

EXTRACTO COAGULANTE DE LECHE PROVENIENTE DEL ESTÓMAGO DE CONEJO (*Oryctolagus cuniculus* sp.)

MILK COAGULANT EXTRACT FROM STOMACH OF RABBIT (*Oryctolagus cuniculus* sp.)

José Dobler-López¹, Enrique Espinosa-Ayala², Pedro A. Hernández-García²,
Leticia X. López-Martínez³, Ofelia Márquez-Molina^{2*}

¹Programa de Doctorado en Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales, Universidad Autónoma del Estado de México, Campus Universitario "El Cerrillo". 50200. Toluca, Estado de México, México. (jose.dobler@gmail.com). ²Centro Universitario UAEM Amecameca, Universidad Autónoma del Estado de México. 56900. Carretera Amecameca Ayapango Km. 2.5. México. (enresaya1@hotmail.com) (pedro_abel@yahoo.com) (ofeliammolina@yahoo.com). ³Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A. C. Carretera a El Dorado Km 5.5 Colonia Campo El Diez. 80110. Culiacan, Sinaloa, México. (lomarleticia@gmail.com).

RESUMEN

La industria quesera emplea coagulantes diversos para la elaboración de quesos, y destacan los cuajos naturales (abomasos de becerro), las enzimas de microorganismos genéticamente modificados (*Mucor miehei*, *M. pusillus* y *Endothia parasitica*), enzimas vegetales de *Cirsium* spp. (cardo) y enzimas de origen animal (cerdos y pollos). Los estómagos de animales de abasto, como el conejo, se podrían usar para la producción de coagulantes de leche, principalmente en queserías de tipo tradicional que elaboran quesos frescos y semi madurados. Por lo anterior, se evaluó la actividad proteolítica y la fuerza de cuajado del extracto de estómago de conejo (*Oryctolagus cuniculus*) adicionados con NaCl y etanol en leche. La investigación se realizó en dos etapas. En la primera se evaluó el efecto de la sal en el secado de los estómagos, la fuerza de cuajado mediante el método de Chazarra y colaboradores y la actividad proteolítica, para esto se usaron estómagos de conejos recién sacrificados. Los tratamientos fueron: 1) inmersión en salmuera saturada (NaCl), 2) saturación superficial y, 3) sin NaCl. Después los estómagos se secaron por insuflación. En la segunda etapa se determinó el efecto de la concentración de NaCl en combinación con etanol sobre la fuerza de cuajado y actividad proteolítica; para esto se usaron seis niveles de adición de etanol y seis niveles de NaCl. En la primera etapa el diseño fue completamente al azar, y en la segunda fue completamente al azar con un arreglo factorial $6 \times 6 \times 4$, con seis niveles de NaCl, seis niveles de etanol

ABSTRACT

The cheese industry uses different coagulants to curdle the milk, outstanding among which are rennet (extracted from the calf abomasum), enzymes from genetically modified microorganisms (*Mucor miehei*, *M. pusillus* and *Endothia parasitica*), plant enzymes from *Cirsium* spp. (thistle) and enzymes from other animals (pigs and chickens). The stomachs of animals for slaughter, such as rabbits, can be used to produce milk coagulants mainly in traditional cheese-making that produces fresh and slightly aged cheeses. In this study, the proteolytic activity and curdling strength of the extract from rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) stomach supplemented with NaCl and ethanol were analyzed in milk. The study had two phases. In the first, the effect of salt on stomach drying, curdling strength following the method of Chazarra and collaborators, and proteolytic activity was evaluated. Stomachs from recently sacrificed rabbits were used. The treatments were: 1) submersion in saturated brine (NaCl), 2) superficial saturation, and 3) no NaCl. Afterwards, the stomachs were dried by insufflation. In the second stage, the effect of the NaCl concentration in combination with ethanol on curdling strength and proteolytic activity was determined. To this end, six levels of added ethanol and six levels of NaCl were utilized. In the first stage the experimental design was completely randomized, and in the second it was completely randomized with a $6 \times 6 \times 4$ factorial array, with six levels of NaCl, six levels of ethanol and four storage times. Means were compared with the Tukey test ($p \leq 0.05$). In the first stage, the stomachs without NaCl exhibited more enzyme activity and, with saturated brine or superficial saturation there was greater curdling strength. In the second stage, the concentration of ethanol did not affect curdling strength.

*Autor responsable ❖ Author for correspondence.

Recibido: marzo, 2015. Aprobado: marzo, 2016.

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 50: 583-593. 2016.

y cuatro tiempos de almacenamiento. La comparación de medias se realizó con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$). En la primera etapa los estómagos sin NaCl mostraron actividad enzimática mayor, y con salmuera saturada o saturación superficial tuvieron fuerza mayor de cuajado. En la segunda etapa, la concentración de etanol no cambió la fuerza del cuajado. Los resultados mejores fueron con 1 a 5 % de NaCl y diferentes ($p \leq 0.05$) a los obtenidos sin NaCl. Los estómagos de conejos adicionados con NaCl y etanol mostraron actividad coagulante de leche. Así, esta víscera tratada adecuadamente se puede usar en la industria quesera.

Palabras clave: Estómagos de conejo, enzimas coagulantes, fuerza de cuajado.

INTRODUCCIÓN

El cuajo es una quimosina o renina, la cual es una aspartato-proteasa, producida en el abomaso de becerros, cabritos y corderos lactantes (Addis *et al.*, 2008). Esta enzima se usa como coagulante de leche, porque hidroliza la κ -caseína y coagula las micelas desestabilizadas de las caseínas, forma un gel, a modo de matriz, que atrapa o retiene grasa, agua y algunos componentes solubles de la leche; el proceso es la gelificación o cuajado (Ordiales *et al.*, 2012). Además de la quimosina, en los abomasos de rumiantes lactantes, hay enzimas lipolíticas que hidrolizan las grasas en la leche; esto confiere notas características de sabor a los quesos madurados (Moatsou *et al.*, 2004; Florez *et al.*, 2006).

La calidad del cuajo se asocia principalmente con la potencia de cuajado que es la capacidad de coagular la leche en un periodo de tiempo, ésta capacidad disminuye durante el almacenamiento ya que las enzimas, principalmente la quimosina, se autolisan y afectan la potencia. En tres meses, la potencia de cuajado se reduce 16 %, y puede ser 26 % a los seis meses de almacenamiento (Kozelkova *et al.*, 2012).

Según Kumar *et al.* (2006), la fuerza de cuajado disminuye proporcionalmente con el aumento de la temperatura de la leche, la actividad máxima coagulante es cuando la leche está a 30 °C, y a 65 °C se inhibe totalmente. La quimosina presenta actividad máxima cuando el pH de la leche es 5.5, a 5.8 la actividad declina y a 8.0 no hay actividad (Kumar *et al.*, 2006).

The best results were obtained with 1 to 5 % NaCl, which were different ($p \leq 0.05$) from those obtained without NaCl. The rabbit stomachs supplemented with NaCl and ethanol coagulated milk. Thus, this organ, suitably treated, can be used in the cheese industry.

Key words: Rabbit stomach, coagulating enzymes, curdling strength.

INTRODUCTION

Rennet is a chymosin or rennin, which is an aspartate proteinase produced in the abomasum of lactating calves, goat kids and lambs (Addis *et al.*, 2008). This enzyme is used as a milk coagulant because it hydrolyzes κ -casein and coagulates the destabilized micelles of the caseins, forms a gel in the form of a matrix that traps or retains fats, water and some soluble components of the milk. This process is called gelling or curdling (Ordiales *et al.*, 2012). Besides the chymosin in the abomasum of nursing ruminants, there are lipolytic enzymes that hydrolyze milk fats, conferring characteristic flavor notes to aged cheeses (Moatsou *et al.*, 2004; Florez *et al.*, 2006).

Rennet quality is associated mainly with curdling strength determined by the capacity to coagulate milk in a period of time. This capacity decreases during storage since the enzymes, mainly the chymosin, undergo autolysis, which affects their potency. Over three months, rennet strength decreases 16 % and may decrease 16 % after six months of storage (Kozelkova *et al.*, 2012).

According to Kumar *et al.* (2006), rennet strength decreases proportionally with increased milk temperature. Maximum coagulating activity occurs when milk temperature is 30 °C, and at 65 °C it is totally inhibited. Chymosin exhibits maximum activity when milk pH is 5.5; at 5.8 its activity decreases, and at 8.0 no activity is observed (Kumar *et al.*, 2006).

Natural rennets are industrialized or are prepared by artisans and sold in liquid (Moschopoulou *et al.*, 2007) or paste (Addis *et al.*, 2008) form. A disadvantage of artisan rennets is the limited microbiological control during preparation; thus, its safety is not guaranteed. For this reason, additives are used that do not affect coagulating capacity: for example, boric acid (Florez *et al.*, 2006), NaCl

Los cuajos naturales se industrializan o preparan artesanalmente y se comercializan en presentación líquida (Moschopoulou *et al.*, 2007) o en pasta (Addis *et al.*, 2008). Una desventaja de los cuajos artesanales es el control microbiológico limitado durante su preparación, que afecta su inocuidad; por esto, se aplican aditivos que no afecten la capacidad coagulante, como el ácido bórico (Florez *et al.*, 2006), NaCl (Moschopoulou, 2011) o etanol (O'Connell *et al.*, 2006), en otros casos disminuyen el pH (Tripaldi *et al.*, 2012).

Para desarrollar un coagulante lácteo parecido al cuajo de becerro se estudian las proteasas de los coagulantes lácteos de origen microbiano, vegetal y de especies no rumiantes (Jacob *et al.*, 2011). Aunque proteasas diversas coagulan la leche, la mayoría tiene especificidad por otros substratos, por lo que el rendimiento de queso es bajo o los quesos tienen sabores indeseables (Koselkova *et al.*, 2012).

El coagulante de origen microbiano contiene solo un tipo de quimosina (A o B) y otros tipos que no existen en el cuajo natural. Los de origen vegetal presentan potencia coagulante baja, contienen principalmente enzimas con actividad proteolítica alta y generan pastas débiles y quesos de consistencia baja (Ordiales *et al.*, 2012). Entre los coagulantes de las especies no rumiantes están las enzimas gástricas del pollo (Rolet *et al.*, 2013) y cerdo (Wahba y El-Abbassy, 1981), con potencia baja de cuajado comparada con las comerciales, por lo que no se permite su inserción en el mercado.

Una especie animal de abasto que tiene estómagos con enzimas coagulantes es el conejo (*Oryctolagus cuniculus*). La leche de la coneja tiene 12.3 % de proteína, 70 % de la cual es caseína (Szendrő y Luzi, 2006). Las conejas alimentan solo una vez al día a sus crías y esto sugiere producción alta de proteasas. De ser así, la fuerza del cuajado podría ser similar a la de los rumiantes. Por lo anterior, el objetivo de la presente investigación fue evaluar en leche de vaca la fuerza de cuajado y actividad proteolítica del estómago de conejo adicionado con NaCl y etanol.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico

Cien estómagos de conejos se usaron en la investigación. Estos eran de razas productoras de carne (California, Nueva

(Moschopoulou, 2011) or ethanol (O'Connell *et al.*, 2006). In other cases, pH is decreased (Tripaldi *et al.*, 2012).

To develop a milk coagulant similar to rennet from calves, studies have been conducted on the proteases of milk coagulants from microbes, plants and non-ruminant species (Jacob *et al.*, 2011). Although diverse proteases coagulate milk, most are specific for other substrates; thus, cheese yield is low or cheeses with undesirable flavors are produced (Koselkova *et al.*, 2012).

Coagulant of microbial origin contains only one type of chymosin (A or B) and other types that do not exist in natural rennet. Those of plant origin have low coagulating strength; they contain mainly enzymes with high proteolytic activity and produce weak pastes and low consistency cheeses (Ordiales *et al.*, 2012). Among the coagulants from non-ruminant species there are gastric enzymes from chickens (Rolet *et al.*, 2013) and pigs (Wahba and El-Abbassy, 1981), which have low curdling strength compared with commercial rennet, and did not have successful insertion in the market.

One animal species for slaughter with stomachs that may contain coagulating enzymes is the rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). Rabbit milk contains 12.3 % protein, of which 70 % is casein (Szendrő and Luzi, 2006). Rabbits nurse their young only once a day, suggesting high production of proteases. If this is true, curdling strength of the rennet could be similar to that from ruminants. For this reason, the objective of this study was to evaluate the curdling strength and proteolytic activity of coagulant from rabbit stomach supplemented with NaCl and ethanol.

MATERIALS AND METHODS

Biological material

One hundred rabbit stomachs were used in the study. The rabbits were meat producing breeds (California, New Zealand, Chinchilla and crosses of these) and were 8 to 9 weeks old, males and females, weighting between 2 and 2.3 kg. The rabbits were sacrificed using the technique of desensitization by breaking the neck and bleeding through a cut in the jugular vein, following the standard NOM-033-ZOO-1995 (humanitarian sacrifice of domestic and wild animals) in the meat workshop of FES-Cuautitlán of the Universidad Nacional Autónoma de México.

Zelanda, Chinchilla y cruza de ellas), de 8 a 9 semanas de edad, de ambos sexos y peso de 2 a 2.3 kg. Los conejos se sacrificaron mediante la técnica de insensibilización por desnucamiento y desangrado por corte yugular, de acuerdo con la norma NOM-033-ZOO-1995 (Sacrificio humanitario de los animales domésticos y silvestres), en el taller de carnes de la FES-Cuautitlán de la Universidad Nacional Autónoma de México.

La grasa peri visceral, el bazo, el remanente de esófago y la porción pilórica con el resto del duodeno se extrajeron y el contenido estomacal se eliminó. Los estómagos se invirtieron para exponer la mucosa gástrica, se enjuagaron con agua potable y escurrieron por 30 min. Los estómagos se separaron en tres lotes: 1) 20 estómagos se sumergieron en solución saturada de NaCl (37 g en 100 g de agua a 20 °C), por 5 min; 2) 20 estómagos se cubrieron en la superficie con NaCl (2 g NaCl g⁻¹ estómago); 3) 60 estómagos se mantuvieron sin NaCl. Los estómagos se insuflaron para secarlos, en estufa, con aire forzado y humedad relativa de 45 %, a 35 °C, se consideraron secos cuando alcanzaron peso contante (48 h aproximadamente), y se molieron a un tamaño de partícula de 25 μm.

Extractos enzimáticos

Cien mL de extracto se elaboraron con 1 g de estómago en agua acidificada (con ácido acético, pH de 4.0). La capacidad coagulante se evaluó en dos etapas. Primero se evaluó el efecto del NaCl en salmuera, saturación superficial y sin NaCl, y se realizó 2 y 10 d para determinar el efecto del almacenamiento en la fuerza de cuajado y la actividad proteolítica. En la segunda etapa se determinó el efecto combinado del NaCl (0, 1, 2, 3, 4 y 5 %) y el etanol (0, 1, 2, 3, 4 y 5 %) en la fuerza de cuajado y en la actividad proteolítica y los extractos se evaluaron después de 4, 8, 12 y 16 d del inicio del almacenamiento. Todos los tratamientos de ambas etapas se realizaron por triplicado.

Fuerza de cuajado

La fuerza de cuajo se cuantificó en 10 mL del extracto enzimático adicionado a 100 mL de leche, se definió como volumen de leche (L) coagulado por gramo de estómago en 40 min, a 35 °C (Chazarra *et al.*, 2007) y se calculó con la fórmula propuesta por Spreer *et al.* (1998):

$$F_c = \frac{Vl \times 100 \times 2400s}{Vc \times t}$$

donde F_c es la fuerza del cuajo, Vl es el volumen de leche, 100 es la dilución de 1 g de estómago en agua acidificada, aforada a 100 mL, 2400 s son 40 min, Vc es la cantidad de cuajo y t es el tiempo de cuajado.

Perivisceral fat, spleen, remnant of the esophagus and the pyloric portion with the rest of the duodena were extracted and the stomach contents eliminated. The stomachs were turned inside out to expose the gastric mucus, rinsed with tap water and left to drip for 30 min. The stomachs were divided into three lots: 1) 20 stomachs were submerged in a saturated NaCl solution (37 g in 100 g water at 20 °C) for 5 min; 2) the surface of 20 stomachs was covered with NaCl (2 g NaCl g of stomach); 3) 60 stomachs were not treated with salt. The stomachs were insufflated for drying in a forced air oven at 45 % relative humidity and 35 °C. They were considered dry when they reached constant weight (48 h approximately), and they were ground to a particle size of 25 μm.

Enzyme extracts

One hundred mL extract was made with 1 g of stomach in acidified water (with acetic acid, pH 4.0). Coagulating capacity was evaluated in two stages. First, the effect of NaCl in brine, surface saturation and no NaCl was evaluated, it was carried out after 2 and 10 d of storage to determine its effect on curdling strength and proteolytic activity. In the second stage, the combined effect of NaCl (0, 1, 2, 3, 4 and 5 %) and ethanol (0, 1, 2, 3, 4 and 5 %) on curdling strength and proteolytic activity. These extracts were evaluated after 4, 8, 12 and 16 d of storage. All the treatments of the two stages were triplicated.

Curdling strength

Curdling strength was quantified in 10 mL of enzyme extracted added to 100 mL milk and defined as volume of milk (L) per gram of stomach coagulated in 40 min at 35 °C (Chazarra *et al.*, 2007), calculated with the formula proposed by Spreer *et al.* (1998):

$$F_c = \frac{Vl \times 100 \times 2400s}{Vc \times t}$$

where F_c is curdling strength, Vl is volume of milk, 100 is the dilution of 1 g of stomach in acidified water gauged to 100 mL, 2400 s are 40 min, Vc is the quantity of curd and t is curdling time.

Curdling time was the lapse between application of the enzyme extract and the moment in which the curd could sustain a straw vertically (Chazarra *et al.*, 2007). If the milk did not coagulate at 40 min, the extract was considered to have no effect. For these tests, milk was pasteurized at 63 °C for 30 min and 20 °Dornic acidity with 50 % CaCl (2 mL 10 L⁻¹ milk).

El tiempo de cuajado fue entre la aplicación del extracto enzimático y el momento en que la cuajada pudo sostener verticalmente una pajilla (Chazarra *et al.*, 2007). El extracto no tuvo efecto cuando la leche no coaguló a los 40 min. Para estas pruebas se usó leche pasteurizada a 63 °C, por 30 min, y acidez 20 °Dornic con (CaCl) al 50 % (2 mL 10 L⁻¹ leche).

Determinación de proteínas

La concentración de proteína se determinó por el método colorimétrico de Bradford (1976) a 595 nm en espectrofotómetro (Génesis 10 UV-VIS, THERMO®), curva estándar de ovalbúmina (2 mg mL⁻¹ en NaCl al 0.9 %) y concentración de 0 a 30 µg mL⁻¹. Los resultados se expresaron en µg proteína mL⁻¹ extracto de estómago.

Actividad proteolítica

La actividad enzimática se determinó con la metodología de Corzo *et al.* (2012): 500 µL de sustrato (caseína al 1 % en solución amortiguadora de fosfato de sodio monobásico y dibásico 0.1 M a pH 6) con 50 µL de extracto enzimático se agitaron 30 s, se mantuvieron a 35 °C por 30 min y después de 20 min se adicionó 1 mL de ácido tricloroacético al 5 %, para detener la reacción. La actividad proteolítica se cuantificó por espectrofotometría a 280 nm en el sobrenadante obtenido después de centrifugar (30 min a 3000 rpm a 4 °C). La actividad se expresó como Unidades de Actividad Enzimática (UAE) (aumento en la absorbancia de 0.001 por mg de proteína por min). Este análisis se realizó en triplicado.

Diseño experimental y análisis estadístico

El diseño experimental fue de bloques completamente al azar, y los datos de efecto del NaCl en la fuerza de cuajado y la actividad proteolítica se analizaron con ANDEVA. Los tratamientos fueron: condición sin sal, con salmuera saturada, y la saturación superficial; el efecto de bloqueo fueron los días de almacenamiento. Para las diferencias se usó la prueba de Tukey, $p \leq 0.05$ (Steel *et al.*, 1997), con SAS 9.0.

Para el efecto combinado de NaCl y etanol el diseño experimental fue completamente al azar, con arreglo factorial 6×6×4, seis niveles de NaCl (0, 1, 2, 3, 4 y 5 %), seis niveles de etanol (0, 1, 2, 3, 4 y 5 %) y cuatro tiempos de almacenamiento (4, 8, 12 y 16 d). Para las diferencias significativas se usó la prueba de Tukey, $p \leq 0.05$ (Steel *et al.*, 1997).

Determination of proteins

Protein concentration was determined with the colorimetric method of Bradford (1976) at 595 nm in a spectrophotometer (Genesis 10 UV-VIS, THERMO™) and a standard curve of ovalbumin (2 mg mL⁻¹ 0.9 % NaCl) at concentrations between 0 and 30 µg mL⁻¹. The results were expressed in µg protein mL⁻¹ stomach extract.

Proteolytic activity

Enzyme activity was determined with the methodology of Corzo *et al.* (2012): 500 µL of substrate (1 % casein in 0.1 M monobasic and dibasic sodium phosphate buffer solution, pH 6) with 50 µL of enzyme extract were shaken for 30 s and kept 30 min at 35 °C. After 20 min, 1 mL 5 % trichloroacetic acid was added to stop the reaction. Proteolytic activity was quantified by spectrophotometry at 280 nm in the supernatant obtained after centrifuging (30 min at 3000 rpm, 4 °C). The activity was expressed as units of enzyme activity (UEA) (increase in absorbance of 0.001 per mg of protein per min). This analysis was performed in triplicate.

Experimental design and statistical analysis

The experimental design was complete randomized blocks, and data about the effect of NaCl on curdling strength and proteolytic activity were analyzed with ANOVA. The treatments were: condition without salt, with saturated brine, and surface saturation. The effect of blocking were days of storage. When differences were found, the Tukey test, $p \leq 0.05$ (Steel *et al.*, 1997) was used, with SAS 9.0.

For the combined effect of NaCl and ethanol the experimental design was completely randomized with a 6×6×4 factorial array: six levels of NaCl (0, 1, 2, 3, 4 and 5 %), six levels of ethanol (0, 1, 2, 3, 4 and 5 %) and four storage times (4, 8, 12 and 16 d). When significant differences were found, the Tukey test was applied, $p \leq 0.05$ (Steel *et al.*, 1997).

RESULTS AND DISCUSSION

Stage 1: Effect of NaCl on curdling strength and proteolytic activity

Significant differences in curdling strength were found among the extracts from stomachs with and without NaCl. The extract without NaCl did not coagulate milk at any of the storage times. The extract from stomachs submerged in brine coagulated milk

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Etapa 1. Efecto del NaCl sobre la fuerza de cuajado y actividad proteolítica

Hubo diferencias significativas entre los extractos de los estómagos con y sin NaCl, en la fuerza de cuajado. El extracto sin NaCl, no coaguló en ninguno de los tiempos de almacenamiento. El extracto de los estómagos sumergidos en salmuera coaguló como el de los estómagos saturados con NaCl (Cuadro 1). Ese resultado permite sugerir que el NaCl afectó la actividad coagulante, como indica Whitaker (1994), quien menciona que concentraciones superiores a 6 % de NaCl puede afectar la actividad enzimática, provocando en algunos casos una inhibición parcial o total. Sánchez y Burgos (1997) reportaron que concentraciones menores de 2 % de NaCl, aumentan la solubilidad y el desdoblamiento de las proteínas incrementando la actividad de las enzimas.

La fuerza de cuajado y UAE mostraron diferencia significativas entre tratamientos, pero la primera no se afectó por el tiempo de almacenamiento. En los extractos sin NaCl la UAE fue mayor (Cuadro 1), pero la leche no coagulo. Esto pudo deberse a que el NaCl modificó la conformación en el espacio de las proteínas y del sitio activo. Además, el efecto del NaCl en la disminución de la actividad proteolítica en los tratamientos se explica porque esta sal promueve la disociación del calcio y fosfatos de las micelas de caseína a la solución, lo cual afecta el estado coloidal de la leche y produce interacciones electrostáticas con los residuos de aminoácidos cargados. Aunque el NaCl en concentraciones menores

as did that from stomachs saturated with NaCl (Table 1). This result suggests that NaCl affected coagulating activity, as Whitaker (1994) indicated. This author states that NaCl concentrations above 6 % can affect enzyme activity, partially or totally inhibiting the process. Sánchez and Burgos (1997) reported that NaCl concentrations below 2 % increase protein solubility and unfolding and increases enzyme activity.

Curdling strength and units of enzyme activity (UEA) were significantly different among treatments. Curdling strength was not affected by storage time. In the extracts without NaCl, UEA was greater (Table 1), but the milk did not coagulate. The reason for this may have been that the NaCl modified the conformation of the protein space and the active site. Moreover, the diminishing effect of the NaCl on proteolytic activity of the treatments is explained by the fact that salt promotes dissociation of calcium and phosphates of casein micelles, affecting the colloidal state of the milk and producing electrostatic interactions with the charged amino acids. Although, NaCl at concentrations below 5.8 % (1 M) seems to stabilize the original protein folding (Chazarra *et al.*, 2007), the method of applying the salt can affect activity, since high concentrations of NaCl delay proteolysis (Calvo *et al.*, 2007).

Moschopoulou *et al.* (2007) pointed out that air-dried milk coagulants obtained from lamb stomachs maintain more activity for a longer time than those made from fresh or salted stomachs. In contrast, rennet from lambs lose their coagulating activity after four months of storage when salt is not applied (Moschopoulou, 2011). Busamante *et al.* (2000)

Cuadro 1. Efecto de NaCl en la fuerza de cuajado (10^3) y actividad proteolítica de estómago de conejo.
Table 1. Effect of NaCl on curdling strength (10^3) and proteolytic activity of coagulant from rabbit stomach.

	Sin NaCl		NaCl acuoso		NaCl saturado	
	2	10	2	10	2	10
Tiempo de cuajado (s)	S E	S E	606 ^a ±65	731 ^a ±38	351 ^b ±45	252 ^b ±51
Fuerza de cuajado [†]	S E	S E	4.48 ^a ±1.66	3.65 ^a ±1.34	8.05 ^b ±3.17	16.38 ^b ±5.88
UAE	1208 ^b ±123	1393 ^b ±149	985 ^a ±56	1067 ^a ±101	915 ^a ±87	846 ^a ±92

S E: Sin efecto. UAE: Unidades de Actividad Enzimática (aumento de 0.001 en la absorbancia por mg de proteína por minuto); [†]L de leche coagulados por g de estómago. Tratamientos con letra diferente en un renglón son diferentes estadísticamente ($p \leq 0.05$) ❖ S E: No effect. UEA: Units of Enzyme Activity (increase of 0.001 in absorbance per mg protein per minute). [†]L of milk coagulated by g stomach. Treatments with different letters in a row are significantly different ($p \leq 0.05$).

a 5.8 % (1 M) parece estabilizar el plegamiento original de las proteínas (Chazarra *et al.*, 2007), el método de aplicación de la sal puede afectar la actividad, porque concentraciones altas de NaCl retrasan la proteólisis (Calvo *et al.*, 2007).

Moschopoulou *et al.* (2007) señalaron que los coagulantes lácteos secados al aire y salados obtenidos de estómagos de cordero, mantienen más actividad coagulante por más tiempo que los elaborados con estómagos frescos y salados. En contraste, los cuajos de cordero sin la aplicación de NaCl pierden su actividad coagulante después de cuatro meses de almacenamiento (Moschopoulou, 2011). Bustamante *et al.* (2000) reportaron que la cantidad de NaCl añadida en la elaboración de cuajos de cordero, no afectó la actividad coagulante o su estabilidad.

Etapa 2. Efecto de los extractos coagulantes de estómagos de conejo adicionados con NaCl y etanol sobre la fuerza de cuajado y actividad enzimática

La fuerza de cuajado no cambió con NaCl, pero hubo diferencias significativas ($p \leq 0.05$) con la combinación de etanol y NaCl (Cuadro 2). La fuerza de cuajado promedio (g estómago de conejo L^{-1} leche) (Cuadro 3) fue superior 4 (1:17 640), 8 (1:24 480), 12 (1:14 520) y 16 (1:31 710), a la obtenida por Florez *et al.* (2006) entre 4 y 16 d (alrededor de 1:1000 para cuajo de cabrito) y por Chazarra *et al.* (2007) con 0, 34, 51 y 102 mM de NaCl en extractos de flores de cardo (de 1:387 a 1:422 g^{-1} cardo). Este resultado puede atribuirse a las concentraciones bajas de NaCl empleadas para elaborar los extractos, e indica la importancia de este factor, ya que la fuerza de cuajado de pepsina y quimosina naturales, sin NaCl, se pierde hasta 26 % después de 6 meses de almacenamiento (Kozelkova *et al.*, 2012). Según, Anifantakis y Green (1980) la actividad coagulante fue mayor con las enzimas coagulantes extraídas con 6 % NaCl.

La diferencia fue significativa ($p \leq 0.05$) para UAC en el tratamiento con 0 % de NaCl y 0 % de etanol, respecto a los tratamientos con 1 a 5 % de NaCl en todos los niveles de etanol (Cuadro 3). El aumento en la actividad proteolítica causado por la adición de 2 a 5 % de NaCl puede deberse a que la fuerza iónica de las soluciones mejora la solubilidad de las enzimas, como lo reportan Ahmed *et al.*

reported that the amount of salt added in making rennet from lambs does not its affect coagulating activity or its stability.

Stage 2. Effect of the coagulating extracts from rabbit stomachs supplemented with NaCl and ethanol on curdling strength and enzyme activity

Coagulating strength was not modified by NaCl. However, there were significant differences ($p \leq 0.05$) when ethanol was combined with NaCl (Table 2). Average curdling strength (g rabbit stomach L^{-1} milk) (Table 3) was higher 4 (1:17 640), 8 (1:24 480), 12 (1:14 520) and 16 (1:31 710) than that obtained by Florez *et al.* (2006) between days 4 and 16 (around 1:1000 for rennet from goat kid) and by Chazarra *et al.* (2007) with 0, 34, 51 and 102 mM NaCl in extracts from thistle flowers (1:387 to 1:422 g^{-1} thistle). This result may be attributed to the low NaCl concentrations used to prepare the extracts, indicating the importance of this factor since natural pepsin and chymosin without salt lose up to 26 % of their curdling strength after 6 months of storage (Kozelkova *et al.*, 2012). According to Anifantakis and Green (1980) coagulating activity was higher with coagulant enzymes extracted with 6 % NaCl.

UEA observed in the treatment that contained 0 % NaCl and 0 % ethanol was significantly different ($p \leq 0.05$) from the treatments with 1 to 5 % NaCl at all levels of ethanol (Table 3). The increase in proteolytic activity observed when 2 to 5 % concentrations of NaCl were added may be due to improvement in solubility of the enzymes by ionic force, as reported by Ahmed *et al.* (2009), that enzyme proteolytic activity is potentiated when using solutions of up to 5 % NaCl. According to Irigoyen *et al.* (2001), chymosin proteolytic activity in rennet from calves may be affected by the NaCl concentration by modifying its specificity.

CONCLUSIONS

Rabbit stomachs contain coagulating enzymes that can be extracted with solutions containing 1 to 5 % NaCl and pH 4. Addition of NaCl and ethanol to the rabbit stomachs did not affect coagulating activity or curdling strength when tested with cow's milk. The use of rabbit stomachs as a

Cuadro 2. Efecto combinado del NaCl y el etanol sobre la fuerza de cuajado (L leche coagulados g⁻¹ estómago) (10³).

Table 2. Combined effect of NaCl and ethanol on curdling strength (L milk coagulated g⁻¹ stomach) (10³).

Tratamientos		Días de almacenamiento			
NaCl (%)	Etanol (%)	4	8	12	16
0	0	S E	S E	S E	S E
	1	S E	S E	S E	S E
	2	S E	S E	S E	S E
	3	S E	S E	S E	S E
	4	S E	S E	S E	S E
	5	S E	S E	S E	S E
1	0	7.34 ^c ±7.12	13.07 ^b ±5.42	10.67 ^{bc} ±5.11	18.31 ^a ±18.18
	1	8.73 ^{bc} ±8.10	12.98 ^b ±2.72	7.31 ^{bc} ±1.24	15.93 ^a ±13.58
	2	11.18 ^{abc} ±5.40	15.73 ^b ±7.02	8.29 ^{bc} ±6.23	17.26 ^a ±3.19
	3	8.46 ^{bc} ±8.0	11.99 ^b ±4.80	5.15 ^c ±2.44	11.93 ^a ±12.65
	4	13.85 ^{abc} ±2.45	17.50 ^b ±6.98	7.84 ^{bc} ±4.92	18.12 ^a ±4.41
	5	14.12 ^{abc} ±0.35	17.51 ^b ±7.87	8.76 ^{bc} ±5.67	19.99 ^a ±4.37
2	0	18.09 ^{abc} ±2.01	31.58 ^{ab} ±0.59	20.28 ^{ab} ±4.60	26.59 ^a ±6.47
	1	20.96 ^{abc} ±0.39	33.12 ^{ab} ±0.97	26.56 ^a ±1.45	34.17 ^a ±10.19
	2	19.46 ^{abc} ±2.0	49.93 ^a ±29.22	19.60 ^{abc} ±5.24	36.96 ^a ±1.61
	3	21.85 ^{ab} ±1.12	32.23 ^{ab} ±0.92	19.85 ^{ab} ±1.96	41.39 ^a ±9.35
	4	20.67 ^{abc} ±1.63	24.09 ^{ab} ±2.04	18.22 ^{abc} ±4.81	32.30 ^a ±9.96
	5	19.24 ^{abc} ±3.64	27.75 ^{ab} ±0.68	18.39 ^{abc} ±2.27	38.85 ^a ±18.84
3	0	21.43 ^{ab} ±2.02	37.24 ^{ab} ±4.86	19.20 ^{abc} ±3.42	38.34 ^a ±12.32
	1	21.69 ^{ab} ±1.66	27.77 ^{ab} ±1.14	20.89 ^{ab} ±2.17	42.43 ^a ±12.2
	2	21.34 ^{ab} ±0.67	26.52 ^{ab} ±0.21	19.93 ^{ab} ±0.58	29.10 ^a ±0.75
	3	18.47 ^{abc} ±0.40	27.13 ^{ab} ±3.02	18.80 ^{abc} ±4.26	31.86 ^a ±5.60
	4	18.98 ^{abc} ±0.32	28.98 ^{ab} ±1.98	18.40 ^{abc} ±3.24	40.53 ^a ±27.54
	5	18.34 ^{abc} ±0.79	27.86 ^{ab} ±2.51	16.43 ^{abc} ±4.59	38.49 ^a ±22.71
4	0	17.98 ^{abc} ±2.17	23.85 ^{ab} ±3.16	15.31 ^{abc} ±0.83	30.78 ^a ±11.21
	1	14.18 ^{abc} ±2.28	17.50 ^b ±5.02	11.07 ^{bc} ±1.57	27.50 ^a ±3.54
	2	15.95 ^{abc} ±0.07	30.48 ^{ab} ±10.77	14.66 ^{abc} ±4.79	44.93 ^a ±28.19
	3	18.45 ^{abc} ±1.50	23.57 ^{ab} ±6.60	11.16 ^{bc} ±5.17	33.03 ^a ±16.14
	4	17.84 ^{abc} ±2.14	24.01 ^{ab} ±9.00	9.73 ^{bc} ±0.81	51.76 ^a ±39.93
	5	19.13 ^{abc} ±0.54	22.88 ^{ab} ±4.54	12.62 ^{abc} ±3.10	34.92 ^a ±19.88
5	0	17.87 ^{abc} ±1.03	22.42 ^{ab} ±3.65	13.76 ^{abc} ±1.88	37.12 ^a ±18.21
	1	24.14 ^a ±1.55	22.14 ^{ab} ±5.98	14.24 ^{abc} ±5.19	35.27 ^a ±12.98
	2	19.38 ^{abc} ±2.63	21.55 ^{ab} ±0.96	11.85 ^{abc} ±0.04	32.02 ^a ±1.21
	3	20.14 ^{abc} ±1.55	19.86 ^b ±0.93	13.12 ^{abc} ±0.10	32.33 ^a ±2.76
	4	19.61 ^{abc} ±0.79	21.65 ^{ab} ±1.10	12.12 ^{abc} ±1.50	32.28 ^a ±4.26
	5	20.43 ^{abc} ±6.11	21.41 ^{ab} ±7.03	11.56 ^{bc} ±1.71	26.78 ^a ±8.49
	Promedio	17.64 ^{abc} ±2.48	24.48 ^{ab} ±4.72	14.52 ^{abc} ±3.03	31.71 ^a ±12.02
	EE	2.40	5.04	2.51	10.65

S E: Sin efecto; EE: error estándar de la media; tratamientos con letras diferentes en una columna son diferentes estadísticamente (p≤0.05) ❖ S E: No effect; EE: standard error of the mean; treatments with different letters in a column are statistically significant (p≤0.05).

Cuadro 3. Efecto combinado del NaCl y el etanol en la actividad proteolítica (UAE×10³).
Table 3. Combined effect of NaCl and ethanol on proteolytic activity (UEA×10³).

Tratamientos		Días de almacenamiento			
NaCl (%)	Etanol (%)	4	8	12	16
0	0	3.86 ^a ±0.21	2.79 ^a ±1.91	2.86 ^a ±1.50	2.14 ^a ±1.40
	1	2.88 ^{ab} ±0.79	1.67 ^{ab} ±0.40	1.89 ^{ab} ±0.50	1.60 ^a ±0.42
	2	2.27 ^{abc} ±0.90	1.28 ^{ab} ±0.15	1.43 ^{ab} ±0.14	1.18 ^a ±0.08
	3	2.89 ^{ab} ±0.58	1.58 ^{ab} ±0.56	1.70 ^{ab} ±0.57	1.40 ^a ±0.42
	4	2.95 ^{ab} ±0.06	2.06 ^{ab} ±1.30	2.05 ^{ab} ±1.26	1.78 ^a ±1.09
	5	2.90 ^{ab} ±0.22	1.88 ^{ab} ±0.92	1.91 ^{ab} ±1.12	1.76 ^a ±1.12
1	0	2.11 ^{abc} ±0.31	1.29 ^{ab} ±0.38	1.43 ^{ab} ±0.43	1.66 ^a ±0.51
	1	1.48 ^{bc} ±0.43	0.94 ^{ab} ±0.29	1.06 ^{ab} ±0.25	1.20 ^a ±0.33
	2	1.76 ^{bc} ±0.63	0.99 ^{ab} ±0.09	1.22 ^{ab} ±0.14	1.28 ^a ±0.11
	3	1.94 ^{bc} ±1.56	1.19 ^{ab} ±0.21	1.21 ^{ab} ±0.25	1.27 ^a ±0.29
	4	1.56 ^{bc} ±0.83	0.96 ^{ab} ±0.01	1.07 ^{ab} ±0.07	1.18 ^a ±0.12
	5	1.64 ^{bc} ±0.87	0.96 ^{ab} ±0.04	1.05 ^{ab} ±0.08	1.22 ^a ±0.11
2	0	1.48 ^{bc} ±0.29	1.29 ^{ab} ±0.32	1.42 ^{ab} ±0.25	1.48 ^a ±0.15
	1	1.34 ^{bc} ±0.15	1.21 ^{ab} ±0.25	1.20 ^{ab} ±0.13	1.34 ^a ±0.06
	2	1.16 ^{bc} ±0.21	1.09 ^{ab} ±0.19	1.13 ^{ab} ±0.04	1.17 ^a ±0.00
	3	1.29 ^{bc} ±0.13	1.12 ^{ab} ±0.00	1.15 ^{ab} ±0.03	1.24 ^a ±0.09
	4	1.29 ^{bc} ±0.13	0.92 ^{ab} ±0.00	1.00 ^b ±0.04	1.12 ^a ±0.10
	5	1.19 ^{bc} ±0.22	0.96 ^{ab} ±0.03	1.06 ^{ab} ±0.02	1.14 ^a ±0.01
3	0	1.25 ^{bc} ±0.21	0.95 ^{ab} ±0.14	1.04 ^b ±0.24	1.18 ^a ±0.34
	1	1.29 ^{bc} ±0.11	1.00 ^{ab} ±0.17	1.09 ^{ab} ±0.07	1.15 ^a ±0.01
	2	1.20 ^{bc} ±0.13	0.90 ^{ab} ±0.09	1.03 ^b ±0.16	1.10 ^a ±0.23
	3	1.17 ^{bc} ±0.17	0.91 ^{ab} ±0.15	0.98 ^b ±0.08	1.08 ^a ±0.03
	4	1.20 ^{bc} ±0.13	0.94 ^{ab} ±0.07	1.07 ^{ab} ±0.17	1.16 ^a ±0.16
	5	0.86 ^c ±0.09	0.70 ^b ±0.08	0.69 ^b ±0.11	0.81 ^a ±0.17
4	0	1.46 ^{bc} ±0.57	1.09 ^{ab} ±0.44	1.15 ^{ab} ±0.21	1.30 ^a ±0.08
	1	1.43 ^{bc} ±0.05	1.21 ^{ab} ±0.02	1.38 ^{ab} ±0.07	1.18 ^a ±0.51
	2	1.38 ^{bc} ±0.15	1.02 ^{ab} ±0.03	1.22 ^{ab} ±0.14	1.10 ^a ±0.17
	3	1.20 ^{bc} ±0.10	0.97 ^{ab} ±0.05	1.13 ^{ab} ±0.20	1.03 ^a ±0.09
	4	1.27 ^{bc} ±0.14	1.01 ^{ab} ±0.14	1.26 ^{ab} ±0.02	1.15 ^a ±0.29
	5	1.32 ^{bc} ±0.04	1.05 ^{ab} ±0.14	1.26 ^{ab} ±0.05	1.20 ^a ±0.02
5	0	1.63 ^{bc} ±0.04	1.27 ^{ab} ±0.04	1.53 ^{ab} ±0.05	1.57 ^a ±0.32
	1	1.62 ^{bc} ±0.04	1.24 ^{ab} ±0.29	1.60 ^{ab} ±0.049	1.47 ^a ±0.01
	2	1.26 ^{bc} ±0.15	1.06 ^{ab} ±0.06	1.19 ^{ab} ±0.12	1.24 ^a ±0.07
	3	1.37 ^{bc} ±0.30	1.16 ^{ab} ±0.20	1.28 ^{ab} ±0.04	1.28 ^a ±0.32
	4	1.46 ^{bc} ±0.22	1.23 ^{ab} ±0.12	1.32 ^{ab} ±0.03	1.38 ^a ±0.32
	5	1.27 ^{bc} ±0.02	0.95 ^{ab} ±0.12	1.16 ^{ab} ±0.29	1.12 ^a ±0.01
EEM		320	326	308	294

Tratamientos con letras diferentes en una columna son diferentes estadísticamente ($p \leq 0.05$) ❖ Treatments with different letter in a column are statistically different ($p \leq 0.05$).

(2009) de que la actividad proteolítica de las enzimas se potencia al usar soluciones hasta con 5 % de NaCl. Según Irigoyen *et al.* (2001), la actividad proteolítica de la quimosina en el cuajo de becerro puede ser afectada por la concentración de NaCl modificando su especificidad.

CONCLUSIONES

Los estómagos de conejo contienen enzimas coagulantes que se pueden extraer con soluciones que contengan 1 a 5 % de NaCl y pH 4. La adición de NaCl y etanol a los estómagos de conejo no afectó la actividad coagulante y fuerza de cuajado al ser probados en leche de vaca. La utilización de estómagos de conejo como fuente de enzimas coagulantes es una alternativa al cuajo convencional, con potencial para la quesería artesanal.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Universidad Autónoma del Estado de México por el financiamiento de este proyecto de investigación (clave 3253/2012CHT).

LITERATURA CITADA

- Addis, M., G. Piredda., and A. Pirisi. 2008. The use of lamb rennet paste in traditional sheep milk cheese production. *S. Rum. Res.* 79: 2-10.
- Anifantakis, E. and M. Green. 1980. Preparation and properties of rennets from lamb's and kid's abomasa. *J. Dairy Res.* 47: 221-230.
- Ahmed, I. A. M., Morishima, I., Babiker, E. E., and Mori, N. 2009. Characterisation of partially purified milk-clotting enzyme from *Solanum dubium* Fresen seeds. *Food Chem.* 116: 395-400.
- Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Bustamante, M., F. Chavarri, A. Santisteban, G. Ceballos, I. Hernández, J. Miguelez, I. Aranburu, L. Barron, M. Virto., and M. de Renobales. 2000. Coagulating and lipolytic activities of artisanal lamb rennet pastes. *J. Dairy Res.* 67: 393-402.
- Calvo, M., I. Castillo, V. Díaz-Barcos, T. Requena, and J. Fontecha. 2007. Effect of a hygienized rennet paste and a defined strain starter on proteolysis, texture and sensory properties of semi-hard goat cheese. *Food Chem.* 102: 917-924.
- Chazarra, S., L. Sidrach, D. López-Molina, and J. Rodríguez-López. 2007. Characterization of the milk-clotting properties of extracts from artichoke (*Cynara scolymus* L.) flowers. *Int. Dairy J.* 17: 1393-1400.

source of coagulating enzymes is an alternative to conventional rennet and has potential use in artisan cheese-making.

—End of the English version—



- Corzo, C., K. Waliszewsky, and J. Weltio-Chanes. 2012. Pineapple fruit bromelain affinity to different protein substrates. *Food. Chem.* 133: 631-635.
- Florez, A., A. Hernández, I. Marcos, and B. Mayo. 2006. Biochemical and microbiological characterization of artisan kid rennet extracts used for cabrales cheese manufacture. *LWT Food Sc. Tech.* 39: 605-612.
- Irigoyen, A., J. M. Izco, F. C. Ibanez, and P. Torre. 2001. Influence of rennet milk-clotting activity on the proteolytic and sensory characteristics of an ovine cheese. *Food Chem.* 72: 137-144.
- Jacob, M., D. Jaros, and H. Rohm. 2011. Recent advances in milk clotting enzymes *International J. Dairy Tech.* 64: 14-33.
- Kozelkova, M., M. Jüzl, T. Lužova, K. Šustova, and A. Bubeníčková. 2012. Changes of quality of rennets during storing. *Acta Universitatis Agriculturae Et Silviculturae Mendelianae Brunensis* 60: 189-196.
- Kumar A., J. Sharma, A. Mohanty, S. Grover, and V. Batish. 2006. Purification and characterization of milk clotting enzyme from goat (*Capra hircus*). *Comparativ. Biochem. Physiol. Part B.* 145: 108-113.
- Moatsou, G., E. Moschopoulou, A. Georgala, E. Zoiidou, I. Kandarakis, S. Kaminarides, and E. Anifantakis. 2004. Effect of artisanal liquid rennet from kids and lambs abomasa on the characteristics of Feta cheese. *Food Chem.* 88: 527-525.
- Moschopoulou, E., I. Kandarakis, and E. Anifantakis. 2007. Characteristics of lamb and kid artisanal liquid rennet used for traditional Feta cheese manufacture. *Small Rum. Res.* 72: 237-241.
- Moschopoulou, E. 2011. Characteristics of rennet and other enzymes from small ruminants used in cheese production. *Small Rum. Res.* 101: 188-195.
- NOM-033-ZOO-1995. Sacrificio humanitario de los animales domésticos y silvestres. Dirección de Normalización.
- O'Connell, H., P. Saracino, T. Huppertz, T. Uniake, and C. de Kruiif. 2006. Influence of ethanol on the rennet-induced coagulation of milk. *J. Dairy Res.* 73: 312-317.
- Ordiales, E., A. Martín, M. Benito, M. Fernández, R. Casquete, and M. Córdoba. 2012. Influence of technological properties of vegetable rennet (*Cynara 1 cardunculus*) on the texture of "Torta del Casar" cheese. *J. Dairy Sc.* 133: 227-235.
- Rolet, O., F. Berthier, E. Beuvier, S. Gavoye, E. Notz, S. Roustel, V. Gagnaire, and C. Achilleos. 2013. Characterization of the non-coagulating enzyme fraction of different milk-clotting preparations. *LWT Food Sc. Tech.* 50: 459-468.
- Sánchez, A. C., and J. Burgos. 1997. Gelation of sunflower globulin hydrolysates: rheological and calorimetric studies. *J. Agric. Food Chem.* 45: 2407-2412.
- Spreer, E., and A. Mixa. 1998. *Milk and Dairy Product Technology.* Marcel Decker Inc. USA. 260 p.

- Szendró, Z., and F. Luzi. 2006. Milk production of rabbit. *Baromfiágazat*. 6: 68-72.
- Steel, G., J. H. Torrie, and D. A. Dickey. 1997. Principles and Procedures of Statistics. A Biometrical Approach. The McGraw-Hill Companies, Inc., Michigan University Press, Michigan, USA. 666 p.
- Tripaldi, C., G. Palocci, S. Bilei, T. Bogdanova, M. Scintu, and M. Addis. 2012. Physical, chemical, enzymatic and microbiological characteristics of artisanal rennet pastes from the center of Italy. *Italian J. Food Sc.* 24: 70-76.
- Wahba, A., and F. El-Abbassy. 1981. Milk-clotting activity of rennet and of rabbit, sheep and porcine pepsins. I. Effect of some salts, temperature and storage. *Egyptian J. Dairy Sc.* 9: 5-10.
- Whitaker, J. 1994. Principles of Enzymology for the Food Sciences. Marcel Dekker. 648 p.