

ACTIVIDAD COAGULANTE DEL EXTRACTO DE LA FLOR DEL CARDON *CYNARA HUMILIS*, L.*

(CLOTTING ACTIVITY OF AN EXTRACT FROM THE FLOWERS OF THE CARDON
CYNARA HUMILIS).

por

EMILIA MARTINEZ Y MARIA A. ESTEBAN

Departamento de tecnología y bioquímica de los alimentos. Facultad de veterinaria
Universidad de Córdoba (España)

S u m m a r y .

The milk-clotting activity of an extract of coagulant obtained from the flowers of Cynara humilis L. has been compared with that of crystalline rennin, pig pepsin, and crude papain.

The influence of enzyme concentration, temperature, pH, and calcium chloride on the clotting activities of the four enzymes, was also investigated.

R e s u m e n .

Se ha estudiado comparativamente la actividad coagulante del extracto obtenido de la flor del cardo Cynara humilis L., de la renina cristalina, pepsina porcina y papaína bruta, así como la influencia de la concentración enzimática, temperatura, pH y concentración de cloruro cálcico, sobre la actividad coagulante de las cuatro enzimas.

El extracto de la flor de cardo se utiliza en la península Ibérica como cuajo vegetal en la fabricación casera de los quesos de oveja españoles de los Pedroches (Córdoba), Serena (Badajoz), queso torta del Casar (Cáceres) y queso de los montes de San Benito de Huelva; ocasionalmente se emplea en la fabricación del queso de

* Resumen de la tesina de licenciatura realizada por Emilia Martínez Galisteo bajo la dirección de la Dra. D.^a M.^a Asunción Esteban Quílez, leída el 13-VII-1979 y calificada de sobresaliente.

Aragón¹. Los campesinos portugueses también usan la flor de cardo para elaborar los quesos de Serra y Serpa²⁵.

El extracto coagulante se obtiene de los cardos del género *Cynara*, principalmente de las especies *C. cardunculus*, *C. humilis* y *C. scolymus*¹.

Christen y Virasoro⁷ estudiaron las propiedades coagulantes de la leche de extractos de los pétalos de la flor del cardo *C. cardunculus*. Más recientemente se ha determinado la actividad coagulante del extracto de flor de cardo (*C. cardunculus*), así como la influencia de factores tales como la temperatura, pH concentración de enzima y tipo de leche²⁵.

El objetivo del presente trabajo es determinar la actividad coagulante de la proteasa presente en la flor del cardo *C. humilis*, así como el efecto de la concentración de enzima, temperatura, pH, y concentración de cloruro cálcico sobre el tiempo de coagulación.

La actividad coagulante del cuajo de cardo se investiga comparativamente, utilizando otro coagulante vegetal (papaína) y dos coagulantes de origen animal: pepsina porcina y la renina cristalina.

En otro trabajo paralelo realizado en este Departamento se ha investigado la actividad proteolítica del extracto del cardo *C. humilis* por electroforesis cuantitativa, así como la influencia del cloruro sódico, utilizando como referencia renina cristalina¹⁹.

Material y métodos.

Substrato. Se ha utilizado leche descremada reconstituída según².

Enzimas coagulantes. Renina cristalina (E. C. N.º 3.4.23.4), pepsina porcina (E. C. N.º 3.4.4.1) y papaína bruta (E. C. N.º 3.4.22.2.), obtenidos de Sigma.

Polvo bruto de pétalos desecados de la flor de cardos silvestres de la especie *Cynara humilis*.

Soluciones enzimáticas. La renina se disolvió en agua destilada a una concentración de 80 ng/ml. Un mililitro de esta solución dio tiempos de coagulación próximos a 6 minutos.

De los restantes coagulantes se obtuvieron soluciones madres, dejándolos macerar en agua destilada durante 12 horas y filtrando seguidamente; los filtrados fueron diluidos hasta conseguir que las soluciones de ensayo tuviesen aproximadamente el mismo tiempo de coagulación que la solución de renina cristalina.

Determinación de proteína. La proteína de los extractos enzimáticos se determinó por el método de Jhonson¹⁴, utilizando como referencia albúmina de suero bovino (Sigma).

Actividad coagulante de las soluciones enzimáticas. Se ha seguido la técnica de Berridge^{3,4} adoptada como "rennet test" y publicada por la *British Standard Institution*⁶. Las determinaciones se hicieron por duplicado.

Determinación del tiempo de coagulación en otras condiciones. Para determinar la influencia de la temperatura, del pH, de diferentes combinaciones de temperatura y pH, de la concentración de enzima y de la concentración de $\text{Cl}_2 \text{Ca}$ en la actividad de los cuatro coagulantes, se modificaron adecuadamente las condiciones de la prueba normal del tiempo de coagulación.

En el caso del efecto del pH sobre el tiempo de coagulación, alícuotas de la leche reconstituida fueron ajustadas a los diferentes valores de pH mediante la adición de ácido láctico al 10 p. 100 o hidróxido sódico 0,1 N. El pH se ajustó con titulador combinado a pH-metro Beckman modelo Expandomatic.

Para estudiar el efecto de la concentración de $\text{Cl}_2 \text{Ca}$ se mezclaron en las proporciones adecuadas la leche reconstituida normal y una alícuota de la misma, a la que se añadió y en la que se disolvió cloruro cálcico para ajustar la molaridad a 0,03.

Resultados y discusión.

Efectos de la concentración enzimática sobre el tiempo de coagulación.

En la figura 1 se representan los tiempos de coagulación correspondientes a distintas concentraciones de las diferentes enzimas.

En general las concentraciones elevadas de renina, pepsina y extrato de flor de cardo no tienen gran influencia sobre la actividad coagulante. A concentraciones bajas, sin embargo, el tiempo de coagulación tiende a incrementarse considerablemente con la disminución de la concentración de enzima; efecto que es algo menor en la proteasa del cardo que en la renina y en ésta menor que en el caso de la pepsina. Ketting y Paulay¹⁶ hallaron que la actividad coagulante de la pepsina, a diferencia de la renina, decrecía desproporcionadamente al decrecer la concentración de enzima.

En lo que respecta a la papaína el efecto de la concentración del coagulante sobre el tiempo de coagulación es más regular y tiende a ser más lineal que en las restantes enzimas (figura 1).

En el cuadro I se muestran los valores K obtenidos multiplicando la concentración de enzima por el tiempo de coagulación. Los citados valores no son constantes,

MARTINEZ Y ESTEBAN: ACTIVIDAD COAGULANTE DE LA FLOR DEL CARDO.

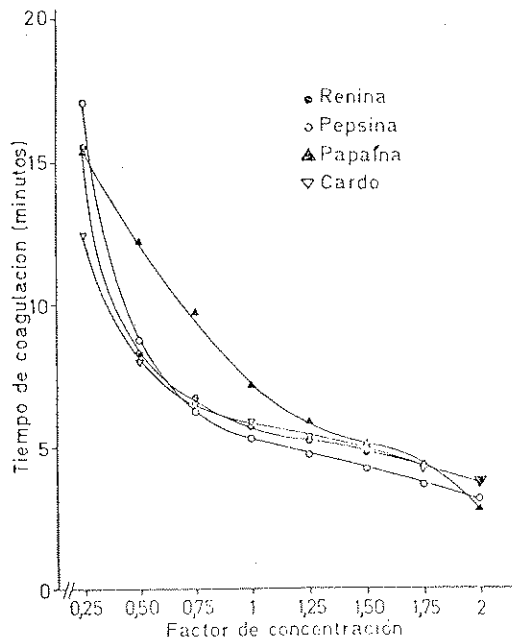


FIGURA 1. Efecto de la concentración de enzima sobre el tiempo de coagulación.

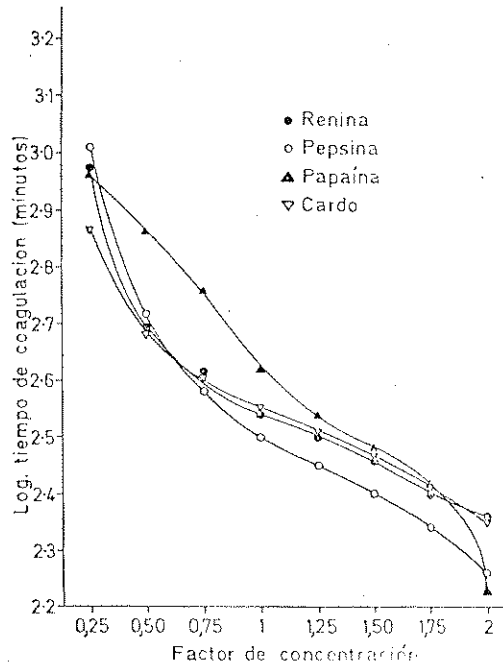


FIGURA 2. Relación entre la actividad coagulante y la concentración de enzima

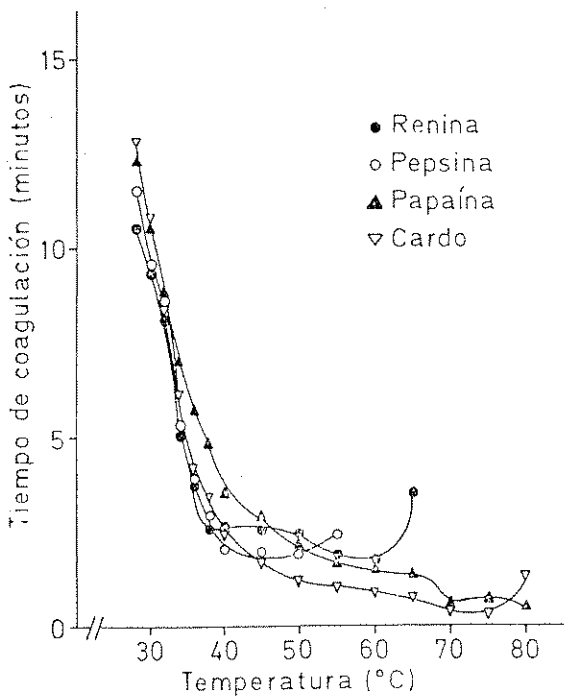


FIGURA 3. Efecto de la temperatura sobre el tiempo de coagulación.

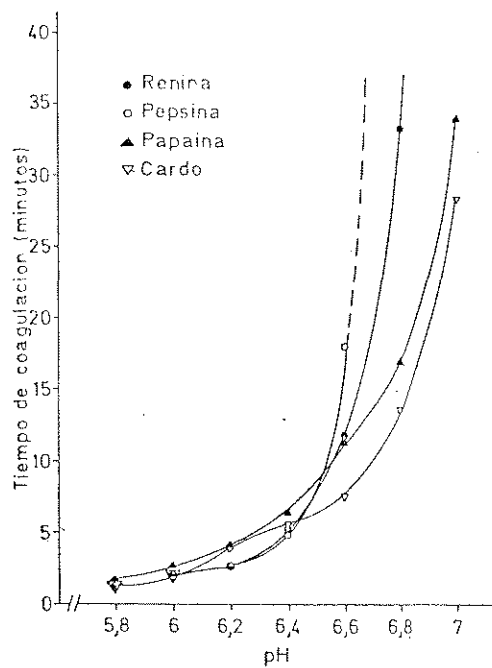


FIGURA 4. Efecto del pH sobre el tiempo de coagulación.

CUADRO I. Valores *K* (producto de la concentración de enzima por el tiempo de coagulación).

Factor de concentración	Renina (a)	Pepsina (b)	Papaína (c)	Cardo (d)
0,25	233,00	256,75	230,00	186,25
0,50	247,50	264,50	366,00	240,00
0,75	305,25	282,75	436,50	295,50
1,00	347,00	319,00	420,00	356,00
1,25	391,25	356,25	437,50	405,00
1,50	430,50	378,00	456,00	438,00
1,75	442,75	381,50	465,50	455,00
2,00	454,00	364,00	336,00	444,00

- (a) 80 ng proteína/ml.
 (b) 78,5 μ g proteína/ml.
 (c) 2,1 mg proteína/ml.
 (d) 4,3 mg proteína/ml.

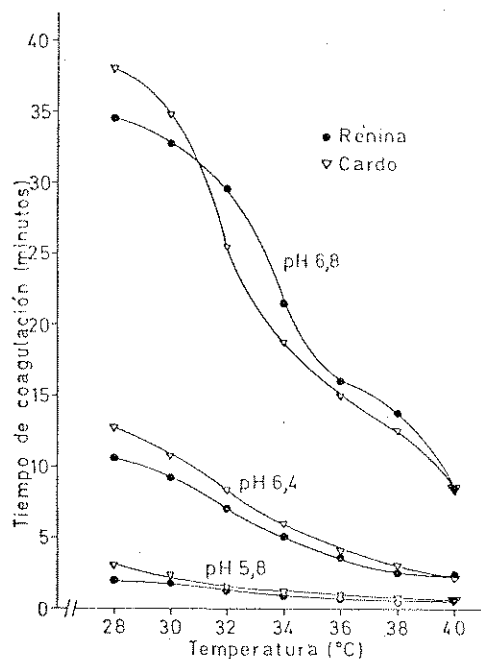


FIGURA 5. Efecto combinado de la temperatura y del pH sobre el tiempo de coagulación.

como cabría esperar de la relación de Storch y Segelke²⁰, sino que en los cuatro coagulantes el valor K decrece al disminuir la concentración de enzima; hecho que concuerda con las observaciones de Holter¹³ y Ernstrom⁹ relativas a la renina,

Tampoco la concentración de enzima se encuentra relacionada logarítmicamente con el tiempo de coagulación, como señalaron Grimmer y Krüge¹², según puede verse en la figura 2.

Efecto de la temperatura sobre el tiempo de coagulación.

En la figura 3 se representan gráficamente los datos referentes a la influencia de la temperatura sobre la actividad coagulante de las enzimas objeto de estudio.

Dentro del margen de temperatura de 28 a 38° C la influencia de la temperatura en la actividad de los cuatro coagulantes es crítica a juzgar por la elevada pendiente de las correspondientes gráficas. Entre los 38° y los 48° C el tiempo de coagulación, por la acción de la renina cristalina, permanece aproximadamente constante, acortándose a partir de los 50° C hasta alcanzar un mínimo a los 60° C; a temperaturas más elevadas (65° C) el tiempo de coagulación aumenta nuevamente debido a la inactivación de la renina por desnaturalización térmica. Kelley¹⁵ señaló que a temperaturas superiores a 40° C la velocidad de inactivación de la renina superaba al aumento de su actividad, debido a la mayor temperatura.

También la actividad coagulante de la pepsina porcina se estabiliza entre los 40 y los 50° C; temperatura a partir de la cual comienza a manifestarse la inactivación enzimática.

Los coagulantes de origen vegetal (papaína y proteasa de la flor de cardo) son enzimas claramente termófilas, cuya actividad coagulante aumenta con la temperatura hasta valores relativamente elevados. A temperaturas de 75° C el tiempo de coagulación del extracto de flor de cardo es mínimo para aumentar nuevamente a 80° C. Vieira de Sá y Barbosa²⁵ comprobaron que el extracto de la flor de cardo *C. cardunculus* era estable a alta temperatura y que su actividad coagulante se incrementaba hasta alcanzar los 70° C, decreciendo a temperaturas superiores hasta el punto de desaparecer totalmente a 75° C. La actividad coagulante de la papaína aumentó progresivamente con la temperatura hasta 80° C, máxima temperatura objeto de ensayo.

Efecto del pH sobre el tiempo de coagulación.

La figura 4 indica la influencia del pH en la actividad coagulante de las cuatro enzimas.

En el margen de pH comprendido entre 5,8 y 6,4 el tiempo de coagulación de todas las enzimas aumenta con el pH sin que existan grandes diferencia en la sen-

CUADRO II. Efecto de la concentración de cloruro cálcico sobre el tiempo de coagulación (min : s).

Coagulante	M o l a r i d a d							
	0 00	0,005	0,01	0,015	0,02	0,025	0,03	
Renina	10:52	8:16	6:52	5:42	5:35	3:01	2:26	
Pepsina	12:43	7:00	5:08	3:58	3:12	2:40	2:07	
Papaína	8:30	7:38	6:30	5:30	4:54	4:16	3:34	
Cardo	10:55	7:55	5:26	3,30	2:56	2:20	1:45	

MARTINEZ Y ESTEBAN: ACTIVIDAD COAGULANTE DE LA FLOR DEL CARDO.

sibilidad al pH de la actividad coagulante de los cuatro fermentos. A pH superior a 6,4 existen sin embargo grandes diferencias en la sensibilidad al pH de la actividad del coagulante de las diferentes enzimas, siendo las de origen animal mucho más sensibles a los cambios del pH que las de origen vegetal; la pepsina porcina es la más sensible, hasta el punto de que a pH 6,8 fue incapaz de coagular la leche transcurridos 80 minutos. La enzima coagulante de la flor de cardo resultó ser la menos sensible a los cambios del pH.

Se ha observado que la actividad coagulante de la proteasa microbiana *Mucor pusillus* var. LINDT es mucho más sensible a los cambios de pH entre 6,4 y 6,8 que la renina, pero mucho menos sensible la actividad de la pepsina porcina (Richardson *et al.*¹⁷). Igualmente se ha señalado que entre los valores pH 6,3 y 6,8 la actividad coagulante de la pepsina porcina disminuye mucho más rápidamente que la de la renina²¹ y que a pH 6,8 los niveles normales de pepsina son incapaces de coagular la leche⁹. Se ha sugerido que la pérdida de la actividad coagulante de la pepsina puede ser debida a su inactivación por el pH elevado⁸. A valores pH superiores a 6,0 la pepsina se hace crecientemente inestable, a pesar de que las pepsinas minoritarias B y C sean estables a pH de 6,9 y 25° C¹⁸.

La menor sensibilidad a los cambios del pH dentro del margen 6,4 a 7,0, observada en la actividad coagulante de la proteasa de la flor del cardo *Cynara humilis*, respecto a la renina cristalina, difiere sustancialmente de las observaciones efectuadas por Vieira de Sá y Barbosa^{22, 23, 24} con el extracto del cardo *C. cardunculus*, cuya actividad coagulante varió más con el pH que la de la renina. A pH 7,0 el tiempo de coagulación de la renina fue casi de una hora.

Efecto combinado del pH y de la temperatura sobre la actividad coagulante.

El efecto combinado de la temperatura sobre la actividad coagulante de la renina cristalina y de la proteasa de la flor del cardo se muestra en la figura 5. Puede verse que a pH bajo (de 5,8) la temperatura apenas afecta al tiempo de coagulación y que el efecto es tanto mayor cuando más elevado es el pH. A pH alto (de 6,8) el aumento de la temperatura determina un notable incremento de la actividad coagulante, tanto de la renina como del extracto de la flor de cardo. Estos resultados concuerdan bastante bien con los obtenidos por Vieira de Sá y Barbosa²⁵ con el extracto de cardo *C. cardunculus*.

Efecto de la concentración de cloruro cálcico sobre la actividad coagulante.

La influencia de la concentración de cloruro cálcico sobre el tiempo de coagulación de las cuatro enzimas se indica en el cuadro II. El tiempo de coagulación por la acción de la papaína disminuye linealmente con el aumento de la concentración de iones Ca^{2+} , mientras que en las restantes enzimas la actividad coagulante es más

sensible a bajas concentraciones de cloruro cálcico. El efecto de la concentración de cloruro cálcico sobre la actividad coagulante de la proteasa de la flor de cardo es muy similar a la de la pepsina porcina, si bien el tiempo de coagulación de la última es mayor en ausencia de calcio añadido.

Agradecimientos.

Al Dr. D. Eugenio Domínguez Vilchez, del Departamento de botánica de la Facultad de ciencias de la Universidad de Córdoba, por la identificación de la especie del cardo.

Bibliografía.

1. Anónimo, 1974. Catálogo de quesos españoles, 2.^a ed., Ed. Ministerio de Agricultura. Madrid.
2. Berridge, N. J. 1945. *Biochem. J.*, 39, 179.
3. Berridge, N. J. 1952a. *J. Dairy Res.*, 19, 328.
4. Berridge, N. J. 1952b. *Analyst (London)*, 77, 57.
5. Berridge, N. J. 1954. *Apud Advances in enzymology*. Ed. F. F. Nord, Interscience Publishers, New York.
6. British Standards Institution 1963. *British Standard 3624*, 1963, London.
7. Christen, C. y E. Virasoro, E. 1935. *Lait*, 15, 354.
8. Emmons, D.B. 1970. *J. Dairy Sci.*, 53, 1177.
9. Ernstom, C. A. 1956. Ph. D. Thesis. Univ. Wisconsin.
10. Ernstom, C. A. 1961. *Milk prod. J.*, 52, 8.
11. Ernstom, C. A. 1965. *Apud Fundamentals of Dairy Chemistry*, pág. 590. Ed. B. H. Webb y A. H. Johnson, The AVI Publishing Company, Inc., Westport.
12. Grimmer, W. y M. Kruger, 1925. *Milchwirtssch, Forsch.*, 2, 457.
13. Holter, H. 1932. *Biochem. Z.*, 255, 160.
14. Johnson, M. L. 1941. *Third Int. Congr. Microbiol.*, New York, 1939.
15. Kelley, L. A. 1951. Ph. Thesis, Univ. Wisconsin.
16. Ketting, F. y Paulay, G. 1970. *18th Intern. Dairy Congr. IE*, 285.
17. Richardson, G. H., J. H. Nelson, R. E. Lubnow, y R. L. Schwarberg, 1967. *J. Dairy Sci.*, 50, 1066.

18. Ryle, A. P. 1970. *Apud* Methods in Enzymology, 19, 316, G. E. Perlmann and L. Lorand. Ed. Academic Press, New York.
19. Serrano, E. 1979. Tesina de licenciatura. Facultad veter. Córdoba (España).
20. Storch, V. y T. Segelke, 1874. *Milchztg.*, 3, 997.
21. Tsugo, T. y K. Yamauchi, 1959. 15th Intern. Dairy Congr., IE, 286.
22. Vieira de Sá, F. y M. Barbosa, 1970a. 18th Intern. Dairy Congr., IE, 286.
23. Vieira de Sá, F. y M. Barbosa, 1970b. 18th Intern. Dairy Congr., IE, 287.
24. Vieira de Sá, F. y M. Barbosa, 1970c. 18th International Dairy Congr. IE, 288.
25. Vieira de Sá, F. y M. Barbosa, 1972. *J. Dairy Res.*, 39, 335.