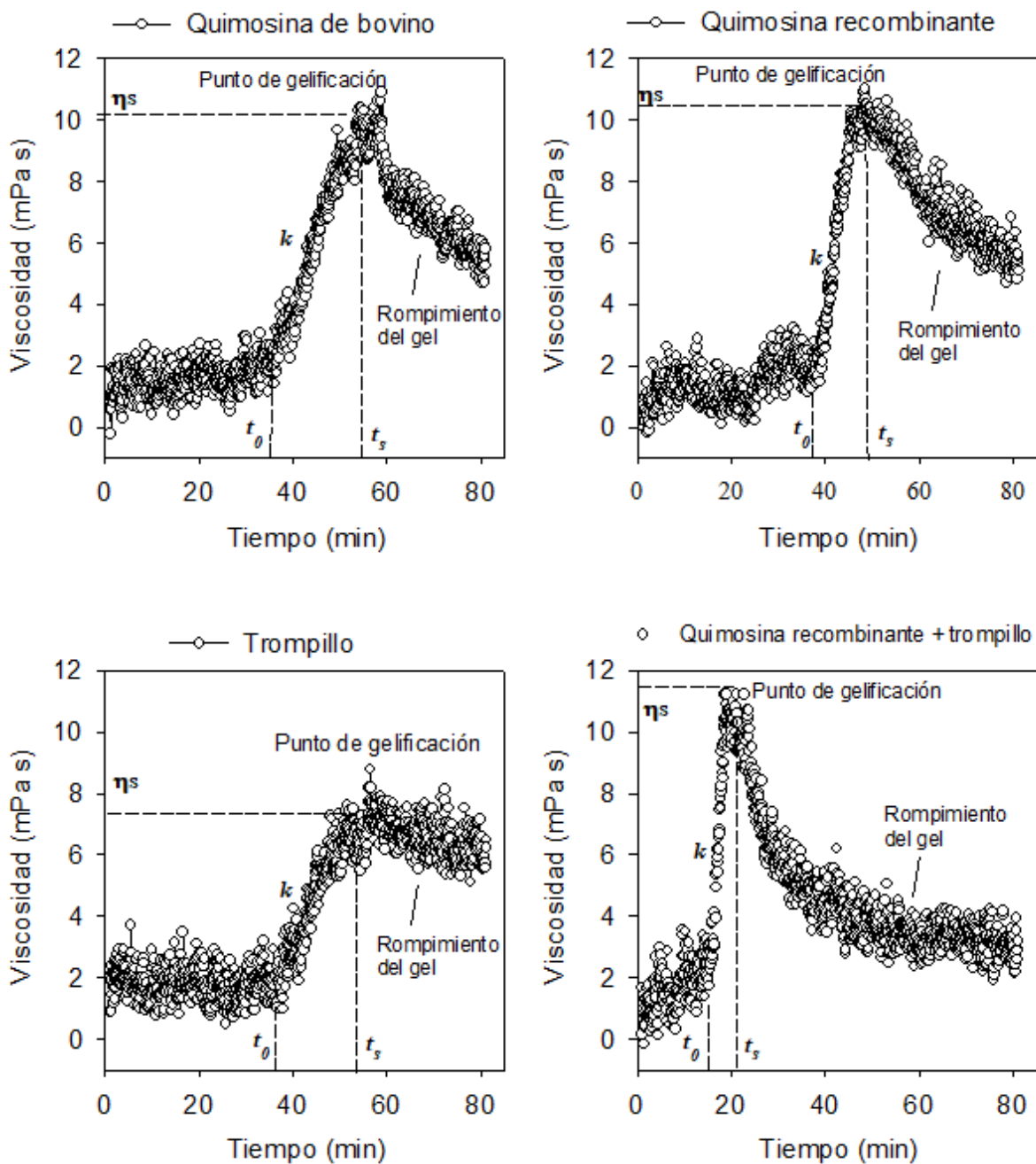
Se evaluó la actividad coagulante midiendo el cambio en la viscosidad de la leche durante la formación de geles por acción de diferentes agentes coagulantes. Para esta prueba se utilizó leche comercial marca Zaragoza (lactosa  $3.80 \pm 0.010$ , grasa  $3.05 \pm 0.042\%$ , proteína  $2.67 \pm 0.008\%$ ; Apéndice XII). Los resultados se ajustaron a una ecuación sigmoideal de 4 parámetros, en la Figura 8 se muestra la representación gráfica del análisis, y en la Tabla 6 se muestran los parámetros medidos y calculados a partir de este análisis.

Los agentes coagulantes utilizados tienen actividad coagulante diferente ya que para lograr que la coagulación iniciara al mismo tiempo se utilizaron diferentes cantidades (Jacob *et al.*, 2011). Con base en el volumen resultante en cada caso, aquí se observó que la actividad coagulante del trompillo es menor, ya que fue necesario agregar mayor



cantidad para que la coagulación iniciara. En el caso de la evaluación de la coagulación utilizando la mezcla el tiempo para iniciar la coagulación se redujo de ~40 min a 16.45.

El siguiente parámetro a observar una vez iniciado el proceso de coagulación de la leche es la velocidad de agregación de las caseínas ( $k$ ), que está representado en la gráfica por la pendiente y que termina al llegar a la viscosidad máxima ( $\eta_s$ ). La agregación de las caseínas fue la de menor magnitud para el EC ( $0.43 \text{ mPa s min}^{-1}$ ), aunque no tuvo diferencia estadísticamente significativa con respecto a los otros geles. Esto indica una lenta agregación de las caseínas, que se llevó a alcanzar la viscosidad máxima de menor magnitud ( $7.03 \text{ mPa s}$ ) y se formó en el mayor tiempo ( $51.99 \text{ min}$ ) en comparación con los otros geles. Esto indica una lenta formación de un gel débil o blando. Estos resultados no son exclusivos de la proteasa de trompillo, otras proteasas vegetales como la ficina y bromelina probaron inducir una coagulación lenta y la formación de geles de leche blandos (Beltrán-Espinoza *et al.*, 2021). De manera general, los geles de leche formados por acción de proteasas vegetales son menos firmes. Este fenómeno se explica por la actividad proteolítica de los agentes coagulantes sobre la caseína, que afecta predominantemente la proteólisis de la  $\kappa$ -caseína. Durante la formación del gel, la amplia actividad de las proteasas vegetales sobre las caseínas de la leche generan la hidrólisis continua provocando reordenamientos en la estructura del gel y esto a su vez, una menor firmeza (Ben Amira *et al.*, 2017).



**Figura 8.** Representación gráfica del comportamiento de los geles durante la evaluación de la actividad coagulante a 37 °C. Se muestran los cambios en la viscosidad durante el tiempo del análisis.  $\eta_s$ , viscosidad en el punto de gelificación;  $k$ , velocidad de agregación de las caseínas;  $t_0$ , tiempo en que inicia la agregación de las caseínas;  $t_s$ , tiempo en que se forma el gel.

Tabla 6. Comportamiento reológico de la leche coagulada con diferentes proteasas.

Parámetro	Quimosina recombinante	Quimosina de bovino	Trompillo	Quimosina	EEM	<i>P</i>
				recombinante + EC		
$\eta_0$ , mPa s	1.23 <sup>a</sup>	1.17 <sup>a</sup>	1.78 <sup>a</sup>	1.86 <sup>a</sup>	0.293	0.027
$\eta_s$ , mPa s	10.17 <sup>b</sup>	9.13 <sup>b</sup>	7.03 <sup>c</sup>	11.99 <sup>a</sup>	0.566	< 0.001
$\Delta\eta$ , mPa s	8.94 <sup>ab</sup>	7.95 <sup>b</sup>	5.25 <sup>c</sup>	10.13 <sup>a</sup>	0.529	< 0.001
$k$ , mPa s min <sup>-1</sup>	1.14 <sup>ab</sup>	1.06 <sup>ab</sup>	0.43 <sup>ab</sup>	1.76 <sup>a</sup>	0.389	0.011
$t_0$ , min	38.89 <sup>a</sup>	37.67 <sup>a</sup>	37.38 <sup>a</sup>	16.45 <sup>b</sup>	1.779	< 0.001
$t_s$ , min	48.31 <sup>a</sup>	46.28 <sup>a</sup>	51.99 <sup>a</sup>	21.96 <sup>b</sup>	2.487	< 0.001
$\Delta t$ , min	9.42 <sup>b</sup>	8.61 <sup>b</sup>	14.61 <sup>a</sup>	5.51 <sup>c</sup>	0.993	< 0.001

Ensayo a 37 °C.  $\eta_0$ , viscosidad inicial;  $\eta_s$ , viscosidad máxima;  $\Delta\eta$ , incremento en la viscosidad durante la formación del gel ( $\eta_s - \eta_0$ );  $k$ , velocidad de agregación de las caseínas ( $1/b$ );  $t_0$ , tiempo en que inicia la agregación de las caseínas ( $t_c - 2b$ ),  $t_s$ , tiempo en que se alcanza la máxima viscosidad ( $t_c + 2b$ );  $\Delta t$ , tiempo para inducir la gelificación de la leche cuando ha iniciado la agregación de caseínas ( $t_s - t_0$ ). a-d Medias seguidas de diferente letra en el mismo renglón son estadísticamente diferentes (ANOVA, Tukey-Kramer,  $P < 0.05$ ). Los datos representan el promedio de tres réplicas. EEM, error estándar de la media. *P*, valor de probabilidad.

La viscosidad inicial no fue estadísticamente diferente en ninguno de los casos, esto se debe a la composición de la leche pues la viscosidad inicial representa la viscosidad de la leche sin cambios. En contraste, la máxima viscosidad ( $\eta_s$ ) alcanzada fue estadísticamente diferente entre los cuatro geles. El gel producido por acción del trompillo fue el que alcanzó la menor viscosidad máxima (7.03 mPa s), seguidos por los geles de quimosina de bovino y quimosina recombinante (9.13 y 10.17 mPa s, respectivamente), siendo el de mayor viscosidad el de la mezcla de coagulantes (10.13 mPa s). De manera proporcional se encuentran los resultados del incremento en la viscosidad ( $\Delta\eta$ ), donde el gel de trompillo obtuvo el menor incremento (5.25 mPa s) y el de la mezcla de coagulantes tuvo el mayor (10.13 mPa s). Esto nos indica que el gel formado por acción del trompillo fue el más blando, pero resulta interesante el efecto sinérgico que se tiene cuando se usa este coagulante junto con la quimosina recombinante, pues resulta en la formación de un gel más firme. El tiempo para alcanzar la máxima viscosidad sólo presentó diferencias para la mezcla de agentes coagulantes. En este caso, la viscosidad máxima se alcanzó en la mitad del tiempo (21.96 min) en comparación con los otros geles. El tiempo para inducir la coagulación una vez que ha iniciado la agregación de las caseínas fue mayor para el gel de trompillo (14.61 min), lo que indica que este fue el gel que tardó más tiempo en formarse. Los geles formados por las quimosinas comerciales tuvieron un tiempo sin diferencia significativa, mientras que el gel formado por la mezcla de coagulantes fue el que se formó más rápido.

Una alternativa para adecuar el uso de las proteasas vegetales es hacer una combinación con la quimosina. Este hecho mejora las condiciones de coagulación ya que ambos efectos suceden dentro de la misma matriz generando una cuajada con características deseables para un producto lácteo. Algunos autores han probado el uso de mezclas de coagulantes utilizando la quimosina junto a un coagulante de origen vegetal y se han encontrado resultados favorables. Colombo *et al.* (2018) reportaron el uso de quimosina con el extracto acuoso de las flores de cardo en diferentes proporciones para la elaboración de quesos miniatura. Ellos encontraron que utilizando



una adecuada proporción, se producían cuajadas firmes y el queso tenía un intenso aroma que era agradable para el consumidor. Estos resultados proponen la base para el estudio posterior de la trompillina en combinación con la quimosina recombinante para producir un producto lácteo con características reológicas similares a los que ya existen y que tenga cualidades organolépticas agradables.

Los resultados de la cuantificación de la actividad coagulante y proteolítica de las proteasas utilizadas en la prueba de actividad coagulante se muestran en la tabla 7. En el presente estudio se encontró que la actividad específica del EC de trompillo (50.23 U/mg de proteína) fue del doble que el encontrado para las quimosinas. En otras investigaciones se han encontrado resultados similares, donde la actividad específica de las proteasas vegetales es 1.5 a 2 veces mayor que el de las quimosinas comerciales. La actividad coagulante específica del trompillo (841 SU/mg de proteína) resultó mucho menor que la alcanzada por las quimosinas. Estos resultados son consistentes con lo reportado por Beltrán *et al.* (2020), donde se encontró que la actividad coagulante específica de las proteasas vegetales ficina y bromelina (433 y 57 SU/mg de proteína, respectivamente) fueron menores que la encontrada para las quimosinas comerciales analizadas.

El radio es la relación entre la actividad coagulante y la actividad proteolítica, y suele calcularse para hacer una estimación sobre el éxito de un agente coagulante para su uso como sustituto de cuajo en la elaboración de queso (Jaros y Rohm, 2017). El radio del trompillo (6.83) es mayor al radio reportado para ficina (0.6) y bromelina (0.1) reportadas por Beltrán *et al.* (2020). Esto indica que la actividad coagulante es mayor en el trompillo. Al comparar el radio de trompillo con las quimosinas se encuentra que es de 33 a 27 veces menor comparado con el radio de la quimosina recombinante y la quimosina de bovino. Estos resultados indican que las quimosinas tienen una mejor relación entre actividad coagulante y proteolítica y que generan una cuajada susceptible de ser convertida en queso. En otros estudios se han reportado radios de 60 – 95 veces menores al comparar la quimosina con el extracto de gengibre y kiwi





(Mazorra-Manzano *et al.*, 2013). Estos valores no indican que el extracto de trompillo o cualquier otro origen vegetal no pueda ser usado para coagular leche, pero sugiere que se adapten las cantidades utilizadas y se ajusten los parámetros como temperatura y pH de acuerdo al tipo de enzima y producto que se desea generar.

Tabla 7. Actividad coagulante y proteolítica de las proteasas utilizadas durante la prueba de actividad coagulante.

	Quimosina recombinante	Quimosina de bovino	Trompillo	EEM	P
Proteína (mg/mL)	1.31 ± 0.11 <sup>b</sup>	0.63 ± 0.08 <sup>b</sup>	10.66 ± 0.50 <sup>b</sup>		
MCA (SU/mL)	6120.22 <sup>a</sup>	4397.45 <sup>b</sup>	3658.86 <sup>c</sup>	247.2	<0.001
E-MCA (SU/ mg proteína)	4697.30 <sup>b</sup>	7064.76 <sup>a</sup>	841.00 <sup>c</sup>	626.7	<0.001
AP (U/mL)	32.60 <sup>b</sup>	19.21 <sup>b</sup>	535.47 <sup>a</sup>	6.259	<0.001
APE (U/mg proteína)	24.89 <sup>c</sup>	30.49 <sup>b</sup>	50.23 <sup>a</sup>	0.968	<0.001
Radio (SU/U)	187.75 <sup>b</sup>	223.76 <sup>a</sup>	6.83 <sup>c</sup>	10.33	<0.001

Ensayo a 37 °C. a-d Medias seguidas de diferente letra en el mismo renglón son estadísticamente diferentes (ANOVA, Tukey-Kramer,  $p < 0.05$ ). Los datos representan el promedio de tres réplicas. MCA, actividad coagulante de la leche, expresada en Unidades Soxhlet por mililitro; E-MCA, actividad coagulante específica de la leche, expresada en unidades Soxhlet por miligramo de proteína; AP, actividad proteolítica, expresada en unidades enzimáticas, como la cantidad de enzima que libera 1 micromol de tirosina equivalente por minuto de reacción ( $U_{Tir}/mL$ ); APE, actividad proteolítica específica, expresada en unidades enzimáticas por miligramo de proteína ( $U_{Tir}/mL \text{ min}$ ); Radio, relación entre actividad coagulante y actividad proteolítica.

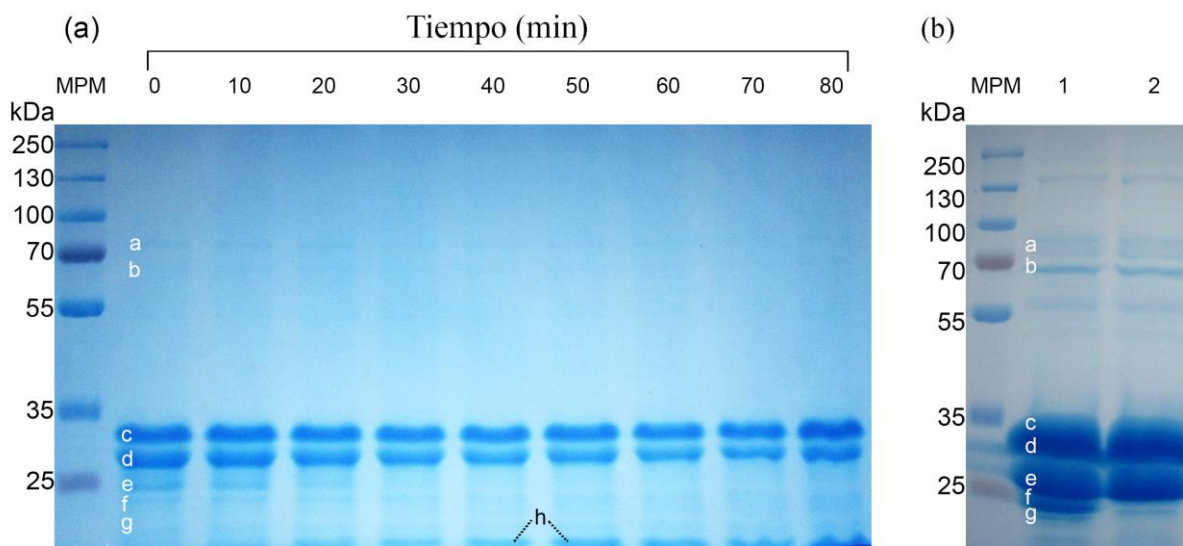
## 7.7 Hidrólisis de las caseínas de la leche por la trompillina

La hidrólisis de caseína en leche se determinó en dos procedimientos, por un lado la cinética de hidrólisis de 0 a 80 min (Figura 9a) y por otro en los geles coagulados en 80 min durante la evaluación de la actividad coagulante. Como se puede observar en la Figura 9a, la trompillina hidrolizó todas las caseínas presentes en la leche, a diferencia de las quimosinas que hidrolizan preferentemente la  $\kappa$ -caseína. Como resultado de la hidrólisis de las caseínas por la trompillina se generaron péptidos con tamaño  $\sim 14$  kDa, conforme el tiempo de reacción avanzó de 0 a 80 min estas nuevas bandas aparecieron. Hacia los 30 - 40 min de reacción la  $\kappa$ -caseína tuvo gran grado de hidrólisis y se completó hacia los 80 min. Es importante señalar que la trompillina no hidrolizó por completo la  $\alpha$ -caseína y  $\beta$ -caseína, en la Figura 9a se puede ver claramente, que estas bandas permanecen casi sin cambios a lo largo de toda la cinética. Este patrón de hidrólisis sugiere que esta proteasa escinde el enlace Phe<sub>105</sub>-Met<sub>106</sub> liberando el fragmento de para- $\kappa$ -caseína (f<sub>1-105</sub>) (González-Velázquez *et al.*, 2021). Esta hidrólisis es llevada a cabo también por la quimosina, pero en el caso de las proteasas vegetales la hidrólisis se lleva a cabo sobre todas las caseínas y continúa sobre los nuevos péptidos formados. Esto se confirma junto a la alta actividad proteolítica y baja actividad coagulante discutida anteriormente, y mismo factor que es limitante para el uso de las proteasas vegetales como coagulantes para la producción de queso pues la formación de péptidos de bajo peso molecular afectan la textura y sabor del queso (Bey *et al.*, 2018).

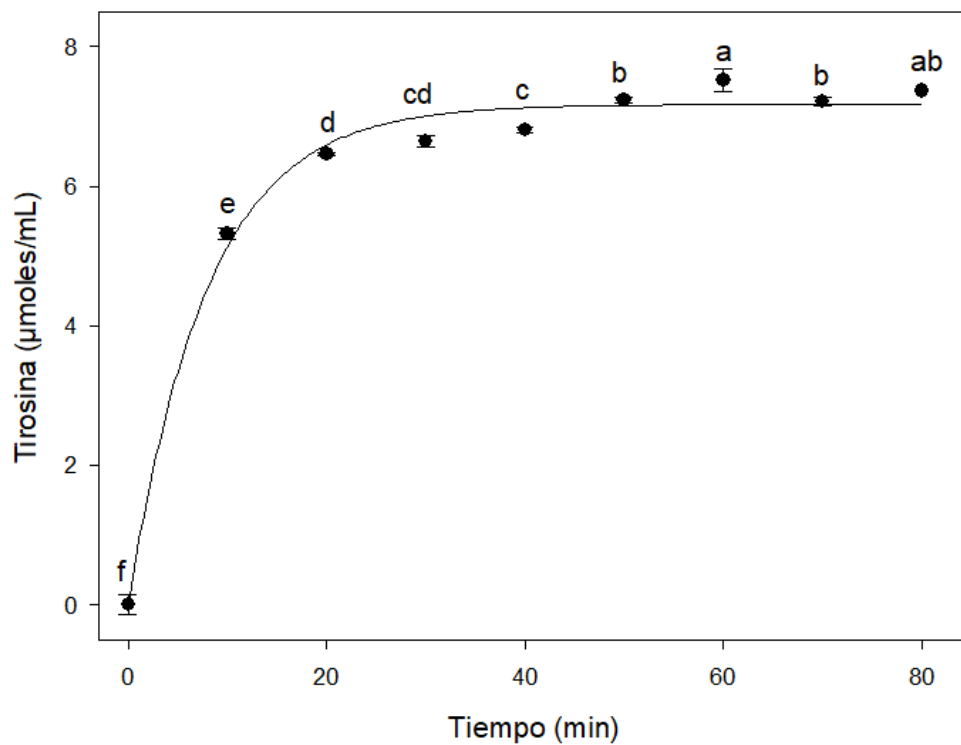
En la evaluación de la actividad proteolítica de las quimosinas al final de la formación del gel (Figura 9b) se observa que no hubo hidrólisis de todas las caseínas. Con esta información se confirmó que las quimosinas producen una hidrólisis específica y limitada sobre las proteínas de la leche. Esta baja actividad proteolítica favorece la formación de geles cohesivos en tiempos cortos (Tabla 6).



Los resultados de la cuantificación de tirosina liberada cada 10 min por un total de 80 (Figura 10) sobre el sustrato caseína permite hacer una comparación con la hidrólisis de las proteínas de leche evaluada por SDS-PAGE. En la Figura 10 se puede observar la cinética de formación de tirosina, donde la máxima actividad se observa de los 60 a los 80 min. Este efecto visualizado sobre la hidrólisis de caseínas *in vitro* explica el hecho de que la  $\kappa$ -caseína casi se hidrolizó por completo hacia los 40 min, pero fue hidrolizada por completo hacia los 80 min (Figura 9a). La actividad proteolítica de estas enzimas es alta de los 40 a los 80 min. Este resultado es interesante pues podría aplicarse esta solución de proteasas en reacciones de más de una hora.



**Figura 9.** Hidrólisis de las proteínas de la leche durante la formación de un gel a 37 °C. (a) Coagulación con trompillo, reacción detenida cada 10 min por 80 min. (b) Coagulación con quimosina recombinante (carril 1) y quimosina de bovino (carril 2), muestras tomadas a los 80 min. MPM, marcador de peso molecular, a = transferrina, b = albúmina sérica bovina, c =  $\beta$ -caseínas, d =  $\alpha_{s1}$ -caseína, e =  $\kappa$ -caseína, f =  $\gamma$ -caseína, g =  $\beta$ -lactoglobulina, h = péptidos formados por hidrólisis ~ 14 kDa.



**Figura 10.** Cinética de cuantificación de tirosina. Reacción de 80 min sobre sustrato caseína a 37 °C y pH 7.5. a-f Medias seguidas de diferente letra son estadísticamente diferentes (ANOVA, Tukey-Kramer,  $p < 0.05$ ). Los datos representan el promedio de tres réplicas  $\pm$  desviación estándar.

## 7.8 Sinéresis de los geles de leche

La leche se preparó de acuerdo a lo descrito en la sección 6.14. La leche utilizada en esta prueba fue leche comercial marca Lala (lactosa  $3.87 \pm 0.026$ , grasa  $3.29 \pm 0.012\%$ , proteína  $2.70 \pm 0.006\%$ ). Los resultados obtenidos de la evaluación de la sinéresis (Tabla 8) indican un grado de sinéresis considerablemente mayor en el gel formado por acción del trompillo (31.08%). En correspondencia este gel tuvo bajo volumen (24.81 g) y gran cantidad de proteína en el suero. Este es el resultado de la alta actividad proteolítica mostrada por la trompillina, que cumple con la generalidad de que la hidrólisis de las proteínas de leche por acción de las proteasas vegetales provoca que se pierdan en el suero, lo que disminuye el rendimiento de la cuajada (Kumar y Sasmal, 2020). En los geles formados por cuajo, el reordenamiento de la red de proteínas genera la pérdida de agua. En el caso del gel formado por el trompillo este reordenamiento pudo ser mayor, además de que la red formada correspondería a proteínas y péptidos pequeños que no pueden formar un coagulo firme y permanecen fluídos. Se observó un gel débil, con alta sinéresis y un contenido de proteína (0.938 g/100 mL) tan alto que el suero era color blanco (Imagen en la tabla 8). En el análisis SDS-PAGE (Figura 11, carril1) se observa la presencia de bandas densas correspondientes a la  $\alpha$ - y  $\beta$ - caseínas, proteínas del suero y péptidos de bajo peso molecular ( $\sim 18$  kDa) generados por la actividad proteolítica. Estos resultados indican que la mayor parte de las proteínas que se perdieron en el gel formado por la trompillina eran de esta clase. Para el caso de este coagulante vegetal, las caseínas se pierden en el suero por lo que queda formando el gel débil con péptidos de menor peso molecular. Se observó que estos péptidos se encontraban tanto en el gel de leche (Figura 9a) como en el suero (Figura 11) obtenido por sinéresis, lo que podría indicar que una parte de ellos son de carácter hidrofóbico y otros hidrofílico.

En los carriles 2 y 3 del gel mostrado en la Figura 11 se observan las proteínas presentes en el suero del gel formado por la quimosina recombinante (carril 2) y la



quimosina de bovino (carril 3). En estos casos, la cantidad de proteína es muy baja (Tabla 8) y corresponde en su mayoría a albúmina sérica bovina.

El gel formado por la combinación de la actividad coagulante de la quimosina recombinante y el trompillo no mostró diferencia estadísticamente significativa con respecto a los geles formados por quimosinas. La sinéresis generada por el trompillo se minimizó por acción de la quimosina recombinante, y la cantidad de proteína en el suero también fue mínima. En la Figura 11 carril 4 se puede observar que las proteínas del suero son  $\alpha/\beta$ -caseínas, pero se encuentran en menor proporción si se compara con el carril 1 (trompillo). Esto indica que la acción de la quimosina recombinante evitó la pérdida de proteínas hacia el suero y en este caso se pudo conservar mayor cantidad de  $\alpha$ - y  $\beta$ - caseínas en la matriz de proteínas del gel. Este hallazgo es muy importante, pues el resultado obtenido indica que se puede usar el trompillo de manera binaria junto a una quimosina y que se puede obtener el mismo rendimiento pero utilizando una proteasa vegetal que puede darle atributos diferentes al producto elaborado. En cuanto a la cantidad de agente coagulante utilizado, otros autores han reportado que al aumentar la proporción de proteasa vegetal en una mezcla con quimosina, se disminuía el rendimiento del producto (Colombo *et al.*, 2018).



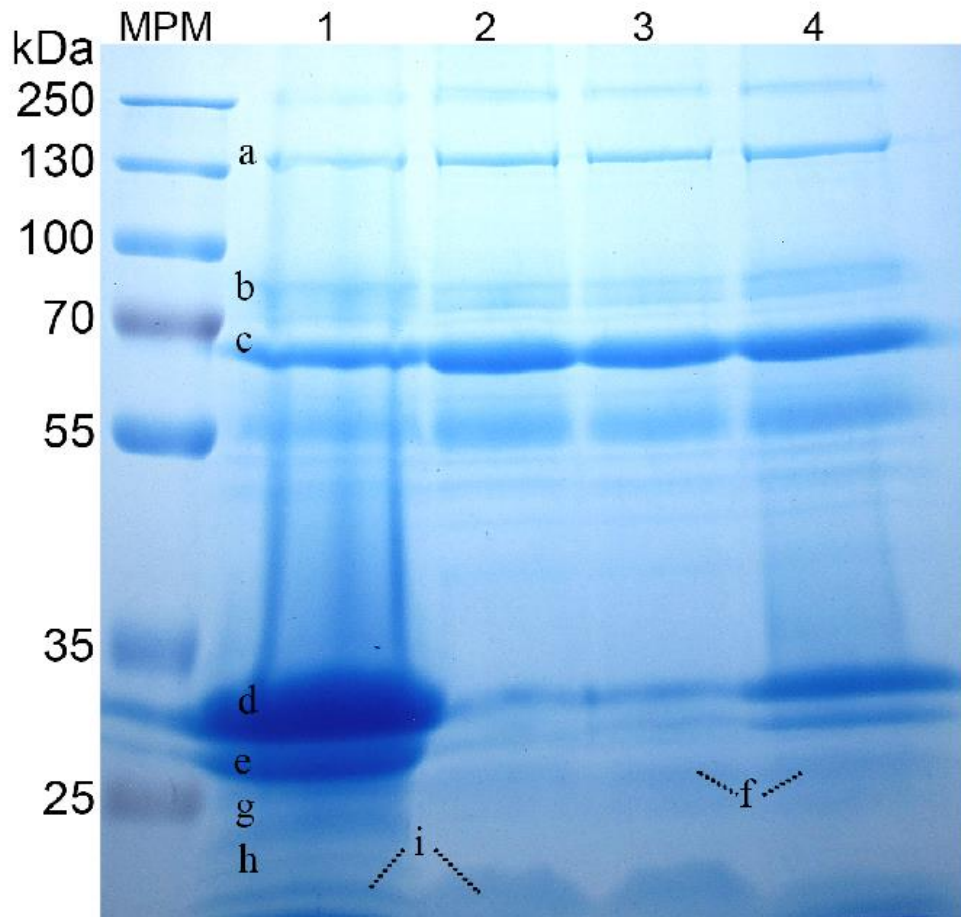
Tabla 8. Resultados de la prueba de sinéresis de los gels de leche.

Agente coagulante	Quimosina recombinante	Quimosina de bovino	Trompillo	Mezcla de coagulantes	EEM	<i>P</i>
Leche <sup>1</sup> (g)	36.21 <sup>a</sup>	37.41 <sup>a</sup>	36.02 <sup>a</sup>	36.35 <sup>a</sup>	0.731	0.169
Suero <sup>2</sup> (g)	1.63 <sup>a</sup>	1.68 <sup>a</sup>	11.20 <sup>a</sup>	1.22 <sup>a</sup>	0.416	<0.001
Gel de leche (g)	34.58 <sup>a</sup>	35.73 <sup>a</sup>	24.81 <sup>b</sup>	35.11 <sup>a</sup>	0.713	<0.001
Sinéresis (%)	4.51 <sup>b</sup>	4.49 <sup>b</sup>	31.08 <sup>a</sup>	3.41 <sup>b</sup>	0.949	<0.001
Proteína (g/100 mL)	0.137 <sup>b</sup>	0.138 <sup>b</sup>	0.938 <sup>a</sup>	0.164 <sup>b</sup>	0.022	<0.001

Apariencia del suero



<sup>1</sup>Leche adicionada con CaCl<sub>2</sub> (0.02%). <sup>2</sup>Suero liberado después de 80 min de incubación a 37 °C, obtenido por centrifugación a 300x g, a 10 °C por 10 min. a-c Medias seguidas de diferente letra en el mismo renglón son estadísticamente diferentes (ANOVA, Tukey-Kramer, *P* < 0.05). Los datos representan el promedio de tres réplicas. EEM, error estándar de la media. *P*, valor de probabilidad.



**Figura 11.** Proteínas presentes en el suero liberado por geles de leche. Carril 1, gel de trompillo; carril 2, gel de quimosina recombinante; carril 3, quimosina de bovino; carril 4, mezcla de coagulantes (quimosina recombinante y trompillo). MPM, marcador de peso molecular, a = inmunoglobulinas, b = lactoferrina, c= albúmina sérica bovina, d =  $\beta$ -caseínas, e =  $\alpha_{s1}$ -caseína, f =  $\kappa$ -caseína, g =  $\gamma$ -caseína, h= péptidos generados, i=  $\beta$ -lactoglobulina.



## 8. CONCLUSIÓN

Se demostró que las bayas maduras de la planta *Solanum elaeagnifolium* Cavanilles presentan actividad proteolítica, amilolítica y lipolítica. Por lo que estas bayas podrían utilizarse potencialmente en el procesamiento de distintos alimentos como en productos lácteos (actividad proteolítica y lipolítica) o en productos de panadería (actividad proteolítica, amilolítica y lipolítica). Posteriormente, se aisló la proteasa de los frutos maduros de *Solanum elaeagnifolium* Cavanilles, la cual fue nombrada “trompillina.” La trompillina presentó una alta actividad proteolítica sobre la caseína a pHs alcalinos y a altas temperaturas, lo cual coincide con lo reportado para otras serina proteasas tipo cucumisina. Además, se demostró que la trompillina puede hidrolizar las caseínas de manera diferente a la quimosina, debido a que hidroliza no sólo a la  $\kappa$ -caseína, sino también a las caseínas  $\alpha$  y  $\beta$ . Esta amplia actividad se mantiene hasta por 80 min y como resultado genera péptidos de bajo peso molecular; mismos que podrían estudiarse posteriormente y aplicarse como un hidrolizado en varios productos como por ejemplo en fórmulas lácteas para infantes o como ingredientes funcionales. La evaluación de la actividad coagulante de la trompillina junto con una quimosina comercial demostró que las propiedades del gel formado mejoran. Por lo tanto, se concluye que la trompillina podría aplicarse también junto a una quimosina comercial con el fin de generar sinergia y mejorar el proceso de gelación de la leche.



## 9. BIBLIOGRAFÍA

- Afsharnezhad, M., Shahangian, S. S., y Sariri, R. (2019). A novel milk-clotting cysteine protease from *Ficus johannis*: Purification and characterization. *Int J Biol Macromol*, 121, 173-182.
- Agoreyo, B. O., y Fregene, R. O. (2014). Variations in amylase and invertase activities in *Solanum* species (eggplants) during ripening. *Journal of Applied Sciences and Environmental Management*, 18(2), 283-290.
- Ahmed, I. A. M., Morishima, I., Babiker, E. E., y Mori, N. (2009). Characterisation of partially purified milk-clotting enzyme from *Solanum dubium* Fresen seeds. *Food Chemistry*, 116(2), 395-400.
- Almeida, C.A. y Simoes, I. (2018). Cardoon-based rennets for cheese production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102, 4675–4686.
- Badgujar, S. B., y Mahajan, R. T. (2014). Nivulian-II a new milk clotting cysteine protease of *Euphorbia nivulia* latex. *Int J Biol Macromol*, 70, 391-398.
- Balakrishnan, D., Kumar, S. S. y Sugathan, S. (2019). Amylases for food applications – updated information. En Binod, P., Varjani, S. y Raveendran, S. (Eds), *Green bioprocess, enzymes in industrial food processing*. (pp 199-227). Singapur, Singapur: Springer.
- Beka, R. G., Krier, F., Botquin, M., Guiama, V. D., Donn, P., Libouga, D. G., Mbofung, C.M., Dimitrov, K., Slomianny, M.C., Guillochon, D. y Vercaigne-Marko, D. (2014). Characterisation of a milk-clotting extract from *Balanites aegyptiaca* fruit pulp. *International Dairy Journal*, 34(1), 25-31.
- Beltrán-Espinoza, J. A., Domínguez-Lujan, B., Gutiérrez-Méndez, N., Chávez-Garay, D. R., Nájera-Domínguez, C., y Leal-Ramos, M. Y. (2021). The impact of chymosin and plant-derived proteases on the acid-induced gelation of milk. *International Journal of Dairy Technology*, 74(2), 297-306.
- Ben Amira, A., Besbes, S., Attia, H., y Blecker, C. (2017). Milk-clotting properties of plant rennets and their enzymatic, rheological, and sensory role in cheese making: A review. *International Journal of Food Properties*, 20(sup1), S76-S93.



- Ben Elarbi, M., Khemiri, H., Jridi, T., y Ben Hamida, J. (2009). Purification and characterization of alpha-amylase from safflower (*Carthamus tinctorius* L.) germinating seeds. *C R Biol*, 332(5), 426-432.
- Bey, N., Debbebi, H., Abidi, F., Marzouki, M. N., y Ben Salah, A. (2018). The non-edible parts of fennel ( *Foeniculum vulgare* ) as a new milk-clotting protease source. *Industrial Crops and Products*, 112, 181-187.
- Binod, P., Papamichael, E., Varjani, S. y Sindhu, R. (2019). Introduction to green bioprocesses: industrial enzymes in food applications. En Binod, P., Varjani, S. y Raveendran, S. (Eds), *Green bio-process, enzymes in industrial food processing*. (pp 1-8). Singapur, Singapur: Springer.
- Bodansky, A. (1916). The chymase of *Solanum elaeagnifolium*. *Journal of Biological Chemistry*, 27, 103-105.
- Bodansky, A. (1924). A study of milk-coagulating enzyme of *Solanum elaeagnifolium*. *Journal of Biological Chemistry*, 61, 365-375.
- Boyd, J. W., Murray, D. S., y Tyrl, R. J. (1984). Silverleaf Nightshade, *Solanum elaeagnifolium*, Origin, Distribution, and Relation to Man. *Economic Botany*, 38(2), 210-217.
- Bradford, M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248 - 254.
- Campillo-Alvarado, G., y Tovar-Miranda, R. (2013). Recent advances and applications of the lipolytic activity of *Carica papaya* latex. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 90, 49-60.
- Carrasco-Palafox, J., Rivera-Chavira, B. E., Ramirez-Baca, N., Manzanares-Papayanopoulos, L. I., y Nevarez-Moorillon, G. V. (2018). Improved method for qualitative screening of lipolytic bacterial strains. *MethodsX*, 5, 68-74.
- Chávez-Garay, D. R. (2013). Caracterización parcial de un extracto acuoso obtenido de los frutos maduros de *Solanum elaeagnifolium* var. Cavanilles utilizado para coagular la leche. (Master). Universidad Autónoma de Chihuahua.



- Chávez-Garay, D. R., Gutiérrez-Méndez, N., Valenzuela-Soto, M. E., y García-Triana, A. (2016). Partial characterization of a plant coagulant obtained from the berries of *Solanum elaeagnifolium*. *CyTA - Journal of Food*, 14(2), 200-205.
- Clauss, K., Baumert, A., Nimtz, M., Milkowski, C., y Strack, D. (2008). Role of a GDLS lipase-like protein as sinapine esterase in Brassicaceae. *Plant J*, 53(5), 802-813.
- Colombo, M. L., Fernandez, A., Cimino, C. V., Liggieri, C., Bruno, M., Faro, C., . . . Vairo-Cavalli, S. (2018). Miniature cheeses made with blends of chymosin and a vegetable rennet from flowers of *Silybum marianum*: Enzymatic characterization of the flower-coagulant peptidase. *Food Chem*, 266, 223-231.
- Doonan, S. y Cutler, P. (2004). General strategies. En Cutler, P. (Ed.), *Methods in molecular biology*, vol. 244 (1-13). Humana Press Inc., Totowa, NJ, EUA.
- Egito, A. S., Girardet, J. M., Laguna, L. E., Poirson, C., Mollé, D., Miclo, L., . . . Gaillard, J. L. (2007). Milk-clotting activity of enzyme extracts from sunflower and albizia seeds and specific hydrolysis of bovine  $\kappa$ -casein. *International Dairy Journal*, 17(7), 816-825.
- Enzymes Market Size, Share and Trends Analysis Report By Type (Industrial, Specialty), By Product (Carbohydrase, Proteases), By Source (Microorganisms, Animals), By Region, And Segment Forecasts, 2021 - 2028. (2021). Retrieved from <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/enzymes-industry>
- Felix da Silva, D., Matumoto-Pintro, P. T., Bazinet, L., Couillard, C., y Britten, M. (2015). Effect of commercial grape extracts on the cheese-making properties of milk. *J Dairy Sci*, 98(3), 1552-1562.
- Freitas, C. D. T., Leite, H. B., Oliveira, J. P. B., Amaral, J. L., Egito, A. S., Vairo-Cavalli, S., . . . Ramos, M. V. (2016). Insights into milk-clotting activity of latex peptidases from *Calotropis procera* and *Cryptostegia grandiflora*. *Food Res Int*, 87, 50-59.
- Gagaoua, M., Ziane, F., Nait Rabah, S., Boucherba, N., Ait Kaki El-Hadef El-Okki, A., Bouanane-Darenfed, A., y Hafid, K. (2017). Three phase partitioning, a scalable method for the purification and recovery of cucumisin, a milk-clotting enzyme, from the juice of *Cucumis melo* var. *reticulatus*. *Int J Biol Macromol*, 102, 515-525.



- García, V., Rovira, S., Bouteau, K., Ferrandini, E., y López, M. B. (2016). Physicochemical, microbiological, textural and sensory changes during the ripening of pasteurised goat milk cheese made with plant coagulant (*Cynara scolymus*). *International Journal of Dairy Technology*, 69(1), 96-102.
- Gonzalez-Rabade, N., Badillo-Corona, J. A., Aranda-Barradas, J. S., y Oliver-Salvador Mdel, C. (2011). Production of plant proteases in vivo and in vitro--a review. *Biotechnol Adv*, 29(6), 983-996.
- González-Velázquez, D. A., Mazorra-Manzano, M. A., Martínez-Porchas, M., Huerta-Ocampo, J. A., Vallejo-Cordoba, B., Mora-Cortes, W. G., . . . Ramirez-Suarez, J. C. (2021). Exploring the Milk-Clotting and Proteolytic Activities in Different Tissues of *Vallesia glabra*: a New Source of Plant Proteolytic Enzymes. *Appl Biochem Biotechnol*, 193(2), 389-404.
- Guevara, M., y Daleo, G. (2018). *Biotechnological Applications of Plant Proteolytic Enzymes* (M. Guevara y G. Daleo Eds. Vol. 1). Switzerland: Springer.
- Guevara, M., Daleo, G., y Oliva, R. (2001). Purification and characterization of an aspartic protease from potato leaves. *Physiologia plantarum*, 112, 321-326. doi:10
- Guiama, V. D., Koube, J., Ngah, E., Beka, R. G., y Bindzi, J. M. (2021). *Solanum aethiopicum* extract used as coagulant affected nutritional and rheological characteristics of cheese. *American Journal of Food and Nutrition*, 9(1), 31-41.
- Guiama, V. D., Libouga, D. G., Ngah, E., y Mbofung, C. M. (2010). Milk-clotting activity of berries extracts from nine *Solanum* plants. *African Journal of Biotechnology*, 9(25), 3911-3918.
- Gutiérrez-Méndez, N., Balderrama-Carmona, A., Garcia-Sandoval, S. E., Ramirez-Vigil, P., Leal-Ramos, M. Y., y García-Triana, A. (2019). Proteolysis and Rheological Properties of Cream Cheese Made with a Plant-Derived Coagulant from *Solanum elaeagnifolium*. *Foods*, 8(2).
- Gutiérrez-Méndez, N., Chávez-Garay, D. R., y Jiménez-Campos, H. R. (2012). Exploring the milk-clotting properties of a plant coagulant from the berries of *S. elaeagnifolium* var. *Cavanilles*. *J Food Sci*, 77(1), C89-94.





- Gutiérrez-Méndez, N., López-Díaz, J. A., Chávez-Garay, D. R., Leal-Ramos, M. Y., y García-Triana, A. (2020). Milk-clotting enzymes: *S. elaeagnifolium* as an alternative source. In G. V. Nevarez-Moorillon, A. Prado-Barragán, J. L. Martínez-Hernández, y C. N. Aguilar (Eds.), *Food microbiology and biotechnology, Safe and sustainable food production*.
- Hafid, K., John, J., Sayah, T. M., Dominguez, R., Becila, S., Lamri, M., . . . Gagaoua, M. (2020). One-step recovery of latex papain from *Carica papaya* using three phase partitioning and its use as milk-clotting and meat-tenderizing agent. *Int J Biol Macromol*, 146, 798-810.
- Harris, E. L. V. y Angal, S. (Eds). (1989). *Protein purification methods, a practical approach*. N.Y., EUA: Oxford University Press.
- Hashim, M. M., Mingsheng, D., Iqbal, M. F., y Xiaohong, C. (2011). Ginger rhizome as a potential source of milk coagulating cysteine protease. *Phytochemistry*, 72(6), 458-464.
- Jacob, M., Jaros, D., y Rohm, H. (2011). Recent advances in milk clotting enzymes. *International Journal of Dairy Technology*, 64(1), 14-33.
- Jaros, D., y Rohm, H. (2017). Rennets: Applied Aspects. In *Cheese* (pp. 53-67).
- Javed, S., Azeem, F., Hussain, S., Rasul, I., Siddique, M. H., Riaz, M., . . . Nadeem, H. (2018). Bacterial lipases: A review on purification and characterization. *Prog Biophys Mol Biol*, 132, 23-34.
- Khemakhem, B., El Abed, H., Chakroun, M., Fendri, I., y Smaoui, S. (2019). Functional effects of ice plant amylases on cake and bun quality. *Food Bioscience*, 29, 142-149.
- Kumar, A., y Sasmal, S. (2020). Rheological and physico-chemical properties of milk gel using isolate of pumpkin (*Cucurbita moschata*) seeds: A new source of milk clotting peptidase. *Food Hydrocolloids*, 106.
- Kumari, Singh, V. K., Fitter, J., Polen, T., y Kayastha, A. M. (2010). Alpha-amylase from germinating soybean (*Glycine max*) seeds--purification, characterization and sequential similarity of conserved and catalytic amino acid residues. *Phytochemistry*, 71(14-15), 1657-1666.





- Kumari, M., Sharma, A., y Jagannadham, M. V. (2012). Religiosin B, a milk-clotting serine protease from *Ficus religiosa*. *Food Chemistry*, 131(4), 1295-1303.
- Li, Z., Scott, K., Hemar, Y., Zhang, H., y Otter, D. (2018). Purification and characterisation of a protease (tamarillin) from tamarillo fruit. *Food Chem*, 256, 228-234.
- Lo Piero, A. R., Puglisi, I., y Petrone, G. (2011). Characterization of the purified actinidin as a plant coagulant of bovine milk. *European Food Research and Technology*, 233(3), 517-524.
- Lopez-Gonzalez, J. A., Vargas-Garcia Mdel, C., Lopez, M. J., Suarez-Estrella, F., Jurado, M., y Moreno, J. (2014). Enzymatic characterization of microbial isolates from lignocellulose waste composting: chronological evolution. *J Environ Manage*, 145, 137-146.
- Lucey, J. A. (2011). Cheese | Curd Syneresis. In *Encyclopedia of Dairy Sciences* (pp. 591-594).
- Lucey, J.A. (2020). Milk protein gels. En Boland, M. y Singh, H. (Ed.), *Milk proteins: from expresión to food* (599-632). Elsevier, Inc.
- Lufrano, D., Faro, R., Castanheira, P., Parisi, G., Verissimo, P., Vairo-Cavalli, S., . . . Faro, C. (2012). Molecular cloning and characterization of procirsin, an active aspartic protease precursor from *Cirsium vulgare* (Asteraceae). *Phytochemistry*, 81, 7-18.
- Machado de Castro, A., y Días-Ribeiro, B. (2013). Methods of detection of amylolytic activities. In A. B. Vermelho y S. Couri (Eds.), *Methods to determine enzymatic activity* (pp. 100-124): Bentham Science Publishers.
- Margesin, R., Feller, G., Hämmerle, M., Stegner, U., Schinner, F. (2002). A colorimetric method for the determination of lipase activity in soil. *Biotechnology Letters*, 24, 27-33.
- Mazorra-Manzano, M. A., Perea-Gutierrez, T. C., Lugo-Sanchez, M. E., Ramirez-Suarez, J. C., Torres-Llenez, M. J., Gonzalez-Cordova, A. F., y Vallejo-Cordoba, B. (2013). Comparison of the milk-clotting properties of three plant extracts. *Food Chem*, 141(3), 1902-1907.



- McDonald, C. E., Chen, L. L. (1965). The lowry modification of the folin reagent for determination of proteinase activity.
- Milner, S. E., Brunton, N. P., Jones, P. W., O'Brien, N. M., Collins, S. G., y Maguire, A. R. (2011). Bioactivities of glycoalkaloids and their aglycones from *Solanum* species. *J Agric Food Chem*, 59(8), 3454-3484.
- Moreno-Hernandez, J. M., Hernandez-Mancillas, X. D., Navarrete, E. L. C., Mazorra-Manzano, M. A., Osuna-Ruiz, I., Rodriguez-Tirado, V. A., y Salazar-Leyva, J. A. (2017). Partial Characterization of the Proteolytic Properties of an Enzymatic Extract From "Aguama" *Bromelia pinguin* L. Fruit Grown in Mexico. *Appl Biochem Biotechnol*, 182(1), 181-196.
- Nadaroglu, H., y Demir, N. (2012). Purification and characterization of a novel serine protease compositain from compositae (*Scorzonera hispanica* L.). *European Food Research and Technology*, 234(6), 945-953.
- Nasr, A. I., Ahmed, I. A. M., y Hamid, O. I. (2016). Characterization of partially purified milk-clotting enzyme from sunflower (*Helianthus annuus*) seeds. *Food Sci Nutr*, 4(5), 733-741.
- NMX-F-317-S-1978. Determinación de pH en alimentos, (1978).
- Official Methods of Analysis of AOAC International. , (1995).
- Official Methods of Analysis of AOAC International, (1998).
- Piñón-Muñiz, A. J. (2021). Actividades amilolítica y proteolítica del extracto crudo enzimático de bayas de *Solanum elaeagnifolium* Var. Cavanilles y su uso potencial en productos a base de harina de trigo. (Maestría). Universidad Autónoma de Chihuahua,
- Pontual, E. V., Carvalho, B. E., Bezerra, R. S., Coelho, L. C., Napoleao, T. H., y Paiva, P. M. (2012). Caseinolytic and milk-clotting activities from *Moringa oleifera* flowers. *Food Chem*, 135(3), 1848-1854.
- Rajagopalan, A. y Omana, B. (2018). Three phase partitioning to concentrate milk clotting proteases from *Wrightia tinctoria* R. Br and its characterization. *International Journal of Biological Macromolecules*. 118, 279-288.



- Raposo, S., y Domingos, A. (2008). Purification and characterization milk-clotting aspartic proteinases from *Centaurea calcitrapa* cell suspension cultures. *Process Biochemistry*, 43(2), 139-144.
- Salehi, M., Aghamaali, M. R., Sajedi, R. H., Asghari, S. M., y Jorjani, E. (2017). Purification and characterization of a milk-clotting aspartic protease from *Withania coagulans* fruit. *Int J Biol Macromol*, 98, 847-854.
- Sankar, S., y Ponnuraj, K. (2020). Less explored plant lipases: Modeling and molecular dynamics simulations of plant lipases in different solvents and temperatures to understand structure-function relationship. *Int J Biol Macromol*, 164, 3546-3558.
- Sarmah, N., Revathi, D., Sheelu, G., Yamuna Rani, K., Sridhar, S., Mehtab, V., y Sumana, C. (2018). Recent advances on sources and industrial applications of lipases. *Biotechnol Prog*, 34(1), 5-28.
- Serú, A.O. y Tofi, V.C. (s.f.). Dicotiledóneas. Recuperado de <https://sites.google.com/site/floraautoctonamza/categoria-1/sub-categoria-1a/dicotiledoneas?tmpl=%2Fsystem%2Fapp%2Ftemplates%2Fprint%2F&showPrintDialog=1>.
- Seth, S., Chakravorty, D., Dubey, V. K., y Patra, S. (2014). An insight into plant lipase research - challenges encountered. *Protein Expr Purif*, 95, 13-21.
- Shah, M. A., Mir, S. A., y Paray, M. A. (2014). Plant proteases as milk-clotting enzymes in cheesemaking: a review. *Dairy Science y Technology*, 94(1), 5-16.
- Sharma, A., Kumari, M., y Jagannadham, M. V. (2012). Religiosin C, a cucumisin-like serine protease from *Ficus religiosa*. *Process Biochemistry*, 47(6), 914-921.
- Singh, A. N., Shukla, A. K., Jagannadham, M. V., y Dubey, V. K. (2010). Purification of a novel cysteine protease, procerain B, from *Calotropis procera* with distinct characteristics compared to procerain. *Process Biochemistry*, 45(3), 399-406.
- Singh, K. A., Kumar, R., Rao, G. R. K., y Jagannadham, M. V. (2010). Crinumin, a chymotrypsin-like but glycosylated serine protease from *Crinum asiaticum*: Purification and physicochemical characterisation. *Food Chemistry*, 119(4), 1352-1358.



- Somavarapu, S., Vemula, S., y Reddy, I. B. (2017). Extraction, purification and characterization of a novel cysteine protease from the latex of plant *Vallisneria spiralis*. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*.
- Teutschbein, J., Gross, W., Nimtz, M., Milkowski, C., Hause, B., y Strack, D. (2010). Identification and localization of a lipase-like acyltransferase in phenylpropanoid metabolism of tomato (*Solanum lycopersicum*). *J Biol Chem*, 285(49), 38374-38381.
- Tito, F. R., Pepe, A., Tonon, C. V., Daleo, G. R., y Guevara, M. G. (2020). Determination and characterisation of milk-clotting activity of two *Solanum tuberosum* aspartic proteases (StAPs). *International Dairy Journal*, 104.
- Tripathi, P., Tomar, R., y Jagannadham, M. V. (2011). Purification and biochemical characterisation of a novel protease streblin. *Food Chemistry*, 125(3), 1005-1012.
- Uchikoba, T., Kaneda, M. (1996). Milk-Clotting Activity of Cucumisin, a Plant Serine Protease from Melon Fruit. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 56.
- Valles, D., y Cantera, A. M. B. (2018). Antiacanthain A: New proteases isolated from *Bromelia antiacantha* Bertol. (Bromeliaceae). *Int J Biol Macromol*, 113, 916-923.
- van der Hoorn, R. A. (2008). Plant proteases: from phenotypes to molecular mechanisms. *Annu Rev Plant Biol*, 59, 191-223.
- van der Maarel, M. J. E. C., van der Veen, B., Uitdehaag, J.C.M., Leemhuis, H., Dijkhuizen, L. (2002). Properties of starch converting enzymes of alfa amylase family. *Journal of Biotechnology*, 94, 137-155.
- Vargas-Requena, C. L., A, H.-S., Jiménez-Vega, F., y López-Díaz, J. (2008). Purificación y caracterización parcial de una proteasa tipo cucumisina presente en *Solanum elaeagnifolium*. *Ciencia en la frontera: revista de ciencia y tecnología de la UACJ*, 6, 161-164.
- Zhang, Y., He, S., y Simpson, B. K. (2018). Enzymes in food bioprocessing — novel food enzymes, applications, and related techniques. *Current Opinion in Food Science*, 19, 30-35.



## Apéndice I. Reactivos, materiales y equipo

### Reactivos

- 2-mercaptoetanol (Sigma-Aldrich)
- 2-propanol
- Acetato de sodio (CTR Scientific)
- Ácido acético (CTR Scientific)
- Ácido bórico (CTR Scientific)
- Ácido clorhídrico (Faga Lab)
- Ácido fosfórico (Golden Bell)
- Ácido sulfúrico (Fermont)
- Ácido tricloroacético (Sigma-Aldrich)
- Acrilamida (Sigma-Aldrich)
- Agar bacteriológico
- Agua desionizada
- Albúmina bovina de suero
- Almidón soluble ACS (CTR Scientific)
- Azul brillante (Fluka)
- Azul de bromofenol (CTR Scientific)
- Azul de bromotimol
- Azul de comassie (Fluka Analytical)
- Bifosfato de sodio (Sigma-Aldrich)
- Bisacrilamida (Sigma-Aldrich)
- Borato de sodio (Fisher Chemicals)
- Carbonato de sodio (CTR Scientific)
- Caseína (Hycel)
- Citrato de sodio (Reactivos Monterrey)
- Cloroformo (CTR Scientific)
- Cloruro de calcio anhidro (FagaLab y Analytyka, Mexico)
- Cloruro de sodio (Golden Bell)
- Dodecil sulfato sódico (Sigma-Aldrich)
- E-64 (trans-epoxisuccinil-L-leucil-amido (4-guanidina) butano) (Sigma)
- EDTA (Sigma-Aldrich)
- Etanol (CTR Scientific)
- Fenol (CTR Scientific)
- Fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) (Sigma-Aldrich)
- Fosfolipasa A1 de Thermomyces lanuginosus (Sigma-Aldrich)
- Glicerol
- Glucosa (CTR Scientific)
- Hexano (CTR Scientific)
- Hidróxido de sodio (CTR Scientific)
- Lisina (Sigma-Aldrich)
- Marcador de peso molecular (PageRuler Plus Prestained Protein Ladder, Thermo Scientific)
- Metanol (CTR Scientific)
- Monoleato de sorbitán (Tween 80) (Faga Lab)
- p-nitrofenol (Sigma-Aldrich)



- p-nitrofenil butirato (Sigma-Aldrich)
- Pepstatina A (Sigma-Aldrich)
- Persulfato de amonio (Sigma)
- Quimosina recombinante (Chy-Max M1000, Chr Hansen)
- Quimosina de bovino (renina, E.C. 3.4.23.4, Sigma-Aldrich)
- Reactivo de Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich)
- Sephadex G-100 (Sigma-Aldrich)
- Solasodina (Sigma-Aldrich)
- Sucrosa (Monterrey)
- Sulfato de amonio (CTR Scientific)
- N,N,N'.N'-tetrametiletilendiamina (Sigma-Aldrich)
- Tirosina (Sigma-Aldrich)
- Tributirina (Sigma-Aldrich)
- Trizma base (Sigma-Aldrich)
- Yodo (Fermont)
- Yoduro de potasio (Fermont)
- $\alpha$ -amilasa de Bacillus licheniformis (Sigma-Aldrich)

### **Materiales**

- Agitador magnético
- Bolsas de plástico con cierre hermético (Ziploc)
- Cajas petri desechables
- Dedal de celulosa
- Embudo de vidrio
- Espátula acanalada
- Extractor Soxhlet
- Filtros de celulosa de 0.45  $\mu\text{m}$
- Frasco de vidrio
- Gasa
- Gradillas
- Matraz aforado 10, 100, 1000 mL
- Matraz erlenmeyer 250 mL
- Matraz fondo plano 500 mL
- Micropipeta y puntillas 0 -10  $\mu\text{L}$ , 10 -100  $\mu\text{L}$ , 100 -1000  $\mu\text{L}$  (Eppendorf)
- Microplacas desechables
- Microtubos 2 mL (Axygen)
- Papel filtro (Whatman No. 1)
- Probeta de vidrio de 50 y 100 mL
- Sistema de extracción Soxhlet
- Tubos de ensayo de vidrio
- Tubos Falcon 50 mL
- Tubo refrigerante Soxhlet
- Vaso de precipitado (50, 250, 400 mL)



## Equipo

- Analizador de leche (Milktech Ultrasound Analyzers, MA250, EUA)
- Agitador Vórtex
- Balanza analítica (Ohaus, EUA)
- Baño de agua con agitación y calentamiento BS-21 (Viresa)
- Bomba de circulación de agua
- Cámara de electroforesis vertical Mini-protean II (Biorad)
- Campana de extracción
- Centrifuga Thermo IEC, Centra CL3R, EUA)
- Centrífuga 5702 R Eppendorf (EUA)
- Desionizador de agua (Thermo Centific Barnstead, modelo B8611, Dubuque Iowa, EUA)
- Espectrofómetro Perkin-Elmer, Lambda 25 (Buckinghamshire, UK)
- Incubadora (37°C)
- Microlector de placas Bio Tek Modelo ELx 808 (EUA)
- Molino de cuchillas (Thomas Wiley Fisher, modelo 3383-L19, EUA)
- Mufla (FELISA)
- Parrilla de agitación y calentamiento
- Potenciómetro (HANNA Instruments, HI4522, Rumania)
- Reómetro Anton Paar (Rheolab QC, Austria)
- Refrigerador (Torrey, CV- 14, México)
- Rotavapor (BUCHI, R-100)
- Ultracongelador SO-LOW FREEZER (Cincinnati, Ohio, EUA)



## Apéndice II. Análisis proximal.

### • **Humedad AOAC 934.01 (1998)**

1. Se colocó una cápsula de porcelana en la estufa por 24 h a 105 °C para que estuviera a peso constante.
2. Se colocó en un desecador por 10 min y se pesó. Se registró el peso como  $W_1$ .
3. Se colocaron en la cápsula de 2 a 3 g de muestra y se registró su peso como  $W_2$ .
4. Se colocó la cápsula en la estufa por 24 h.
5. Se enfrió la cápsula en un desecador y se pesó. Se registró el peso como  $W_3$ .
6. Se calculó el porcentaje de humedad por medio de la siguiente ecuación:

$$\% \text{ humedad} = \frac{W_2 - W_3}{W_2 - W_1} \times 100$$

Donde:

$W_1$  = Peso de la cápsula (g)

$W_2$  = Peso de la cápsula más la muestra (g)

$W_3$  = Peso de la cápsula más sólidos (g)

### • **Grasa AOAC 920.39 (1998)**

1. Se colocó un matraz bola fondo plano en la estufa a 105 °C por 24 h para tenerlo a peso constante.
2. Se dejó enfriar en un desecador por 10 min y posteriormente se pesó. Se registró el peso como  $W_1$ .
3. En un papel filtro se colocaron entre 2 y 3 g de muestra (polvo de bayas). El papel con la muestra se colocó dentro de un cartucho de papel filtro y éste a su vez, dentro de un extractor Soxhlet.
4. Dentro del tubo extractor se colocaron aproximadamente 100 mL de hexano recuperado.





5. Se colocó todo el sistema (extractor – refrigerante) sobre una parrilla de calentamiento y se hizo pasar agua fría por el refrigerante. La muestra se mantuvo en ebullición por 3 h.
6. Se retiró el extractor y se vació el solvente en el matraz bola.
7. El matraz bola se llevó al rotavapor a 70 °C para recuperar todo el hexano y dejar solo la grasa en él.
8. Se colocó el matraz en la estufa a 105 °C por 3 h.
9. Pasado este tiempo, se dejó enfriar el matraz dentro de un desecador por 10 min. Se registró el peso como  $W_2$ .
10. Se calculó el porcentaje de grasa por medio de la siguiente ecuación:

$$\% \text{ grasa} = \frac{W_2 - W_1}{M} \times 100$$

Donde:

$W_1$  = peso del matraz (g)

$W_2$  = peso del matraz más la grasa (g)

$M$  = peso de la muestra (g)

- **Fibra soluble e insoluble AOAC 991.43 (1995)**

1. Se pesó la muestra por triplicado. Procurar una diferencia entre duplicados no mayor a 20 mg.
2. Se adicionaron 50 mL de solución amortiguadora de fosfatos pH 6.0 a cada matraz.
3. Se adicionaron 0.10 mL de  $\alpha$ -amilasa y se agitó el matraz.
4. Se cubrió el matraz con aluminio y se colocó en baño de agua a ebullición. Se incubó el matraz por 15 min, considerando el tiempo a partir de que la temperatura interna del matraz fue 95 °C.
5. Pasados los 15 min, se dejó enfriar el matraz a temperatura ambiente.
6. Se ajustó el pH de la solución a  $7.5 \pm 0.2$  adicionando NaOH 0.275 N.



7. Se preparó una solución de proteasa (50 mg/mL) en solución amortiguadora de fosfatos. De esta solución, se adicionaron 0.1 mL al matraz.
8. Se cubrió el matraz con papel aluminio y se colocó en baño de agua a 60 °C. Se incubó por 30 min con agitación continua. El tiempo se contó a partir de que la temperatura interna del matraz fue de 60 °C.
9. Se dejó enfriar el matraz a temperatura ambiente.
10. Se ajustó el pH de la solución a un rango de 4.0 – 4.6 por adición de HCl 0.325 M.
11. Se adicionó 0.1 mL de amiloglucosidasa.
12. Se cubrió el matraz con papel aluminio y se colocó en baño de agua a 60 °C en agitación continua. Se incubó por 30 min a partir de que la temperatura interna del matraz fue de 60 °C.
13. Se adicionaron 4 volúmenes de etanol al 95% al matraz.
14. Se dejó reposar la solución toda la noche (aproximadamente 12 h) a temperatura ambiente para permitir una precipitación completa.

#### DETERMINACIÓN DE FIBRA INSOLUBLE

15. Se pesó el crisol de filtración y se registró el peso como PC (peso crisol).
16. Se mojó y distribuyó una capa de celita con etanol al 78% en un crisol de filtración. Se aplicó vacío para fijar la celita.
17. Aplicando vacío, se filtró la muestra (homogenizando previamente el precipitado y sobrenadante).
18. Una vez filtrada la muestra, se lavó el residuo dos veces con 10 mL de agua tridestilada. Dos veces con 10 mL de etanol al 95% y dos veces con 10 mL de acetona.
19. Se guardó el líquido filtrado para hacer el análisis de fibra soluble.
20. Se colocó en la estufa a 105 °C el crisol con residuo de muestra y celita por un tiempo de 10 h (toda la noche).



21. Se dejó enfriar el crisol en un desecador por 10 min. Se pesó el crisol y se registró el peso como PCR (peso crisol + celita). El peso del residuo se calculó restando a PCR el PC.
22. El residuo se utilizó para determinar proteína y cenizas.
  - a. Para proteína se siguió el procedimiento establecido por la AOAC.
  - b. Para cenizas, las muestras se mantuvieron en la mufla a 525 °C por 5 h. Se dejó enfriar en un desecador y posteriormente se pesó. Se registró el peso como CCC (crisol, celita y cenizas).

#### DETERMINACIÓN DE FIBRA SOLUBLE

23. Se colocó el líquido filtrado en un matraz y se ajustó su peso a 100 g usando agua tridestilada.
24. Se adicionaron 400 mL de etanol al 95% precalentado a 60 °C y se agitó.
25. Se dejó enfriar a temperatura ambiente y reposar por 1 hora para que precipitaran los azúcares solubles.
26. Se repitieron los pasos del 15 al 21.
27. El contenido de fibra soluble e insoluble se calculó por medio de la siguiente ecuación:

$$Fibra = \frac{\left(\frac{R1 + R2}{2} - P - A\right)}{\left(\frac{M1 + M2}{2}\right)} \times 100$$

Donde:

R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> = peso de los residuos (mg)

P = peso de proteína (mg)

A = peso de cenizas (mg)

M<sub>1</sub> y M<sub>2</sub> = peso de las muestras (mg)



- **Cenizas AOAC 942.01 (1998)**

1. Se colocaron tres crisoles en la estufa a 105 °C por 24 h para tenerlos a peso constante.
2. Se dejaron enfriar en un desecador por 10 min y se registró su peso ( $W_1$ ).
3. En cada crisol se colocaron aproximadamente 2 g de polvo de bayas y se registró su peso ( $W_2$ ).
4. En una parrilla se calentó la muestra dentro de la campana hasta completa carbonización.
5. Los crisoles se llevaron a la mufla por dos h a 550 °C.
6. Se sacaron los crisoles de la mufla y se colocaron en la estufa a 105 °C por 2 h.
7. Se sacaron de la estufa todos los crisoles y se dejaron enfriar en un desecador por 10 min. Se pesaron y se registró el peso como ( $W_3$ )
8. Se calculó el porcentaje de cenizas por medio de la siguiente ecuación:

$$\% \text{ cenizas} = \frac{W_3 - W_1}{W_2 - W_1} \times 100$$

Donde:

$W_1$  = peso del crisol (g)

$W_2$  = peso del crisol más la muestra (g)

$W_3$  = peso del crisol más cenizas (g)

El residuo de determinación de fibra se colocó en la mufla a 525 °C por 5 h.

- **Proteína AOAC 960.52 (1998)**

Digestión de la muestra:

1. Se pesó de 0.15 a 0.20 g de muestra y se colocó en un matraz Microkjeldahl.
2. Se añadieron 0.6 g de mezcla reactiva de selenio, se mezcló con la muestra y se adicionaron 2 mL de ácido sulfúrico concentrado.
3. Se colocó el matraz en la parrilla de digestión dentro de la campana de extracción.



4. Se calentó por cinco min y después a mayor temperatura por 30 min aproximadamente, hasta que la solución se aclaró por completo.
5. Se enfrió la muestra dentro de la campana.

Destilación:

6. En un vaso de precipitados de 50 mL se colocaron 5 mL de ácido bórico al 4% y tres gotas de indicador mixto. El vaso se colocó en la unidad de destilación procurando que el tubo condensación quedara sumergido en el ácido bórico.
7. Se adicionó una pequeña cantidad de agua a la muestra digerida, se disolvió agitando constantemente y se vació en el destilador.
8. Se enjuagó el matraz dos veces más con muy poca agua tridestilada y se vertieron los enjuagues en el destilador.
9. Con la llave cerrada, se depositaron 10 mL de NaOH al 40% y se dejó caer gota a gota.
10. Se cerraron todas las llaves del destilador y se encendió el equipo. Se mantuvo el flujo de agua del refrigerante durante todo el tiempo de destilación hasta que se alcanzó un volumen de 40 mL en el vaso de recuperación.
11. Se retiró el vaso con el destilado y se apagó el destilador. Se eliminó la muestra por sifoneo.

Titulación:

12. El destilado se tituló con una solución valorada de HCl 0.1193 N.
13. Se calculó el porcentaje de nitrógeno y porcentaje de proteína por medio de las siguientes ecuaciones:

$$\% \text{ Nitrógeno} = \frac{V \times N \times meq}{M} \times 100 \text{ Ec. X}$$

$$\% \text{ Proteína} = \% \text{ nitrógeno} \times F \text{ Ec. X}$$

Donde:

V = Volumen de HCl gastado en la titulación (mL)



$N$  = Normalidad de HCl

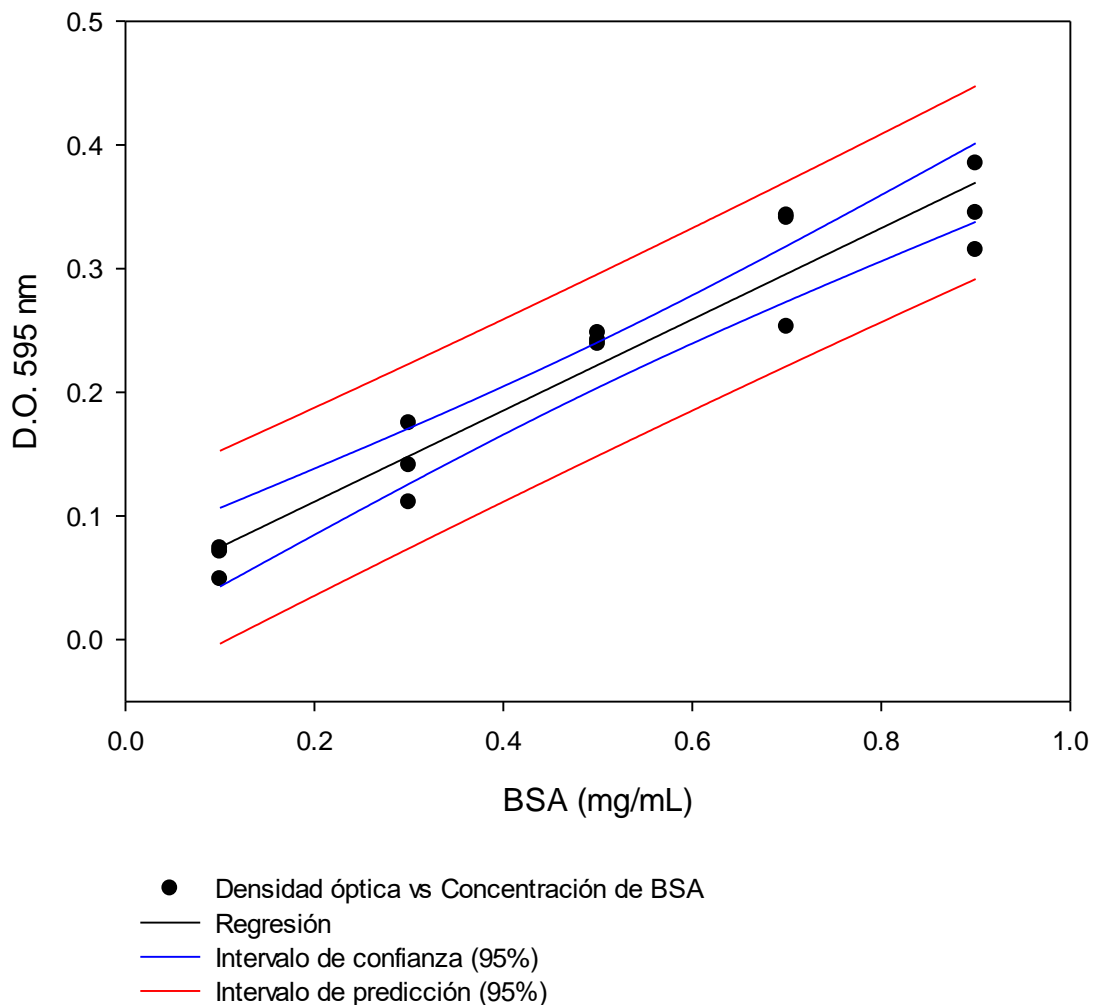
$Meq$  = peso miliequivalente del nitrógeno (0.014)

$M$  = peso de la muestra (g)

$F$  = factor de conversión a proteínas (6.25)

### Apéndice III. Curva de calibración para cuantificación de proteína.

La curva se construyó con estándares de suero de albúmina bovina (BSA; Sigma-Aldrich) y se midió en un microlector de placas BioTek, Elx808 a 595 nm (Bradford, 1976).

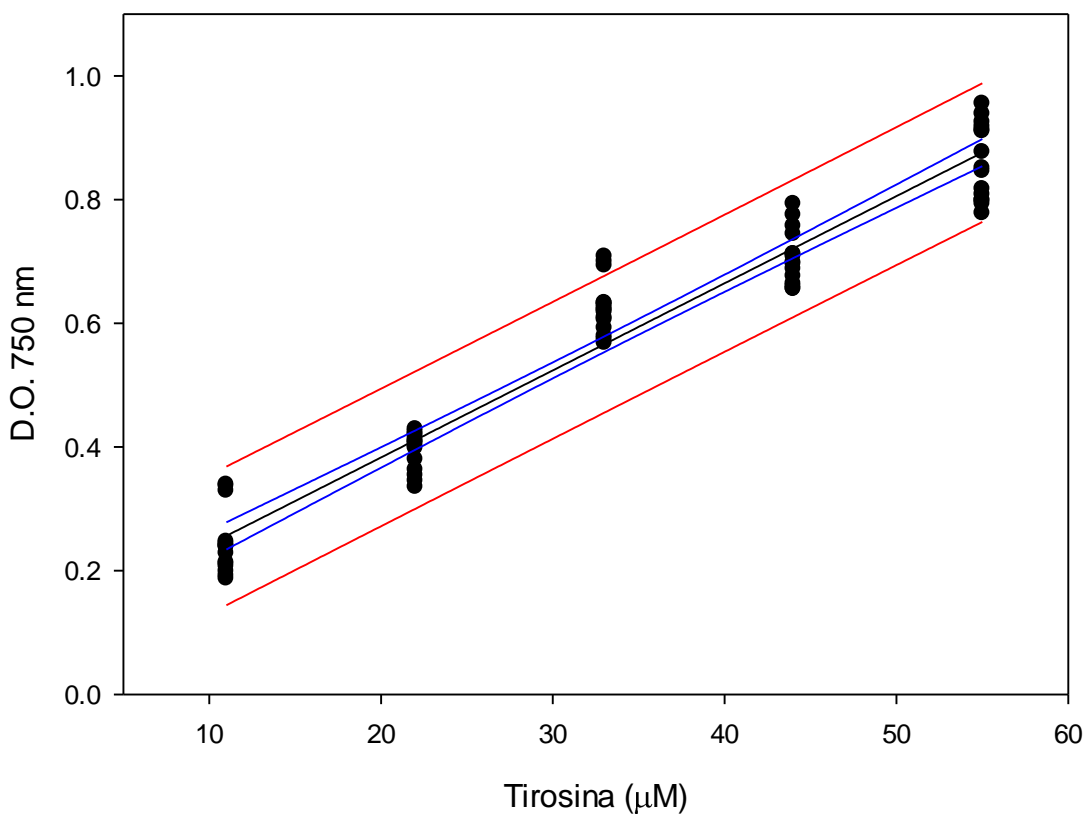


$$y = 0.3687x + 0.0378$$

$$R^2 = 0.9204$$

#### Apéndice IV. Curva de calibración de tirosina (cálculo de actividad proteolítica).

La curva se construyó con estándares de tirosina (Sigma-Aldrich) y se midió en un microlector de placas Bio Tek, Elx808 a 750 nm.



- Densidad óptica vs concentración de tirosina
- Regresión
- Intervalo de confianza (95%)
- Intervalo de predicción (95%)

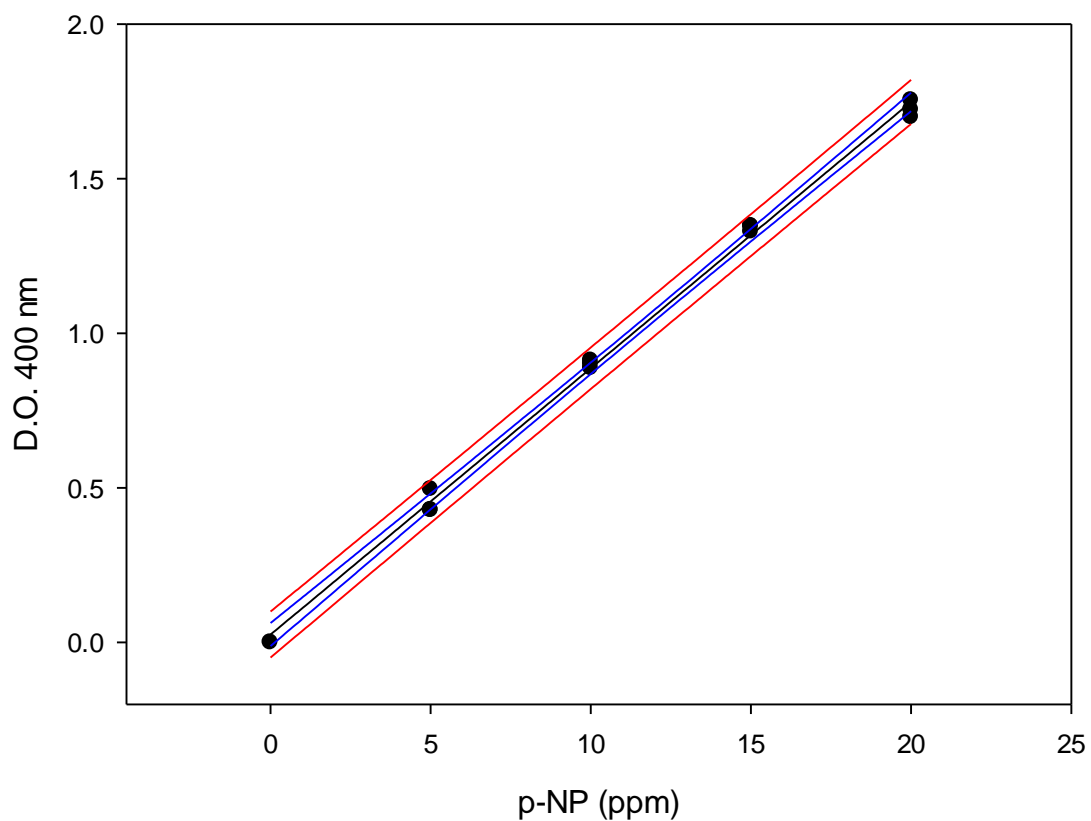
$$y = 0.0141x + 0.1014$$

$$R^2 = 0.9419$$



### Apéndice V. Curva de calibración de para-nitrofenol.

La curva se construyó con estándares de p-NP (Sigma-Aldrich) y se midió en un espectrofotómetro Lambda 25 (Perkin-Elmer) a 400 nm.



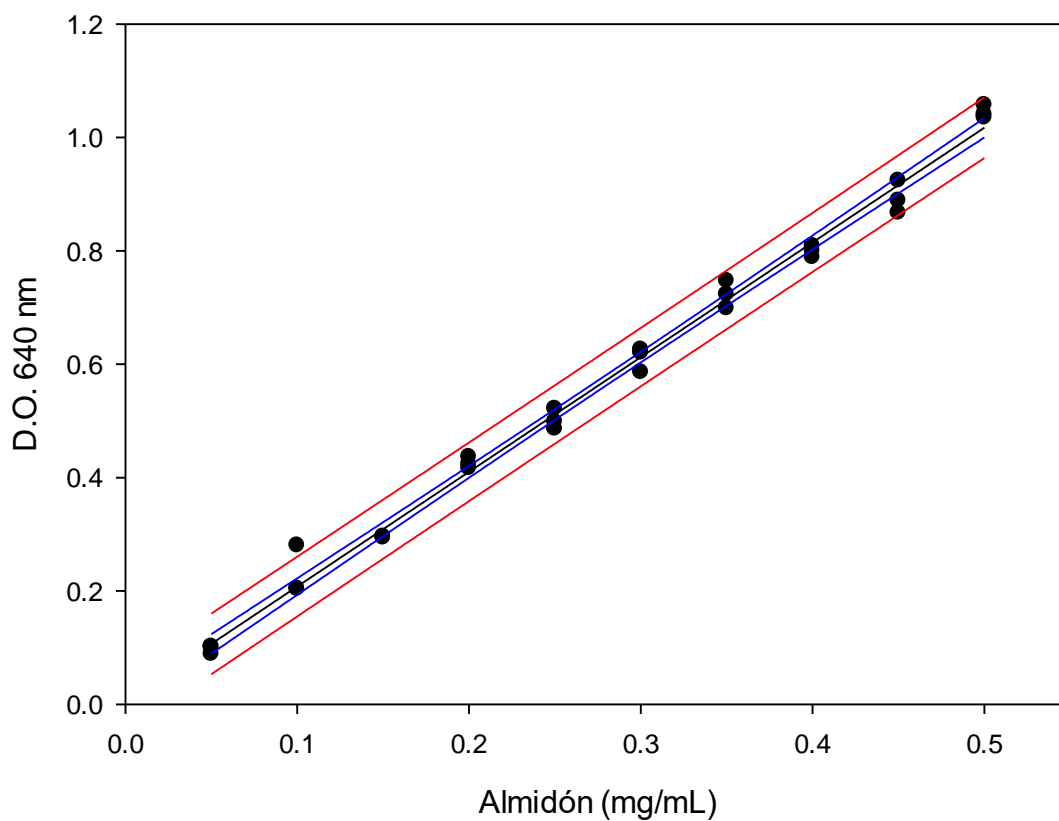
- Densidad óptica vs p-nitrofenol
- Regresión
- Intervalo de confianza (95%)
- Intervalo de predicción (95%)

$$y = 0.0861x + 0.0255$$

$$R^2 = 0.9975$$

### Apéndice VI. Curva de calibración de almidón.

La curva se construyó con estándares de almidón (CTR Scientific) y se midió en un espectrofotómetro Lambda 25 (Perkin-Elmer) a 640nm.



- Densidad óptica vs concentración de almidón
- Regresión
- Intervalo de confianza (95%)
- Intervalo de predicción (95%)

$$y = 2.0236x + 0.0053$$

$$R^2 = 0.9933$$



## Apéndice VII. Protocolo SDS-PAGE.

### Reactivos sistema Laemmli

- Bis/acrilamida (30% T, 2.67% C)  
29.2 g acrilamida  
0.8 g N,N'-metilbenbisacrilamida  
Aforar a 100 mL con agua desionizada. Filtrar y almacenar a 4°C en lugar oscuro.
- Tris-HCl 1.5 M, pH 8.8  
18.5 g Tris base (18.15g /100 mL)  
~80 mL de agua destilada  
Ajustar a pH 8.8 con HCl 6N. Llevar a 100 mL con agua destilada y almacenar a 4°C.
- Tris-HCl 0.5 M, pH 6.8  
6 g Tris base  
~60 mL de agua destilada  
Ajustar pH 6.8 con HCl 6N. Aforar a 100 mL con agua destilada y almacenar a 4°C.
- Sodio dodecil sulfato (SDS 10%)  
Disolver 10 g de en 90 mL de agua destilada, agite cuidadosamente y afore a 100 mL con agua destilada.
- Persulfato de amonio (PSA 10%)  
0.1g de PA, se mezcló con 1 mL de agua destilada. Preparar reactivo diariamente.
- Azul de Coomassie  
2.5g azul brillante  
300mL metanol  
600 mL agua destilada  
100mL ácido acético
  - Solución reveladora  
600 mL agua destilada  
300 mL metanol  
100 mL ácido acético



- Solución amortiguadora de muestra

3.8 mL agua destilada

1.6 mL SDS al 10%

1.0 mL 0.5M Tris-HCl (pH 6.8)

0.8 mL glicerol

0.4 mL azul de bromofenol al 1%.

Almacenar a temperatura ambiente.

Antes de mezclar con la muestra se debe agregar 2-mercaptoetanol (50 $\mu$ L de 2-mercaptoetanol por 950  $\mu$ L de solución amortiguadora). Esta mezcla debe usarse el día de preparación y, por lo tanto, preparar nuevamente en cada corrida de electroforesis.

- Solución amortiguadora de corrida 5x

15 g tris base

72 g glicina (72 g / L)

5 g SDS (5 g/ L)

Llevar hasta 1000 mL con agua destilada. Almacenar a 4°C.

Para dos geles en la cámara, diluir 140 mL 5X con 560 mL de agua destilada. Se recomienda hacer esta dilución como mínimo una hora antes y conservar en refrigeración para que esté fría al momento de iniciar la corrida del gel.

### Preparación de geles

Primero se mezclan los reactivos para el gel separador. En un tubo limpio se mezclan todos los reactivos en orden de aparición en la Tabla 9. Una vez hecha la mezcla, ésta se agita suavemente para homogenizar. Se depositan 4.5 mL del gel separador en la abertura formada entre ambas placas de vidrios (o la cantidad necesaria que llene el nivel hasta 1 cm del peine separador, medir previamente), cuidando no formar burbujas. Se coloca un sello de agua destilada depositándola lentamente con una micropipeta. Se deja reposar el gel para completar la polimerización (aproximadamente 30 min). Con cuidado y utilizando papel absorbente, se retira el sello de agua para proceder a depositar la mezcla del gel concentrador. El gel concentrador se prepara igualmente en un tubo limpio mezclando los reactivos en el orden de aparición de la Tabla 9. Se depositan 2 mL de la mezcla de gel concentrador



(o la cantidad necesaria para llegar al borde del vidrio) y se coloca el peine para formar los pocillos. De igual manera debe evitarse la formación de burbujas.

Tabla 9. Formulación para geles SDS-PAGE:

Solución	Gel separador 12%	Gel concentrador 5%
Agua desionizada	3.57 mL	3 mL
Bis/acrilamida	4.2 mL	0.9 mL
Tris-HCl 1.5 M, pH 8.8	2.625 mL	-
Tris-HCl 1.5 M, pH 6.8	-	1.35 mL
SDS 10%	105 $\mu$ L	52.5 $\mu$ L
PSA 10%	25.2 $\mu$ L	26.25 $\mu$ L
Temed*	5.25 $\mu$ L	5.25 $\mu$ L
Volumen total	10.5 mL	5.3 mL

\*Temed: N,N,N'.N'- tetrametiletilendiamina.

#### Armado de la cámara y corrida de geles

- Las placas de vidrio con los geles se colocan dentro del soporte de la cámara.
- En el espacio formado entre los dos geles se deposita la solución amortiguadora de corrida, previamente diluida y mantenida en refrigeración.
- A continuación, se retiran los peines y se depositan las muestras y el marcador de peso molecular en los pocillos asignados.
- En caso de no completar los 10 pocillos con las muestras, se debe inyectar en los pocillos sin muestra un volumen de solución amortiguadora de muestra, de manera que no queden pocillos vacíos.
- Una vez llenos los pocillos, se coloca la tapa de la cámara y se conecta a la fuente de poder.
- En caso de ser necesario, la cámara se mete a un refrigerador para evitar que se sobrecaliente.
- Se conecta la fuente de poder a la corriente eléctrica y se ajusta el voltaje a utilizar.



- Es importante vigilar la cámara durante todo el procedimiento para ver que el frente de color marcado por la solución amortiguadora de muestra avance de manera satisfactoria. Cuando el frente de color está a uno o dos milímetros del borde, se apaga la cámara y se desconecta de la fuente de poder.
- Se retira la tapa de la cámara y se saca el soporte que contiene los geles. Con mucho cuidado utilizando una espátula de plástico se abren los vidrios para liberar los geles y proceder a su tinción.
- La solución amortiguadora de corrida puede reutilizarse una vez más siempre y cuando se mantenga en refrigeración y se esté seguro de que ninguna de las muestras contaminó la solución.

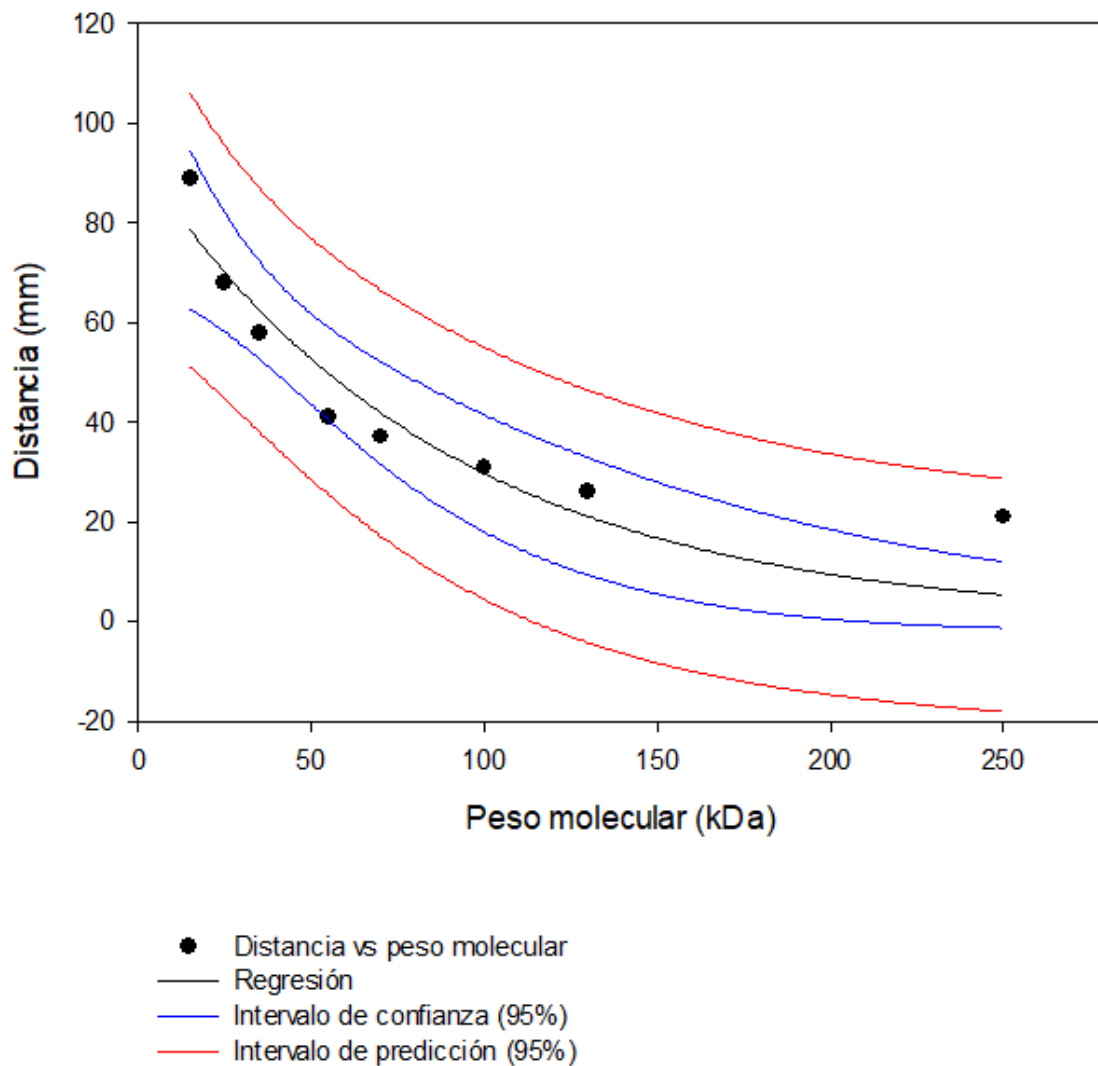
#### Tinción y revelado de geles

El gel se coloca en un contenedor de plástico con suficiente solución de azul de Comassie que lo cubra por completo. El gel se deja en agitación leve por 30 min. El gel se revela sumergiendo el gel en una solución de ácido acético:metanol:agua (1:3:6) en agitación leve por intervalos de 15 min hasta que quede un gel cristalino que muestre las bandas de proteína en color azul.

### Apéndice VIII. Curvas de calibración para cálculo de peso molecular en SDS-PAGE.

Marcador de peso molecular PageRuler Plus Prestained Protein Ladder, Thermo Scientific.

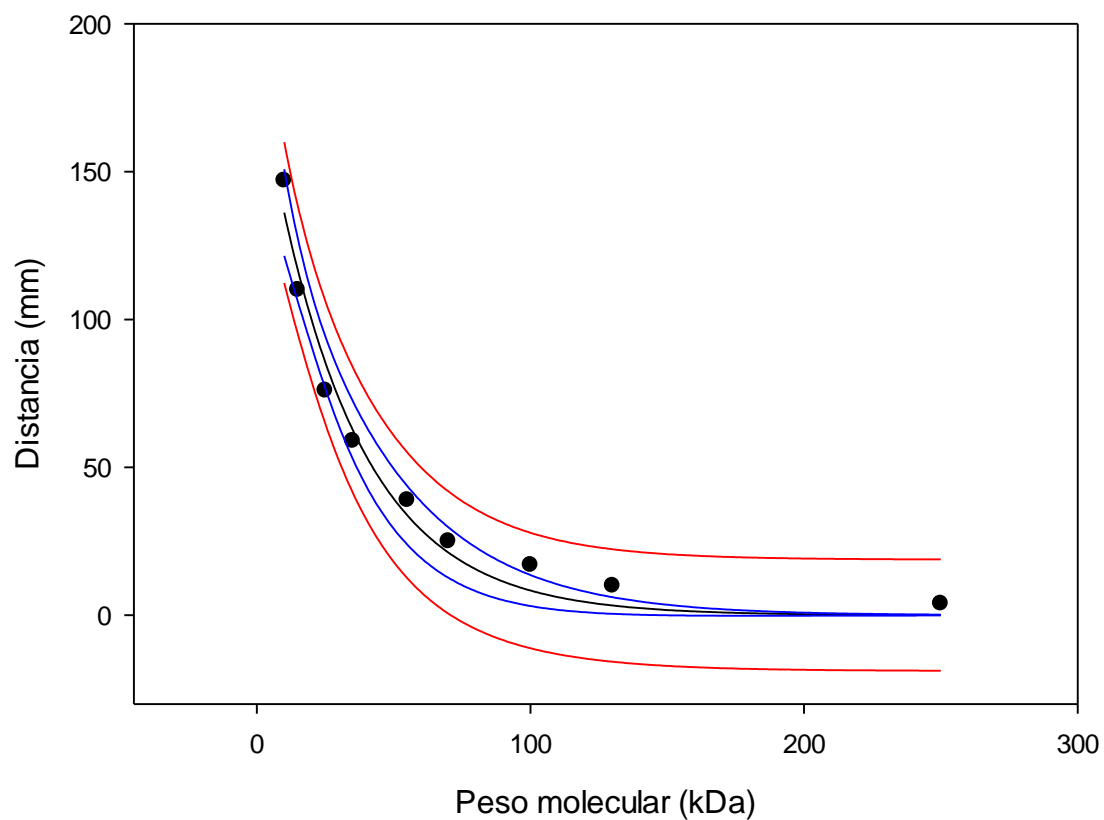
- Gel SDS-PAGE del extracto crudo. Figura 5.



$$y = 374.19x^{-0.537}$$

$$R^2 = 0.9897$$

- Gel SDS-PAGE de la fracción de proteasas. Figura 6a.



- Distancia vs peso molecular
- Regresión
- Intervalo de confianza (95%)
- Intervalo de predicción (95%)

$$y=2493.7x^{-1.11}$$

$$R^2 = 0.9634$$





## Apéndice IX. Saturación de sulfato de amonio considerando la solubilidad a 0°C.

Tomado de Protein purification methods. E.L.V. Harris. (1994). Cap. 3 Concentration of the extract. En E.L.V. Harris y S. Angal (Ed.). Protein purification methods a practical approach. P. 155. New York, EUA.: Oxford University Press.

*Concentración final de sulfato de amonio, % de concentración a 0 °C.*

	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100
<i>Concentración inicial de sulfato de amonio</i>																	
<i>gramos de sulfato de amonio sólido a añadir por cada 100 mL de solución</i>																	
0	10.7	13.6	16.6	19.7	22.9	26.2	29.5	33.1	36.6	40.4	44.2	48.3	52.3	56.7	61.1	65.9	70.7
5	8.0	10.9	13.9	16.8	20.0	23.2	26.6	30.0	33.6	37.3	41.1	45.0	49.1	53.3	57.8	62.4	67.1
10	5.4	8.2	11.1	14.1	17.1	20.3	23.6	27.0	30.5	34.2	37.9	41.8	45.8	50	54.4	58.9	63.6
15	2.6	5.5	8.3	11.3	14.3	17.4	20.7	24.0	27.5	31.0	34.8	38.6	42.6	46.6	51.0	55.5	60.0
20	0	2.7	5.6	8.4	11.5	14.5	17.7	21.0	24.4	28.0	31.6	35.4	39.2	43.3	47.6	51.9	56.5
25		0	2.7	5.7	8.5	11.7	14.8	18.2	21.4	24.8	28.4	32.1	36.0	40.1	44.2	48.5	52.9
30			0	2.8	5.7	8.7	11.9	15.0	18.4	21.7	25.3	28.9	32.8	36.7	40.8	45.1	49.5
35				0	2.8	5.8	8.8	12.0	15.3	18.7	22.1	25.8	29.5	33.4	37.4	41.6	45.9
40					0	2.9	5.9	9.0	12.2	15.5	19.0	22.5	26.2	30	34.0	38.1	42.4
45						0	2.9	6.0	9.1	12.5	15.8	19.3	22.9	26.7	30.6	34.7	38.8
50							0	3.0	6.1	9.3	12.7	16.1	19.7	23.3	27.2	31.2	35.3
55								0	3.0	6.2	9.4	12.9	16.3	20	23.8	27.7	31.7
60									0	3.1	6.3	9.6	13.1	16.6	20.4	24.2	28.3
65										0	3.1	6.4	9.8	13.4	17.0	20.8	24.7
70											0	3.2	6.6	10	13.6	17.3	21.2
75												0	3.2	6.7	10.2	13.9	17.6
80													0	3.3	6.8	10.4	14.1
85														0	3.4	6.9	10.6
90															0	3.4	7.1
95																0	3.5
100																	0



## **Apéndice X. Solvente de proteína.**

(Nájera-Domínguez, 2013).

Formulación para preparar 100 mL de solvente de proteína.

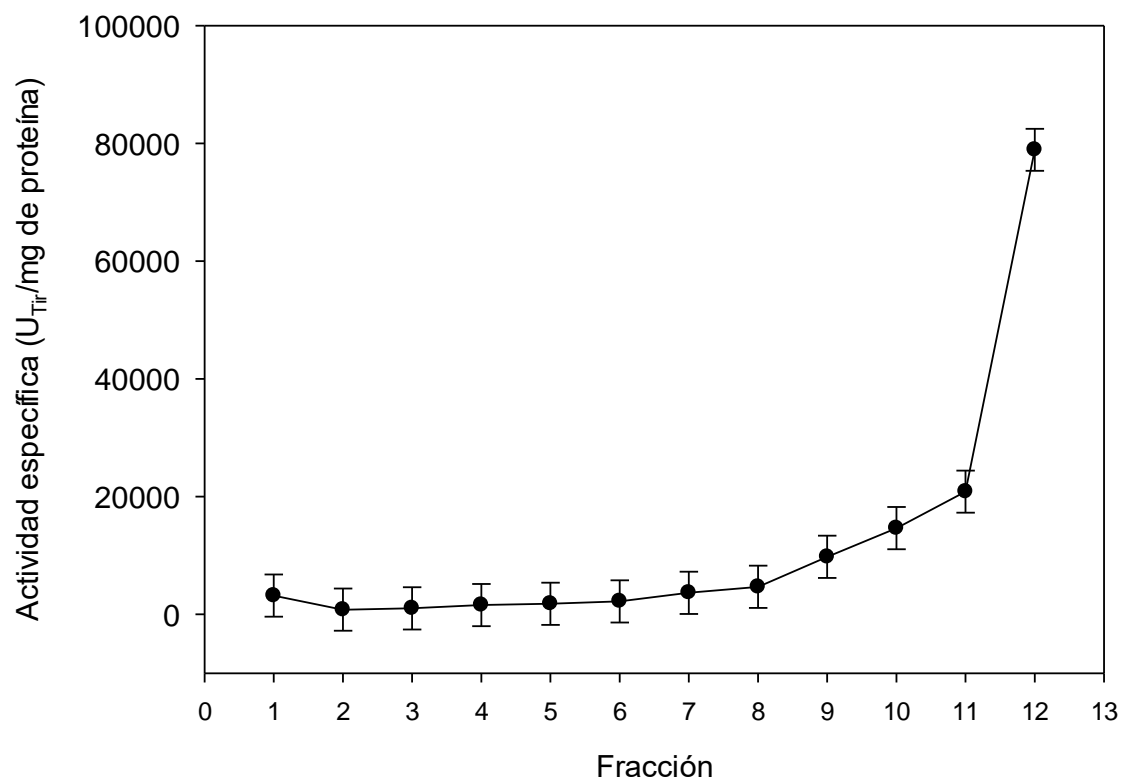
- Depositar en un matraz aforado 2.01 g de tris(hidroximetil)aminometano y 0.037 g de EDTA.
- Llenar el matraz casi hasta el comienzo del cuello, con agua destilada y homogenizar.
- Tomar el pH de la solución y ajustar a 8.0 con HCl 1N.
- Agregar 2 g de dodecilsulfato sódico (SDS) y 78.13 $\mu$ L de mercaptoetanol.
- Aforar hasta la marca del matraz con agua destilada y homogenizar.
- Almacenar en refrigeración protegido de la luz.

### Apéndice XI. Caracterización de las fracciones de elusión en Sephadex G-100.

Tabla 10. Cuantificación de actividad específica en las fracciones de purificación de la trompillina.

Solución enzimática	Proteína (mg/mL)	Actividad proteolítica (U <sub>Tir</sub> /mL)	Actividad específica (U <sub>Tir</sub> / mg proteína)
Extracto crudo	16.95 ± 0.88 <sup>b</sup>	3.19 ± 0.06 <sup>a</sup>	188.90 ± 12.91 <sup>e</sup>
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> – 50%	23.63 ± 0.82 <sup>a</sup>	3.16 ± 0.05 <sup>a</sup>	133.93 ± 5.47 <sup>e</sup>
F1	0.828 ± 0.03 <sup>efgh</sup>	2637.1 ± 79.9 <sup>cde</sup>	3190 ± 186 <sup>de</sup>
F2	3.081 ± 0.04 <sup>c</sup>	2470.0 ± 54.3 <sup>e</sup>	801.9 ± 23.30 <sup>e</sup>
F3	2.528 ± 0.10 <sup>cd</sup>	2585.8 ± 40.9 <sup>cde</sup>	1023.9 ± 48.10 <sup>e</sup>
F4	1.729 ± 0.10 <sup>de</sup>	2733.8 ± 95.6 <sup>bc</sup>	1582.60 ± 41 <sup>de</sup>
F5	1.511 ± 0.09 <sup>ef</sup>	2713.3 ± 42.7 <sup>bcd</sup>	1798.20 ± 75.20 <sup>de</sup>
F6	1.158 ± 0.04 <sup>efg</sup>	2549.1 ± 62.5 <sup>de</sup>	2204.20 ± 114.90 <sup>de</sup>
F7	0.751 ± 0.14 <sup>fgh</sup>	2676.7 ± 35.5 <sup>cd</sup>	3662 ± 774 <sup>de</sup>
F8	0.587 ± 0.10 <sup>fgh</sup>	2686.9 ± 41.6 <sup>cd</sup>	4675 ± 892 <sup>de</sup>
F9	0.267 ± 0.03 <sup>gh</sup>	2584.3 ± 51 <sup>cde</sup>	9766 ± 1142 <sup>cd</sup>
F10	0.191 ± 0.04 <sup>gh</sup>	2742.6 ± 49 <sup>bc</sup>	14649 ± 2565 <sup>bc</sup>
F11	0.128 ± 0.04 <sup>h</sup>	2549.1 ± 35.5 <sup>de</sup>	20847 ± 5010 <sup>b</sup>
F12	0.037 ± 0.004 <sup>h</sup>	2873.1 ± 105.6 <sup>b</sup>	78902 ± 8724 <sup>a</sup>

F1-F12: fracciones obtenidas por cromatografía de exclusión de tamaño. Valor promedio ± desviación estándar; n=3. a-h medias seguidas por diferente letra en la misma columna indican diferencia estadísticamente significativa (ANOVA, Tukey-Kramer, p < 0.05).



**Figura 12.** Perfil de elución del extracto crudo de trompillo en la columna de Sephadex G-100. La columna se preequilibró y eluyó con solución amortiguadora de acetato de sodio 50 mM, pH 5. Se graficó el promedio de la medición de actividad proteolítica (n=3) con barras de error estándar de las fracciones obtenidas.

## Apéndice XII. Composición de la leche comercial utilizada en el proyecto.

Analizada en Milktech Ultrasound Analyzers, modelo MA250, EE.UU.

%Total de Agua = 100 – (%Grasa + %Sólidos no grasos + %Proteína + %Lactosa + %Sólidos)

Tabla 11. Composición de la leche utilizada en las pruebas de coagulación

Parámetro	n1	n2	n3	n4	Promedio ± DE
Temp (°C)	24.4	25	25	25	24.85 ± 0.300
Densidad	24.86	24.89	24.96	24.89	24.9 ± 0.042
Grasa (%)	2.99	3.06	3.09	3.06	3.05 ± 0.042
Sólidos no grasos (%)	7.15	7.17	7.19	7.19	7.18 ± 0.019
Proteína (%)	2.66	2.67	2.68	2.67	2.67 ± 0.008
Lactosa (%)	3.79	3.8	3.81	3.81	3.80 ± 0.010
Sólidos (%)	0.68	0.68	0.68	0.69	0.68 ± 0.005
Agua adicionada (%)	15.19	15	14.61	15.00	14.95 ± 0.244
Punto de congelación (°C)	-0.45	-0.45	-0.44	-0.45	-0.448 ± 0.005
% Total de agua					82.62

Tabla 12. Composición de la leche utilizada en las pruebas de sinéresis

	n1	n2	n3	Promedio ± desviación estándar
Temp (°C)	36.10	36	36	36.03 ± 0.058
Densidad	25.25	25.7	24.9	25.28 ± 0.401
Grasa (%)	3.30	3.28	3.30	3.29 ± 0.012
Sólidos no grasos (%)	7.29	7.27	7.30	7.29 ± 0.015
Proteína (%)	2.71	2.70	2.70	2.70 ± 0.006
Lactosa (%)	3.86	3.85	3.90	3.87 ± 0.026
Sólidos (%)	0.69	0.69	0.69	0.69 ± 0.0
Agua adicionada (%)	13.07	12.87	13.40	13.11 ± 0.268
Punto de congelación (°C)	-0.452	-0.45	-0.453	-0.45 ± 0.002
% Total de agua				82.16

### Apéndice XIII. Datos de la prueba de sinéresis.

Tabla 13. Datos de sinéresis y capacidad de retención de agua de los geles

Coagulante	Masa del tubo (g)	Masa del tubo + gel + suero (g)	Masa del tubo + gel (g)	Masa del suero (g)	Masa del gel (g)	Masa del suero + gel (g)	% sinéresis	CRA (%)	Volumen de suero (mL)	Volumen de gel (mL)	Densidad (g/mL)
Qr	13.124	49.140	47.745	1.395	34.621	36.016	3.873	96.127	1.30	33.70	1.073
Qr	12.965	49.636	47.918	1.718	34.953	36.671	4.684	95.316	1.60	33.40	1.074
Qr	14.228	50.198	48.404	1.794	34.176	35.970	4.988	95.012	1.75	33.25	1.025
Qb	13.397	50.574	48.944	1.630	35.548	37.178	4.384	95.616	1.80	33.20	0.906
Qb	13.406	50.211	48.620	1.591	35.214	36.805	4.323	95.677	1.60	33.40	0.994
Qb	13.443	51.702	49.873	1.830	36.430	38.259	4.782	95.218	1.73	33.27	1.058
EC	13.028	49.134	37.754	11.381	24.726	36.106	31.520	68.480	12.30	22.70	0.925
EC	13.105	48.561	38.217	10.344	25.112	35.456	29.175	70.825	11.50	23.50	0.900
EC	12.965	49.468	37.584	11.884	24.619	36.503	32.556	67.444	12.50	22.50	0.951
M	14.445	51.364	50.152	1.212	35.706	36.919	3.283	96.717	1.40	33.60	0.866
M	13.539	50.557	49.434	1.123	35.896	37.018	3.032	96.968	1.25	33.75	0.898
M	14.505	49.627	48.245	1.381	33.740	35.121	3.932	96.068	1.40	33.60	0.987

Qr, quimosina recombinante; Qb, quimosina de bovino; EC, extracto crudo de trompillo; M, mezcla de coagulantes (quimosina recombinante + extracto crudo de trompillo). CRA, capacidad de retención de agua.



### Apéndice XIV. Análisis de varianza (ANOVA) y análisis múltiple de medias (Tukey-Kramer).

DF. Grados de libertad; Adj. Ajuste; SS. Suma de cuadrados; MS. Media de cuadrados; Fvalue. Valor F (diferencia entre medias- F de Fisher); P-value. Valor P (de probabilidad); S. Estándar (de desviación estándar); R sq; Valor de R<sup>2</sup>; R sq (adj). Valor de R<sup>2</sup> ajustado; R sq (pred). Valor de R<sup>2</sup> predicho; N. Número de muestras; A-D. Letras de agrupación. Todos por sus siglas en inglés.

### Cantidad de proteína durante la purificación de la trompillina (Apéndice XI)

#### *Proteína vs Fracción obtenida por filtración en gel*

Análisis de varianza

Fuente	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Fracciones	13	1998.89	153.760	1437.31	0.000
Error	28	3.00	0.107		
Total	41	2001.88			

Resumen del modelo

S	R-sq	R-sq (adj)	R-sq (pred)
0.327074	99.85%	99.78%	99.66%

Análisis múltiple de medias Tukey-Kramer (Nivel de confianza del 95%)

Fracciones	N	Media	Agrupación
(NH42SO4-50%	3	23.629	A
EC	3	16.948	B
Fracción 2	3	3.0807	C
Fracción 3	3	2.5283	C D
Fracción 4	3	1.7291	D E
Fracción 5	3	1.5113	E F
Fracción 6	3	1.1578	E F G
Fracción 1	3	0.8278	E F G H
Fracción 7	3	0.7509	F G H
Fracción 8	3	0.5873	F G H
Fracción 9	3	0.2672	G H
Fracción 10	3	0.1913	G H
Fracción 11	3	0.1280	H
Fracción 12	3	0.03671	H

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

**Actividad proteolítica vs Fracción obtenida por filtración en gel**

Análisis de varianza

Fuente	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
C1	13	1832506	140962	37.13	0.000
Error	28	106304	3797		
Total	41	1938810			

Resumen del modelo

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
61.6163	94.52%	91.97%	87.66%

Análisis múltiple de medias Tukey-Kramer (Nivel de confianza del 95%)

C1	N	Media	Agrupación
EC	3	3194.1	A
EC50	3	3161.8	A
12	3	2873.1	B
10	3	2742.6	B C
4	3	2733.8	B C
5	3	2713.3	B C D
8	3	2686.9	C D
7	3	2676.7	C D
1	3	2637.1	C D E
3	3	2585.8	C D E
9	3	2584.3	C D E
11	3	2549.1	D E
6	3	2549.1	D E
2	3	2470.0	E

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

**Actividad proteolítica específica vs Fracción obtenida por filtración en gel**

Análisis de varianza

Fuente	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
C1	13	16675711388	1282747030	162.46	0.000
Error	28	221083233	7895830		
Total	41	16896794622			

Resumen del modelo

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
2809.95	98.69%	98.08%	97.06%

Análisis múltiple de medias Tukey-Kramer (Nivel de confianza del 95%)

C1	N	Media	Agrupación
12	3	78902	A
11	3	20847	B
10	3	14649	B C
9	3	9766	C D
8	3	4675	D E
7	3	3662	D E
1	3	3190	D E
6	3	2204.2	D E
5	3	1798.2	D E
4	3	1582.6	D E
3	3	1023.9	E
2	3	801.9	E
EC	3	188.90	E
EC50	3	133.93	E





*Proteína, actividad proteolítica y actividad proteolítica específica del esquema de purificación de la trompillina (Tabla 4)*

### PROTEÍNA

#### Análisis de varianza

Fuente	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
C4	2	887.219	443.609	929.01	0.000
Error	6	2.865	0.478		
Total	8	890.084			

#### Resumen del modelo

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
0.691017	99.68%	99.57%	99.28%

#### Análisis múltiple de medias Tukey-Kramer (Nivel de confianza del 95%)

Muestra	N	Mean	Grouping
EC50	3	23.629	A
EC	3	16.948	B
12	3	0.03671	C

### ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA

#### Análisis de varianza

Fuente	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
C4	2	187451	93726	15.60	0.004
Error	6	36053	6009		
Total	8	223505			

#### Resumen del modelo

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
77.5171	83.87%	78.49%	63.71%

#### Análisis múltiple de medias Tukey-Kramer (Nivel de confianza del 95%)

Fuente	N	Mean	Grouping
EC	3	3194.1	A
EC50	3	3161.8	A
12	3	2873.1	B

### ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA ESPECÍFICA

#### Análisis de varianza

Fuente	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
C4	2	12400215848	6200107924	244.39	0.000
Error	6	152219321	25369887		
Total	8	12552435169			

#### Resumen del modelo

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
5036.85	98.79%	98.38%	97.27%

#### Análisis múltiple de medias Tukey-Kramer (Nivel de confianza del 95%)

Trompillo	N	Mean	Grouping
12	3	78902	A
EC	3	188.90	B
EC50	3	133.93	B

**Actividad proteolítica específica de la trompillina a diferentes condiciones de temperatura (Figura 8)**

Análisis de varianza

Fuente	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Temperatura	7	313.00	44.714	19.95	0.000
Error	40	89.65	2.241		
Total	47	402.64			

Resumen del modelo

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
1.49705	77.74%	73.84%	67.94%

Análisis múltiple de medias Tukey-Kramer (Nivel de confianza del 95%)

Temperatura	N	Media	Agrupación
30	6	31.421	A
90	6	27.875	B
80	6	27.717	B
40	6	26.905	B
25	6	26.727	B C
70	6	25.558	B C
50	6	23.993	C D
60	6	22.349	D

**Actividad proteolítica específica de la trompillina a diferentes condiciones de pH (Figura 7)**

Análisis de varianza

Fuente	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
pH	4	1295.24	323.810	1026.59	0.000
Error	10	3.15	0.315		
Total	14	1298.39			

Resumen del modelo

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
0.561627	99.76%	99.66%	99.45%

Análisis múltiple de medias Tukey-Kramer (Nivel de confianza del 95%)

pH	N	Media	Agrupación
9	3	49.762	A
7	3	43.978	B
8	3	33.679	C
5	3	28.925	D
6	3	24.884	E

**Actividad proteolítica específica de la trompillina en presencia de inhibidores (Tabla 5)**  
**ACTIVIDAD RESIDUAL (%)**

Análisis de varianza

Fuente	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
inh	3	878.70	292.899	78.18	0.000
Error	8	29.97	3.746		
Total	11	908.67			

Resumen del modelo

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
1.93552	96.70%	95.46%	92.58%

Análisis múltiple de medias Tukey-Kramer (Nivel de confianza del 95%)

inhibidor	N	Mean	Grouping
EDTA	3	79.33	A
PMSF	3	69.93	B



E64	3	65.89	B
Pepstatina A	3	55.479	C

### PORCENTAJE DE INHIBICIÓN (%)

Análisis de varianza

Fuente	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
inh	3	878.70	292.899	78.18	0.000
Error	8	29.97	3.746		
Total	11	908.67			

Resumen del modelo

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
1.93552	96.70%	95.46%	92.58%

Análisis múltiple de medias Tukey-Kramer (Nivel de confianza del 95%)

inhibidor	N	Mean	Grouping
Pepstatina A	3	44.521	A
E64	3	34.11	B
PMSF	3	30.07	B
EDTA	3	20.67	C

### Comportamiento reológico de la leche coagulada con diferentes proteasas (Tabla 6)

#### VISCOSIDAD INICIAL $\eta_0$

Análisis de varianza

Fuente	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
enzyme	3	1.2802	0.42672	4.97	0.027
Error	9	0.7732	0.08591		
Total	12	2.0534			

Resumen del modelo

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
0.293112	62.34%	49.79%	19.02%

Análisis múltiple de medias Tukey-Kramer (Nivel de confianza del 95%)

enzyme	N	Mean	Grouping
Mixture	4	1.86383	A
trompillin	3	1.78667	A
Recombinant	3	1.23133	A
Calf stomach	3	1.17833	A

#### VISCOSIDAD MÁXIMA $\eta_s$

Análisis de varianza

Fuente	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
enzyme	3	43.891	14.6303	45.65	0.000
Error	9	2.885	0.3205		
Total	12	46.775			

Resumen del modelo

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
0.566128	93.83%	91.78%	86.83%

Análisis múltiple de medias Tukey-Kramer (Nivel de confianza del 95%)

enzyme	N	Mean	Grouping
Mixture	4	11.9961	A
Recombinant	3	10.1713	B
Calf stomach	3	9.1317	B
trompillin	3	7.0397	C

**INCREMENTO EN LA VISCOSIDAD  $\Delta\eta$** 

Análisis de varianza

Fuente	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
enzyme	3	42.807	14.2689	50.84	0.000
Error	9	2.526	0.2806		
Total	12	45.332			

Resumen del modelo

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
0.529759	94.43%	92.57%	88.85%

Análisis múltiple de medias Tukey-Kramer (Nivel de confianza del 95%)

enzyme	N	Mean	Grouping
Mixture	4	10.1325	A
Recombinant	3	8.9397	A B
Calf stomach	3	7.9530	B
trompillin	3	5.2530	C

**VISCOSIDAD FINAL**

Análisis de varianza

Fuente	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
enzyme	3	19.872	6.6240	11.04	0.002
Error	9	5.402	0.6003		
Total	12	25.274			

Resumen del modelo

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
0.774763	78.63%	71.50%	54.85%

Análisis múltiple de medias Tukey-Kramer (Nivel de confianza del 95%)

enzyme	N	Mean	Grouping
Recombinant	3	5.32333	A
trompillin	3	5.31500	A
Calf stomach	3	4.31067	A
Mixture	4	2.44500	B

**TIEMPO PARA INICIAR LA AGREGACIÓN DE LAS CASEÍNAS  $t_0$** 

Análisis de varianza

Fuente	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
enzyme	3	1287.30	429.099	135.54	0.000
Error	9	28.49	3.166		
Total	12	1315.79			

Resumen del modelo

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
1.77925	97.83%	97.11%	95.34%

Análisis múltiple de medias Tukey-Kramer (Nivel de confianza del 95%)

enzyme	N	Mean	Grouping
Recombinant	3	38.8950	A
Calf stomach	3	37.6700	A
trompillin	3	37.3813	A
Mixture	4	16.4540	B

**TIEMPO PARA ALCANZAR LA VISCOSIDAD MÁXIMA  $t_s$** 

Análisis de varianza

Fuente	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
--------	----	--------	--------	---------	---------



enzyme	3	2053.71	684.569	110.61	0.000
Error	9	55.70	6.189		
Total	12	2109.41			

## Resumen del modelo

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
2.48778	97.36%	96.48%	94.40%

## Análisis múltiple de medias Tukey-Kramer (Nivel de confianza del 95%)

enzyme	N	Mean	Grouping
trompillin	3	51.9943	A
Recombinant	3	48.3173	A
Calf stomach	3	46.2890	A
Mixture	4	21.9690	B

**TIEMPO PARA INDUCIR LA GELIFICACIÓN UNA VEZ INICIADA LA AGREGACIÓN DE LAS CASEÍNAS  $\Delta t$** 

## Análisis de varianza

Fuente	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
enzyme	3	143.355	47.7851	48.43	0.000
Error	9	8.881	0.9868		
Total	12	152.236			

## Resumen del modelo

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
0.993364	94.17%	92.22%	87.84%

## Análisis múltiple de medias Tukey-Kramer (Nivel de confianza del 95%)

enzyme	N	Mean	Grouping
trompillin	3	14.6127	A
Recombinant	3	9.4227	B
Calf stomach	3	8.6190	B
Mixture	4	5.5150	C

**VELOCIDAD DE AGREGACIÓN DE LAS CASEÍNAS  $\kappa$** 

## Análisis de varianza

Fuente	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
enzyme	3	3.063	1.0211	6.74	0.011
Error	9	1.364	0.1516		
Total	12	4.428			

## Resumen del modelo

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
0.389337	69.19%	58.92%	33.75%

## Análisis múltiple de medias Tukey-Kramer (Nivel de confianza del 95%)

enzyme	N	Mean	Grouping	
Mixture	4	1.76137	A	
Recombinant	3	1.14733	A	B
Calf stomach	3	1.05967	A	B
trompillin	3	0.43267	B	

**Actividad coagulante y proteolítica de las proteasas usadas en el estudio (Tabla 7)****CONTENIDO DE PROTEÍNA EN LAS PROTEASAS**

## Análisis de varianza

Fuente	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
--------	----	--------	--------	---------	---------



Coag	2	188.660	94.3301	1064.25	0.000
Error	6	0.532	0.0886		
Total	8	189.192			

## Resumen del modelo

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
0.297716	99.72%	99.63%	99.37%

## Análisis múltiple de medias Tukey-Kramer (Nivel de confianza del 95%)

Coag	N	Media	Agrupación
ECT	3	10.664	A
QR	3	1.3100	B
QB	3	0.6300	B

**MCA (actividad coagulante)**

## Análisis de varianza

Fuente	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Protease	2	9571794	4785897	78.31	0.000
Error	6	366703	61117		
Total	8	9938497			

## Resumen del modelo

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
247.219	96.31%	95.08%	91.70%

## Análisis múltiple de medias Tukey-Kramer (Nivel de confianza del 95%)

Protease	N	Mean	Grouping
Recombinant camel chymosin	3	6120.22	A
Chymosin from calf stomach	3	4397.45	B
Plant-derived protease	3	3658.86	C

**MCA – específica**

## Análisis de varianza

Fuente	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Protease	2	59211038	29605519	75.36	0.000
Error	6	2357168	392861		
Total	8	61568206			

## Resumen del modelo

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
626.787	96.17%	94.90%	91.39%

## Análisis múltiple de medias Tukey-Kramer (Nivel de confianza del 95%)

Protease	N	Mean	Grouping
Chymosin from calf stomach	3	7064.76	A
Recombinant camel chymosin	3	4697.30	B
Plant-derived protease	3	841.00	C

**ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA**

## Análisis de varianza

Fuente	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Factor	2	519580	259790	6630.59	0.000
Error	6	235	39		
Total	8	519815			

## Resumen del modelo

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
---	------	-----------	------------



6.25944 99.95% 99.94% 99.90%

Análisis múltiple de medias Tukey-Kramer (Nivel de confianza del 95%)

Protease	N	Mean	Grouping
Plant-derived protease	3	535.475	A
Recombinant camel chymosin	3	32.609	B
Chymosin from calf stomach	3	19.213	B

### ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA ESPECÍFICA

Análisis de varianza

Fuente	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Factor	2	1063.00	531.498	566.77	0.000
Error	6	5.63	0.938		
Total	8	1068.62			

Resumen del modelo

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
0.968385	99.47%	99.30%	98.82%

Análisis múltiple de medias Tukey-Kramer (Nivel de confianza del 95%)

Protease	N	Mean	Grouping
Plant-derived protease	3	50.2322	A
Chymosin from calf stomach	3	30.4963	B
Recombinant camel chymosin	3	24.8926	C

### Radio (MCA/AP)

Análisis de varianza

Fuente	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Protease	2	81083.8	40541.9	379.47	0.000
Error	6	641.0	106.8		
Total	8	81724.8			

Resumen del modelo

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
10.3362	99.22%	98.95%	98.24%

Análisis múltiple de medias Tukey-Kramer (Nivel de confianza del 95%)

Protease	N	Mean	Grouping
Chymosin from calf stomach	3	223.763	A
Recombinant camel chymosin	3	187.750	B
Plant-derived protease	3	6.837	C

### Cantidad de tirosina en la cinética de 80 min (Figura 11)

Análisis de varianza

Fuente	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
tiempo	8	134.275	16.7844	2297.19	0.000
Error	18	0.132	0.0073		
Total	26	134.407			

Resumen del modelo

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
0.0854779	99.90%	99.86%	99.78%

Análisis múltiple de medias Tukey-Kramer (Nivel de confianza del 95%)

tiempo	N	Media	Agrupación
60	3	7.5158	A
80	3	7.3621	A B



50	3	7.2297	B
70	3	7.2132	B
40	3	6.8113	C
30	3	6.6458	C D
20	3	6.4638	D
10	3	5.3148	E
0	3	0.008577	F

### Prueba de sinéresis (Tabla 8)

#### LECHE

Análisis de varianza

Fuente	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Protease	3	3.495	1.1648	2.17	0.169
Error	8	4.286	0.5358		
Total	11	7.781			

Resumen del modelo

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
0.731950	44.91%	24.26%	0.00%

Análisis múltiple de medias Tukey-Kramer (Nivel de confianza del 95%)

Protease	N	Mean	Grouping
Chymosin from calf stomach	3	37.4140	A
Mixture RCChy + Plnat protease	3	36.3526	A
Recombinant camel chymosin	3	36.2191	A
Plant-derived protease	3	36.0217	A

#### SUERO

Análisis de varianza

Fuente	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Protease	3	211.349	70.4495	405.66	0.000
Error	8	1.389	0.1737		
Total	11	212.738			

Resumen del modelo

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
0.416734	99.35%	99.10%	98.53%

Análisis múltiple de medias Tukey-Kramer (Nivel de confianza del 95%)

Protease	N	Mean	Grouping
Plant-derived protease	3	11.2029	A
Chymosin from calf stomach	3	1.6835	B
Recombinant camel chymosin	3	1.6356	B
Mixture RCChy + Plnat protease	3	1.2386	B

#### GELES DE LECHE

Análisis de varianza

Fuente	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Protease	3	241.789	80.5962	158.18	0.000
Error	8	4.076	0.5095		
Total	11	245.865			

Resumen del modelo

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
0.713818	98.34%	97.72%	96.27%

Análisis múltiple de medias Tukey-Kramer (Nivel de confianza del 95%)

Protease	N	Mean	Grouping
----------	---	------	----------





Chymosin from calf stomach	3	35.7305	A	
Mixture RCChy + Plnat protease	3	35.1141	A	
Recombinant camel chymosin	3	34.5835	A	
Plant-derived protease	3	24.8188		B

## SINÉRESIS

### Análisis de varianza

Fuente	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Protease	3	1636.15	545.384	604.35	0.000
Error	8	7.22	0.902		
Total	11	1643.37			

### Resumen del modelo

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
0.949965	99.56%	99.40%	99.01%

### Análisis múltiple de medias Tukey-Kramer (Nivel de confianza del 95%)

Protease	N	Mean	Grouping
Plant-derived protease	3	31.0867	A
Recombinant camel chymosin	3	4.5133	B
Chymosin from calf stomach	3	4.4933	B
Mixture RCChy + Plnat protease	3	3.4133	B

## PROTEÍNA EN EL SUERO

### Análisis de varianza

Fuente	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Protease	3	1.41161	0.470538	910.57	0.000
Error	8	0.00413	0.000517		
Total	11	1.41575			

### Resumen del modelo

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
0.0227321	99.71%	99.60%	99.34%

### Análisis múltiple de medias Tukey-Kramer (Nivel de confianza del 95%)

Protease	N	Mean	Grouping
Plant-derived protease	3	0.938333	A
Mixture RCChy + Plnat protease	3	0.164667	B
Chymosin from calf stomach	3	0.138000	B
Recombinant camel chymosin	3	0.137333	B



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE  
CHIHUAHUA

Chihuahua, Chih., 18 de marzo del 2020

M.C. EMILIANO ZAPATA CHÁVEZ  
SECRETARÍA ACADÉMICA  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS  
PRESENTE.-

Me permito hacer de su conocimiento que los estudiantes BERENICE DOMÍNGUEZ LUJÁN No. de matrícula 291726 y JESÚS ABRAHAM BELTRÁN ESPINOZA No. de matrícula 291695 del programa educativo de Ingeniero Químico, han concluido satisfactoriamente el trabajo de Tesis: "COAGULACIÓN ÁCIDA DE LA LECHE ASISTIDA POR PROTEASAS: EFECTO DE PROTEASAS DE ORIGEN VEGETAL SOBRE LA FORMACIÓN DEL GEL". Por lo que solicito se inicie el proceso de revisión con sus revisores para concluir el proceso de titulación.

Sin otro particular por el momento, nos es grato quedar de usted.

ATENTAMENTE  
"POR LA CIENCIA PARA BIEN DEL HOMBRE"

D. C. NÉSTOR GUTIÉRREZ MÉNDEZ  
Director de tesis

M. C. DELY RUBI CHÁVEZ GARAY  
Asesor

M. C. CAROLINA NÁJERA DOMÍNGUEZ  
Asesor

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS  
Círculo Universitario  
Campus Universitario #2, C.P. 31125  
Tels. 52(614) 236 60 00  
Chihuahua, Chih., México.  
www.fcq.uach.mx





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE  
CHIHUAHUA

Número de acta: 4999  
Número de matrícula: 291695

## UNIVERSIDAD AUTONOMA DE CHIHUAHUA

En la ciudad de CHIHUAHUA, CHIH. a los 15 días del mes de OCTUBRE del 2020, se reunieron en la:

### FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS

Los señores profesores :

**D.C. RUBEN MARQUEZ MELENDEZ**

**M.C. CARLOS ARMANDO DE LA VEGA COBOS**

**D.C. IVAN SALMERON OCHOA**

### ACTA DE EXAMEN PROFESIONAL



FACULTAD DE CIENCIAS  
QUIMICAS

Bajo la presidencia del primero y fungiendo como secretario el último, para proceder AL EXAMEN PROFESIONAL de INGENIERO QUIMICO del Pasante:

**JESUS ABRAHAM BELTRAN ESPINOZA**

quien para el efecto cumplió con anterioridad el requisito reglamentario siguiente:

**TESIS. "COAGULACIÓN ÁCIDA DE LA LECHE ASISTIDA POR PROTEASAS: EFECTOS DE PROTEASAS DE ORIGEN VEGETAL SOBRE LA FORMACIÓN DEL GEL"**

Los señores sinodales replicaron al sustentante y terminada la réplica, después de debatir entre sí, reservada y libremente, lo declararon:

Aprobado por Unanimidad con Mención Honorífica

Acto continuo, el presidente del jurado le tomó la protesta de ley.

**D.C. RUBEN MARQUEZ MELENDEZ**

Presidente(a)

**M.C. CARLOS ARMANDO DE LA VEGA COBOS**

Vocal

**D.C. IVAN SALMERON OCHOA**

Secretario(a)

**DR. PEDRO JAVIER MARTINEZ RAMOS**


Director(a)

El C. Director que suscribe, certifica que las firmas que aparecen en esta acta son auténticas.

CHIHUAHUA, CHIH. a 15 de OCTUBRE del 2020.

ORIGINAL  
RESEARCH

## The impact of chymosin and plant-derived proteases on the acid-induced gelation of milk

JESÚS A BELTRÁN-ESPINOZA, BERENICE DOMÍNGUEZ-LUJAN, NÉSTOR GUTIÉRREZ-MÉNDEZ,\*  DELY R CHÁVEZ-GARAY, CAROLINA NÁJERA-DOMÍNGUEZ and MARTHA Y LEAL-RAMOS*Chemistry School, Autonomous University of Chihuahua, Chihuahua, Mexico*

*This work aimed to study milk gel formation during a slow fermentation process and the simultaneous action of different proteases like bovine chymosin, recombinant camel chymosin, ficin and bromelain. The acid-induced gels with bovine chymosin and recombinant camel chymosin were firmer than the control gels without proteases or the gels added with plant proteases. However, the acid-induced gels with chymosins had a considerable water release and shrunk in volume as the milk fermentation progressed. In contrast, the acid-induced gels added with bromelain and ficin were softer and showed less syneresis, even at acidic pHs.*

**Keywords** Milk coagulation, Acid-induced gelation, Plant-derived proteases, Chymosin.

## INTRODUCTION

Milk gelation can be induced by acidification/fermentation of milk (acid-induced gelation), by adding milk-clotting proteases (enzyme-induced gelation) or by using a mixture of these two methods (acid-enzyme-induced gelation). Manufacturing yoghurt-like products involve the acid-induced gelation of milk, and most types of cheeses apply the enzyme-induced gelation of milk in their cheesemaking processes. Soft-acid-curd cheeses like Quark, Tvorog, Petit-Suisse, Cream, Fresh and Cottage combine the acid- and enzyme-induced milk gelation. In these cheeses, the milk is clotted by a slow fermentation process and the simultaneous action of milk-clotting proteases like chymosin. The amount of chymosin used is one-tenth of the quantity used in the enzyme-induced gelation. This enzyme is added to the milk with the bacterial starter culture or during the first hours of fermentation (<pH 6.0). The intended use of chymosin in soft-acid-curd cheeses shortens the milk-clotting time and enhances the curd's firmness. However, the use of chymosin manufacturing these types of cheeses is merely empirical (Lucey and Singh 2003; Lee and Lucey 2003; Schulz-Collins and Senge 2004; Farkye 2004a; Farkye 2004b).

The process of milk coagulation combining fermentation with milk-clotting enzymes has attained less attention than the acid-induced and the enzyme-induced gelation, which have been studied and reviewed extensively (Lucey and Singh 1997; Lucey and Singh 2003; Horne and Banks 2004; Horne and Lucey 2017). Induction of milk coagulation by enzymes involves hydrolysis of caseins by proteases like chymosin. This enzyme cleaves the fragments of  $\kappa$ -caseins protruding from casein micelles, which halves the zeta potential and minimises the steric repulsion among casein micelles. The altered micelles aggregate into strands (~10 micelles long) and then into clusters (~1–4 micelles thick) to form a cohesive particulate gel ( $G' = 32$  Pa at  $\omega = 0.01$  rad/s). Enzyme-induced milk gels reorganise the strands of casein micelles whether the pH decreases or the temperature increases, resulting in syneresis. It is estimated that enzyme-induced gels may lose two-thirds of its volume, which is undesired in soft-acid-curd cheeses (Lucey *et al.* 2003; Horne and Banks 2004; Fagan *et al.* 2017). On the other hand, the acidification/fermentation of milk decreases the zeta potential and reduces the electrostatic repulsion between casein micelles. The acidification of milk also solubilises the micellar calcium phosphate (MCP), which partially disrupts the

\* Author for correspondence. E-mail: [ngutierrez@uach.mx](mailto:ngutierrez@uach.mx)

micelle structure by liberating a portion of caseins into the serum phase. Unlike enzyme-induced milk gels, acidic milk gels exhibit only weak syneresis, although these gels are more fragile than enzymatic milk gels ( $G' = 20$  Pa at  $\omega = 0.01$  rad/s) (Tuinier and Kruif 2002; Fox and Brodkorb 2008; Fagan *et al.* 2017; Bijl *et al.* 2019).

The few studies on acid-enzymatic milk gels have revealed that multiple chemical modifications arise when milk fermentation and chymosin proteolysis coincide in this type of gelation (Salvatore *et al.* 2011). According to Schulz-Collins and Senge (2004), the proteolysis carried out by chymosin has a synergist effect with acidification facilitating the aggregation of casein particles. When the chymosin is incorporated during milk fermentation, the aggregation of caseins occurs at a less acidic pH, and the gels are firmer than milk gels only induced by acidification. These authors also reported that supplementing the milk with a small amount of chymosin does not alter MCP's dissociation upon acidification (Schulz-Collins and Senge 2004). However, little has been described regarding the effect of adding chymosin on the syneresis and shrinkage of acid-induced milk gels. Moreover, there is a lack of information about using proteases other than chymosin to assist the acid-induced gelation of milk.

Different plant-derived proteases have been studied as chymosin substitutes in cheesemaking processes, although only a few plant proteases are used in the large-scale manufacture of enzyme-coagulated cheese (Shah *et al.* 2014). The vast majority of plant proteases are inadequate for manufacturing enzyme-coagulated cheese since they are more proteolytic than chymosin. The extensive hydrolysis of caseins leads to weak milk gels, which decreases the cheese yield and detracts the texture of hard and semihard cheeses (Jacob *et al.* 2011; Shah *et al.* 2014). Nevertheless, different studies suggest that the unspecific hydrolysis carried out by plant-derived proteases on casein micelles increases the mobility and water retention of individual caseins, favouring the viscoelastic properties of soft-acid-curd cheeses (Gutiérrez-Méndez *et al.* 2012; Chávez-Garay *et al.* 2016; Gutiérrez-Méndez *et al.* 2019). Therefore, plant-derived proteases could be used to assist the acid-induced gelation of milk in the manufacture of soft-acid-curd cheeses.

This work aimed to study milk gel formation during the slow fermentation of milk combined with diverse proteases, including two chymosins and two plant-derived proteases (ficin and bromelain).

## MATERIALS AND METHODS

### Proteases

The proteases used were as follows: recombinant camel chymosin expressed in *Aspergillus niger* var. *awamori* (EC 3.4.23.4; Chy-Max M1000, Chr Hansen, Horsholm,

Denmark), bovine chymosin from calf stomach (EC 3.4.23.4; Sigma Aldrich St. Louis, MO), ficin from fig tree latex (EC 3.4.22.3; Sigma Aldrich St. Louis, MO) and bromelain from the pineapple stem (EC 3.4.22.32; Sigma Aldrich St. Louis, MO). Both plant-derived proteases selected for this study have been reported with milk-clotting activity (Kumar *et al.* 2010). Stock solutions of proteases were prepared with deionised water (conductivity  $>18$  M $\Omega$ /cm) from an ultra-pure water purification system (Thermo Scientific, D8611, Dubuque, IO). The protein content in each protease solution (Table 1) was measured with the Coomassie blue reagent described elsewhere (Bradford 1976).

### Milk and lactic acid bacteria

Pasteurised milk (72 °C - 15 s) with a standardised composition of 3% fat and a protein of 2.7% was used in all the assays. The milk samples were also added with CaCl<sub>2</sub> to get a final concentration of 1.8 mM (0.02%). The fermentation starter was a lyophilised culture of lactic acid bacteria (LAB). The starter culture included mesophilic (*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar diacetylactis and *Leuconostoc*) and thermophilic (*Streptococcus thermophilus*) bacteria (FD-DVS-XPL-1, Chr Hansen, Hoersholm, Denmark). The starter culture was reactivated before the assays by inoculating sterile milk with 1% (w/v) of lyophilised culture and incubating the milk at 37 °C for 17 h. This reactivated culture was used as an inoculum in further experiments.

### Milk-clotting activity of proteases

The efficiency of clotting the milk by each protease was assessed by measuring milk viscosity changes (Gutiérrez-Méndez *et al.* 2012). For this purpose, a rheometer (Anton Paar, Rheolab QC, Austria) and a concentric cylinder geometry with a conical tip (CC39,  $\phi$  3.899 cm, 132°) were used. Warm milk (37 °C) was poured into the rheometer cup (76 mL), and then, the corresponding protease solution was added. The volume of each protease solution varied to ensure the proper gelation of milk (Table 1). The changes in milk viscosity were followed for 60 min at 37 °C and a fixed shear rate of 50 s<sup>-1</sup>. Data were collected with the rheometer software (Rheoplus V3.20, Ostfildern, Germany) and fitted to the sigmoidal function (Figure S1 in Supplementary Information) using Equation (1) (SigmaPlot V12, Jandel Scientific, San Rafael, CA), where  $\eta$  = viscosity (mPa s),  $\eta_0$  = initial viscosity (mPa s),  $\eta_s$  = maximum increase of viscosity at steady state (mPa s),  $k$  = rate of caseins aggregation during the secondary coagulation stage (min<sup>-1</sup>),  $t$  = time and  $t_c$  = time to reach the half value of  $\eta_s$ . The time needed to start the milk clotting ( $t_0$ ) was estimated with Equation (2). The time required to complete the gelation of the milk was considered as  $2t_c$ . Milk-clotting

**Table 1** Milk-clotting activity (MCA) of proteases used in this study.

	<i>Bovine chymosin</i>	<i>Recombinant camel chymosin</i>	<i>Ficin</i>	<i>Bromelain</i>
$V_{Enzyme}$ (mL)	0.0213	0.0038	0.38	3.8
[Protein] (mg/mL)	0.5	0.1	1.2	0.3
$\eta_s$ (mPa s)	$16.44 \pm 2.0^a$	$13.6 \pm 1.8^a$	$5.7 \pm 0.7^b$	$7.9 \pm 1.9^b$
$t_0$ (min)	$4.7 \pm 1.4^c$	$12.2 \pm 1.7^b$	$7.0 \pm 1.1^{bc}$	$24.0 \pm 4.7^a$
$t_c$ (min)	$4.9 \pm 1.4^c$	$13.3 \pm 1.8^b$	$8.3 \pm 1.2^{bc}$	$26.5 \pm 5.3^a$
$2t_c$ (min)	$9.9 \pm 2.8^c$	$26.6 \pm 3.6^b$	$16.7 \pm 2.4^{bc}$	$53.1 \pm 10.6^a$
$k$ (1/min)	$8.6 \pm 1.5^a$	$1.9 \pm 0.4^b$	$1.5 \pm 0.3^b$	$0.8 \pm 0.2^b$
MCA (SU/mL)	$15\ 065 \pm 2595^b$	$30\ 099 \pm 2187^a$	$507.7 \pm 70.8^c$	$15.5 \pm 3.2^c$
Sp-MCA (SU/mg protein)	$31\ 877 \pm 7606^b$	$372\ 580 \pm 27\ 077^a$	$433.0 \pm 60.7^c$	$57.0 \pm 11.5^c$

All the milk-clotting assays were conducted in 76 mL of milk.

Mean  $\pm$  standard deviation; each treatment was replicated four times ( $n = 4$ ), means with the same letter in the same row did not have a significant difference (Tukey–Kramer test,  $\alpha = 0.05$ ).

$2t_c$  = time required to clot the milk;  $k$  = rate of caseins aggregation during the secondary coagulation stage; MCA = milk-clotting activity expressed in Soxhlet Units per millilitre; Sp-MCA = specific MCA;  $t_0$  = time to start the aggregation of caseins;  $t_c$  = time to reach the half value of  $\eta_s$ ;

$V_{Enzyme}$  = volume of enzyme solution added in the milk;  $V_{Milk}$  = volume of milk used;  $\eta_s$  = maximum increase of viscosity at steady state.

activities of proteases (MCA) were calculated with the previous information and Equation (3). The MCA was expressed as Soxhlet units (SU) per millilitre of coagulant or per milligram of protein as specific-milk-clotting activity (Sp-MCA). One SU was defined as the volume of milk that can be clotted by one volume unit of the coagulant in 40 min at 37 °C (Gutiérrez-Méndez *et al.* 2019).

$$\eta = \eta_0 + \frac{\eta_s}{1 + e^{-k(t-t_c)}} \quad (1)$$

$$t_0 = t_c - \frac{2}{k} \quad (2)$$

$$\text{MCA} \left( \frac{\text{SU}}{\text{mL}} \right) = \frac{40 \text{ (min)}}{2t_c \text{ (min)}} \times \frac{V_{enzyme} \text{ (mL)}}{V_{milk} \text{ (mL)}} \quad (3)$$

### Proteolytic activity of proteases

The capability of hydrolysing milk proteins by each protease was measured in a casein solution, according to McDonald's and Chen's (1965) methodology. Briefly, 25  $\mu\text{L}$  from each protease solution (see Table 2) was added to 130  $\mu\text{L}$  of casein solution (0.6%) and incubated at 37 °C for 10 min. The enzymatic reaction was stopped with 130  $\mu\text{L}$  of 100 mM trichloroacetic acid (TCA). The entire mixture was centrifuged (3000  $g$ , 15 min, 10 °C) to separate the hydrolysed caseins (supernatant) from the nonhydrolysed caseins (sediment). A supernatant aliquot of 250  $\mu\text{L}$  was pipetted into 625  $\mu\text{L}$  of  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (500 mM), followed by 125  $\mu\text{L}$  of Folin–Ciocalteu solution (0.2 N). This mixture was incubated at 37 °C for 30 min and read at 760 nm (Biotek, Elx808, Winooski, VT, USA). The calibration curve was built using tyrosine standards at 5.5, 11, 27.5 and 55  $\mu\text{M}$ . Proteolytic activities (PA) were expressed as enzymatic units per millilitre of enzyme solution or per

milligram of protein as specific-proteolytic activity (Sp-PA). One unit of enzyme activity ( $U$ ) was the amount of enzyme that releases one micromole of tyrosine equivalents per minute of reaction.

### Acid-induced coagulation of milk

The acid coagulation of milk was induced through fermentation with the LAB starter culture. The milk was incubated at 37 °C until the pH reached a value of 6.0. At this pH, the milk was split into two portions. One portion was used to follow milk coagulation by small-amplitude oscillatory shear (SAOS) rheology. The other portion was used to monitor pH changes (pH-meter, Hanna Instrument pH 211, Nufalau, Romania). The SAOS experiments were performed with a rheometer (AR-2000, TA Instruments, New Castle, DE), an aluminium plate ( $\phi$  6.0 cm, 0°), and a solvent trap (60 mm) to prevent sample evaporation. First, a strain sweep (0.2–10%, 1 Hz, 1 mm gap, 37 °C) determined the linear viscoelastic region or LVR. Then, the SAOS tests were carried out at 37 °C and using a fixed strain of 5% and a frequency of 1 Hz because these conditions gave a well-defined LVR. Changes in the storage ( $G'$ ) module, loss ( $G''$ ) module and  $\tan \delta$  were monitored for 16 h, as preliminary tests showed that the acid-induced milk gels were formed in <9 h. Data were collected and analysed using Rheology Advantage Data Analysis V5.7 (TA Instruments, New Castle, DE). The gelation point was considered the crossover point between  $G'$  and  $G''$  ( $\tan \delta = 1$ ). Additionally, the maximum  $G'$  value during milk clotting was calculated.

### Acid-induced coagulation of milk assisted by proteases

The acid coagulation of milk was induced as described previously. Still, when the milk had a pH of 6.0, it was added

**Table 2** Proteolytic activity (PA) of proteases used in this study.

	<i>Bovine chymosin</i>	<i>Recombinant camel chymosin</i>	<i>Ficin</i>	<i>Bromelain</i>
PA (U/mL)	270.5 ± 20.9 <sup>b</sup>	37.4 ± 8.9 <sup>d</sup>	828.9 ± 30.6 <sup>a</sup>	177.7 ± 15.8 <sup>c</sup>
Sp-PA (U/mg protein)	572.3 ± 44.3 <sup>ab</sup>	462.4 ± 90.0 <sup>b</sup>	708.4 ± 26.1 <sup>a</sup>	653.0 ± 58.1 <sup>a</sup>
Ratio MCA/PA	55.3 ± 10.3 <sup>b</sup>	736.1 ± 60.7 <sup>a</sup>	0.6 ± 0.1 <sup>c</sup>	0.1 ± 0.01 <sup>c</sup>

Mean ± standard deviation; each treatment was replicated four times ( $n = 4$ ), means with the same letter in the same row did not have a significant difference (Tukey–Kramer test,  $\alpha = 0.05$ ).

PA = proteolytic activity expressed in enzymatic units (U) per millilitre where 1 U is the  $\mu$ moles of tyrosine equivalents liberated per minute; Sp-PA = specific-proteolytic activity.

with the corresponding protease solution (bovine chymosin, recombinant chymosin, ficin or bromelain). Table 1 describes the volumes of protease solution used for each enzyme. Because of discrepancies in proteases milk-clotting activities, different volumes were used to ensure that all the enzymes had similar MCA (15 SU per 100 mL) in the milk. For all the proteases, the volume of enzyme added in the milk was only a tenth part of the enzyme amount required to induce the enzymatic coagulation of milk. The changes in pH and rheological parameters were measured, as explained earlier.

#### Proteolysis in milk gels

A milk gel portion (~750  $\mu$ g) was removed from the rheometer platform immediately after finishing the rheological tests. To stop the activity of proteases and the growth of microorganisms in milk gel samples, these were mixed with 630  $\mu$ L of 110 mM TCA and stored at  $-20$  °C. Before the gel electrophoresis analysis, milk gels were thawed and blended with 750  $\mu$ L of Tris-HCl buffer pH 8 (165 mM Tris, one mM EDTA, 70 mM SDS). These blends were centrifuged at 5 °C for one hour at 4000  $g$  to recover the protein fractions (supernatant). Afterwards, 15  $\mu$ L from the aqueous fractions of proteins was mixed with 30  $\mu$ L of Tris-HCl buffer pH 8 supplemented with  $\beta$ -mercaptoethanol and boiled for 5 min. Polyacrylamide gels were run in a Miniproteam II cell (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) at 100 V for one hour. Gels were stained with Coomassie blue G-250 and washed with a solution of acetic acid:methanol:water (7:40:53, v/v) (Gutiérrez-Méndez *et al.* 2012; Gutiérrez-Méndez *et al.* 2019). Image analysis of SDS-PAGE gels was done as described by Weber and Osborn (1969). The densitometric analysis of SDS-PAGE gels was carried out using the software ImageJ (National Institute of Health, Bethesda, MD, USA).

#### Syneresis in milk gels

Pasteurised milk was inoculated and incubated as described above. When the milk attained a pH value of 6.0, portions of 25 mL were poured into sterile plastic tubes with screw

caps. The milk in each tube was added immediately with the corresponding protease solution to obtain 15 SU per 100 mL of milk. The tubes were incubated 24 h at 37 °C and were centrifuged for 10 min at 10 °C and 300  $g$ . After centrifugation, the volume of whey released was measured and weighted. The milk gels were also weighted, and their volumes were estimated by difference. Syneresis in milk gels was expressed as the relative percentage of whey released after 24 h of incubation.

#### Statistical analysis

This study used a completely randomised one-factor (type of protease) design with five levels: (1) without protease, (2) with bovine chymosin, (3) with recombinant bovine chymosin, (4) with bromelain and (5) with ficin. Each treatment was replicated four times ( $n = 4$ ). All the responses (dependent variables) were analysed with a one-factor analysis of variance (ANOVA) and Tukey–Kramer post hoc test.

## RESULTS AND DISCUSSION

#### Milk-clotting and proteolytic activities of proteases

All the proteases involved in this study (two chymosins and two plant-derived proteases) clotted the milk. Unlike the two chymosins, the plant-derived coagulants needed a larger volume and a longer time to induce milk coagulation (Table 1). Overall, casein micelles began their aggregation ( $t_0$ ) during the first 15 min of incubation, except for the bromelain, which required a longer time (Table 1). Once the agglomeration of caseins started, the rate of casein micelles aggregation ( $k$ ) depended on the type of protease. For instance, the milk added with recombinant camel chymosin had a prompt aggregation of casein micelles ( $k = 8 \text{ min}^{-1}$ ) that sped up the coagulation ( $2t_c = 9 \text{ min}$ ). In contrast, milk added with the bromelain protease showed a slow aggregation of casein micelles ( $k = 0.8 \text{ min}^{-1}$ ), which delayed the process of coagulation ( $2t_c = 53 \text{ min}$ ). Milk gels clotted with camel or bovine chymosins had a higher viscosity ( $\eta_s$ , 13–16 mPa s) than gels coagulated with bromelain and ficin ( $\eta_s$ , 5–7 mPa s). Likewise, the two chymosins had a superior



MCA than the two plant-derived proteases. Among all proteases, the recombinant camel chymosin showed the highest MCA (Table 1). This protease had an Sp-MCA ~10 times higher than bovine chymosin and ~6000 times higher than bromelain. The recombinant camel chymosin also had the lowest PA with ~400 U/mg protein. In contrast, the protease from the fig tree latex had the highest PA with ~700 U/mg protein (Table 2). Therefore, the ratio of MCA/PA was higher for the two chymosins (50–700) than for ficin (>1) and bromelain (>0.1).

The effectiveness of mammal chymosins coagulating milk arises from their evolutionary capability to hydrolyse caseins to stimulate a proper stomach function without hydrolysing immunoglobulins (Kumar *et al.* 2010). Chymosins act specifically on  $\kappa$ -casein fragments protruding from the surface of casein micelles and have limited action on  $\alpha_{s1}$  and  $\beta$  caseins (Tuinier and Kruijff 2002; Lucey and Singh 2003; Horne and Banks 2004). Hence, it was not a surprise the bovine chymosin had a superior Sp-MCA activity (Table 1), as reported by other authors (18 000–24 000 SU/mg protein; Harboe *et al.* 2011). Interestingly enough, the highest MCA was not observed in the bovine chymosin, but the recombinant camel chymosin (Table 1). According to Kappeler *et al.* (2006), the recombinant camel chymosin has higher specific activity towards bovine  $\kappa$ -caseins and lower proteolytic activity than the bovine chymosin. Therefore, the ratio MCA/PA for recombinant camel chymosin has been reported to be sevenfold higher than the ratio for bovine chymosin (Kappeler *et al.* 2006), which agrees with our results (Table 2).

In concordance with the literature, the plant-derived proteases had low MCA and high PA (Table 2), which yielded a low ratio of MCA/PA (Kumar *et al.* 2010; Shah *et al.* 2014). For instance, (Raskovic *et al.* 2016) reported an MCA/PA ratio of 0.6–0.7 for ficin from fig tree latex, which agrees with results in Table 2 for ficin (0.61). A large MCA/PA ratio means that a small coagulant volume can clot the milk in a brief time without producing extensive proteolysis on milk proteins. Therefore, some state that manufacturing enzyme-coagulated cheeses requires a large MCA/PA (Crabbe 2004). Nevertheless, a low ratio of MCA/PA, like those observed in the plant-derived proteases, can benefit the manufacture of fresh acid-curd cheeses, as discussed below in further detail.

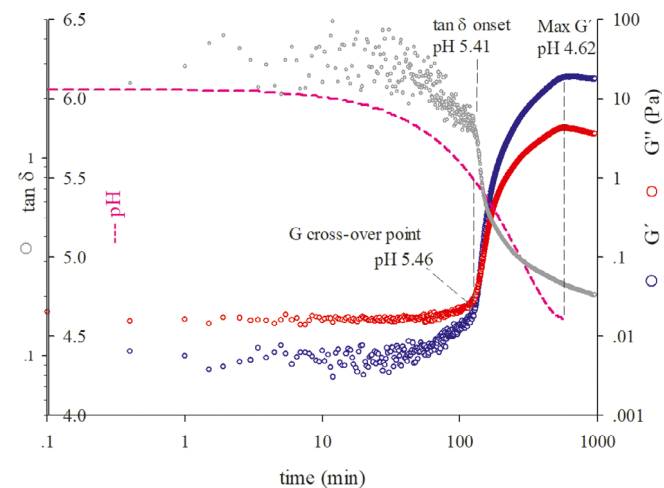
### Acid-induced coagulation of milk

Fermented milk had a fluid-like behaviour ( $\tan \delta > 1$ ) at pH ~ 6.0 with the loss modulus ( $G''$ ) prevailing over the storage modulus ( $G'$ ). The fluid-like behaviour remained until the milk reached a pH of 5.46 (~2 h). At this pH, there was a crossover point between  $G''$  and  $G'$  ( $\tan \delta = 1$ ), denoting the start of network formation (gel point) by an extensive aggregation of casein micelles. The  $G'$  and  $G''$  moduli increased rapidly after the gel point (pH 5.41) with

a concomitant decrease in the  $\tan \delta$  response ( $\tan \delta$  onset). According to Gunasekaran and Ak (2002), the exponential increase of  $G'$  and  $G''$  moduli after the gel point is because of the rise in the number of contacts between casein micelles. Beyond the gel point, the fermented milk showed a solid-like behaviour ( $\tan \delta < 1$ ) where  $G'$  was predominant over  $G''$ . The value of  $G'$  and  $G''$  continued to rise until reaching their maximum after 9 h (pH 4.6, max  $G' = 26$  Pa), signifying gel firming due to the increase in the number of bonds among caseins (Gunasekaran and Ak 2002). Neither the pH nor the  $G'$  module had a further change in their values after nine hours of fermentation (Figure 1).

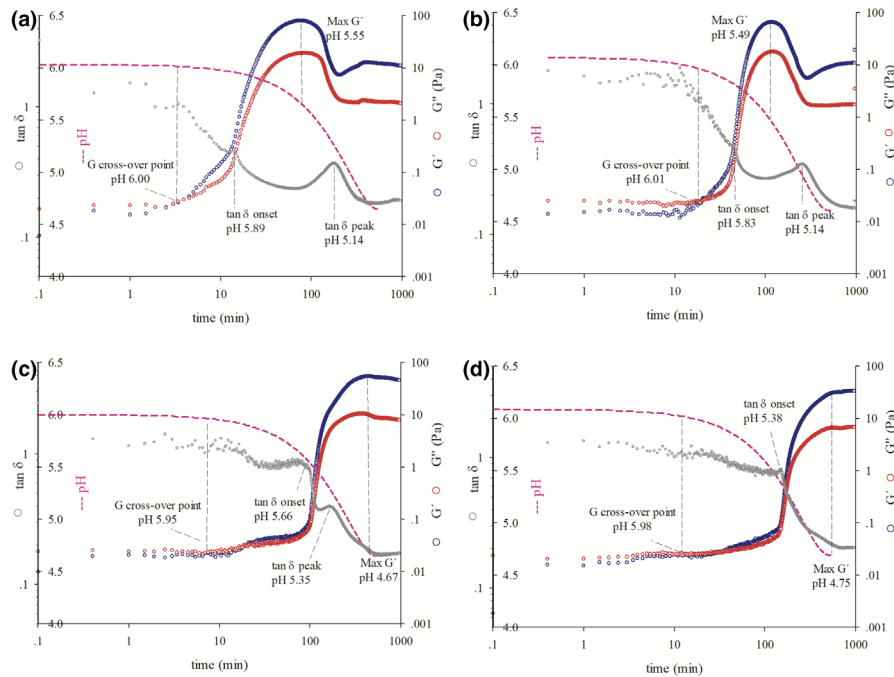
### Acidic coagulation of milk assisted by proteases

Incorporating proteases in a small quantity (15 SU/100 mL) during milk fermentation (at pH 6) modified the coagulation process of acidic milk gels. The beginning of network formation ( $G$  crossover point) occurred earlier in the fermented milk with proteases than in the milk without proteases (134 min and pH 5.46). The gel point was observed between 4 and 11 min (pH 6) in the milk with chymosins and 9–8 min (pH 5.9) in the milk with plant-derived proteases (Figure 2 and Table 3). Besides, the exponential aggregation of caseins ( $\tan \delta$  onset) took place in a range of less acidic pHs (5.8–5.6) than observed in the fermented milk without proteases (pH 5.3), except for the milk added with ficin (pH 5.38). Milk treatments added with chymosins generated gels with higher viscoelasticity (max  $G' = 64$ –70 Pa) in a shorter time (107–101 min) and at higher pH (5.5) than the milk without proteases (26 Pa, 562 min, and pH 4.7). The two plant-derived proteases also increased the maximum viscoelasticity of milk gels, but to a lower



**Figure 1** Acid-induced gelation of milk inoculated with *Lactococcus lactis* and incubated at 37 °C.





**Figure 2** Coagulation of milk inoculated with lactic acid bacteria (LAB) and assisted by different proteases: (a) milk added bovine chymosin, (b) milk added with recombinant camel chymosin, (c) milk added with bromelain and d) milk added with ficin.

extent than chymosins did. The fermented milk with bromelain had a maximum  $G'$  value of 63 Pa, and this value was reached at pH 4.6 in 482 min. In contrast, the fermented milk with ficin had a max  $G'$  of 33 Pa, which was achieved in 608 min, and at pH 4.7 (Figure 2, and Table 3).

From these results, adding a small volume of proteases during milk fermentation produced an early aggregation of caseins, and the maximum viscoelasticity of milk gels arose at a less acidic pH (Figure 2 and Table 3). In agreement with these findings, Schulz-Collins and Senge (2004) reported that adding chymosin to assist the acidic gelation of milk shortened the clotting time and increased the pH of casein aggregation from 5.44 to 6.31. These authors also described that the pH necessary to reach the maximum viscoelasticity was 5.0 in milk fermented, but it was 5.38 when the chymosin was incorporated during milk fermentation. The maximum viscoelasticity of acidic milk gels without proteases occurred near the isoelectric point of caseins (pH < 4.8). At this pH, the electrostatic and the steric repulsive forces are minimal, favouring the strong aggregation among caseins (Tuinier and Kruif 2002). However, when the acid-induced gelation of milk is assisted with proteases, milk acidification coincides with the hydrolysis of milk proteins. Therefore, the aggregation of caseins can arise in less acidic pH since the enzymatic cleavage of caseins reduces the electrostatic and steric repulsive force.

The two chymosins had a more noticeable effect on the acid-induced milk gelation than the two plant-derived proteases. Unlike other proteases, chymosins are highly efficient coagulating milk by acting on  $\kappa$ -caseins. The  $\kappa$ -caseins are small proteins (169 a.a.) located at the surface of casein micelles. A section of these  $\kappa$ -caseins (63 a.a.) protrude from the casein micelle providing a hairy mobile surface of  $\kappa$ -casein fragments that stabilise micelles sterically. The fragments of  $\kappa$ -caseins also contribute to the micelle charge density since these fragments contain 15 charged groups (pKa 4.9). Chymosins have evolved to cleave the fragments of  $\kappa$ -caseins exposed in outer surfaces of casein micelles. Such specificity diminishes the steric and electrostatic forces efficiently, favouring casein micelles' aggregation (Tuinier and Kruif 2002; De Kruif and Holt 2003). Therefore, it makes sense that adding chymosin during milk fermentation promoted the aggregation of casein micelles at less acidic pH. According to theoretical data reported by Tuinier and Kruif (2002), the removal of 50% of  $\kappa$ -caseins from the micelle surface increases the pH of maximum aggregation from 4.8 to 5.1. The further removal of  $\kappa$ -caseins (60%) increases the pH of maximum aggregation from 5.1 to 5.7, which agrees with our results (Figure 2, Table 3).

Plant-derived proteases were more proteolytic than chymosins (Table 2) and produced unspecific hydrolysis of caseins, as further detailed. Unlike chymosins, the unspecific

**Table 3** Rheological behaviour of milk fermented with *Lactococcus lactis* and added with different proteases at 15 Soxhlet units (SU) per 100 mL of milk.

Item		Milk without protease	Milk with recombinant camel chymosin	Milk with bovine chymosin	Milk with bromelain	Milk with ficin
<i>G</i> crossover	<i>G'</i> , <i>G''</i> (Pa)	0.03 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.02 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.03 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.02 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.02 ± 0.01 <sup>a</sup>
	Time (min)	134.4 ± 24.4 <sup>a</sup>	11.3 ± 7.6 <sup>b</sup>	4.8 ± 2.2 <sup>b</sup>	9.5 ± 2.7 <sup>b</sup>	18.7 ± 4.2 <sup>b</sup>
	pH	5.4 ± 0.2 <sup>a</sup>	6.0 ± 0.1 <sup>b</sup>	6.0 ± 0.1 <sup>b</sup>	5.9 ± 0.1 <sup>b</sup>	6.0 ± 0.1 <sup>b</sup>
tan δ onset	Time (min)	146.1 ± 3.7 <sup>a</sup>	40.7 ± 9.1 <sup>c</sup>	26.5 ± 12.0 <sup>d</sup>	71.7 ± 2.4 <sup>b</sup>	150.0 ± 3.0 <sup>a</sup>
	pH	5.3 ± 0.1 <sup>d</sup>	5.8 ± 0.2 <sup>b</sup>	5.9 ± 0.1 <sup>a</sup>	5.6 ± 0.1 <sup>c</sup>	5.4 ± 0.1 <sup>d</sup>
tan δ peak	Time (min)	ND	195.5 ± 45.4 <sup>a</sup>	216.0 ± 34.7 <sup>a</sup>	150.1 ± 21.9 <sup>a</sup>	ND
	pH	ND	5.1 ± 0.2 <sup>a</sup>	5.1 ± 0.1 <sup>a</sup>	5.3 ± 0.1 <sup>a</sup>	ND
Max <i>G'</i>	Time (min)	562.5 ± 40.9 <sup>a</sup>	107.8 ± 15.3 <sup>c</sup>	101.3 ± 22.1 <sup>c</sup>	482.0 ± 71.4 <sup>b</sup>	608.7 ± 46.9 <sup>a</sup>
	<i>G'</i> (Pa)	26.2 ± 6.5 <sup>c</sup>	64.1 ± 4.0 <sup>ab</sup>	70.9 ± 8.4 <sup>a</sup>	63.2 ± 12.8 <sup>b</sup>	33.3 ± 10.2 <sup>c</sup>
	pH	4.7 ± 0.1 <sup>c</sup>	5.5 ± 0.2 <sup>b</sup>	5.6 ± 0.1 <sup>a</sup>	4.6 ± 0.2 <sup>c</sup>	4.7 ± 0.1 <sup>c</sup>

Mean ± standard deviation; each treatment was replicated four times ( $n = 4$ ), means with the same letter in the same row did not have a significant difference (Tukey–Kramer test,  $\alpha = 0.05$ ).

ND = not detected.

proteolysis of caseins by plant-derived proteases had probably a lower impact decreasing the steric and electrostatic repulsive forces of casein micelles. Besides, some authors suggest that plant-derived proteases degrade their gel network (Kumar *et al.* 2010; Shah *et al.* 2014), explaining the weak gel structures built by these enzymes (Table 3).

### Proteolysis on milk gels

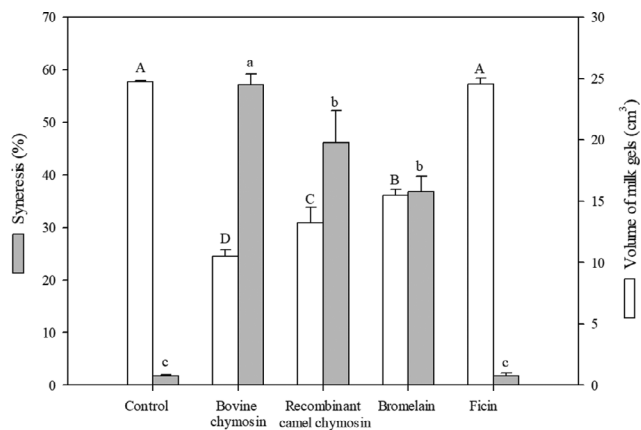
The two plant-derived proteases hydrolysed  $\kappa$ -caseins but also  $\alpha$ <sub>2</sub>-,  $\beta$ - and  $\alpha$ <sub>1</sub>-caseins (Figure 4). Other authors have also reported the unspecific hydrolysis that ficin and bromelain produce on caseins (Gallagher *et al.* 1994; Raskovic *et al.* 2016). In contrast, the chymosins caused limited hydrolysis on caseins (Figure 4). According to different authors, chymosins act specifically on  $\kappa$ -caseins and barely hydrolyse  $\alpha$ <sub>2</sub>-,  $\beta$ - and  $\alpha$ <sub>1</sub>-caseins. The cleavage of  $\kappa$ -caseins by chymosins occurs in the peptide bond between the Phe<sub>105</sub>–Met<sub>106</sub> bond of  $\kappa$ -casein, yielding a glyco-macropptide and *para*- $\kappa$  casein (Horne and Banks 2004; Crabbe 2004). About whey proteins, the proteases used in this study slightly hydrolysed the  $\alpha$ -lactalbumin ( $\alpha$ -La) and  $\beta$ -lactoglobulin ( $\beta$ -Lg). The bovine chymosin and the recombinant camel chymosin had a mild effect on  $\alpha$ -La and did not hydrolyse the  $\beta$ -Lg (Figure 4). According to Miranda *et al.* (1989), bovine chymosin can hydrolyse only 10% of  $\alpha$ -La under nonacidic conditions (pH < 4). Meanwhile, the bromelain protease hydrolysed to some extent both whey proteins (Figure 4).

### Syneresis of milk gels

After 24 h of incubation, milk gels without proteases (control) had a volume of 24.8 cm<sup>3</sup> and showed a slight whey release (syneresis = 1.8%). Incorporating bovine chymosin during

milk fermentation increased the percentage of syneresis to 57.2%. The volume of milk gels with bovine chymosin was 60% lower (10.1 cm<sup>3</sup>) than the volume of control milk gels without proteases. Milk gels added with recombinant camel chymosin had 46.1% of syneresis and 47% lower volume (13.2 cm<sup>3</sup>) than control. Bromelain protease also enhanced the syneresis (36%) and generated gels 37% smaller than control (15.5 cm<sup>3</sup>). In contrast, ficin protease did not augment the release of whey (1.8%) or change the volume of milk gels (24.6 cm<sup>3</sup>) compared to control milk gels (Figure 3). We also detected the shrinkage of milk gels during gel formation with the rheological analysis. The milk treatments added with either bovine chymosin or recombinant camel chymosin showed a well-defined peak on tan  $\delta$  response (Figure 2a,b). Such peak arose at pH 5.14, after milk gels reached their maximum viscoelasticity at pH ~ 5.5, denoting a prominent decrease in *G'* and *G''* values, which was interpreted as gel contraction. The milk added with bromelain also exhibited a small peak on the tan  $\delta$  response (Figure 2c), although this peak derived from the second increase of *G'* and *G''* at pH 5.35. The milk gels with ficin did not present any peak on the tan  $\delta$  response (Figure 2d), which was consistent with the small effect that this protease had on milk gel shrinkage and syneresis (Figure 3).

Milk gels induced by fermentation attained their maximal viscoelasticity at pH ~ 4.6 when the electrostatic and steric repulsive forces were minimal. Incorporating chymosin to assist the acid-induced gelation allowed to form milk gels at pH ~ 5.5. However, as the fermentation proceeded, these milk gels became more acid, and their structure got more compact with a concomitant release of water. The strong interaction among caseins in acidic pH is due to diminished electrostatic and steric repulsive forces at pHs below 5.5.

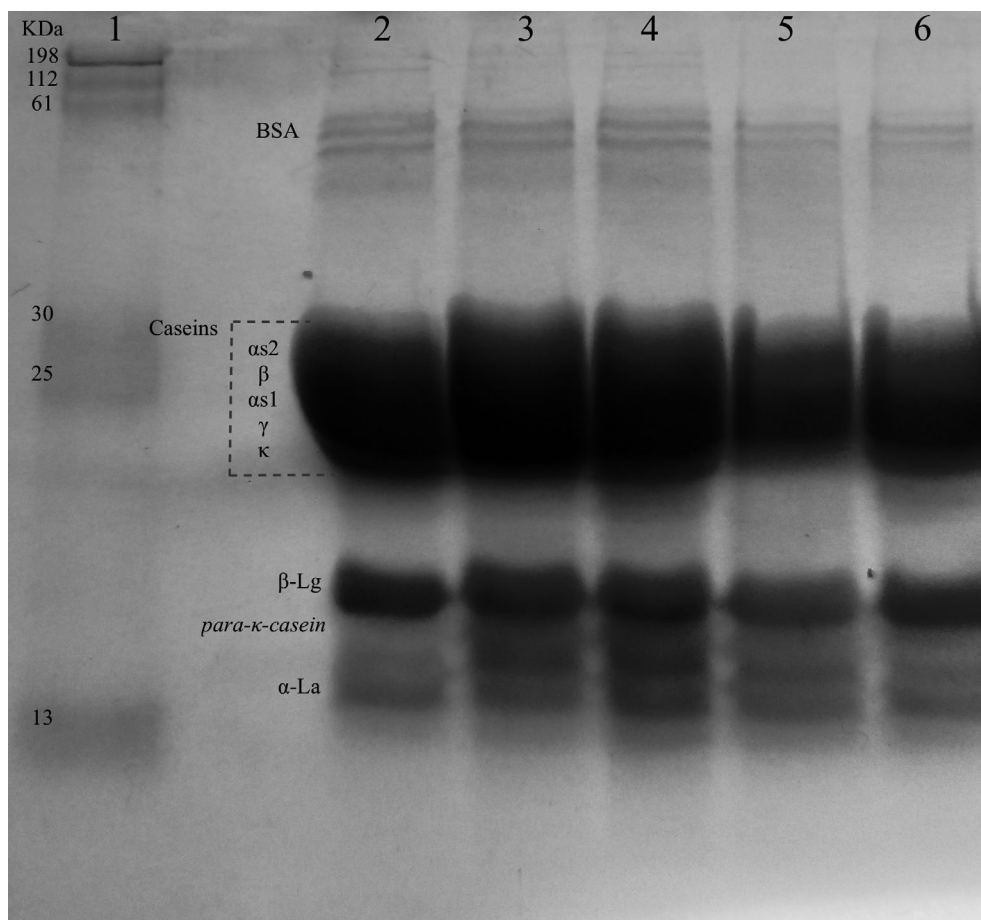


**Figure 3** Percentage of syneresis and volume of milk gels obtained from 25 mL of milk fermented with *Lactococcus lactis* (24 h, 37 °C) and added with different proteases.

Furthermore, most micellar calcium phosphate is solubilised below pH 5.5, and the casein strands can be re-arranged more easily (Lucey and Singh 1997; Tuinier and Kruif 2002; Sosme-Sánchez *et al.* 2017). The small syneresis observed in milk gels with ficin might be related to a coincidence between the rate of fermentation and the hydrolysis of caseins. Besides, the small peptides produced by the hydrolysis of caseins by ficin (Table 2 and Figure 4) probably increased the retention of water in the milk gels.

### CONCLUSION

Adding milk-clotting proteases to assist the acidic coagulation of milk is common in the manufacture of fresh acid-curd cheeses. From this work, it was evidenced that chymosins reduce the clotting time and increase the firmness of acid-induced milk gels but shrink the volume of milk gels



**Figure 4** SDS-PAGE of milk gels clotted by acidification and the addition of different proteases. Lane 1: molecular weight marker, lane 2: acidic milk gel without protease (control), lane 3: acidic milk gel with recombinant camel chymosin, lane 4: acidic milk gel with bovine chymosin, lane 5: acidic milk gel with bromelain and lane 6: acidic milk gel with ficin. BSA = serum albumin, β-Lg = beta-lactoglobulin, α-La = alpha-lactalbumin.

and promote syneresis. Chymosins are proteases that coagulate the milk efficiently, and therefore, these enzymes induced the gelation of milk in the first hour of fermentation. As the fermentation proceeded, the interaction among caseins became stronger, and the milk gels turned into a more compact structure with a simultaneous release of water. The plant-derived proteases (ficin and bromelain) also increased the firmness of acid-induced milk gels, although to a lower extent than chymosins. The proteolytic activity of ficin corresponded better with the fermentation rate of milk, and consequently, the release of water during the formation of acid-induced gels was minimal. Overall, when a firm texture is desirable, like in the cottage and fresh cheeses, the best option could be to use chymosin to assist their manufacture. In soft-acid-curd cheeses like Petite Suisse and cream cheese, the best is to use a plant-derived protease since these proteases generate soft gels without producing an excess of syneresis. However, further studies on plant-derived coagulants are needed to assess their impact on the flavour of soft-acid-curd cheeses.

## CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

**Jesús A Beltrán-Espinoza:** Investigation; methodology. **Berenice Domínguez-Lujan:** Investigation; methodology. **Néstor Gutiérrez-Méndez:** Conceptualization; formal analysis; resources; writing-original draft; writing-review & editing. **Carolina Nájera-Domínguez:** Methodology; project administration; supervision. **Dely R Chávez-Garay:** Methodology; project administration; supervision. **Martha Y Leal-Ramos:** Project administration; resources.

## DATA AVAILABILITY STATEMENT

Research data are not shared.

## REFERENCES

- Bijl E, Huppertz T, Van Valenberg H and Holt C (2019) A quantitative model of the bovine casein micelle: ion equilibria and calcium phosphate sequestration by individual caseins in bovine milk. *European Biophysics Journal* **48** 45–59.
- Bradford M M (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72** 248–254.
- Chávez-Garay D R, Gutiérrez-Méndez N, Valenzuela-Soto M E and García-Triana A (2016) Partial characterization of a plant coagulant obtained from the berries of *Solanum elaeagnifolium*. *CyTA - Journal of Food* **14** 200–205.
- Crabbe M (2004) Rennets: general and molecular aspects. In Fox, P F, McSweeney, P L H, Cogan, T M & Guinee, T P (Eds.), *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, pp. 19–45. San Diego: Elsevier Academic Press.
- De Kruif C G and Holt C (2003) Casein micelle structure, functions and interactions. In *Advanced Dairy Chemistry—1 Proteins: Part A/Part B*, pp. 233–276. Fox P F and McSweeney P L H, eds. Boston, MA: Springer, US.
- Fagan C C, O’Callaghan D J, Mateo M J and Dejmek P (2017) Chapter 6 - the syneresis of rennet-coagulated curd. In *Cheese*, 4th edn, pp. 145–177. McSweeney P L H, Fox P F, Cotter P D and Everett D W, eds. San Diego: Academic Press.
- Farkye N (2004a) Acid-and acid/rennet-curd cheeses part B: Cottage cheese. Fox, P F, McSweeney, P L H, Cogan, T M & Guinee, T P (Eds.), *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, pp. 329–341. Elsevier.
- Farkye N (2004b) Acid-and acid/rennet-curd cheeses part C: Acid-heat coagulated cheeses. In *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, pp. 343–348. Elsevier.
- Fox P F and Brodtkorb A (2008) The casein micelle: Historical aspects, current concepts and significance. *International Dairy Journal* **18** 677–684.
- Gallagher J, Kanekanian A D and Evans E P (1994) Hydrolysis of casein: a comparative study of two proteases and their peptide maps. *International Journal of Food Science & Technology* **29** 279–285.
- Gunasekaran S and Ak M M (2002) *Cheese Rheology and Texture*, pp. 96–109, 1st edn. Boca Raton: CRC Press.
- Gutiérrez-Méndez N, Balderrama-Carmona A, García-Sandoval S E, Ramírez-Vigil P, Leal-Ramos M Y and García-Triana A (2019) Proteolysis and rheological properties of cream cheese made with a plant-derived coagulant from *Solanum elaeagnifolium*. *Foods* **8** 1–11.
- Gutiérrez-Méndez N, Chávez-Garay D R and Jiménez-Campos H (2012) Exploring the milk-clotting properties of a plant coagulant from the berries of *S. elaeagnifolium* var. *cavanilles*. *Journal of Food Science* **71** 89–94.
- Harboe M, Broe M and Qvist K (2011) The production, action and application of rennet and coagulants. In *Technology of Cheesemaking*, pp. 98–129. Law B A and Tamime A Y, eds. Westmorland, UK: John Wiley and Sons.
- Horne D S and Banks J M (2004) Rennet-induced coagulation of milk. In *Cheese Chemistry, Physics and Microbiology*, pp. 47–70. Fox P F, McSweeney P L H, Cogan T M and Guinee T P, eds. Italy: Elsevier Academic Press.
- Horne D S and Lucey J A (2017) Chapter 5 - Rennet-induced coagulation of milk. In McSweeney, P L H F, Cotter, P F, Everett, P D & David, W (Eds.), *Cheese*, 4th edn, pp. 115–143. San Diego: Academic Press.
- Jacob M, Jaros D and Rohm H (2011) Recent advances in milk clotting enzymes. *International Journal of Dairy Technology* **64** 14–33.
- Kappeler S R, van den Brink H J M, Rahbek-Nielsen H, Farah Z, Puhani Z, Hansen E B and Johansen E (2006) Characterization of recombinant camel chymosin reveals superior properties for the coagulation of bovine and camel milk. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **342** 647–654.
- Kumar A, Grover S, Sharma J and Batish V K (2010) Chymosin and other milk coagulants: sources and biotechnological interventions. *Critical Reviews in Biotechnology* **30** 243–258.
- Lee W-J and Lucey J A (2003) Rheological properties, whey separation, and microstructure in set-style yogurt: effects of heating temperature and incubation temperature. *Journal of Texture Studies* **34** 515–536.

- Lucey J A, Johnson M E and Horne D S (2003) Perspectives on the basis of the rheology and texture properties of cheese. *Journal of Dairy Science* **86** 2725–2743.
- Lucey J A and Singh H (1997) Formation and physical properties of acid milk gels: a review. *Food Research International* **30** 529–542.
- Lucey J and Singh H (2003) Acid coagulation of milk. In *Advanced Dairy Chemistry—1 Proteins*, pp. 1001–1025. Fox P F and McSweeney P L H, eds. New York: Springer.
- McDonald C E and Chen L L (1965) The Lowry modification of the Folin reagent for determination of proteinase activity. *Analytical Biochemistry* **10** 175–177.
- Miranda G, Hazé G, Scanff P and Pélissier J P (1989) Hydrolysis of  $\alpha$ -lactalbumin by chymosin and pepsin. Effect of conformation and pH. *Lait* **69** 451–459.
- Raskovic B, Lazic J and Polovic N (2016) Characterisation of general proteolytic, milk clotting and antifungal activity of *Ficus carica* latex during fruit ripening. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **96** 576–582.
- Salvatore E, Pirisi A and Corredig M (2011) Gelation properties of casein micelles during combined renneting and bacterial fermentation: Effect of concentration by ultrafiltration. *International Dairy Journal* **21** 848–856.
- Schulz-Collins D and Senge B (2004) Acid-and acid/rennet-curd cheeses part A: quark, cream cheese and related varieties. In Fox, P F, McSweeney, P L H, Cogan, T M & Guinee, T P (Eds.), *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, Vol. **2**, pp. 301–328. Amsterdam, Netherlands: Elsevier.
- Shah M A, Mir S A and Paray M A (2014) Plant proteases as milk-clotting enzymes in cheesemaking: a review. *Dairy Science and Technology* **94** 5–16.
- Sosme-Sánchez T, Gutiérrez-Méndez N, Nápoles-Duarte J M, María Rodríguez-Valdez L and Chávez-Rojo M A (2017) Monte Carlo simulation study of acid coagulation in casein suspensions. *arXiv e-prints*, pp. arXiv:1703.08555.
- Tuinier R and Kruif C G D (2002) Stability of casein micelles in milk. *The Journal of Chemical Physics* **117** 1290–1295.
- Weber K and Osborn M (1969) The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Journal of Biological Chemistry* **244** 4406–4412.

## SUPPORTING INFORMATION

The following supporting information is available for this article:

**Figure S1.** Example of rheological data fitted to the sigmoidal function  $\eta = \eta_0 + \eta_s / 1 + e^{-k(t-t_c)}$  to obtain the time needed to start the milk clotting ( $t_0$ ).

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25

**Milk-gelling properties of trompillin protease extracted from the fruits of *Solanum elaeagnifolium* Cavanilles**

Carolina Nájera-Domínguez<sup>1</sup>, Néstor Gutiérrez-Méndez<sup>1\*</sup>, Diego E. Carballo-Carballo<sup>1</sup>,  
María Rosario Peralta-Pérez<sup>1</sup>, Blanca Sánchez-Ramírez<sup>1</sup>, Guadalupe Virginia Nevarez-  
Moorillon<sup>1</sup>, Armando Quintero-Ramos<sup>1</sup>, Antonio García-Triana<sup>1</sup>, and Efren Delgado<sup>2</sup>.

<sup>1</sup> The Graduate School, Graduate Program in Chemistry, Chemistry School,  
Autonomous University of Chihuahua, Mexico.

<sup>2</sup> Consumer and Environmental Sciences, College of Agricultural, New Mexico State  
University, New Mexico, USA.

\*Corresponding author: Néstor Gutiérrez-Méndez

Chihuahua, México C.P. 31125, Phone: +52(614) 23-66-000 ext. 4245.

E-mail: [ngutierrez@uach.mx](mailto:ngutierrez@uach.mx)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0791-3211>

26 **ABSTRACT**

27 Chymosin, an animal-derived protease, has been used in cheese processing since ancient  
28 times. Plant-derived proteases have been explored as an alternative replacement for  
29 chymosin-based rennets in the last decades. Nevertheless, only a few plant proteases can  
30 induce suitable milk gelation since their excessive proteolytic nature. In addition, there  
31 is little information on the gelling process of milk by using plant proteases or the  
32 combination of plant proteases with chymosin. As a result, plant proteases are  
33 frequently misused in the manufacture of cheese (i.e., wrong temperature, pH, or  
34 amount of protease), getting unsatisfactory results and concluding that plant proteases  
35 are not suitable for cheese production. This work aimed to study the protease enclosed  
36 in the ripe fruits of *Solanum elaeagnifolium* (commonly named trompillo) and its  
37 capability to form milk gels by itself and in combination with chymosin. Trompillo is an  
38 endemic plant from the United States, Mexico, and some regions of South America. The  
39 fruits from this plant have been used for decades to manufacture pasta filata-type  
40 cheeses in the north of Mexico; though, the protease from trompillo's fruits has been  
41 scarcely studied as well as its milk gelling properties. This work describes the  
42 temperature and pH dependence of trompillin, the cucumisin-like serine protease (57  
43 kDa) found in trompillo's fruits. Our result also showed that milk gels formed with the  
44 trompillin protease were softer and had a higher release of whey than the milk gels  
45 clotted with chymosin. However, the combination of trompillin with chymosin sped up  
46 the gelling process, improved the firmness of milk gels, and decreased the whey release  
47 from milk curds.

48 *Key words: Solanum elaeagnifolium, plant proteases, milk gelation*

49        **1. Introduction**

50        Milk coagulation is an essential step to manufacture most cheese types. Historically, the  
51        animal rennet extracted from calf abomasum has been used as a milk coagulant agent in  
52        cheese making. This calf rennet contains mainly the chymosin protease (50-95%) and a  
53        fraction of pepsin protease depending on the animal age [1]. Nowadays, chymosin-  
54        based rennets are still the most used milk coagulants in the cheese industry. However,  
55        not all the chymosin-based rennets come from the abomasal tissues of young ruminants.  
56        Currently, the calf chymosin gene is expressed in bacteria (*E. coli*), yeast  
57        (*Kluveryomyces lactis*), or molds (*Aspergillus niger var. awamori*) to meet the industrial  
58        demand for chymosin. These recombinant chymosins are becoming very popular among  
59        cheese makers since their high milk-clotting properties, vegetarian approval, kosher  
60        certification, and protection of animal rights. Nevertheless, the downside of  
61        recombinant chymosins is that some countries and consumers have concerns or negative  
62        perceptions of genetically modified organisms (GMOs) [1-3]. Therefore, plant proteases  
63        have been seen as an alternative replacement for chymosin-based rennets [4].

64

65        All the plants contain proteases, and plant genomes encode hundreds of different  
66        proteases [5]. However, only a few plant proteases can induce suitable milk gelation  
67        since their excessive proteolytic nature [6]. Unlike plant proteases, chymosin has low  
68        proteolytic activity and an elevated capability to coagulate ruminant milk. These  
69        chymosin features have physiological and nutritional significance for newborn  
70        ruminants. The low proteolytic activity avoids immunoglobulins hydrolysis, and milk  
71        coagulation stimulates an appropriate function of developing stomachs [3].

72



73 Chymosin is an aspartic protease (EC 3.4.23.4) which cleaves chiefly the bond between  
74 phenylalanine (a.a. 105) and methionine (a.a. 106) in  $\kappa$ -caseins; although, chymosin  
75 hydrolyzes to some extent  $\alpha_{s1}$ - and  $\beta$ -caseins [1, 3]. The hydrolysis of  $\kappa$ -caseins  
76 destabilizes the whole micelle with thousands of caseins ( $5 \times 10^3$ ) enclosed inside [7].  
77 This effect occurs because  $\kappa$ -caseins protrude from the micelle surface ( $8 \times 10^{-10}$  cm<sup>2</sup>);  
78 63 out of 169 amino acids are exposed on the micelle surface [7]. Such protruding  
79 amino acids provide micelle stabilization through steric and electrostatic forces, the last  
80 one because of the 15 charged groups (from  $\kappa$ -casein amino acids) in the exterior [8].  
81 The hydrolysis of  $\kappa$ -caseins protruding from casein micelles decreases in half the  
82 negative micelle charge (-20 mV) and minimizes the steric repulsion between casein  
83 micelles. Consequently, millions of casein micelles ( $10^{14}$ - $10^{16}$  micelles per mL of milk)  
84 aggregate and form gel networks [9]. In contrast to chymosins, the information on milk  
85 gelation by plant proteases is scarce, and it is not clear how differently casein micelles  
86 aggregate to form milk gels.

87

88 Many plant proteases have been explored as viable substitutes for chymosin-based  
89 rennets [10]. For instance, proteases extracted from date [11], papaya [12], ginger [13],  
90 grape [14], sunflower seed [15], orange blossom [16], ficus [17], fennel [18], and  
91 *Cynara cardunculus* flowers [19] have shown caseinolytic and milk-clotting activity. As  
92 far as our knowledge is concerned, only the cardosin protease extracted from *Cynara*  
93 *cardunculus* flowers is used for industrial-scale cheese production [6]. Besides cardosin,  
94 only a few plant proteases like those obtained from *Solanum elaeagnifolium* fruits are  
95 used in cheese making at artisanal or low-scale levels [20]. One main reason for the  
96 limited usage of plant proteases is their excessive caseinolytic activity and poor milk-  
97 clotting capacity [3, 15, 21]. Another reason is that most plant proteases have not been

98 completely characterized or studied. Accordingly, they could be misused in cheese  
99 production (i.e., wrong temperature, pH, or amount of protease), getting unsatisfactory  
100 results [6]. Additionally, there has been barely explored the use of plant protease to  
101 complement the gelling properties of chymosin-based rennets.

102

103 This work aimed to study the protease enclosed in the ripe fruits of *Solanum*  
104 *elaeagnifolium* and its capability to form milk gels by itself and in combination with  
105 chymosin. *Solanum elaeagnifolium* is an endemic plant from the southwest of the  
106 United States, the northeast of Mexico, and Argentina. Some common names for this  
107 plant are silver leaf nettle, white horse nettle, silver leaf bitter apple, meloncillo del  
108 campo, revienta caballo, and trompillo (most used name). For decades, trompillo's fruits  
109 have been used in Mexico to manufacture pasta filata-type cheeses, specifically artisanal  
110 Asadero cheese [20], which share similarities with Mozzarella cheese [22]. However,  
111 little is known about the gelling properties of the protease from trompillo's fruits.

112

113 **2. Materials and methods**

114 *2.1 Vegetable material*

115 Fruits from *Solanum elaeagnifolium* Cavanilles plants (Trompillo) were collected in  
116 Chihuahua, Mexico during the fall and winter of 2019. First, the yellow and dry fruits  
117 (Table 1) were grounded with a knife mill (Thomas Wiley Fisher, model 3383-L19,  
118 Swedesboro, NJ, USA) and sieved through a 0.841 mm mesh (mesh number 20). Next,  
119 the gross composition of the fruits powder was determined according to the AOAC  
120 methods (ash 942.05, fat 948.22, protein 960.52, moisture 934.01, total, soluble, and  
121 insoluble fiber 991.43). Finally, the fruits powder was stored in hermetic-sealed plastic  
122 bags at -20 °C.

123

124 *2.2 Proteases*

125 This study used two types of chymosins and the protease extracted and purified from  
126 Trompillo's fruits (details below). One of the chymosins used was recombinant camel  
127 chymosin expressed in *Aspergillus niger* var. *awamori* with EC 3.4.23.4 (Chy-Max  
128 M1000, Chr Hansen, Horsholm, Denmark). The other chymosin used was bovine  
129 chymosin from the calf stomach with EC 3.4.23.4 (Sigma Aldrich St. Louis, MO).

130

131 *2.3 Extraction and purification of proteases from Trompillo's fruits*

132 The fruits powder was mixed in a ratio of 1:3 (w/v) with sodium acetate buffer (0.05 M,  
133 pH 5) added with NaCl (50 g L<sup>-1</sup>). This mixture was kept under magnetic stirring for 24  
134 hours at 4°C. Then, the liquid was filtered through three layers of gauze and centrifuged  
135 at 3000 × g for 20 min at 4 °C. The resulted supernatant was filtered (Whatman No. 1

136 filter paper) and stored at -20 °C until use. Such supernatant was considered the crude  
137 extract (CE), and it was later used in proteases purification.

138

139 The CE was subject to protein precipitation using ammonium sulfate at various saturation  
140 levels. All the saturation processes were conducted under continuous stirring (600 rpm)  
141 at 0°C for 30 minutes. Proteins precipitated were recovered by centrifugation (3200 × g,  
142 20 min at 4 °C) and resuspended (1:3 v/v) in sodium acetate buffer (0.05 M, pH 5) [23,  
143 24]. These experiments showed that proteins precipitated with 50% of ammonium sulfate  
144 saturation had the highest proteolytic activity. Therefore, this protein fraction was further  
145 purified by size exclusion chromatography using Sephadex G-100 (Sigma Aldrich St.  
146 Louis, MO) and sodium acetate buffer (0.05 M, pH 5) as mobile phase.

147

#### 148 *2.4 Characterization of the plant-derived protease*

149 First, the protein content in the purified fraction with proteases was quantified according  
150 to Bradford's method [25]. Then, the purified protease fraction was analyzed by sodium  
151 dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) as described by  
152 Chávez-Garay, Gutiérrez-Méndez [26]. Additionally, a gel zymogram analysis was  
153 performed to confirm the presence of proteases in the purified protein fraction. The gel  
154 used for this purpose was an SDS-polyacrylamide gel added with casein at 20 g L<sup>-1</sup>. This  
155 gel was run at 100 volts (Miniprotean II cell, Bio-Rad, CA) until the bromophenol blue  
156 dye marked reached the gel bottom. Next, the gel was washed with Triton X-100 (25 g  
157 L<sup>-1</sup>) for 30 minutes and submerged into tris-buffer solution (50mM tris, pH 7, 5mM  
158 CaCl<sub>2</sub>, and 0.2 M NaCl) for 48 h at 37 °C. Finally, the gel was stained with Coomassie  
159 blue dye and slightly washed with the tris-buffer solution. The clear zone that appears  
160 upon gel staining indicates proteolytic activity [27].

161

162 The proteolytic activity of proteases was measured by Lowry's method [28] with slight  
163 modifications [29]. Briefly, 25  $\mu\text{L}$  from the purified protease fraction was added to 130  
164  $\mu\text{L}$  of casein solution ( $6 \text{ g L}^{-1}$ ) and incubated at  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  for 10 min. The reaction was stopped  
165 with 130  $\mu\text{L}$  of 100 mM trichloroacetic acid (TCA). The mixture was centrifuged at 3000  
166  $\times g$  for 15 min at  $10 \text{ }^\circ\text{C}$  to separate the hydrolyzed (supernatant) and non-hydrolyzed  
167 (sediment) caseins. Then, a supernatant aliquot of 250  $\mu\text{L}$  was mixed with 625  $\mu\text{L}$  of  
168  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (0.5 M) and 125  $\mu\text{L}$  of Folin-Ciocalteu reagent (0.2N). This mixture was  
169 incubated for 30 min at  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  and read at 760 nm (Biotek, Elx808, Winooski, VT, USA).  
170 Sample blank was prepared similarly but substituting the protease solution with distilled  
171 water. The calibration curve was built using tyrosine standards (5.5, 11, 27.5, and 55  $\mu\text{M}$ ).  
172 The reaction velocity ( $v$ ) was calculated with equation one, where  $[\text{Tyr}_{protease}]$  and  
173  $[\text{Tyr}_{blank}]$  are the calculated concentration of tyrosine in the protease solution and the  
174 blank. Meanwhile,  $t$  represents the time of reaction (10 min). The proteolytic activity (PA)  
175 was calculated with equation 2, where  $V_{enzyme}$  is the volume of enzyme used (25  $\mu\text{L}$ ), and  
176  $V_{reaction}$  is the volume of reaction (155  $\mu\text{L}$ ). One unit of enzyme activity ( $\text{U}_{\text{Tyr}}$ ) was the  
177 amount of enzyme that releases one micromole of tyrosine equivalents per minute of  
178 reaction.

179 
$$V = \frac{[\text{Tyr}_{protease}] - [\text{Tyr}_{blank}]}{t} \quad (1)$$

180 
$$PA = \frac{v \times V_{reaction}}{V_{enzyme}} \quad (2)$$

181

182 The proteolytic activity of Trompillo's proteases was also assessed in a range of  
183 temperatures (20 to  $90 \text{ }^\circ\text{C}$ ) and pHs (5 to 9) to find the better reaction conditions. In  
184 addition, proteolytic activity assays were conducted in the presence of different protease  
185 inhibitors to identify the possible type of protease. The inhibitors used were 10 mM

186 ethylene diamine tetra-acetic acid (EDTA) as a metalloprotease inhibitor, 10 mM  
187 phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) as a serine-protease inhibitor, 0.01 mM pepstatin  
188 A as an aspartic-protease inhibitor, and 0.01 mM trans-epoxysuccinyl- L -leucylamido  
189 (4-guanidino)-butane (E-64) as a cysteine-protease inhibitor.

190

### 191 *2.5 Milk-clotting properties of proteases*

192 The milk-clotting activity (MCA) of proteases was studied by following changes in milk  
193 viscosity during the coagulation process. The tests were conducted in a rotational  
194 rheometer (Anton Paar, Rheolab QC, Austria) with a concentric cylinder geometry and a  
195 conical tip (CC39,  $\varnothing$  3.899 cm, 132°). Before the assays, pasteurized milk (% fat  
196  $3.07 \pm 0.06$ , % protein  $2.68 \pm 0.026$ , % lactose  $3.82 \pm 0.040$ ) was warmed at 30 °C and added  
197 with  $\text{CaCl}_2$  ( $0.2 \text{ g L}^{-1}$ ). Then, milk was poured in the rheometer cup (70 mL) and added  
198 with an adequate volume of protease solution to clot the milk in ~40 min. The volume of  
199 each enzyme added into the milk was as follow: recombinant camel chymosin = 15  $\mu\text{L}$   
200 ( $1.30 \text{ mg protein mL}^{-1}$ ), chymosin from calf stomach = 20  $\mu\text{L}$  ( $0.63 \text{ mg protein mL}^{-1}$ ), and  
201 Trompillo's protease = 27  $\mu\text{L}$  ( $0.63 \text{ mg protein mL}^{-1}$ ). All the rheological tests were  
202 performed under a constant shear rate of  $50 \text{ s}^{-1}$  at 30 °C.

203

204 Data were collected for 80 minutes with the rheometer software (Theoplus V3.20,  
205 Ostfildern, Germany) and fitted to the four-parameter sigmoidal function (Figure 1). In  
206 this equation three,  $\eta_0$  is the initial viscosity or milk viscosity,  $\Delta\eta_1$  is the increase of  
207 viscosity during gel formation,  $t$  is the time of incubation,  $t_c$  is the time to reach half  
208 maximum viscosity, and  $b$  is the reciprocal value for the rate of caseins aggregation ( $k$ ).

$$209 \quad \eta = \eta_0 + \frac{\Delta\eta_1}{1 + e^{-(t-t_c)/b}} \quad (3)$$

210

211 The MCA for each protease solution was calculated with equation four. In such equation,  
212  $V_{\text{milk}}$  and  $V_{\text{protease}}$  are the volume of milk and protease used. The equation term  $t_c+2b$   
213 represents the time to reach the gel point or maximal viscosity ( $t_s$ ), and it was obtained  
214 from equation three. The MCA values were expressed in Soxleth units (SU) per milliliter  
215 of protease solution. One SU was defined as the volume of milk (mL) that can be clotted  
216 by one milliliter of protease solution in 40 min at 30 °C.

217

$$218 \quad MCA = \frac{V_{\text{milk}}}{V_{\text{protease}}} \times \frac{1\text{mL protease}}{40 \text{ min}} \times (t_c + 2b) \quad (4)$$

219

## 220 *2.6 Milk-protein hydrolysis during gel formation*

221 The breakdown of milk proteins by Trompillo's protease during the gelling process was  
222 monitored at time intervals. For this purpose, sterile tubes were filled with 70 mL of  
223 pasteurized milk added with  $\text{CaCl}_2$  ( $0.2 \text{ g L}^{-1}$ ). Next,  $27 \mu\text{L}$  ( $0.63 \text{ mg protein mL}^{-1}$ ) of  
224 the plant-derived protease were incorporated into the milk and incubated at 30 °C. At  
225 ten-minute intervals, one milliliter of milk or milk-gel was taken from each tube and  
226 mixed with one milliliter of TCA to stop protease activity. These milk samples were  
227 analyzed by SDS-PAGE and proteolytic activity as described in previous sections.

228

## 229 *2.7 Syneresis in milk gels*

230 By triplicate, 35 mL of milk with  $\text{CaCl}_2$  ( $0.2 \text{ g L}^{-1}$ ) were poured in sterile tubes and added  
231 with the corresponding protease solution (see details above). The tubes were incubated at  
232 30°C for 80 minutes for milk gel formation. Then, the tubes were centrifuged for ten  
233 minutes at 10 °C and  $300 \times g$ . The volume of whey released after centrifugation was  
234 measured and weighted. Syneresis was expressed as the relative percentage of whey

235 released from the milk gels after 80 minutes of incubation [30]. Protein content in the  
236 whey released by the milk gels was analyzed by Bradford's method [25]. In addition, the  
237 whey was subject to SDS-PAGE analysis to investigate the milk proteins and peptides in  
238 the whey.

239

## 240 *2.8 Statistical analysis*

241 A randomized one-factor design was used for the comparative analysis between the plant-  
242 derived protease and the chymosins. The experimental factor ( $\tau_i$ ) was the type of protease  
243 with the following levels: 1) plant-derived protease, 2) recombinant camel chymosin, and  
244 3) bovine chymosin. Each treatment was replicated three times ( $n = 3$ ). The data collected  
245 were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) and Tukey-Kramer multiple  
246 range test ( $\alpha = 0.05$ ).

247

## 248 **3. Results and discussion**

### 249 *3.1 Extraction and purification of plant-derived protease*

250 The powder obtained from the yellow fruits of *Solanum elaeagnifolium* contained  
251 mostly carbohydrates, primarily fiber. The content of proteins in Trompillo dried fruits  
252 was 10.1% (Table 1). Other authors have reported protein content ranging from 4.5 to  
253 13.8% [20]. Composition discrepancies arise chiefly because of differences in the water  
254 content of fruits. The fruits of *Solanum elaeagnifolium* are produced during the summer  
255 (one single plant produces up to 60 fruits). At first, the fruits are green with white  
256 patches and fleshly with large water content [31]. These greenish fruits have no  
257 proteolytic or milk-clotting activity, suggesting that Trompillo's protease is in a  
258 zymogen form in this maturity stage [26]. Trompillo's fruits become dehydrated and  
259 turn yellow-orange during the hot summer months (Table 1). Such ripened and



260 dehydrated fruits are brittle, break easily, release many flat seeds (up to 120 seeds per  
261 fruit) [32], and have a high proteolytic and milk-clotting activity [26]. According to  
262 Chávez-Garay, Gutiérrez-Méndez [26], the proteolytic activity in dehydrated  
263 Trompillo's fruits is either in the fruit peels or seeds. Therefore, we milled whole  
264 dehydrated yellow-orange fruits to recover and purify Trompillo's protease in this work.

265

266 In the purification process, first, a crude extract (CE) from Trompillo dried fruits was  
267 obtained. Eleven proteins were observed in this CE (Figure 2a) with the following  
268 molecular weights: 66, 57, 45, 36, 34, 26, 22, 19, 15, 11, and 8 kDa. After precipitation  
269 of CE proteins with ammonium sulfate at diverse saturation levels, it was detected that  
270 the precipitate obtained at 50% of saturation had the highest proteolytic activity. This  
271 ammonium sulfate precipitate was further purified through size exclusion  
272 chromatography (Sephadex G-100), and the protein fraction with the maximum  
273 proteolytic activity was selected. According to the SDS-PAGE analysis (Figure 2), the  
274 protein fraction selected had a 57 kDa protein and traces of another protein with a  
275 molecular weight of 66 kDa (Figure 2b). It is worth mentioning that the purification  
276 process was replicated at least three times, and always the fraction with the 57 kDa  
277 protein had the highest proteolytic activity. In addition, the proteolytic zymogram  
278 analysis (Figure 2c) confirmed the presence of proteases in this protein fraction.  
279 Therefore, it was concluded that Trompillo's protease has a molecular weight of 57  
280 kDa. Hereafter, this protease will be referred to as "*trompillin*".

281

282 In previous work on the partial characterization of Trompillo's protease, we observed  
283 that this protease could have a molecular weight between 50 to 70 kDa [26], which

284 agrees with the 57 kDa of trompillin. Other authors have purified proteases from plants  
285 similar to *Solanum elaeagnifolium*. For instance, Ahmed, Morishima [33] purified from  
286 the fruit seeds of *Solanum dubium*, a milk-clotting protease (dubiumin) with a molecular  
287 weight of 66 kDa. *Solanum dubium* Fresen is an endemic plant from Sudan used to  
288 make goat and sheep cheese using its ripe yellow fruits [34]. *S. dubium* and *S.*  
289 *elaegnifolium* are plants that share many phenotypic characteristics, differing only in  
290 the size and shape of their leaves and the presence of sharp spines in the stem and  
291 unripe fruits of *S. dubium*. Therefore, dubiumin and trompillin may be closely related  
292 proteases. Furthermore, dubiumin and trompillin proteases could share similarities with  
293 other milk-clotting proteases obtained from ripe fruits of diverse *Solanum* genus plants.  
294 For example, Guiama, Libouga [35] described the milk-clotting activity of ripe fruits  
295 from nine *Solanum* plants that are endemic from Cameroon (*S. acuelustrum*, *S.*  
296 *aethiopicum*, *S. anomalum*, *S. cerasiferum*, *S. dasyphyllum*, *S. indicum*, *S. nigrum*, *S.*  
297 *nodiflorum*, and *S. terminale*). Unfortunately, the milk-clotting proteases from these  
298 plants have not been purified and characterized.

299

### 300 3.2 Characterization of trompillin protease

301 The capability of trompillin protease to hydrolyze caseins was studied in a range of  
302 different temperatures and pHs. It was observed that under neutral pH conditions (pH  
303 7), the maximal proteolytic activity of trompillin occurred at 30 °C (Figure 3). Results  
304 also showed that this plant-derived protease was thermostable, keeping a sizeable  
305 proteolytic activity at temperatures above 70 °C (Figure 3). Similar results were  
306 obtained by Bodansky [36], who described that trompillin had activity even at 84 °C.  
307 The best pH condition for caseins hydrolysis by trompillin at 30 °C was at pH 9 (Figure  
308 3). The kinetic study of caseins hydrolysis by trompillin under normal milk-clotting

309 conditions (30 °C and pH 7) revealed that the enzymatic reaction was completed within  
310 the first 20 minutes of incubation (Figure 4). After one incubation hour, the remaining  
311 proteolytic activity was low (Figure 4). These results were further confirmed by SDS-  
312 PAGE analysis in the milk-gel formation experiments (see details below).

313

314 Trompillin was identified as a serine-protease enzyme according to the inhibitors'  
315 results and because of its high activity under harsh conditions of temperature and pH  
316 (Figure 3). The aspartic protease inhibitor (pepstatin A) and the cysteine protease  
317 inhibitor (E-64) reduced the proteolytic activity of trompillin by 55 and 66%. In  
318 contrast, the PMSF and EDTA inhibitors decreased by 79 and 70% of the specific  
319 proteolytic activity of trompillin. The EDTA is considered a metalloproteinase inhibitor,  
320 and the PMSF is a serine protease inhibitor. Unlike the metalloproteinases (EC 3.4.24)  
321 [37], the plant serine proteases (EC 3.4.21) are stable and active at high temperatures  
322 (30 to 80 °C) and alkaline conditions (pH 7 to 11) [38, 39]. Therefore, we concluded  
323 trompillin is a serine protease, specifically a cucumisin-like serine protease. The  
324 cucumisin-like serine proteases exhibit a strong caseinolytic activity, have a molecular  
325 mass of ~60 kDa, and some of them show high milk-clotting activity. Some examples of  
326 cucumisin-like serine proteases with high milk clotting activity are the dubiumin (66  
327 kDa) from *Solanum dubium* [33], the cucumisin (66-68 kDa) from *Cucumis melo* [40],  
328 and the religiosin C (80 kDa) from *Ficus religiosa* [41]. Other authors coincide in  
329 identifying the protease from the ripe fruits of *Solanum elaeagnifolium* as a cucumisin-  
330 like serine protease [20, 42].

331

332 *3.3 Proteolytic and milk-clotting activity of trompillin and chymosins*

333 The specific proteolytic activity of trompillin (UTyr per mg of protein) was almost  
334 twice as high as the recombinant camel chymosin and the chymosin from the calf  
335 stomach (Table 2). Similar results have been reported with other plant-derived  
336 proteases. For instance, the ficin from fig tree latex and the bromelain from pineapple  
337 steam have been reported with higher specific proteolytic activity than the recombinant  
338 camel chymosin and the calf chymosin [30]. Likewise, the dubiumin from the fruits of  
339 *Solanum dubium*, and the papain from papaya fruit, have shown superior proteolytic  
340 activity than chymosins [34]. Overall, it has been well documented that most plant-  
341 derived proteases have a strong caseinolytic activity, contrasting with the low  
342 proteolytic activity of chymosins [3, 6].

343

344 In comparison with other plant-derived proteases, trompillin had greater milk-clotting  
345 activity (841 SU mg protein<sup>-1</sup>) than ficin (433 SU mg protein<sup>-1</sup>), bromelain (57 SU mg  
346 protein<sup>-1</sup>)[30], and dubiumin (30 SU mg protein<sup>-1</sup>)[33]. However, trompillin protease  
347 had a much lower capacity to clot the milk than the recombinant and calf chymosins  
348 (Table 2). As far as we know, any plant-derived protease has superior milk-clotting  
349 activity than chymosin, not even the cardosins A and B from *Cynara cardunculus* [43],  
350 which are plant proteases used in the industrial manufacture of cheese [6]. Indeed, most  
351 plant proteases cannot coagulate the milk, chiefly because they hydrolyze caseins  
352 extensively, avoiding the formation of gel networks. Only a few plant proteases can  
353 induce milk gelation, though these vegetable coagulants usually present a very low ratio  
354 of milk-clotting activity to proteolytic activity (MCA/PA) [6, 15, 44]. The MCA/PA  
355 ratio for trompillin was 6.83, which was larger than reported for other plant proteases  
356 like ficin (0.6) and bromelain (0.1) [30, 45], but lower than observed in the recombinant  
357 camel chymosin (187) or the chymosin from the calf stomach (223) (Table 2). These

358 large MCA/PA ratios indicate chymosins produce a very low (and specific) proteolysis  
359 on milk proteins, which induces the coagulation of a large volume of milk [9].  
360 Therefore, chymosin remains the preferred coagulant in cheese manufacturing.

361

### 362 *3.4 Formation of milk gels by using trompillin and chymosins*

363 Trompillin protease generated softer milk gels than the two chymosins (Table 3). The  
364 maximal viscosity ( $\eta_s$ ) reached in the milk clotted with trompillin was 7 mPa s, which  
365 means a viscosity increase ( $\Delta\eta$ ) of 5 mPa s. In contrast, the recombinant chymosin and  
366 the calf chymosin had  $\eta_s$  of 10 and 9 mPa s with  $\Delta\eta$  of 8 and 7 mPa s, respectively.  
367 Interestingly, when the recombinant chymosin was mixed with the trompillin protease,  
368 the milk gels attained a maximal viscosity ( $\eta_s$ ) of 12 mPa s, indicating a viscosity  
369 increase ( $\Delta\eta$ ) of 10 mPa s (Table 3).

370

371 The enzyme volume for each protease was adjusted to trigger milk proteins aggregation  
372 in ~40 minutes ( $t_0$ ). The trompillin protease and the two chymosins had a  $t_0$  of around  
373 38 minutes, with no difference between them (Figure 5, Table 3). However, the  
374 aggregation of milk proteins happened at different rates ( $k$ ), depending on the protease  
375 used. For example, the  $k$ -value for trompillin was about half the value of the two  
376 chymosins (Table 3). Consequently, the time to induce milk gelation once milk proteins  
377 started their aggregation ( $\Delta t = t_s - t_0$ ) was longer in the milk clotted with trompillin ( $\Delta t =$   
378 15 min) than in milk clotted with chymosins ( $\Delta t = 8-9$  min). Overall, the gelling  
379 process in milk added with the trompillin protease was slower than observed for the  
380 recombinant chymosin and the calf chymosin. Nevertheless, trompillin combined with  
381 chymosin accelerated the milk-gelling process significantly ( $\Delta t = 5$  min).

382

383 According to the SDS-PAGE analysis, the trompillin protease hydrolyzed more milk  
384 proteins during the milk coagulation process than chymosins did (Figure 6). Unlike  
385 chymosins (Figure 6B), the trompillin hydrolyzed all types of caseins, particularly the  
386  $\kappa$ -caseins, which were almost totally depleted within the first 30 minutes (Figure 6A).  
387 Trompillin protease did not hydrolyze whey proteins like  $\beta$ -lactoglobulins, perhaps  
388 because of their native globular conformation (Figure 6A). It is also worth mentioning  
389 that some peptides derived from caseins hydrolysis by trompillin were held in the milk  
390 gel matrix. These peptides had a molecular weight of  $\sim 14$  kDa and were probably poor  
391 water-soluble since they did not migrate to the whey during gel syneresis.

392

393 Milk coagulation by chymosin has been extensively studied, and there is a consensus  
394 that chymosin-induced coagulation occurs in two stages [3, 46]. In the first stage,  
395 chymosins hydrolyze the  $\kappa$ -casein fragments protruding from casein micelles.  
396 Hydrolysis of  $\kappa$ -caseins decreases in half (from  $-20$  mV to  $-10$  mV) the repulsive forces  
397 between casein micelles, favoring their further aggregation (stage two) [46, 47]. It has  
398 been estimated that only 60% of  $\kappa$ -caseins have to be hydrolyzed to induce casein  
399 micelles aggregation, which explains the effectiveness of chymosins gelling milk [8]. In  
400 this work, we confirmed chymosins produce limited and specific hydrolysis on milk  
401 proteins (Table 2, Figure 5B), but such low proteolytic activity induces the formation of  
402 very cohesive milk gels in a short time (Table 3, Figure 6). Unlike chymosins,  
403 trompillin protease depleted almost all  $\kappa$ -caseins in 40 minutes and hydrolyzed the other  
404 casein types to some extent (Figure 6A). It is essential to highlight that trompillin  
405 protease did not hydrolyze caseins completely; in fact, most  $\beta$ -caseins and  $\alpha_{s1}$ -caseins  
406 remained unhydrolyzed by trompillin after 80 minutes (Figure 6B). The hydrolysis of  $\kappa$ -

407 caseins by trompillin induced the aggregation of casein micelles, but they aggregated  
408 slowly (low  $k$ ) and weakly (low  $\eta_s$ ). These results indicate that either repulsive forces,  
409 steric impediments, or both remained in the casein micelles when they started their  
410 aggregation. It is also likely that caseins aggregation hindered the action of trompillin  
411 on caseins, avoiding excessive caseins' hydrolysis. These results are not exclusive to  
412 trompillin, and it has been reported that other plant proteases like ficin and bromelain  
413 induce slow coagulation of milk and the formation of soft milk gels [30].

414

415 Casein micelles aggregated faster and stronger when chymosin and trompillin were  
416 mixed (Figure 5, Table 3). The unspecific hydrolysis carried out by trompillin over all  
417 casein types (Figure 6A), combined with the very specific hydrolysis of chymosin on  $\kappa$ -  
418 caseins (Figure 6B), had a significant impact on casein micellar stability. It is probable  
419 that the action of the two proteases simultaneously minimized quickly and efficiently  
420 the repulsive forces and the steric impediments between casein micelles. As a result,  
421 strong gels were formed in a brief time (Figure 5, Table 3).

422

### 423 *3.5 Syneresis of milk gels clotted with trompillin and chymosins*

424 The percentage of whey released after 80 minutes was substantially higher for the milk  
425 gels clotted with trompillin (31%) than for chymosin-induced gels (4%). In addition, the  
426 whey released from trompillo-induced milk gels had nine times more protein than the  
427 whey from chymosin-induced gels (Table 4). The proteins in the whey released from  
428 trompillin-induced gels were mostly caseins or partially hydrolyzed caseins, whey  
429 proteins, and peptides of ~18 kDa (Figure 7). This excessive syneresis and migration of  
430 caseins were minimized by mixing the trompillin protease with the recombinant camel

431 chymosin. As a result, the milk gels clotted with such protease's mixture had a low  
432 percentage of syneresis (3%) and the whey released had a little protein (Table 4).

433

434 Milk gels coagulated with other plant proteases like ficin and bromelain have also  
435 shown higher syneresis than chymosin-clotted milk gels [30]. Unlike chymosins, plant  
436 proteases hydrolyze the  $\kappa$ -caseins protruding from the casein micelles but also the  $\beta$ -,  
437  $\alpha_{s1}$ - and  $\alpha_{s2}$ -caseins at nonspecific cleavage sites (Figures 6 and 7). Such extensive and  
438 random hydrolysis induces the formation of weak gel networks (Figure 5) unable to  
439 hold much water or casein fragments in their structure (Table 4). However, the  
440 extensive and random hydrolysis generated by plant proteases combined with  
441 chymosin's low and specific activity led to strong milk gel structures (Figure 5). These  
442 chymosin-trompillin-induced milk gels hold a larger amount of water (Table 4),  
443 probably because of its ordered arrangement of casein micelles. Furthermore,  
444 trompillin-derived peptides likely helped increase the water retention inside the milk gel  
445 structure.

446

#### 447 **4. Conclusions**

448 The ripen fruits of *Solanum elaeagnifolium* contain a cucumisin-like serine protease  
449 with a molecular weight of 57 kDa, which was named trompillin in this work. This  
450 protease has a high caseinolytic activity under neutral or alkaline conditions, chiefly at  
451 30 °C. This plant protease showed lower milk-clotting activity to proteolytic activity  
452 ratio (MCA/PA) than the chymosin from the calf stomach and the recombinant camel  
453 chymosin. In addition, the milk gels formed with the trompillin protease were softer and  
454 had a higher release of whey than chymosin-induced gels. Overall, our results coincide



455 with those reported for other plant proteases, which leads us to assume that most plant  
456 proteases, including trompillin, cannot substitute the commercial chymosin-based milk  
457 coagulants. However, it is worth highlighting that combining the chymosin protease  
458 with the plant protease trompillin sped up the gelling process, improved the firmness of  
459 milk gels, and decreased the whey release from milk curds. Therefore, trompillin could  
460 be combined with chymosin to improve the cheese yield and change certain cheese  
461 features like cheese texture and probably cheese melting.

462

#### 463 **Data availability**

464 Readers can access the data supporting the conclusions of this study on the following link:

465 [https://osf.io/km3x5/?view\\_only=fca9d4a641204dd18b5ecede7abe5d5d](https://osf.io/km3x5/?view_only=fca9d4a641204dd18b5ecede7abe5d5d)

466

#### 467 **Conflict of interest**

468 The authors declare that there is no conflict of interest regarding the publication of this paper.

469

#### 470 **Funding statement**

471 The Mexican National Council of Science and Technology (CONACyT) supported this research  
472 through the doctoral grant conceded to Carolina Nájera-Dominguez.

473

## References

474

475

- 476 1. Jacob, M., D. Jaros, and H. Rohm, *Recent advances in milk clotting enzymes*.  
477 International Journal of Dairy Technology, 2011. **64**(1): p. 14-33.
- 478 2. Fguiri, I., et al., *Camel Milk-Clotting Using Plant Extracts as a Substitute to*  
479 *Commercial Rennet*. Journal of Chemistry, 2021. **2021**: p. 6680246.
- 480 3. Kumar, A., et al., *Chymosin and other milk coagulants: sources and*  
481 *biotechnological interventions*. Critical Reviews in Biotechnology, 2010. **30**(4):  
482 p. 243-258.
- 483 4. Tronson, R., M. Ashokkumar, and F. Grieser, *Comparison of the Effects of*  
484 *Water-Soluble Solutes on Multibubble Sonoluminescence Generated in Aqueous*  
485 *Solutions by 20- and 515-kHz Pulsed Ultrasound*. The Journal of Physical  
486 Chemistry B, 2002. **106**(42): p. 11064-11068.
- 487 5. van der Hoorn, R.A.L., *Plant Proteases: From Phenotypes to Molecular*  
488 *Mechanisms*. Annual Review of Plant Biology, 2008. **59**: p. 191-223.
- 489 6. Shah, M.A., S.A. Mir, and M.A. Paray, *Plant proteases as milk-clotting enzymes*  
490 *in cheesemaking: a review*. Dairy Science and Technology, 2014. **94**(1): p. 5-16.
- 491 7. Fox, P.F. and A. Brodtkorb, *The casein micelle: Historical aspects, current*  
492 *concepts and significance*. International Dairy Journal, 2008. **18**(7): p. 677-684.
- 493 8. Tuinier, R. and C.G.d. Kruif, *Stability of casein micelles in milk*. The Journal of  
494 Chemical Physics, 2002. **117**(3): p. 1290-1295.
- 495 9. Horne, D.S. and J.M. Banks, *Rennet-induced coagulation of milk*, in *Cheese*  
496 *chemistry, physics and microbiology*, P.F. Fox, et al., Editors. 2004, Elsevier  
497 Academic Press: Italy. p. 47-70.
- 498 10. Shah, M.A., S.A. Mir, and M.A. Paray, *Plant proteases as milk-clotting enzymes*  
499 *in cheesemaking: a review*. Dairy Science & Technology, 2013. **94**(1): p. 5-16.
- 500 11. Beka, R.G., et al., *Characterisation of a milk-clotting extract from Balanites*  
501 *aegyptiaca fruit pulp*. International Dairy Journal, 2014. **34**(1): p. 25-31.
- 502 12. Hafid, K., et al., *One-step recovery of latex papain from Carica papaya using*  
503 *three phase partitioning and its use as milk-clotting and meat-tenderizing agent*.  
504 Int J Biol Macromol, 2020. **146**: p. 798-810.
- 505 13. Hashim, M.M., et al., *Ginger protease used as coagulant enhances the*  
506 *proteolysis and sensory quality of Peshawari cheese compared to calf rennet*.  
507 Dairy Science & Technology, 2011. **91**(4): p. 431-440.
- 508 14. Felix da Silva, D., et al., *Effect of commercial grape extracts on the cheese-*  
509 *making properties of milk*. J Dairy Sci, 2015. **98**(3): p. 1552-62.
- 510 15. Egito, A.S., et al., *Milk-clotting activity of enzyme extracts from sunflower and*  
511 *albizia seeds and specific hydrolysis of bovine  $\kappa$ -casein*. International Dairy  
512 Journal, 2007. **17**(7): p. 816-825.
- 513 16. Nasiri, E., et al., *Novel milk-clotting enzyme from sour orange flowers (Citrus*  
514 *aurantium L.) as a coagulant in Iranian white cheese*. European Food Research  
515 and Technology, 2019. **246**(1): p. 139-148.
- 516 17. Kumari, M., A. Sharma, and M.V. Jagannadham, *Religiosin B, a milk-clotting*  
517 *serine protease from Ficus religiosa*. Food Chemistry, 2012. **131**(4): p. 1295-  
518 1303.
- 519 18. Bey, N., et al., *The non-edible parts of fennel ( Foeniculum vulgare ) as a new*  
520 *milk-clotting protease source*. Industrial Crops and Products, 2018. **112**: p. 181-  
521 187.

- 522 19. Almeida, C.M., et al., *Functional and structural characterization of synthetic*  
523 *cardosin B-derived rennet*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2017. **101**(18): p. 6951-  
524 6968.
- 525 20. Gutiérrez-Méndez, N., et al., *Milk-clotting enzymes: *S. elaeagnifolium* as an*  
526 *alternative source*, in *Food microbiology and biotechnology: safe and*  
527 *sustainable food production*, G.V. Nevarez-Moorillón, et al., Editors. 2020,  
528 AAP, Apple Academic Press: Florida, USA. p. 355-376.
- 529 21. Ben Amira, A., et al., *Milk-clotting properties of plant rennets and their*  
530 *enzymatic, rheological, and sensory role in cheese making: A review*.  
531 *International Journal of Food Properties*, 2017. **20**(sup1): p. S76-S93.
- 532 22. González-Córdova, A.F., et al., *Invited review: Artisanal Mexican cheeses*.  
533 *Journal of Dairy Science*, 2016. **99**(5): p. 3250-3262.
- 534 23. Wingfield, P.T., *Protein precipitation using ammonium sulfate*. *Curr Protoc*  
535 *Protein Sci*, 2016. **84**: p. A 3F 1-A 3F 9.
- 536 24. Nasr, A.I., I.A. Mohamed Ahmed, and O.I. Hamid, *Characterization of partially*  
537 *purified milk-clotting enzyme from sunflower (*Helianthus annuus*) seeds*. *Food*  
538 *Sci Nutr*, 2016. **4**(5): p. 733-41.
- 539 25. Bradford, M., *A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram*  
540 *Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding*. *Analytical*  
541 *Biochemistry*, 1976. **72**: p. 248 - 254.
- 542 26. Chávez-Garay, D.R., et al., *Partial characterization of a plant coagulant*  
543 *obtained from the berries of *Solanum elaeagnifolium**. *CyTA - Journal of Food*,  
544 2016. **14**(2): p. 200-205.
- 545 27. Afsharnezhad, M., S.S. Shahangian, and R. Sariri, *A novel milk-clotting cysteine*  
546 *protease from *Ficus johannis*: Purification and characterization*. *International*  
547 *Journal of Biological Macromolecules*, 2019. **121**: p. 173-182.
- 548 28. McDonald, C.E. and L.L. Chen, *The Lowry modification of the Folin reagent for*  
549 *determination of proteinase activity*. *Analytical Biochemistry*, 1965. **10**(1): p.  
550 175-177.
- 551 29. Gutiérrez-Méndez, N., et al., *Proteolysis and rheological properties of cream*  
552 *cheese made with a plant-derived coagulant from *Solanum elaeagnifolium**.  
553 *Foods*, 2019. **8**(2): p. 44.
- 554 30. Beltrán-Espinoza, J.A., et al., *The impact of chymosin and plant-derived*  
555 *proteases on the acid-induced gelation of milk*. *International Journal of Dairy*  
556 *Technology*, 2021. **74**(2): p. 297-306.
- 557 31. OEPP, *Solanum elaeagnifolium*. *OEPP/EPPPO Bulletin*, 2007. **37**: p. 236-245.
- 558 32. Boyd, J.W., D.S. Murray, and R.J. Tyrl, *Silverleaf nightshade, *Solanum**  
559 *elaeagnifolium, origin, distribution, and relation to man*. *Economic Botany*,  
560 1984. **38**(2): p. 210-217.
- 561 33. Ahmed, I.A.M., et al., *Dubiumin, a chymotrypsin-like serine protease from the*  
562 *seeds of *Solanum dubium* Fresen*. *Phytochemistry*, 2009. **70**(4): p. 483-491.
- 563 34. Ahmed, I.A.M., et al., *Characterisation of partially purified milk-clotting*  
564 *enzyme from *Solanum dubium* Fresen seeds*. *Food Chemistry*, 2009. **116**(2): p.  
565 395-400.
- 566 35. Guiana, V.D., et al., *Milk-clotting activity of berries extracts from nine *Solanum**  
567 *plants*. *African Journal of Biotechnology*, 2010. **9**(25): p. 3911-3918.
- 568 36. Bodansky, A., *The chymase of *Solanum elaeagnifolium* a preliminary note*. *The*  
569 *Journal of Biological Chemistry*, 1916. **27**(1): p. 103-105.
- 570 37. Amalinei, C., I.-D. Caruntu, and R. Balan, *Biology of metalloproteinases*.  
571 *Romanian Journal of Morphology and Embryology*, 2007. **48**(4): p. 323-334.

- 572 38. Yadav, R.P., A.K. Patel, and M.V. Jagannadham, *Neriifolin S, a dimeric serine*  
573 *protease from Euphorbia neriifolia Linn.: Purification and biochemical*  
574 *characterisation*. Food Chemistry, 2012. **132**(3): p. 1296-1304.
- 575 39. Antão, C.M. and F.X. Malcata, *Plant serine proteases: biochemical,*  
576 *physiological and molecular features*. Plant Physiology and Biochemistry, 2005.  
577 **43**(7): p. 637-650.
- 578 40. Gagaoua, M., et al., *Three phase partitioning, a scalable method for the*  
579 *purification and recovery of cucumisin, a milk-clotting enzyme, from the juice of*  
580 *Cucumis melo var. reticulatus*. International Journal of Biological  
581 Macromolecules, 2017. **102**: p. 515-525.
- 582 41. Sharma, A., M. Kumari, and M.V. Jagannadham, *Religosin C, a cucumisin-like*  
583 *serine protease from Ficus religiosa*. Process Biochemistry, 2012. **47**(6): p. 914-  
584 921.
- 585 42. Vargas-Requena, C.L., et al., *Purificación y caracterización parcial de una*  
586 *proteasa tipo cucumisina presente en Solanum elaeagnifolium*. Ciencia en la  
587 frontera: revista de ciencia y tecnología de la UACJ, 2008. **6**: p. 161-164.
- 588 43. Silva, S.V., et al., *Comparative studies on the gelling properties of cardosins*  
589 *extracted from Cynara cardunculus and chymosin on cow's skim milk*.  
590 International Dairy Journal, 2003. **13**(7): p. 559-564.
- 591 44. Puglisi, I., G. Petrone, and A.R. Lo Piero, *A kiwi juice aqueous solution as*  
592 *coagulant of bovine milk and its potential in Mozzarella cheese manufacture*.  
593 Food and Bioproducts Processing, 2014. **92**(1): p. 67-72.
- 594 45. Raskovic, B., J. Lazic, and N. Polovic, *Characterisation of general proteolytic,*  
595 *milk clotting and antifungal activity of Ficus carica latex during fruit ripening*. J  
596 Sci Food Agric, 2016. **96**(2): p. 576-82.
- 597 46. Horne, D.S. and J.A. Lucey, *Chapter 5 - Rennet-Induced Coagulation of Milk, in*  
598 *Cheese (Fourth edition)*, P.L.H.F. McSweeney, Patrick F.
- 599 Cotter, Paul D.
- 600 Everett, David W. , Editor. 2017, Academic Press: San Diego. p. 115-143.
- 601 47. Lucey, J.A., M.E. Johnson, and D.S. Horne, *Perspectives on the basis of the*  
602 *rheology and texture properties of cheese*. Journal of dairy science, 2003. **86**: p.  
603 2725-2743.
- 604
- 605

606 **Table 1.** Compositional analysis of the powder obtained from yellow and dry fruits of  
 607 *Solanum elaeagnifolium* plants.

608

Component	Mean <sup>1</sup>	SD <sup>2</sup>	Other authors <sup>4</sup>
	g 100 g <sup>-1</sup>		
Moisture	6.3	0.06	10.5
Lipids	6.2	0.26	3.4
Ashes	3.7	0.01	5.6
Proteins	10.1	1.41	12.0
Carbohydrates <sup>3</sup>	73.7	1.53	68.2
Total fiber	34.1	1.42	48.4
Insoluble fiber	26.3	1.52	53.8
Soluble fiber	7.8	0.10	2.9



609

610 <sup>1</sup> Average of three replicates

611 <sup>2</sup> SD = standard deviation

612 <sup>3</sup> Estimated by difference

613 <sup>4</sup> Average composition reported by diverse authors [20].

614

615 **Table 2.** Milk clotting and proteolytic activities of proteases used in this study.

Parameter	Recombinant camel chymosin	Chymosin from the calf stomach	Trompillin <sup>1</sup>	SEM	<i>P</i>
MCA, SU mL <sup>-1</sup>	6120.22 <sup>a</sup>	4397.45 <sup>b</sup>	3658.86 <sup>c</sup>	247.2	< 0.001
Sp-MCA, SU mg protein <sup>-1</sup>	4697.30 <sup>b</sup>	7064.76 <sup>a</sup>	841.00 <sup>c</sup>	626.7	< 0.001
PA, UTyr mL <sup>-1</sup>	32.60 <sup>b</sup>	19.21 <sup>b</sup>	535.47 <sup>a</sup>	6.259	< 0.001
Sp-PA, UTyr mg protein <sup>-1</sup>	24.89 <sup>c</sup>	30.49 <sup>b</sup>	50.23 <sup>a</sup>	0.968	< 0.001
Ratio MCA/PA	187.75 <sup>b</sup>	223.76 <sup>a</sup>	6.83 <sup>c</sup>	10.33	< 0.001

616

617 <sup>1</sup>Plant-derived protease from the fruits of *Solanum elaeagnifolium*.

618 MCA = Milk-clotting activity expressed in Soxleth Units (SU) per milliliter.

619 Sp-MCA = Specific milk clotting activity expressed in Soxleth Units (SU) per milligram of  
620 enzyme.

621 PA = Proteolytic activity expressed in Tyrosine Units (U<sub>Tyr</sub>) per milliliter.

622 Sp-PA = Specific proteolytic activity expressed in Tyrosin Units (U<sub>Tyr</sub>) per milligram of  
623 enzyme.

624 SEM = standard error of mean.

625 *P* = probability value.

626 <sup>a,b,c</sup> Mean values in the same row with different superscripts differ (ANOVA, Tukey-Kramer  
627 test, *P* < 0.05). Data represent the average of three replicates (*n* = 3).

628

629 **Table 3.** Rheological behavior of milk clotted with different proteases at 30 °C.

Parameter	Recombinant camel chymosin	Chymosin from the calf stomach	Trompillin <sup>1</sup>	Recombinant chymosin + Trompillin <sup>1</sup>	SEM	<i>P</i>
$\eta_0$ , mPa s	1.23 <sup>a</sup>	1.17 <sup>a</sup>	1.78 <sup>a</sup>	1.86 <sup>a</sup>	0.293	0.027
$\eta_s$ , mPa s	10.17 <sup>b</sup>	9.13 <sup>b</sup>	7.03 <sup>c</sup>	11.99 <sup>a</sup>	0.566	< 0.001
$\Delta\eta$ , mPa s	8.94 <sup>ab</sup>	7.95 <sup>b</sup>	5.25 <sup>c</sup>	10.13 <sup>a</sup>	0.529	< 0.001
$k$ , mPa s min <sup>-1</sup>	1.14 <sup>ab</sup>	1.06 <sup>ab</sup>	0.43 <sup>ab</sup>	1.76 <sup>a</sup>	0.389	0.011
$t_0$ , min	38.89 <sup>a</sup>	37.67 <sup>a</sup>	37.38 <sup>a</sup>	16.45 <sup>b</sup>	1.779	< 0.001
$t_s$ , min	48.31 <sup>a</sup>	46.28 <sup>a</sup>	51.99 <sup>a</sup>	21.96 <sup>b</sup>	2.487	< 0.001
$\Delta t$ , min	9.42 <sup>b</sup>	8.61 <sup>b</sup>	14.61 <sup>a</sup>	5.51 <sup>c</sup>	0.993	< 0.001

630

631 <sup>1</sup>Plant-derived protease from the fruits of *Solanum elaeagnifolium*.

632  $\eta_0$  = initial viscosity,  $\eta_s$  = maximal viscosity,  $\Delta\eta$  = increase of viscosity during gel formation  
 633 ( $\eta_s - \eta_0$ ),  $k$  = rate of caseins aggregation ( $1/b$ ),  $t_0$  = time to start caseins aggregation ( $t_c - 2b$ ),  $t_s$  =  
 634 time to reach the maximal viscosity ( $t_c + 2b$ ),  $\Delta t$  = time to induce milk gelation once caseins  
 635 started their aggregation ( $t_s - t_0$ ).

636 <sup>a,b,c,d</sup> Mean values in the same row with different superscripts differ (ANOVA, Tukey-Kramer  
 637 test,  $P < 0.05$ ). Data represent the average of three replicates ( $n = 3$ ). SEM = standard error of  
 638 mean.  $P$  = probability value.

639

640 **Table 4.** Whey separation in milk gels clotted at 30°C with different proteases

Parameter	Recombinant camel chymosin	Chymosin from the calf stomach	Trompillin <sup>1</sup>	Recombinant chymosin + Trompillin <sup>1</sup>	SEM	<i>P</i>
Milk <sup>2</sup> , g	36.21 <sup>a</sup>	37.41 <sup>a</sup>	36.02 <sup>a</sup>	36.35 <sup>a</sup>	0.731	0.169
Whey <sup>3</sup> , g	1.63 <sup>a</sup>	1.68 <sup>a</sup>	11.20 <sup>a</sup>	1.22 <sup>a</sup>	0.416	< 0.001
Milk gel, g	34.58 <sup>a</sup>	35.73 <sup>a</sup>	24.81 <sup>b</sup>	35.11 <sup>a</sup>	0.713	< 0.001
Syneresis, %	4.51 <sup>b</sup>	4.49 <sup>b</sup>	31.08 <sup>a</sup>	3.41 <sup>b</sup>	0.949	< 0.001
[ <i>P</i> ], g 100mL <sup>-1</sup>	0.137 <sup>b</sup>	0.138 <sup>b</sup>	0.938 <sup>a</sup>	0.164 <sup>b</sup>	0.022	< 0.001

641

642 <sup>1</sup>Plant-derived protease from the fruits of *Solanum elaeagnifolium*.

643 <sup>2</sup>Milk added with the protease solution and CaCl<sub>2</sub> at 0.02% w/v

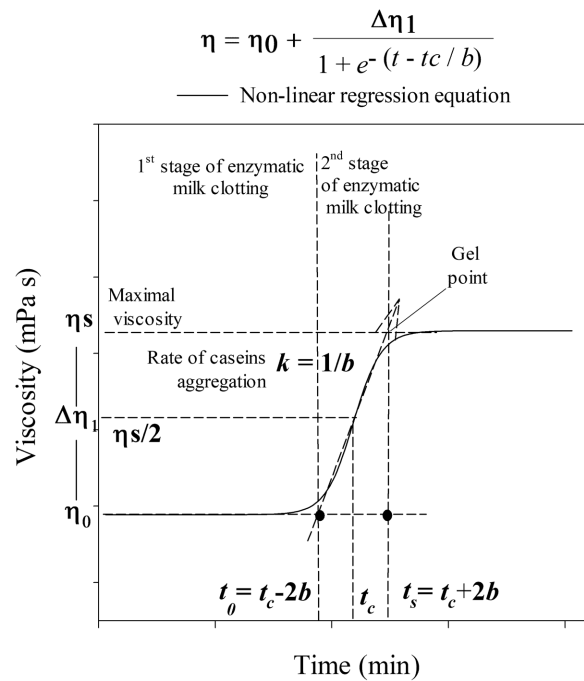
644 <sup>3</sup>Whey released after 80 minutes of incubation at 30°C, and subsequently centrifuged for 10  
645 minutes at 10 °C and 300 × *g*.

646 [*P*] = protein content in the whey.

647 <sup>a,b,c,d</sup>Mean values in the same row with different superscripts differ (ANOVA, Tukey-Kramer  
648 test, *P* < 0.05). Data represent the average of three replicates (*n* = 3). SEM = standard error of  
649 mean. *P* = probability value.

650

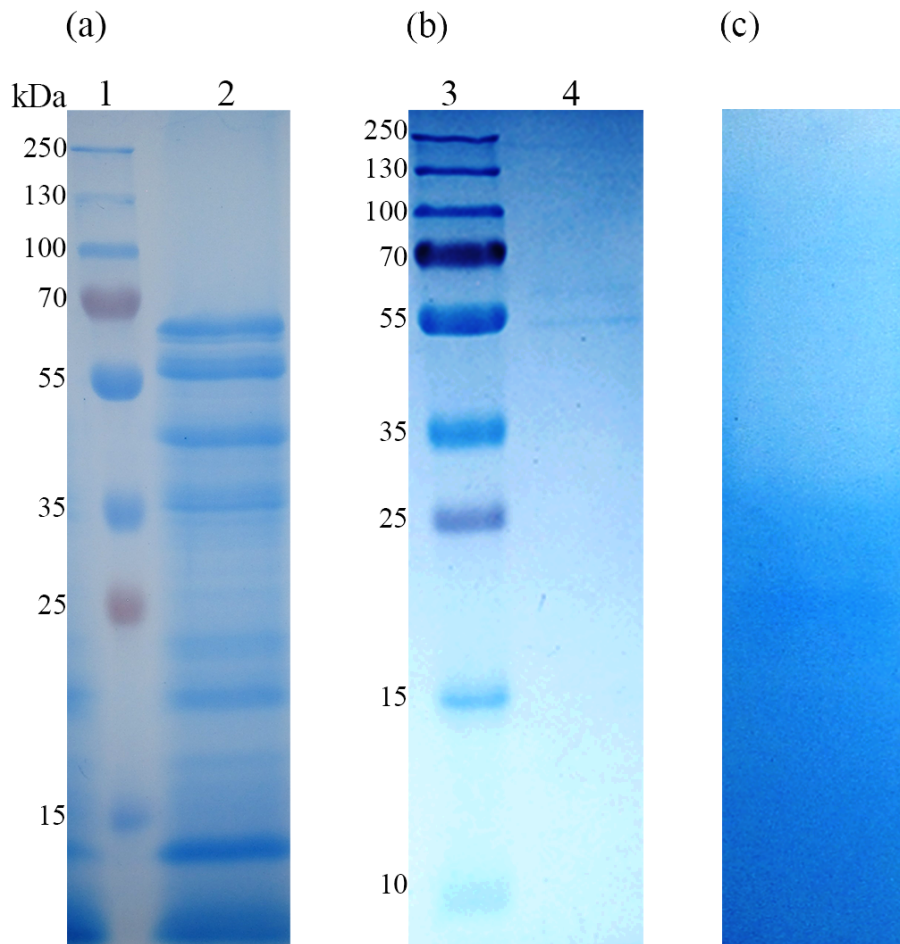




651

652 **Figure 1.** Sigmoidal four-parameters equation used to analyze the rheological behavior  
 653 of milk clotted with bovine chymosin, recombinant camel chymosin, and Trompillin.  $\eta_s$   
 654 = viscosity at gel point,  $\eta_0$  = initial viscosity,  $\eta_{s/2}$  = half of the maximum viscosity,  $t_c$  =  
 655 time to reach half maximum viscosity,  $k$  = rate of caseins aggregation,  $t_0$  = time to start  
 656 the caseins aggregation,  $t_s$  = time to form the milk gel.

657



658

659

660 **Figure 2.** SDS-PAGE analysis of crude extract from *Solanum elaeagnifolium* fruits

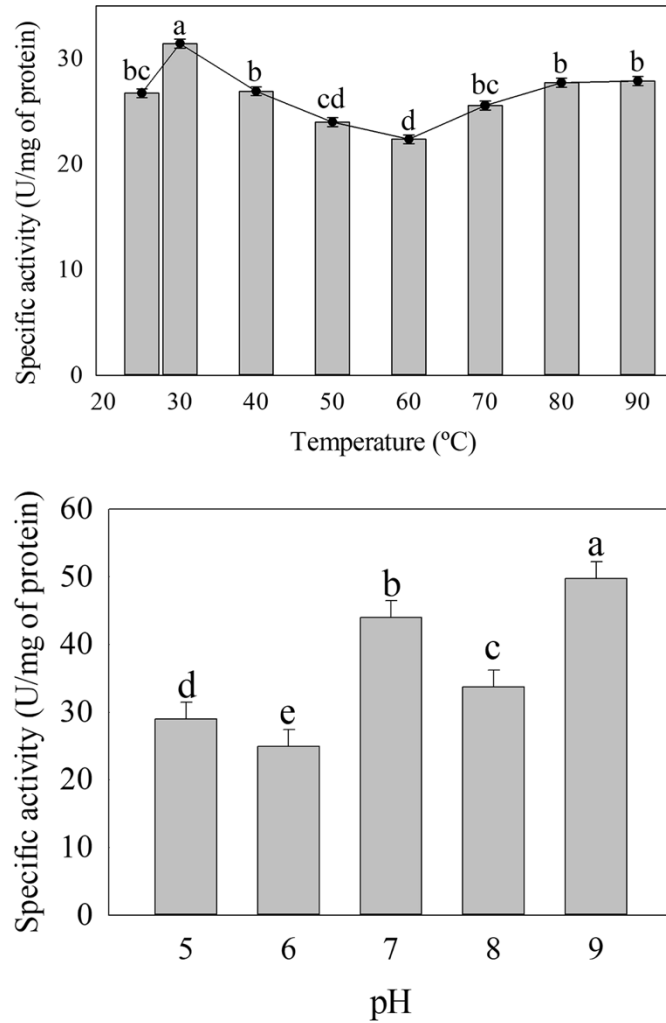
661 (a), and the purified proteases from the crude extract (b), with its proteolytic

662 zymogram (c). Lane 1 = molecular weight market, lane 2 = crude extract, lane 3 =

663 molecular weight marker, lane 4 = fraction recover sulphate ammonium precipitation

664 (50%) and gel filtration on Sephadex G-100.

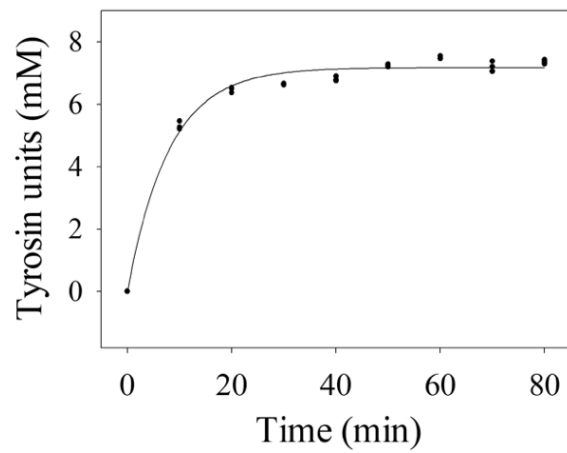
665



666

667 **Figure 3.** Specific proteolytic activity of trompillin at different assay conditions. The  
 668 upper figure shows the assays at a fixed pH of 7 and varying the incubation temperature.  
 669 The lower figure shows the assays at a fixed temperature of 30 °C and varying the  
 670 reaction pH. Treatments sharing same letters are not significantly different (Tukey-  
 671 Kramer,  $\alpha = 0.05$ ,  $n = 3$ ).

672



673

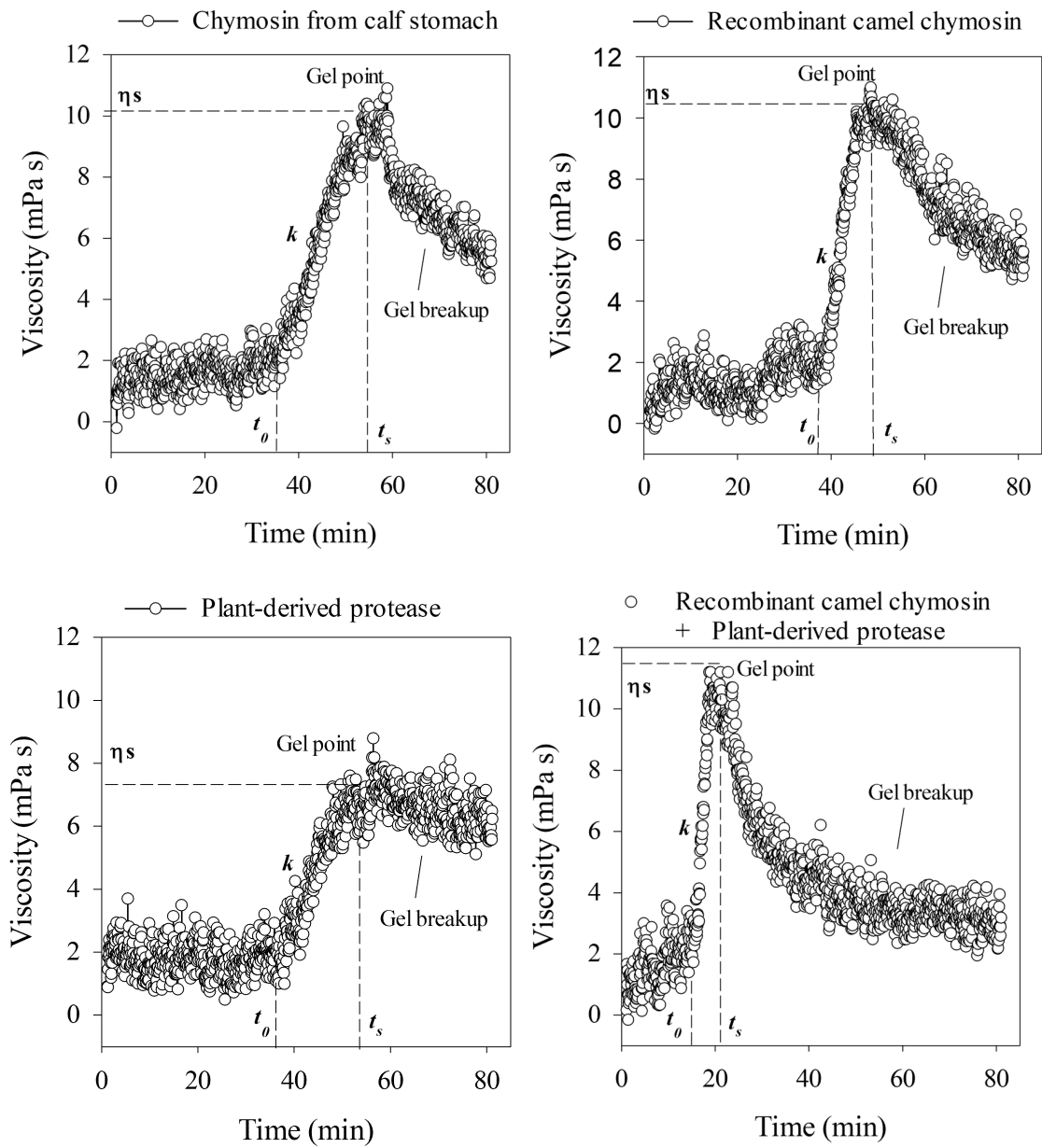
674 **Figure 4.** Kinetic of caseins hydrolysis by trompillin at 30°C and pH 7. Values represent  
675 the average of triplicates ( $n = 3$ ). Points sharing the same letters had no significant  
676 difference (Tukey-Kramer,  $\alpha = 0.05$ ).

677

678

679

680



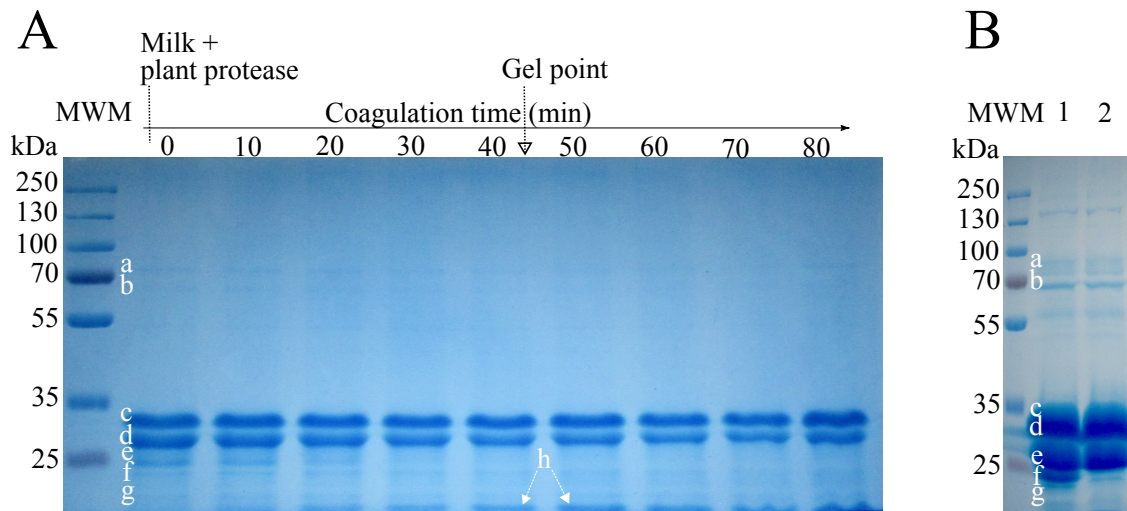
681

682 **Figure 5.** Rheological analysis of milk gelation induced by different proteases at 30 °C.

683  $\eta_s$  = viscosity at gel point,  $k$  = rate of caseins aggregation,  $t_0$  = time to start the caseins

684 aggregation,  $t_s$  = time to form the milk gel.

685



686

687

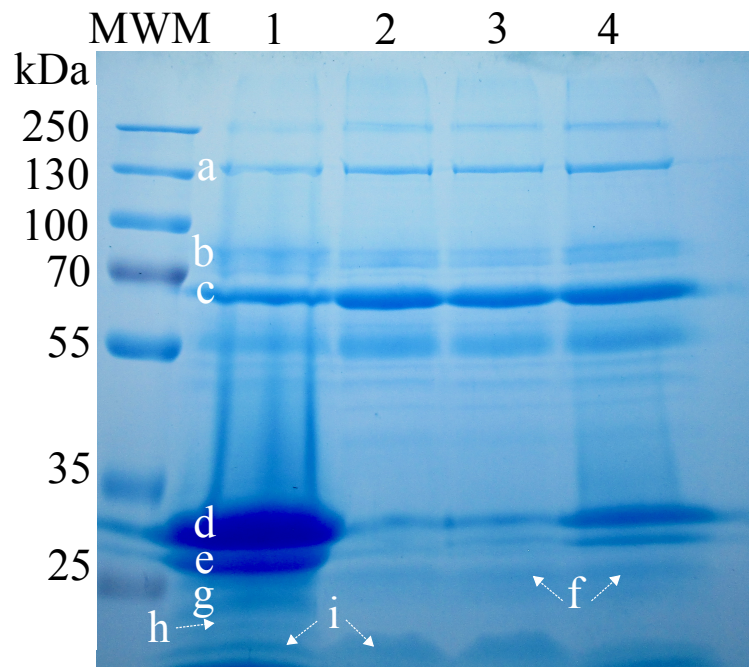
688 **Figure 6.** Hydrolysis of milk proteins during gel formation at 30°C under the action of  
 689 different proteases. A) Milk clotted with trompillin. B) Milk clotted with recombinant  
 690 camel chymosin (lane 1) and chymosin from calf stomach (lane 2); samples taken after  
 691 80 minutes of incubation. MWM = molecular weight marker, a = transferrin, b = serum  
 692 albumin, c =  $\beta$ -caseins, d =  $\alpha_{s1}$ -caseins, e =  $\kappa$ -caseins, f =  $\gamma$ -caseins, g =  $\beta$ -lactoglobulin,  
 693 h = hydrophobic peptides ~14kDa.

694

695

696

697



698

699 **Figure 7.** Proteins observed in the whey released by milk gels clotted with trompillin

700 (lane 1), recombinant camel chymosin (lane 2), bovine chymosin (lane 3) and the

701 mixture (1:1 ratio) of recombinant camel chymosin with trompillin (lane 4). MWM =

702 molecular weight marker, a = immunoglobulins, b = lactoferrin, c = serum albumin, d

703 =  $\beta$ -caseins, e =  $\alpha$ <sub>1</sub>-caseins, f =  $\kappa$ -caseins, g =  $\gamma$ -caseins, h = hydrophilic peptides

704 ~18kDa, i =  $\beta$ - lactoglobulin.

705