

# ALTERNATIF PROTEASE PADA ENZIM RENNIN DALAM PEMBUATAN KEJU

## PROTEASE ALTERNATIVE TO THE RENNIN ENZYME IN CHEESE MANUFACTURING

Arco Anggoro

Mahasiswa Program Studi Teknologi Pangan, Fakultas Teknologi Pertanian,  
Universitas Katolik Widya Mandala Surabaya

[foodtech.arco.a.20@ukwms.ac.id](mailto:foodtech.arco.a.20@ukwms.ac.id)

### Abstrak

Rennin merupakan kombinasi dari enzim protease seperti kimosin dan pepsin yang didapatkan dari abomasum anak sapi. Enzim kimosin sendiri merupakan enzim yang memiliki pengaruh dominan terhadap peristiwa koagulasi pada susu menjadi curd dan whey dalam pembuatan keju. Beberapa alternatif dari enzim rennet dapat berasal dari bahan pangan non-hewani, seperti enzim papain (dari ekstrak getah buah pepaya), enzim zingibain (ekstrak rimpang jahe), enzim cucumisin (ekstrak bagian sarkokarp melon), dan bromelain (ekstrak batang dan buah nanas). Parameter yang diamati dari beberapa jurnal berkaitan dengan sumber, pH dan suhu optimum, rasio antara milk clotting activity (MCA) dengan proteolytic activity (PA), persentase cheese yield serta hardness keju. Hasil yang didapatkan dari akumulasi beberapa jurnal dan ditabulasikan untuk mengetahui perbedaan karakteristik dan kualitas dari masing-masing enzim. Keju yang dihasilkan oleh enzim papain memiliki karakteristik aroma manis, floral, dan fruity akibat pembentukan asam asetat dan aldehid, sedangkan penambahan enzim zingibain menghasilkan keju dengan senyawa aromatik yang cukup kuat. Enzim cucumisin yang ditambahkan pada proses pembuatan keju menghasilkan karakteristik hardness yang rendah dengan nilai minimum sebesar 1,97 N, sedangkan penambahan enzim papain mampu menghasilkan hardness yang paling tinggi pada nilai maksimum 13,79 N. Adapun penambahan enzim bromelain mampu menghasilkan keju dengan karakteristik pahit yang rendah pada keju yang dihasilkan.

Kata kunci: enzim, rennet, keju, koagulasi, susu

### Abstract

Rennin is a combination of protease enzymes such as chymosin and pepsin. Chymosin has an important role in cheese production for coagulating milk and producing two distinct substances (curd and whey). There are several rennet alternatives from non-animal sources, such as papain (extracted from papaya latex), zingibain enzyme (extracted from ginger rhizome), cucumisin enzyme (extracted from melon fruit sarcocarp), and bromelain enzyme (extracted from stem and pineapple fruit). Cheese source, optimum pH and temperature, ratio between milk clotting activity (MCA) and proteolytic activity (PA), cheese yield and cheese hardness observed from several journals related to the topic of this review were tabulated to understand the differences in characteristics and qualities between enzymes. The use of papain enzyme produced sweet, floral, and fruity flavours to the cheese due to acetic acid and aldehyde group formation during cheese making. Zingibain enzyme affected the formation of aromatic compound that gives strong flavor, whilst the addition of bromelain enzyme produced less bitter cheese. Cucumisin enzyme gave minimum hardness texture (1.97 N), whereas the addition of papain enzyme produced the maximum hardness value to the cheese (13.97 N).

Keywords: enzyme, rennet, cheese, coagulation, milk

## PENDAHULUAN

Konsumsi produk olahan susu semakin meningkat secara signifikan seiring dengan peningkatan konsumsi lemak dan protein. Salah satu produk olahan susu yang banyak dikonsumsi adalah keju. Peningkatan perdagangan produk olahan susu meningkat sebesar 8% untuk bubuk whey; 4,1% untuk keju, dan produk olahan susu sebesar 2,8

juta ton per tahun 2020 (FAO, 2021).

Keju merupakan produk olahan susu yang diperoleh melalui proses koagulasi enzimatik pada susu yang menghasilkan curd dan whey. Proses koagulasi pada pembuatan keju umumnya dilakukan secara enzimatik menggunakan rennet sebagai agen koagulan susu. Rennet umumnya diperoleh dari

ekstraksi abomasum (perut keempat) anak sapi yang disapih induknya (Aljammas et al., 2018). Rennet merupakan kombinasi enzim proteolitik dan lipolitik seperti pepsin, lipase dan kimosin yang berperan dalam degradasi protein kasein dengan memutus ikatan peptida fenilalanin (105) dan metionin (106) pada koagulasi susu (Alihanoglu et al., 2018).

Permintaan pasar akan keju yang semakin meningkat tidak sebanding dengan produksi rennet yang terbatas, sehingga menyebabkan peningkatan harga rennet serta keju sebagai produk akhir. Keterbatasan rennet sendiri disebabkan oleh anak sapi yang rentan terserang penyakit, terutama karena ambing induk sapi yang terkontaminasi mikroba patogen, sehingga menyebabkan penurunan kualitas enzim rennet yang diperoleh (Martí-De Olives et al., 2020). Permasalahan produksi tersebut menyebabkan pentingnya menemukan bahan lain yang memiliki kemampuan yang baik dalam menggumpalkan susu dan menghasilkan keju.

Penggunaan enzim protease yang diekstraksi pada beberapa bahan nabati, seperti buah kiwi, melon, dan jahe menunjukkan hasil yang cukup baik dalam penggumpalan susu, tetapi penggunaan protease yang berasal dari bahan nabati memiliki kelemahan pada lemahnya sensitivitas enzim terhadap suhu yang berdampak pada rendahnya nilai *proteolytic activity* (PA) dan *cheese yield*. Cara untuk mengatasinya dengan melakukan pengendalian suhu secara berkala sesuai suhu optimum masing-masing enzim untuk menjaga aktivitas enzim tetap berjalan dengan baik.

Artikel *review* ini bertujuan untuk mengulas beberapa sumber bahan alternatif rennet konvensional yang berasal dari sumber nabati dan mudah ditemukan di masyarakat. Pengetahuan tersebut diharapkan mampu untuk membantu industri keju untuk menekan harga produksi serta meningkatkan

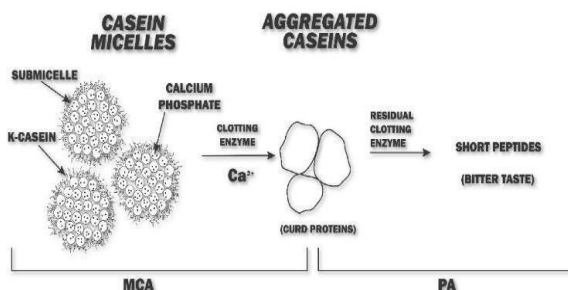
kapasitas produksi, sehingga mampu untuk memenuhi permintaan keju yang semakin meningkat.

### **Mekanisme Kerja Enzim Rennet dalam Mengkoagulasi Susu**

Mekanisme koagulasi protein susu menggunakan enzim rennet untuk membentuk *curd* terdiri dari dua fase utama, yakni fase primer (koagulasi enzimatis) dan fase sekunder (pembentukan agregat). Peristiwa yang terjadi pada fase primer adalah proses hidrolisa yang dilakukan oleh rennet (mengandung enzim kimosin dan pepsin) terhadap  $\kappa$ -kasein pada asam amino fenilalanin 105 dan metionin 106 yang menyebabkan terjadinya pelepasan C-terminal *casein macropeptide* (CMP) serta hilangnya stabilitas serabut-serabut halus pada permukaan misel kasein (Corredig & Salvatore, 2016). Peristiwa ini menyebabkan terbentuknya para- $\kappa$ -kasein yang bersifat hidrofobik dan terlepasnya CMP yang bersifat hidrofilik (Jensen et al., 2015).

Kondisi tersebut terjadi pada komponen kasein lainnya dan menginisiasi pembentukan ikatan jembatan kalsium untuk mengikat antar kasein tersebut. Jembatan kalsium sendiri akan mempengaruhi tingkat kekokohan dari *curd* yang terbentuk sebagaimana dijelaskan Hovjecki et al. (2022) bahwa terdapat pengaruh jumlah rennet terhadap pemutusan ikatan  $\kappa$ -kasein dan pembentukan jembatan kalsium. Terbentuknya jembatan kalsium di antara misel kasein akan meningkatkan kekokohan gel, sehingga bila jumlah rennet yang ditambahkan terbatas akan menghasilkan struktur gel yang lebih lunak (Sandra et al., 2012). Aktivitas enzimatik yang terjadi pada tahap awal tersebut dapat terjadi dengan baik pada kondisi pH yang rendah dan menyebabkan terjadinya peningkatan laju proteolisis (Amaro-Hernández et al., 2020).

Fase sekunder merupakan agregasi kasein misel yang terjadi akibat pelepasan CMP dan terjadi penurunan stabilitas koloidal. (Grassi et al., 2019). Proses koagulasi fase sekunder bergantung pada ion  $\text{Ca}^{2+}$  yang berperan mengikat residu asam amino yang bermuatan negatif pada kasein misel akan menurunkan muatan negatif misel dan menyebabkan terjadinya peningkatan laju agregasi pada protein susu dan pembentukan formasi gel yang lebih kokoh (Arango et al., 2018). Secara ringkas, mekanisme koagulasi disebabkan karena terjadinya kerusakan ikatan fenilalanin-metionin pada  $\kappa$ -kasein yang melepaskan molekul CMP bersifat hidrofilik dan membentuk para- $\kappa$ - kasein bersifat hidrofobik. Hal tersebut menyebabkan terbukanya bagian protein kasein bersifat hidrofobik yang akan saling berikatan satu sama lain untuk membentuk *curd* (Arlene et al., 2015). Ilustrasi koagulasi kasein susu dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1.1. Mekanisme Koagulasi Kasein Susu Sumber: Nicosia et al (2022)

### Sumber Alternatif Enzim Protease

#### 1. Getah Buah Pepaya

Enzim papain termasuk enzim protease sulfhidril yang aktivitas dipengaruhi oleh gugus S-H pada sisi aktifnya dimana pemecahan protein dapat terjadi dengan cara pemecahan substrat menjadi produk oleh gugus histidin dan sistein (Prihatini & Dewi, 2021) serta memiliki kemampuan proteolitik memotong ikatan peptida protein. Gugus fungsional sulfhidril pada enzim papain

mampu untuk menghidrolisa ikatan peptida pada asam amino lisin dan glisin dan ikatan peptida fenilalanin-105 dan metionin-106 pada  $\kappa$ -kasein (Sheryl & Setiadi, 2020) serta beraktivitas secara optimum pada pH 5-7 dengan suhu optimum 50-65°C (Arlene et al., 2014). Hal tersebut sejalan pula dengan penelitian yang dilakukan oleh da Silva et al (2013) bahwa suhu optimum enzim papain adalah 55°C dan dapat bekerja pula pada suhu kamar, yakni 37°C (Li et al., 2022). Aktivitas enzim papain optimum bekerja pada kisaran pH 5-8 serta mengalami penurunan apabila kontak dengan tekanan tinggi serta pada suhu yang tinggi disebabkan karena oksidasi gugus tiol pada sisi aktif enzim.

Penelitian yang dilakukan oleh Fachrariah et al., (2019) menyatakan bahwa penambahan enzim papain dengan penambahan air perasan lemon memiliki kemampuan untuk mengkoagulasikan kasein susu pada proses pembuatan keju *cottage* dan mampu menghasilkan *curd* sebesar 30,16%. Kenampakan keju dari susu sapi pasteurisasi yang dihasilkan dengan penggunaan enzim papain tidak jauh berbeda dengan keju pada umumnya yang memiliki kenampakan sedikit kekuningan dan bertekstur sangat lembut seperti puding. Berdasarkan penelitian Li et al., (2022), enzim papain yang ditambahkan dengan konsentrasi sebesar 0,4% mampu menghasilkan *cheese yield* sebesar 15,3 kg per 100 kg susu sapi dengan suhu koagulasi sebesar 14,1°C dan waktu koagulasi selama 11 menit, serta memiliki total asam amino bebas sebesar 281,92 mg/100 gram bahan, *hardness* sebesar 13,79 N (setelah pemeraman selama 1 hari), dan *springiness* sebesar 0,50 mm (setelah pemeraman selama 1 hari). Karakteristik aroma yang dihasilkan adalah manis, *floral*, dan *fruity* dihasilkan karena adanya pembentukan senyawa asam asetat ester etil, asam benzoat etil ester, asam benzena asetat etil ester serta terdapat aldehid, benzaldehid, tetapi benzaldehid merupakan

senyawa yang paling dominan pada keju dengan penambahan enzim papain (Li et al., 2022). Hasil dari pengujian lain terkait dengan *cheese yield* dan *hardness* keju dengan penambahan enzim papain berturut-turut sebesar 10,75% dan 0,39 N serta rasio MCA/PA yang diperoleh sebesar 408 (Arlene et al., 2015). Rasio MCA/PA dari enzim papain tergolong mendekati dengan rasio MCA/PA kimosin sebesar 520 (Mazorra-Manzano et al., 2013). Salah satu produk keju yang dapat dibuat dengan menggunakan enzim papain adalah keju dangke. Dangke merupakan keju tradisional khas Indonesia dari Enrekang (Sulawesi Selatan) yang tergolong *soft cheese* dan terbuat proses pengkoagulasian susu sapi dengan penambahan getah pepaya untuk mengendapkan kasein (Al-Baarri et al., 2018).

## 2. Jahe

Rimpang jahe mengandung enzim protease yang disebut sebagai zingibain yang merupakan protease sistein dengan letak glikosilasi pada asparagin-99 dan asparagin-156. Enzim zingibain memiliki nilai rasio MCA/PA sekitar 3,2 pada suhu optimum 60°- 65°C dengan pH optimum 7 (Mazorra-Manzano et al., 2013) dan enzim zingibain dapat bekerja efektif pula pada suhu dengan rentang 40°-70°C (Gagaoua et al., 2017). Flavor keju yang dibuat dengan penambahan enzim zingibain lebih disukai dibandingkan dengan penggunaan rennet yang dapat disebabkan oleh karakteristik jahe sebagai rempah-rempah dan tanaman yang memiliki gugus aromatik yang dapat meningkatkan flavor dari keju, sedangkan kekurangan dari penggunaan enzim zingibain adalah menghasilkan keju dengan rasa cukup pahit. (Adhikari et al., 2021). Pada pengujian yang dilakukan oleh Mazorra-Manzano, et al (2013) mengenai penambahan enzim zingibain pada susu mampu menghasilkan persentase *cheese yield* sebesar 15,40% dan *hardness* sebesar 4,71N.

## 3. Melon

Enzim cucumisin yang berasal dari ekstraksi bagian sarkokarp melon mengandung konsentrasi serine protease yang cukup tinggi. (Mazorra-Manzano et al., 2013). Aktivitas enzim cucumisin optimum pada rentang suhu optimum 65-70°C, tetapi masih mampu beraktivitas hingga suhu 85°C (Gagaoua et al., 2017). Enzim cucumisin relatif stabil untuk beraktivitas pada pH 6,5, sedangkan semakin tinggi suhu pemanasan dapat menurunkan aktivitas proteolitik enzim cucumisin. Aktivitas enzim cucumisin dapat ditingkatkan dengan keberadaan beberapa ion logam, seperti  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ , dan  $\text{Mn}^{2+}$  serta ion  $\text{Na}^+$  dan  $\text{K}^+$  (Gagaoua et al., 2017). Enzim cucumisin yang tergolong protease serin tidak membutuhkan reagen pengkelat dan reduktan untuk dapat mempertahankan aktivitasnya. Hal tersebut berbeda dengan beberapa protease yang berasal dari sumber nabati yang tergolong sebagai endopeptidase jenis sistein. Ikatan sistein yang ditemukan pada sisi aktif enzim cucumisin terletak pada sistein-245 dan sistein-250 serta sifat enzim memiliki laju autolisis yang rendah dibandingkan dengan enzim tripsin dan papain (Murayama et al., 2012).

Aktivitas protease dari enzim cucumisin dipengaruhi oleh enzim protease serin yang memiliki kemampuan tinggi dalam proses proteolitik dan memiliki kemampuan mendekati enzim papain serta menghasilkan lebih sedikit peptida pahit (Aktayeva et al., 2018). Peptida pahit pada keju dihasilkan akibat produksi proteolitik kasein susu dan bergantung pada nilai rerata hidrofobisitas protein (nilai Q) atau peptida yang dikoagulasikan oleh enzim protease. Apabila nilai Q (nilai rerata hidrofobisitas peptida) lebih dari 1,4 kkal.residu<sup>-1</sup> dan memiliki berat molekul antara 100-6000 Da maka kemungkinan keju memiliki rasa pahit akan jauh lebih tinggi (Nath et al., 2022). Bila ditinjau berdasarkan jenis enzim dan gugus

katalitik target yang digunakan, yakni enzim cucumisin dengan target asam amino sistein (berat molekul 121 Da) dibandingkan dengan enzim kimosin yang memiliki gugus katalitik adalah fenilalanin dengan berat molekul sebesar 165 Da, maka intensitas rasa pahit pada keju yang dihasilkan dengan enzim cucumisin lebih rendah dibandingkan dengan keju yang dihasilkan oleh enzim kimosin.

Penggunaan enzim cucumisin dalam memproduksi *curd* memiliki nilai yang rendah sebesar 1,97 N yang disebabkan karena tingginya aktivitas proteolitik (PA), sehingga menghasilkan nilai rasio MCA/PA yang jauh lebih rendah (Mazorra-Manzano et al., 2013). Rasio MCA/PA dari enzim cucumisin sendiri memiliki nilai maksimal hingga 44,4 (Gómez-García et al., 2021).

#### 4. Nanas

Enzim bromelin diisolasi dari batang dan buah nanas yang belum matang. Enzim bromelin paling stabil diperoleh dari bagian batang buah nanas (Bala et al., 2012). Enzim bromelin dengan asam amino sistein-26 dan histidin-158 sebagai letak aktivitas katalitik bekerja secara optimum pada pH 4,36-7,5 dan suhu 50°-55°C (Mazorra- Manzano et al., 2013) serta pada suhu optimum maksimal 85°C (Gómez-García et al., 2021) dan suhu optimum terendah sebesar 40°C (Komansilan et al., 2021). Rasio MCA/PA yang didapatkan oleh Beltran-ezpinosa et al (2021) sebesar 0,1. Hal itu disebabkan karena enzim bromelin membutuhkan waktu yang lebih lama (lebih dari 15 menit) pada waktu agregasi kasein misel serta berdampak pada lambatnya proses koagulasi kasein. (Beltrán-Espinoza et al., 2021). Enzim bromelin sendiri akan mengawali destabilisasi misel kasein susu dan terjadi agregasi pada proses koagulasi protein yang menghasilkan matriks tiga dimensi protein kasein (Komansilan et al., 2021). Koagulasi kasein tersebut berdampak pada persentase

*cheese yield* dan nilai *hardness* pada keju. Karakteristik keju yang dihasilkan dengan penambahan enzim bromelin tidak mengurangi kualitas dari produk yang secara umum diasosiasikan memiliki rasa pahit. Hal itu dibuktikan dengan penambahan enzim bromelin selama 8 jam tidak menghasilkan keju yang pahit dan memiliki karakteristik yang normal. Hal itu sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Vergara-Alvarez, et al (2019) bahwa penggunaan ekstrak enzim bromelin pada pembuatan *soft cheese* menghasilkan *soft cheese* berwarna kuning keju dan rasa pahit tidak teridentifikasi pada seluruh sampel keju yang diberi perlakuan penambahan enzim bromelin pada konsentrasi berbeda serta memiliki daya tahan secara mikrobiologis hingga 14 hari masa simpan.

#### KESIMPULAN

Alternatif enzim rennet dapat digunakan dengan memanfaatkan enzim protease yang memiliki sifat mampu mengkoagulasi susu menjadi *curd* dan *whey* melalui dua tahapan koagulasi, yakni fase primer (koagulasi enzimatis) dan sekunder (pembentukan agregat). Enzim protease dapat diperoleh dari komponen non-hewani, yakni dengan penggunaan enzim papain yang berasal dari ekstraksi getah buah pepaya, enzim zingibain yang berasal dari ekstraksi rimpang jahe, enzim cucumisin dari ekstraksi sarkokarp buah melon, dan enzim bromelin yang diekstrak dari bagian batang dan buah nanas.

#### DAFTAR PUSTAKA

- Adhikari, B., Bhattarai, R., Katuwal, & Das, S. (2021). Effects of ginger protease on quality of mozzarella cheese. *Approaches in Poultry, Dairy & Veterinary Sciences*, 8(5), 835–845.
- Aktayeva, S., Akishev, Z., & Khassenov, B. (2018). Proteolytic Enzymes in Cheese

- Making. *Eurasian Journal of Applied Biotechnology*, 1.
- Al-Baarri, A. N. M., Legowo, A. M., Arum, S. K., & Hayakawa, S. (2018). Extending shelf life of Indonesian soft milk cheese (dangke) by lactoperoxidase system and lysozyme. *International Journal of Food Science*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/430539>
- Alihanoğlu, S., Ektiren, D., Akbulut Çakır, Ç., Vardin, H., Karaaslan, A., & Karaaslan, M. (2018). Effect of *Oryctolagus cuniculus* (rabbit) rennet on the texture, rheology, and sensory properties of white cheese. *Food Science and Nutrition*, 6(4), 1100–1108.
- Aljammas, H. A., Al Fathi, H., & Alkhalaf, W. (2018). Study the influence of culture conditions on rennin production by *Rhizomucor miehei* using solid-state fermentations. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 16(1), 213–216.
- Amaro-Hernández, J. C., Olivas, G. I., Acosta-Muñiz, C. H., Gutiérrez-Méndez, N., & Sepulveda, D. R. (2020). Structure rearrangement during rennet coagulation of milk modifies curd density. *Journal of Dairy Science*, 103(4), 3088–3094. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-1699>
- Arango, O., Trujillo, A. J., & Castillo, M. (2018). Monitoring the effect of inulin, protein, and calcium on milk coagulation phases using a fibre optic sensor. *International Dairy Journal*, 81, 80–86. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2018.01.015>
- Arlene, A., Kristijanti, A. P., & Phani, A. (2014). The Effects of Milk Types (Cow, Peanut, Red Bean) And Enzyme Types (Rennet, Papain, Bromelain) Towards The Quantity And Quality of Cheddar Cheese. *International Conference on Engineering Technology and Industrial Application*, 101–105.
- Bala, M., Ismail, N. A., Mel, M., Jami, M. S., Mohd Salleh, H., & Amid, A. (2012). Bromelain production: Current trends and perspective. *Archives Des Sciences*, 65(11), 369–399.
- Beltrán-Espinoza, J. A., Domínguez-Lujan, B., Gutiérrez-Méndez, N., Chávez-Garay, D. R., Nájera-Domínguez, C., & 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. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12760>
- Corredig, M., & Salvatore, E. (2016). *Enzymatic Coagulation of Milk BT - Advanced Dairy Chemistry* (P. L. H. McSweeney & J. A. O'Mahony (eds.); pp. 287–307). Springer New York.
- Corzo, C. A., Waliszewski, K. N., & Welti-Chanes, J. (2012). Pineapple fruit bromelain affinity to different protein substrates. *Food Chemistry*, 133(3), 631–635. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.05.119>
- da Silva, A. C., Nascimento, T. C. E. da S., da Silva, S. A., Herculano, P. N., & Moreira, K. A. (2013). Potential of quixaba (*Sideroxylon obtusifolium*) latex as a milk-clotting agent. *Food Science and Technology*, 33(3), 494–499. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612013005000075>
- Fachraniah, Rihayat, T., Zaini, H., Nita, D., & Fazil, M. (2019). Papain Enzyme and Lemon as Coagulants in Cottage Cheese. *IOP Conference Series:*

- Materials Science and Engineering*, 536(1).  
<https://doi.org/10.1088/1757-899X/536/1/012103>
- FAO. (2021). Dairy Market Review: Overview of global dairy market development. In *Food and Agriculture Organization of the United Nations*.
- Gagaoua, M., Ziane, F., Nait Rabah, S., Boucherba, N., Ait Kaki El- Hadeif El-Okki, A., Bouanane-Darenfed, A., & 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. *International Journal of Biological Macromolecules*, 102, 515–525.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.04.060>
- Gómez-García, R., Campos, D. A., Aguilar, C. N., Madureira, A. R., & Pintado, M. (2021). Biological protein precipitation: A green process for the extraction of cucumisin from melon (*Cucumis melo* L. inodorus) by-products. *Food Hydrocolloids*, 116 (February).
- Grassi, S., Strani, L., Casiraghi, E., & Alamprese, C. (2019). Control and monitoring of milk renneting using FT-NIR spectroscopy as a process analytical technology tool. *Foods*, 8(9).  
<https://doi.org/10.3390/foods8090405>
- Hovjecki, M., Miloradovic, Z., Barukčić, I., Blažić, M., & Miocinovic, J. (2022). Rheological Properties of Goat Milk Coagulation as Affected by Rennet Concentration, pH and Temperature. *Fermentation*, 8(6).  
<https://doi.org/10.3390/fermentation8060291>
- Jensen, H. B., Pedersen, K. S., Johansen, L. B., Poulsen, N. A., Bakman, M., Chatterton, D. E. W., & Larsen, L. B. (2015). Genetic variation and posttranslational modification of bovine  $\kappa$ -casein: Effects on caseino-macropeptide release during renneting. *Journal of Dairy Science*, 98(2), 747–758.  
<https://doi.org/10.3168/jds.2014-867>
- Komansilan, S., Rosyidi, D., Radiati, L. E., Purwadi, P., & Evanuarini, H. (2021). The physicochemical characteristics and protein profile of cottage cheese produced by using crude bromelain enzyme extracted from ananas comosus. *Current Research in Nutrition and Food Science*, 9(2), 578–587.  
<https://doi.org/10.12944/CRNFSJ.9.2.21>
- Li, L., Chen, H., Lü, X., Gong, J., & Xiao, G. (2022). Effects of papain concentration, coagulation temperature, and coagulation time on the properties of model soft cheese during ripening. *Lwt*, 161(August 2021), 113404.  
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113404>
- Mamo, A., & Balasubramanian, N. (2018). Calf rennet production and its performance optimization. *Journal of Applied and Natural Science*, 10(1), 247–252.  
<https://doi.org/10.31018/jans.v10i1.1612>
- Martí-De Olives, A., Peris, C., & Molina, M. P. (2020). Effect of subclinical mastitis on the yield and cheese-making properties of ewe's milk. *Small Ruminant Research*, 184.
- Mazorra-Manzano, M. A., Perea-Gutiérrez, T. C., Lugo-Sánchez, M. E., Ramirez-Suarez, J. C., Torres-Llanez, M. J., González- Córdoba, A. F., & Vallejo-Cordoba, B. (2013). Comparison of the milk-clotting properties of three plant extracts. *Food Chemistry*, 141(3), 1902–1907.



- Murayama, K., Kato-Murayama, M., Hosaka, T., Sotokawauchi, A., Yokoyama, S., Arima, K., & Shirouzu, M. (2012). Crystal structure of cucumisin, a subtilisin-like endoprotease from cucumis melo L. *Journal of Molecular Biology*, 423(3), 386–396. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2012.07.013>
- Nath, A., Eren, B. A., Zinia Zaukuu, J. L., Koris, A., Pásztorné- Huszár, K., Szerdahelyi, E., & Kovacs, Z. (2022). Detecting the bitterness of milk-protein-derived peptides using an electronic tongue. *Chemosensors*, 10(6). <https://doi.org/10.3390/chemosensors10060215>
- Nicosia, F. D., Puglisi, I., Pino, A., Caggia, C., & Randazzo, C. L. (2022). Plant milk-clotting enzymes for cheesemaking. *Foods*, 11(6). <https://doi.org/10.3390/foods11060871>
- Prihatini, I., & Dewi, R. K. (2021). Kandungan Enzim Papain pada Pepaya (*Carica papaya* L) Terhadap Metabolisme Tubuh. *Jurnal Tadris IPA Indonesia*, 1(3), 449–458. <https://doi.org/10.21154/jtii.v1i3.312>
- Sandra, S., Ho, M., Alexander, M., & Corredig, M. (2012). Effect of soluble calcium on the renneting properties of casein micelles as measured by rheology and diffusing wave spectroscopy. *Journal of Dairy Science*, 95(1), 75–82. <https://doi.org/10.3168/jds.2011-4713>
- Sheryl, A. F., & Setiadi. (2020). Improving the texture of cheese product from cow's milk through the coagulation process using a combination of papain and transglutaminase enzyme. *AIP Conference Proceedings*, 2255.
- Vergara-álvarez, W., Arteaga-Márquez, M., & Hernández-Ramos, E.J. (2019). Sensory acceptance and shelf life of fresh cheese made with dry bromelain extract as a coagulating agent. *DYNA*, 86(210), 270–275.