

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL  
DE HUAMANGA**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**ESCUELA DE FORMACIÓN PROFESIONAL DE BIOLOGÍA**



**Manejo y caracterización bioquímica de cuajos utilizados en la  
elaboración tradicional de quesos**

**Tesis para optar el título profesional de Bióloga,  
Especialidad: Microbiología**

Presentado por:

**Bach. Sheila Cisneros García**

Asesor:

**Blgo. Fidel Rodolfo Mujica Lengua**

**Ayacucho - Perú**

**2007**

## **DEDICATORIA**

A mis queridos padres  
Clementina y Teófilo, por sus  
enseñanzas morales, su  
sacrificio y comprensión.

A mis hermanos Robinsón y  
Omar por su apoyo constante.

## AGRADECIMIENTO

Expreso mi agradecimiento y reconocimiento a mi Alma Mater y tricentenario Casa Superior de Estudios, la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, a la Facultad de Ciencias Biológicas por haberme brindado en sus aulas los principios de una maravillosa profesión.

A la Escuela de Formación Profesional de Biología, a toda plana docente, por haberme ofrecido sus sabios conocimientos que hicieron posible la realización de mis ideales, también mis sinceros agradecimientos al personal interno y de servicio.

Manifiesto mi reconocimiento especial a mis asesores el Mg. Fidel Mujica Lengua y la Mg Paula García Godos Alcázar, por su permanente disponibilidad, por los conceptos transmitidos durante la elaboración de mi tesis, por sus grandes cualidades personales y profesionales que durante mi trabajo me han sido de ejemplo.

Al finalizar, muchas gracias a Jenny Reymundez, Lizbett Ramírez y Jeanne Salvatierra, por ser mis compañeras y mis mejores amigas.

## INDICE

	<b>PAGINA.</b>
<b>RESUMEN</b>	
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>II. MARCO TEÓRICO</b>	<b>4</b>
2.1. Anatomía del sistema digestivo de los rumiantes	4
2.2. Digestión en no rumiantes (monogástricos)	7
2.4. La leche	8
2.5. Generalidades sobre el queso	12
2.6. Enzimas coagulantes	13
2.7. Coagulación de la leche	18
2.8. Factores que afectan a la coagulación de la leche	24
2.9. Aplicaciones biotecnológicas	26
<b>III. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>30</b>
3.1. Material	30
3.1.1. Población y muestra.	30
3.1.2. Recolección de cuajos	31
3.2. Métodos	31
3.2.1. Descripción del proceso artesanal de elaboración de cuajos naturales	31
3.2.2. Obtención del extracto enzimático	32
3.2.5. Determinación de proteína total soluble	33
3.2.3. Determinación de la actividad proteolítica	34
3.2.4. Determinación del título o fuerza de cuajo	35
3.2.6. Análisis microbiológico	36
3.2.7. Análisis físico -químico de la leche	38
<b>IV. RESULTADOS</b>	<b>44</b>
<b>V. DISCUSION</b>	<b>58</b>
<b>VI. CONCLUSIONES</b>	<b>64</b>
<b>VII. RECOMENDACIONES</b>	<b>65</b>
<b>VIII.REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>66</b>
<b>IX. ANEXOS</b>	<b>71</b>

## **Manejo y caracterización bioquímica de cuajos utilizados en la elaboración tradicional de quesos**

**Autor** : Sheila, Cisneros García.  
**Asesores** : Fidel Rodolfo, Mujica Lengua; Paula, García Godos

### **RESUMEN**

El presente trabajo de investigación tuvo como objetivo describir la tecnología artesanal de obtención, preparación y manipulación de cuajos durante la elaboración de queso y caracterizar los cuajos de ternero, cordero, cabra, llama, alpaca, vicuña y cerdo en base a su actividad proteolítica y su capacidad de coagulación y a partir de los resultados explorar su potencial biotecnológico como insumo en la elaboración de quesos.

Se trabajó con un total de 21 muestras provenientes de 7 cuajos puros de diferentes especies, cada uno con 3 repeticiones, las cuales fueron recolectados de los distritos de Paras, Sancos, Huamanquiya, Cangallo y Pampacangallo.

Los cuajos son extraídos de animales de poco días de nacido, los cuales se secan en la parte superior de un fogón de una cocina a leña, por espacio de un mes aproximadamente, para su utilización se hace remojar en un recipiente el cuajo con suero láctico por 4 días, su utilización y proporción de uso es muy variable.

Se obtuvo el extracto enzimático a partir del cuajo seco mezclando un volumen de cuajo con 5 volúmenes de suero lácteo, luego se dejó en agitación constante por espacio de 4 días, para realizar las siguientes determinaciones: proteína total soluble, actividad proteolítica, fuerza de cuajo y el análisis microbiológico.

Entre los diferentes cuajos de animales, son los camélidos sudamericanos, los que reportan una mayor actividad proteolítica, siendo la vicuña con 2.106 U/mg la que obtuvo la mayor actividad, seguida de alpaca 1.282 U/mg, vaca 1.257 U/mg, llama 0.9040 U/mg, oveja 0.439 U/mg, cabra 0.241 U/mg y el menor de cerdo con 0.013 U/mg. Para la fuerza de cuajo los resultados obtenidos muestran que el cuajo de vicuña tiene una fuerza de cuajo de 1/175512 ml, alpaca 1/120519 ml, vaca 1/108127 ml, llama 1/97011 ml, oveja 1/61346 ml, cabra 1/32289 ml, y cerdo con 1/26561 ml. Por tanto los cuajos de camélidos tiene un mayor poder coagulante, Veisseryre refiere que los extractos líquidos tienen por lo general una fuerza de 1/10 000 y los cuajos en polvo alcanzan una fuerza de 1/100000 y aún mas elevada. Por lo tanto los datos obtenidos se encuentran conforme la referencia bibliográfica.

El control microbiológico realizado, evidencia un mínimo cuidado en el manejo sanitario al extraer estos cuajos. Todos estos resultados, (si bien son parciales) ameritan continuar su estudio, ya que nuestro medio es una zona productora de quesos.

**Palabras clave:** Cuajo, quimosina, fuerza de cuajo.

## I. INTRODUCCIÓN

El cuajo es uno de los más importantes insumos en la industria quesera. En la actualidad poco se conoce respecto a la caracterización enzimática de cuajos y coagulantes provenientes de especies nativas, particularmente de camélidos sudamericanos, como la alpaca, llama y la vicuña.

Probablemente, la práctica de transportar la leche en bolsas hechas con estómagos de animales, común en algunas zonas de Europa oriental y Asia occidental en la antigüedad, dio lugar a la elaboración más o menos accidental de los primeros quesos. Los romanos fueron los primeros en describir con detalle el proceso de elaboración, se mezclaba una preparación rica en enzimas extraída del estómago de cabras, corderos e, incluso, liebres, con la leche de cabra u oveja (la leche de vaca no empezó a producirse a gran escala hasta el siglo XIII). La cuajada separada del suero se salaba y se almacenaba para su posterior consumo.

Artesanalmente en el Perú, el proceso de elaboración del cuajo, donde primero se extrae el cuajar de animales tiernos es decir que solo tenga días de nacido, luego se le espolvorea sal, se hace secar en la parte superior de un fogón de una cocina a leña, durante el tiempo que sea necesario.

Cuando el cuajo este listo para ser utilizado se coloca en un recipiente, se le agrega suero de leche y se hace remojar hasta que libere sus enzimas, este cuajo es utilizado varias veces así se obtienen el queso fresco o "quesillos" típicos que hoy se elaboran en el Perú que son muy reconocidos compitiendo con los europeos.

Los animales recién nacidos, nacen con un rumen pequeño y el cuarto estomago es, el más grande de sus compartimientos gástricos. Por lo tanto, la digestión del animal de corta edad se parece mucho más al animal de estomago simple que a la del rumiante ( Bone, 1983; Churc, 1974).

El principio activo que se encuentra en el cuajo es una enzima conocida como quimosina (proteasa ácida), esta enzima abunda en el cuajar de los terneros, corderos y cabritos tiernos, que son los animales de los cuales se extrae, pero a medida que su alimentación láctea va siendo reemplazada por el pasto, la quimosina va siendo substituido por la pepsina (Bone, 1983 y Coultate, 1998).

La quimosina, renina o quimasa junto con la pepsina hacen parte de las enzimas que constituyen los jugos gástricos. La quimosina coagula la leche porque actúa sobre una proteína que posee la leche, llamada caseína y la descompone para facilitar la unión con el calcio. Este enzima continúa su trabajo, más lentamente durante la maduración del queso.

El cuajo se emplea en muy pequeña cantidad. Para coagular la leche, ésta debe tener una temperatura que varia entre 30 y 40 °C. Cuando la leche está ácida, el cuajo trabajo rápidamente (Walstra y col, 2000).

La fuerza del cuajo, es decir su poder de coagulación, decrece cuando es expuesto al agua, al calor y a la luz. Este producto se debe siempre conservar en un recipiente muy cerrado para que no entre la humedad y en lugares secos, fríos y oscuros.

Debido a la alta demanda del cuajo para la fabricación de quesos, han realizado investigaciones con la enzima quimosina con tanta rapidez es así que en el año 1980 fue la primera enzima, obtenida de un microorganismo genéticamente modificado, esta enzima es la misma obtenida en becerros con un alto grado de pureza en *Saccharomyces cerevisiae*.

En la actualidad la quimosina es obtenida de *Mucor pussilus* obtenido por técnicas de DNA recombinante (Salermo, 2004).

Con base en estos fundamentos se realizó el presente trabajo de investigación, teniendo en cuenta los siguientes objetivos:

- ◆ Describir la tecnología artesanal de obtención, preparación y manipulación de cuajos durante la elaboración del queso.
- ◆ Caracterizar los cuajos de vaca, oveja, cabra, cerdo, llama, alpaca, y vicuña en base a su actividad proteolítica y su capacidad de coagulación.

## **II. MARCO TEÓRICO**

### **2.1. SISTEMA DIGESTIVO DE LOS RUMIANTES**

Los rumiantes poseen un sistema digestivo más eficiente para usar la fibra de los alimentos, los rumiantes como los bovinos, ovinos, caprinos, camélidos etc. Estos animales difieren de los no rumiantes en los siguientes aspectos.

#### **2.1.1. Boca.**

Los rumiantes, que no tienen dientes incisivos superiores ni caninos, dependen de la placa dental superior, junto a los labios y la lengua, para realizar la aprehensión de los alimentos.

#### **2.1.2. Compartimientos del estómago.**

Los rumiantes poseen un estómago de cuatro compartimientos: rumen, retículo, omaso y abomaso (estómago verdadero), (ver Fig. 1) mientras que los monogástricos tienen un solo estómago. Además el estómago es de suficiente tamaño para procesar grandes cantidades de forraje voluminosos y para ofrecer un ambiente propicio para la enorme población de microorganismos (Griffin, 1970).

#### **Rumen.**

El rumen es un compartimiento grande revestido por una gran cantidad de papilas que acrecientan la superficie para revolver y absorber el material digerido. El alimento digerido entra en estos dos compartimientos y se digiere bien por la acción de diversos microorganismos (bacterias y protozoarios) que

están en el rumen. El rumen es una batea de fermentación fisiológica (Bone, 1983).

Los microbios del rumen digieren a los hidratos de carbono, produciendo anhídrido carbónico y ácidos grasos volátiles. Aunque se forman muchos ácidos grasos volátiles la basta mayoría de estos son acetatos, propionato y butirato. Estos ácido grasos se absorben en el rumen y aportan gran parte de la energía que el animal necesita. Como la mayoría de las bacterias del rumen son sensibles al pH, todo cambio importante en él altera las proporciones de los diversos tipos de microorganismos (Johnsom y col, 1990). Los microbios del rumen degradan lípidos a ácidos grasos y colesterol, luego la mayor parte del glicerol se convierte en propionato, en tanto que los ácidos grasos de cadena larga van al intestino, donde se absorben (Cruger, 1993 y Luquet, 1993).

#### **Retículo.**

El retículo posee un revestimiento muy parecido a un panal de abejas y sirve de compartimientos colector de cuerpos extraños y también de órgano digestivo.

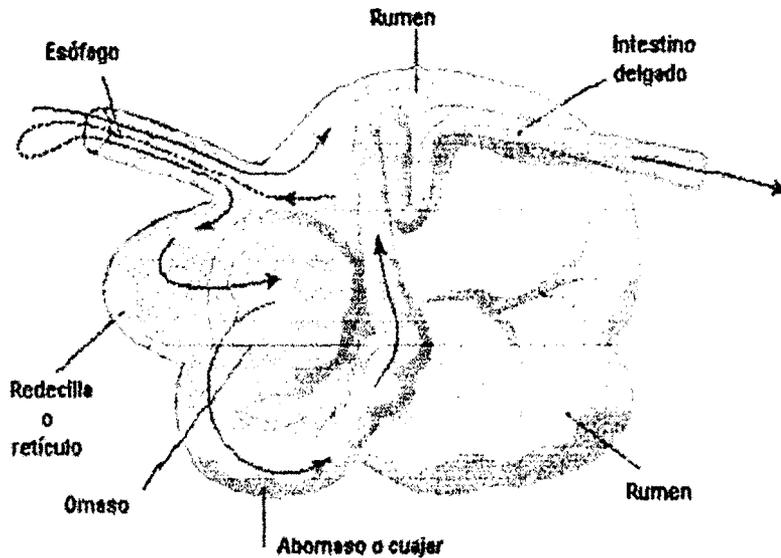
#### **Omaso (reciclaje de algunos nutrimentos)**

Es el siguiente compartimiento de la digestión. Contiene muchas láminas (hojas de tejido) que contribuyen a disgregar la ingesta. Aunque no se elucidó del todo bien la función fisiológica que cumple este compartimiento, muchos investigadores opinan que sirve para absorber agua, además de su función de desintegrar el alimento. Cumple con la función de absorción de agua, sodio, fósforo y ácidos grasos volátiles residuos (Castejon y col, 1979; Griffin, 1970).

#### **Abomaso (digestión ácida)**

Es el único compartimiento de la región gástrica del rumiante que contiene glándulas digestivas. Los procesos digestivos de este compartimiento son muy similares a los del estómago de los no rumiantes. Sus funciones son:

- Secreción de ácidos fuertes y enzimas digestivas.
- Digestión de alimentos no fermentados en el rumen (algunas proteínas y lípidos).
- Digestión de proteínas bacterianas producidas en el rumen (0.5 a 2.5 kg por día (Castejon y col 1979; Churc 1974; Goldstein 1981).



**Fig. 1.- Compartimientos del estómago del rumiante (URL3).**

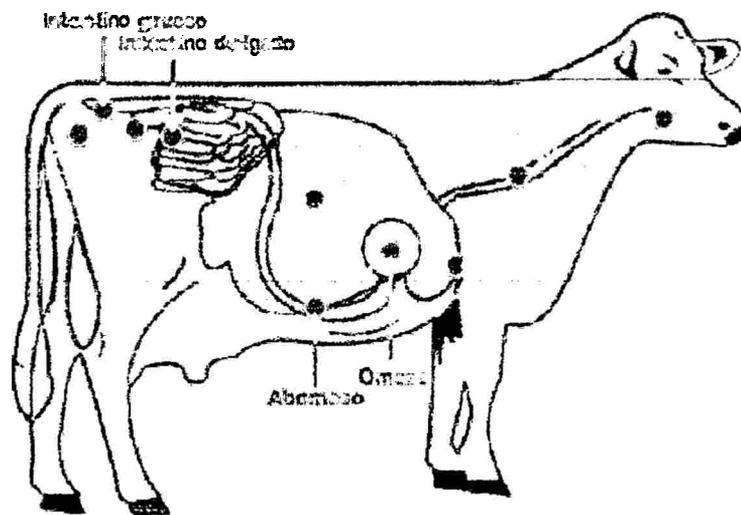
### **2.1.3. Intestino delgado (digestión y absorción).**

En el intestino delgado, la masa digerida se ve expuesta a las enzimas intestinales y pancreáticas, así como también a la bilis del hígado. La proteína, almidón, y los azúcares son digeridos enzimáticamente aquí, pero la fibra (tal como celulosa) que escapó del proceso de fermentación en el rumen-retículo no puede ser digerida en el intestino delgado (Castejon y col, 1979). La digestión de los lípidos (grasas) también ocurre en el intestino delgado. En el intestino delgado acontece la absorción de productos digeridos durante el proceso enzimático de proteína, carbohidratos y lípidos (Bone, 1983).

La rumia es un indicador de normalidad ruminal y de que los microbios se están reproduciendo adecuadamente, facilitando la digestión y sintetizando las sustancias nutricionales. Un período de rumia puede durar hasta dos horas y por el proceso se repite una vez por minuto (Churc 1974; Martinez 2003).

### **2.1.4. Intestino grueso.**

El intestino grueso es el segundo sitio de fermentación donde el agua y los productos finales son absorbidos. Los alimentos sin digerir se excretan a través del recto como excrementos (Churc, 1974).



**Fig. 2.- Anatomía del sistema digestivo de los rumiantes (Martinez, 2003).**

## **2.2. SISTEMA DIGESTIVO EN NO RUMIANTES (MONOGÁSTRICOS).**

Se conoce como monogástrico al cerdo, pollo, perro, pez, mono, hombre, etc. El estómago de estos animales es de estructura relativamente sencilla. Se subdividen según la funcionalidad del ciego y colon.

### **2.2.1. Aparato digestivo.**

Este es el aparato digestivo más sencillo posible. Consiste en la boca y sus respectivas glándulas, esófago, estómago, intestino delgado, intestino grueso, páncreas e hígado. Se caracteriza por su capacidad limitada, por una acción microbiana relativamente escasa y por su pequeña capacidad para digerir alimentos fibrosos. De esto se deduce que estos animales están mejor adaptados para consumir alimento concentrado como granos y productos de carne, que grandes cantidades de fibra (Castejon y col, 1979; Goldstein, 1981).

## **2.4. LA LECHE.**

La leche es un líquido segregado por las glándulas mamarias de las hembras de mamíferos tras el nacimiento de la cría. Es un líquido complejo, blanco y opaco de sabor dulce y reacción iónica cercana a la neutralidad. La función natural de la leche, es de alimento durante el periodo crítico de su

existencia, tras el nacimiento, cuando el desarrollo es rápido y no puede ser sustituida por otros alimentos (Alais, 1970).

La leche está en fase acuosa contiene esencialmente lactosa, minerales, elementos dispersos de naturaleza lipídica y de naturaleza proteica (micelas de caseína). Las propiedades nutricionales y tecnológicas, depende en gran parte de las características fisicoquímicas de los constituyentes de la leche que permiten comprender mejor la tecnología de los productos lácteos (Mahuat y col, 2003). Las proporciones de su composición varían según el tipo de alimentación. Numerosos factores pueden intervenir en la composición de la leche: la especie, la raza, el estadio de lactación, la estación, el estado sanitario, la alimentación etc. (Pérez, 1996).

#### **2.4.1. Proteínas de la leche.**

Aproximadamente el 95% del nitrógeno de la leche está en forma de proteínas. Constituyendo una compleja mezcla (Walstra y col, 2000). Además las proteínas desempeñan un papel importante en la transformación de la leche. Cuando la leche se coagula por efecto de la acidificación o por el cuajo, la proteína modifica su estado y precipita (Mahuat y col, 2003).

Desde el punto de vista de la conformación, y transformación de la leche; las proteínas se encuentran formadas por dos grandes componentes: la caseína o sustancia que propiamente forma el queso y las llamadas proteínas del suero, estos últimos componentes proteicos (fracciones de globulina y albúmina) no pueden obtenerse en forma de queso. La caseína constituye alrededor del 80% de toda la proteína de la leche; la proteína serica (lactoalbúmina y lactoglobulina), en torno al 20%, cuya relación es aproximadamente de 4:1 (Escobar, 1997 y URL3)

Ambos componentes presentan propiedades básicamente distintas. La caseína puede ser modificada por los ácidos o por el cuajo, cosa que no sucede con las proteínas sericas ya que estas se pierden con el suero en la fabricación de los quesos (Meyer, 1993 y Pérez, 1996). No toda la lactoglobulina y

lactoalbumina se van con el suero. Parte del suero es retenido en la estructura de los coágulos de caseína (Madrid, 1996).

#### 2.4.2. Caseína.

Las caseínas se encuentran en estado coloidal en forma de micelas, una micela está compuesta de alrededor de unas 1000 moléculas de caseína y estas a la vez están formadas por cadenas de aminoácidos (Madrid, 1999 y Madrid, 1996).

El rango del diámetro micelar de la caseína en la leche de vaca varía entre 20 y 600 nm. Las variaciones del tamaño de la micela están relacionadas con el periodo de lactación, con diferencias individuales de los animales, con factores medio ambientales y también con el genotipo de las caseínas (Aguilar; 1992). Las micelas de caseína son las principales responsables de la estabilidad física de los productos lácteos durante el tratamiento térmico, la concentración y el almacenamiento (Walstra y col, 2000).

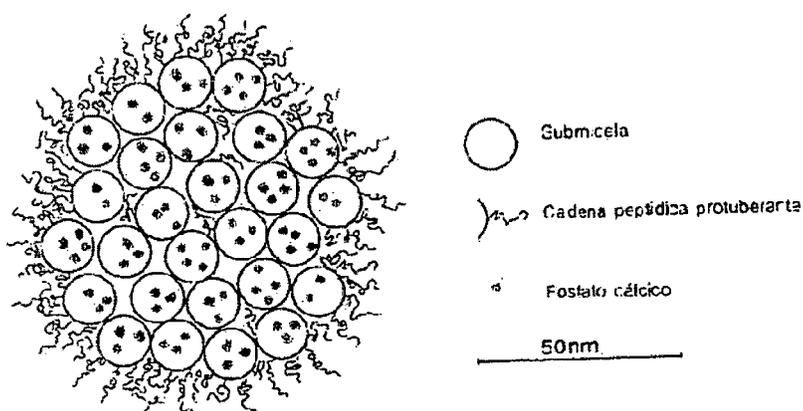


Fig. 3.- Modelo de micela de caseína (Walstra, 2000).

Se representa un modelo de micela de caseína (ver Fig. 3). La micela es un agregado bastante denso de submicelas. Cuando hay fosfato cálcico, como ocurre en la micela completa, la flexibilidad de las cadenas peptídicas desaparece casi por completo, excepto en la parte C- terminal de la caseína  $\kappa$ . Las submicelas no son unas partículas esféricas rígidas, sino que algunas veces

tienen formas irregulares difusas. Es muy importante que entre las submicelas se establecen interacciones proteína –proteína (Alais, 1970; Walstra y col, 2000).

Las caseínas forman hélices  $\alpha$  cortas y casi no presentan estructura terciaria. Esto significa que las moléculas están desarrolladas aleatoriamente, pero en soluciones diluidas las cadenas están parcialmente desplegadas. Como quedan expuestos muchos grupos hidrofóbicos, se establece fácilmente enlaces hidrofóbicos entre las moléculas (Walstra y col, 2000; Mahuat y col, 2003).

Este componente proteico está constituido por diversos integrantes fundamentales, que se designan con letras griegas. Los más importantes son las caseínas  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  así como la caseína  $\kappa$ . Las caseínas  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  son sensibles al calcio, esto quiere decir que dichos componentes principales reaccionan en presencia de este elemento, con el que forman compuestos que precipitan, provocando la coagulación de la leche (Mahuat y col, 2003).

Las caseínas se encuentran compuestas por las diferentes fracciones proteicas estas son  $\alpha$ s1,  $\alpha$ S2,  $\beta$ ,  $\kappa$ , derivadas de estos fragmentos peptídicos además mezclados de compuestos salinos (calcio y fosfatos), por citratos y por una fracción glucosídica (ver Figura 4) (Escobar, 1997; Lee, 1996).

La estructura de la caseína tiene la siguiente composición está formado por la capa protectora de  $\kappa$  caseína. Esta última tiene una parte hidrófila cargada negativamente, el llamado el glucomacropéptido, orientado hacia fuera. Por ello las micelas de caseína están en condiciones normales rodeadas por una capa de agua, que constituye a la vez un revestimiento protector. Esta capa de agua y la porción negativa de la  $\kappa$  caseína son las encargadas de la fina distribución de la caseína en la leche (Dubach, 1973).

Encontramos en la micela una mayor cantidad de la  $\alpha$  caseína (38 - 42%), las  $\beta$  caseína (34 a 36 %) al romperse da péptidos con sabor amargo, la  $\kappa$  caseína (14 –16 %) en la micela y  $\gamma$  caseína (9 – 11 %) (Luquet, 1993). Las caseínas  $\alpha$ ,  $\beta$  son fosfoproteínas que tienen grupos prostéticos que tienen grupos fosfatos esterificando a la serina; estas caseínas precipitan en presencia de iones de  $\text{Ca}^{2+}$ .

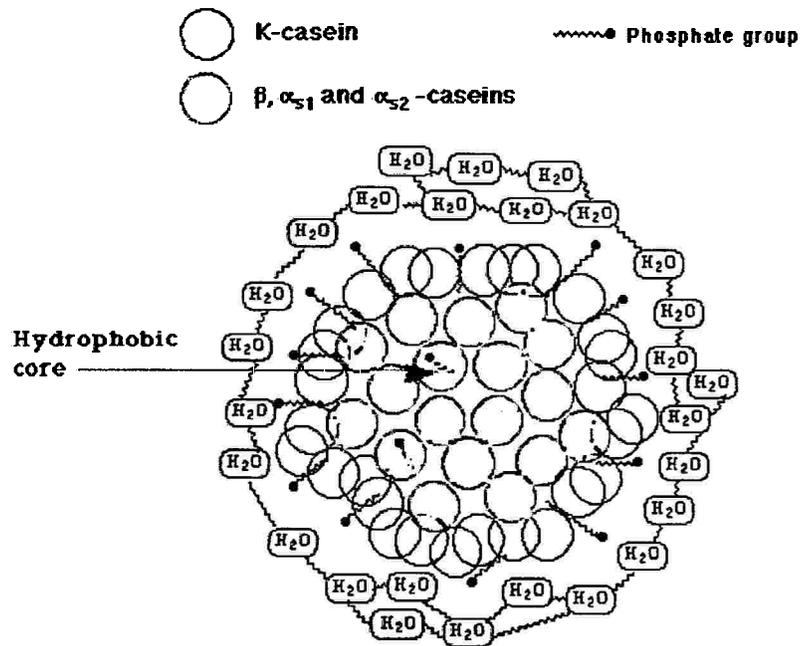


Fig. 4.- Modelo de una submicela de caseína (Salermo, 2004).

La  $\kappa$  caseína es la superficie de las micelas confieren un espacio veloso, y con un alto potencial eléctrico negativo. Este último mas la hidratación intensa, hacen que las micelas se repulsen impidiendo que se junten unas con otras es por eso que la leche se encuentra en una solución coloidal (URL3). Sin embargo, la caseína  $\kappa$  es fácilmente atacada por la enzima del cuajo, la quimosina que hidroliza una parte de su molécula; como consecuencia la caseína pierde la capacidad de protector coloidal (Walstra y col, 2000).

Los tipos de caseínas se diferencia por el contenido de ácido fosfórico que esterifican los OH de aminoácidos como la serina, arginina y triptófano; pero en el caso de la fracción Kappa también en que contiene ácido siálico. La principal función biológica de la caseína es la de proporcionar nutrientes al ternero. Pero no se trata sólo de aminoácidos; también el calcio y el fosfato son componentes importantes (Salinas, 1988).

Obviamente, la caseína ha evolucionado de forma que es capaz de ligar grandes unidades de fosfato cálcico bastante insoluble, manteniendo esta sustancia en una suspensión estable (Pérez, 1996).

## 2.5. GENERALIDADES SOBRE EL QUESO.

La palabra "queso" proviene del latín "caseus". Españoles, portugueses, holandeses alemanes e ingleses usaron la raíz latina (queso-queijokaas - käse-cheese), mientras que italianos y franceses se volcaron hacia la denominación griega "formaggi" o "fromage" (Dubach, 1998).

Los quesos constituyen una forma ancestral de conservación de las proteínas y de la materia grasa, así como de una parte del calcio y del fósforo, cuyas cualidades nutritivas y organolépticas son apreciadas por el hombre en casi todas las regiones del mundo. El término "queso" está reservado, al producto fermentado. El queso está constituido por caseína en forma de gel, materia grasa, ácido láctico y sustancias minerales obtenidas de la leche. La fabricación de los quesos es un método de transformación que comprende 4 etapas: (Mahuat y col, 2003)

Estandarización, coagulación (enzimática y/o láctica), desuerado, maduración. Es un producto de fácil conservación menor volumen, alto valor nutritivo, sabor agradable de buena digestibilidad (Aquarone y col, 1993; Luquett, 1993).

El queso es el resultado de la concentración de los principales componentes de la leche por acción de una enzima (la más frecuente cuajo extraído de los del cuajar de los bovinos jóvenes antes del destete) (Mahuat y col, 2003).

Así mismo el queso es un alimento lácteo obtenido por la coagulación enzimática de la leche con la subsiguiente separación del suero. Existen alrededor de 1000 variedades de queso en el mundo, solamente en Francia hay más de 200. La elaboración del queso es una habilidad casera que se convirtió en arte, y éste, a su vez, en una industria. La mayoría de los principales quesos nacionales ha evolucionado gradualmente a partir de los métodos tradicionales de las granjas. Sin embargo, también hay infinidad de quesos rurales poco conocidos que nunca llegan a los grandes mercados y que se han elaborado durante siglos en valles remotos y escondidos, o en altas punas (Dubach, 1998).

## 2.6. ENZIMAS COAGULANTES.

### 2.6.1. Antecedentes.

El cuajo y los coagulantes son preparaciones de enzimas proteolíticas, las cuales han sido utilizadas en la industria quesera por miles de años, siendo esta aplicación la más antigua conocida de las enzimas. Históricamente, la mayoría de las enzimas utilizadas en quesería han sido extractos de estómagos de rumiantes, aunque también se emplearon coagulantes microbianos y vegetales (Blanco y col, 2003).

Es conocido que la elaboración de quesos fue inventada por accidente, cuando nómades viajaban en días calurosos manteniendo leche en sacos fabricados de estómagos de rumiantes. Con la introducción del cuajo bovino estandarizado en 1874, Hansen en Dinamarca, fue la primera compañía en producir y comercializar enzima coagulante estandarizada para elaboración de quesos (Dubach, 1973).

Originariamente, las enzimas extraídas de los estómagos de rumiantes jóvenes fueron usadas y caracterizadas. El primer nombre para la enzima coagulante de la leche fue quimosina (Chymosin en inglés), derivada de la palabra griega "Chyme", que significa líquido gástrico, utilizada por Deschamps en 1840. En 1890, fue introducido el término de "Renina", derivado de la palabra griega "Rennet" (que significa cuajo), fue adoptado por los países de habla Inglesa, así como también como nomenclatura internacional de la enzima (URL1).

Debido a la confusión con las enzimas proteolíticas relacionadas, la enzima renina, la principal enzima coagulante de la leche, fue denominada nuevamente quimosina (Salermo, 2004).

La preparación original del cuajo (rennet), por definición, es un extracto del cuarto estómago (abomaso) de rumiantes. Esta definición esta generalmente aceptada y ha sido confirmada por la International Dairy Federation (IDF), que el nombre cuajo (rennet) debe ser reservado para la preparación de enzimas de estómagos de rumiantes también, las otras enzimas coagulantes de la leche se

denominan "coagulantes". Actualmente ha sido generalmente aceptado que la quimosina producida por un organismo modificado genéticamente debe ser denominada "Quimosina producida por fermentación" (Veisseryre, 1980).

### 2.6.2. Enzimas del cuajo.

El cuajo es el que se extrae del estómago del ternero, del cordero, o del cabrito, es el cuarto estómago del rumiante llamado cuajar, porque produce una sustancia que coagula la leche, el rumiante se sacrifica poco después de haber mamado y se extrae el estómago aun lleno de leche. Este medio posee una consistencia de pasta que servirá de vehículo de la enzima (Salinas, 1988; Alais, 1970; Dubach, 1973).

El componente activo del cuajo es una proteína ácida denominada quimosina. La coagulación de la leche por el cuajo se realiza en etapas (Lee, 1996). A nivel artesanal, se procesa el cuajo, de los estómagos se eliminan las venas y la grasa. Luego éstos se lavan, se secan y se cortan en láminas finas. Estas se dejan macerar en 2 litros de suero ácido o de una salmuera al 5% con el 4% de ácido bórico por cada estómago, la maceración se lleva a cabo a 30° C por 4 días. Para evitar la putrefacción, se puede adicionar antisépticos.

El líquido parduzco se filtra y se deja reposar durante algunos días para que la solución se estabilice (Meyer, 1993).

Hoy en día los laboratorios compran los cuajares de terneros y preparan un cuajo comercial, más puro y de mayor poder coagulante que viene en polvo o en pastillas.

También en la actualidad existe en el mercado un cuajo comercial. El que se prepara en los laboratorios a partir de un moho (especie de hongo) que produce las enzimas, la cual es luego purificada. Su poder de coagulación es similar al cuajo natural, pero tiene la gran ventaja de ser mucho más barato pues no depende del sacrificio de animales tiernos para su obtención (García, 1993).

El cuajo debe ser caracterizado por: pureza bacteriológica, fuerza, actividad y poder de conservación (Aqarone y col, 1992).

## Quimosina.

La quimosina, es una proteasa neonatal encontrada en mamíferos, cuyo código es E.C.3.4.23.4, es una enzima proteolítica esta enzima se le denomina renina, quimasa, o quimosina (Churc, 1974). La quimosina está compuesta de 323 residuos de aminoácidos con tres puentes disulfuro. Además posee un peso molecular de 35.000 daltons (Salermo, 2004).

La quimosina se sintetiza en las células de estómago de becerros recién nacidos, la quimosina es secretada como pro-quimosina, que se activa por la exposición a ácidos. Esta proteína tiene en su cadena 58 aminoácidos, y que no tienen actividad proteolítica. Se secreta al estómago como pro-quimosina, también inactiva, tras el corte de 16 aminoácidos, y se transforma en enzima activa por la eliminación proteolítica de otro fragmento de 42 aminoácidos.

Puesto que la quimosina se inactiva reversiblemente con concentraciones elevadas de cloruro de sodio, se conserva en esta forma (Salermo, 2004; Mahuat y col, 2003).

La selectividad de sustrato de la quimosina viene determinada por presencia de una zona específica con cargas negativas, que interacciona con las histidinas que ocupan las posiciones 98, 100 y 102 en la caseína  $\kappa$  (Biotol, 1991).

La quimosina tiene dos variantes genéticas, la variante A, con un resto de ácido aspártico en la posición 286, y la B, que tiene en esa misma posición un resto de glicina. La variante A es algo más activa que la B frente a la caseína  $\kappa$ , posiblemente porque la carga del ácido aspártico favorece su interacción con ella. En cambio, la variante B es algo más estable a pH 3,5 o inferior. La estabilidad de la enzima esta ligada al pH, se observa una estabilidad máxima a pH 5–5,6 ya a pH 2 (Wiseman, 1991; Biotol, 1991).

Se caracteriza por tener una alta especificidad para coagular la leche y generalmente una baja actividad proteolítica. La actividad coagulante de la enzima, parece ser más específica para las leches de su misma especie (URL2).

Al tratarse de una enzima proteolítica, la quimosina tiene doble acción; por un lado, acción coagulante por hidrólisis de la caseína  $\kappa$  y por otro, una acción proteolítica general capaz de manifestarse en todas las proteínas durante la maduración del queso (Mahuat y col, 2003).

### **Pepsina.**

Fue la primera enzima animal en ser descubierta, por Theodor Schwann en 1836. La pepsina es segregada por el estómago en forma de un precursor inactivo llamado pepsinógeno por las glándulas de la mucosa gástrica del hombre y muchos animales (por ejemplo vaca, cerdo, gallina), tiene 44 aminoácidos adicionales, que se disocian fuera de la célula que la secreta, para evitar la digestión de las proteínas celulares. En un medio ácido por debajo de pH 6, el pepsinógeno se activa de modo autocatalítico para formar la enzima activa, la pepsina (Schmidt, 1983).

Existe la pepsina A o simplemente pepsina cuyo código es E.C.3.4.23.1, la pepsina C o gastricina cuyo código es E.C.3.4.23.3 es una peptidasa y por último la Pepsina B cuyo código es E.C.3.4.23.2, encontrado en el cerdo (Peck, 2001). La pepsina A es la proteasa gástrica predominante en mamíferos adultos y se caracteriza por poseer baja especificidad y mayor dependencia al pH de la quimosina, la pepsina B es una proteasa encontrada en estómagos porcinos se caracteriza por poseer una baja capacidad coagulante de la leche y mayor actividad proteolítica; la pepsina C conocida también como gastricina, es un tipo de proteasa aspártica, se encuentra en cantidades pequeñas en el abomaso bovino y en grandes cantidades en el librillo del porcino. La pepsina actúa sobre los enlaces peptídicos compuestos de aminoácidos aromáticos como tirosina o fenilalanina. Solamente escinde los enlaces peptídicos, sin atacar los ésteres ni las amidas. La velocidad de hidrólisis disminuye cuanto se adiciona glutamato (URL2).

La transformación de pepsinógeno (P.M. 42.000) en pepsina (P.M. 32.000) es catalizada por los iones hidrogeno o por la propia pepsina (autocatálisis). En este proceso se originan junto a la pepsina otros péptidos uno de los cuales, permanece unido a la pepsina cuando el pH es superior a 5

actúa como pepsina inhibidor. Debido a este inhibidor el proceso autocatalítico de activación de la pepsina solo tiene lugar a pH inferior a 5, condición es que en el estómago se da siempre debido al a fuerte secreción ácida (pH 1- 2) (1). A pH superior a 7 se observa una cierta desnaturalización y a pH 8 a una activación irreversible del enzima (Peck, 2001; Veisseyre, 1980).

Casi todas las proteínas atacadas por la pepsina han sido previamente transformadas por el medio fuertemente ácido del estómago, por ejemplo, caseína, globina, colágeno, glutina, condrina, elastina, histona, queratina. La cocción dificulta la acción de la pepsina sobre las proteínas (ovoalbuminas) y en otros casos las facilita (proteína del hueso). Técnicamente se emplea la pepsina para la precipitación del cuajo de caseína en la preparación del queso. En este caso actúa como sustituto de la renina, la pepsina también sirve como preparado farmacéutico como auxiliar de la digestión. Los preparados de la pepsina para fines técnicos se obtienen a partir de mucosa gástrica de cerdo. La mucosa triturada mecánicamente se mezcla con ácido clorhídrico o fosfórico diluido y se deja reposar algún tiempo para que se desactive el pepsinógeno, a veces elevando la temperatura (Bruchman, 1980).

Si se utiliza pepsina en la elaboración de quesos se debe de añadir más cloruro cálcico. La pepsina se utiliza por lo general, mezclada a volúmenes iguales con la renina. La pepsina de cerdo es muy sensible a cambios en el pH en ciertos rangos normalmente utilizados durante el cuajado de la leche, siendo inestable a valor de pH por encima de 6 (Wiseman, 1991).

### Tripsina.

La tripsina es segregada por el páncreas en forma inactiva, el tripsinógeno. Es activada por la enzima enteroquinasa, esta enzima es segregado por las glándulas de las pared intestinal (Bruchman, 1980). La tripsina hidroliza los enlaces peptídicos en los que participan el grupo carboxílico de la L - arginina o la L- lisina. En consecuencia se forman los fragmentos peptídicos relativamente grandes cuyo grupo carboxílico terminal procede de la lisina o de la arginina. Al contrario que la pepsina la tripsina hidroliza también los esteres y

las aminas de estos aminoácidos. La tripsina es también muy activa frente a los péptidos sintéticos, siempre que contengan arginina o lisina (Wiseman, 1991).

La tripsina procede de una sustancia inactiva, el tripsinógeno, cuya activación se lleva a cabo por la propia tripsina. El primer paso para la activación consiste en la ruptura de un solo enlace peptídico entre la lisina y la isoleucina que conduce a la formación de hexapeptido y la tripsina cuyo aminoácido terminal es la isoleucina. Para que la autocatálisis se lleve a cabo es necesaria la presencia de iones  $\text{Ca}^{2+}$ . En su ausencia gran parte del tripsinógeno se convierte en una proteína inactiva. La activación demasiado rápida del tripsinógeno está impedida por la existencia en el jugo pancreático de un complejo inactivo por lo tanto la autocatálisis no se pone en marcha si pequeñas cantidades de tripsina actúan sobre el tripsinógeno durante un tiempo relativamente largo. Sin embargo, cuando grandes cantidades de tripsina actúan simultáneamente sobre el tripsinógeno su activación es rápida y completa (Bruchman, 1980).

La tripsina y el tripsinógeno proceden del páncreas. La tripsina fue, en unión de la ureasa, una de las primeras enzimas que se aisló en forma cristalizada. A valores de pH inferiores a 6 (óptimo 3) la tripsina es muy estable.

Cuando el pH es superior se desnaturaliza por autodigestión. Su pH óptimo de actuación se encuentra entre 7 y 8, siempre que el sustrato sea una proteína. Cuando se trata de ésteres con un grupo amino libre es algo inferior, la tripsina tiene un peso molecular de 23.800 daltons (Wiseman, 1991).

## **2.7. COAGULACIÓN DE LA LECHE**

La coagulación de la leche es el momento clave en la elaboración del queso. Durante esta fase se produce la formación de un coágulo de caseína como consecuencia de la adición del cuajo (Madrid, 1996). La coagulación de la leche se produce por una desestabilización de la micela (García y col, 1993).

La coagulación implica la formación de un gel como consecuencia de la acción de la enzima proteolítica (quimosina). El gel adquiere consistencia muy rápidamente y llega el momento en que es suficientemente firme. Solamente se





estructura reticular tridimensional que adopta un aspecto esponjoso (Alais, 1970).

La paracaseína establecida precipita en presencia de iones calcio. Se van formando unos agregados moleculares cada vez mayores, que crecen incluyendo a los glóbulos de grasa. La adición de cloruro de calcio a la leche aumenta la presencia de iones  $\text{Ca}^{2+}$ , lo que beneficia al proceso de coagulación (Madrid, 1999). Esta segunda fase necesita una temperatura arriba de los  $20^\circ\text{C}$  (Meyer, 1993).

### 2.7.2.3. Fase de sinéresis.

La retracción de los puentes de sales de calcio y el consecuente desuerado constituyen la tercera fase de la coagulación por el cuajo o fase de sinéresis. La leche recién coagulada tiene normadamente tendencia a compactarse por reducción de los espacios de unión entre las micelas de caseína y multiplicación de los puntos de unión, es decir tiende a encogerse. Como los líquidos no pueden comprimirse el suero es expulsado en esta concentración. Cuanto más elevada es la concentración de calcio, más elevada la temperatura y más perfecta la acidificación, más cantidad de suero se expulsa (Escobar, 1997).

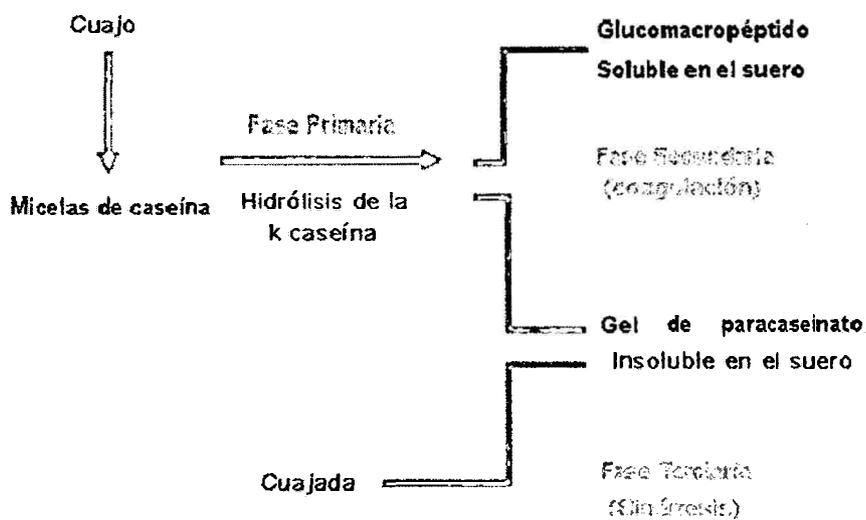


Fig. 6.- Fases de Coagulación de la leche (Salerno, 2004).

### 2.7.3. Actividad proteolítica.

Los enlaces peptídicos pueden resultar hidrolizados, por ácidos fuertes o por enzimas. Las enzimas pueden ser exopeptidasas, que van separando los aminoácidos uno a uno de la cadena polipeptídica, bien a partir del extremo N – terminal o de su extremo C- terminal. Las endopeptidasas y proteasas actúan en las partes internas de las cadenas.

Todas estas enzimas son más o menos específicas y actúan sobre los enlaces entre determinados residuos de aminoácidos. Por tanto, en la proteólisis se originan péptidos y aminoácidos, algunos de los cuales presentan un sabor característico. La degradación posterior por ejemplo, por acción de los microorganismos, puede generar  $H_2S$  y  $NH_3$  que imparten sabores extraños (Walstra y col, 2000).

La hidrólisis de la caseína origina la flexibilidad de la pasta y participa activamente en el desarrollo del sabor de los quesos, puesto que los aminoácidos son precursores de los aromas.

Los mecanismos que intervienen en la proteólisis de la caseína son actualmente bastante bien conocidos gracias a la utilización de la técnica de la cuajada aséptica. La degradación tiene lugar sobre una importante fracción de la caseína, pero que es variable según las fabricaciones. Así, los contenidos en nitrógeno soluble a pH 4.6, en relación con el total, alcanzan al final de la maduración (Mahuat y col , 2003).

La quimosina da lugar *in vitro* a curvas de proteólisis características con la caseína entera y la caseína kappa, consistentes en una pendiente inicial grande seguida de una meseta después de un tiempo de acción relativamente corto; con la caseína kappa la producción de nitrógeno no proteico es unas 4 veces mayor, debido a la hidrólisis específica del enlace Phe105 – Met106 (Alais, 1970).

La proteasa de *Endothia parasitica* presenta la mayor actividad proteolítica tanto frente a la caseína entera como a las caseínas  $\alpha S1$ ,  $\beta$  y  $\kappa$ .

Las curvas de proteólisis de la caseína entera y kappa por la proteasa de *Mucor pusillus* tienen un aspecto comparable al de la proteólisis por quimosina; caseína  $\alpha$ S<sub>1</sub>,  $\beta$ . resultan poco proteolizadas. La proteasa de *Mucor miehei*, proteoliza relativamente más que el *Mucor pusillus* a las caseínas  $\beta$ S<sub>1</sub>,  $\beta$  (Luquet, 1993).

Vaderpooten y Weckx (1972) y Paque Alais (1978) han estudiado por electroforesis la acción de las enzimas coagulantes sobre las diferentes caseínas, demostrando que todos los agentes coagulantes convierten la caseína k en para-caseína k, que migra hacia el cátodo, la reacción primaria fundamental es idéntica a la obtenida con el cuajo de buey (Mahuat y col, 2003).

La acción de éste sobre la caseína  $\alpha$ S<sub>1</sub> se traduce por la aparición de un compuesto de mayor movilidad electroforética. Este compuesto se obtiene con todas las enzimas microbianas coagulantes pero con intensidades variables lo que indica que se obtiene una hidrólisis distinta con las enzimas de *Endothia parasitica* o de *Mucor pusillus*.

En el caso de la hidrólisis de la caseína  $\beta$  se observan grandes diferencias entre la acción de estas enzimas. El cuajo de buey libera un compuesto de mayor movilidad electroforética; la enzima de *Mucor miehei* ataca fuertemente a la caseína  $\beta$  produciendo principalmente un fragmento muy móvil. La proteasa de *Endothia parasitica* es la que hidroliza con más intensidad la caseína  $\beta$  dando lugar a numerosos péptidos (Lee, 1996) (Luquett, 1993).

#### 2.7.4. Fuerza de cuajo.

En 1877 Soxhlet definió la fuerza de los cuajos como la cantidad en volúmenes de leche fresca coagulados por un volumen de cuajo, en 40 minutos a 35°C (Luquet, 1993).

Para su empleo racional, los extractos de cuajo comerciales deben de tener un poder coagulante cuidadosamente determinado. Este poder, llamado

comúnmente fuerza del cuajo, indica el número de mililitros de leche que puede coagular 1 litro de extracto de cuajo a la temperatura de 35°C en 40 minutos. Los extractos líquidos tienen por lo general una fuerza de 10.000. Se dice que se trata de cuajo 1/10.000, es decir, que 1 litro de este extracto puede coagular 10.000 litros de leche a 35°C en 40 minutos (URL2).

Verificar la fuerza de un extracto de cuajo es una operación sencilla. Se calientan 500 ml de leche muy fresca a 35°C y se añade 1 ml del extracto de cuajo. Se espera el tiempo necesario para la formación de una cuajada firme permite determinar la fuerza F del extracto (Veisseyre, 1980).

## **2.8. FACTORES QUE AFECTAN LA COAGULACIÓN DE LA LECHE.**

Para que la coagulación de la caseína de la leche por acción del cuajo se produzca en las mejores condiciones es necesario que se den varios factores:

### **2.8.1. Temperatura:**

Los cuajos de ternera trabajan mejor a una temperatura de 40° C; sin embargo en la práctica se suele trabajar a unos 30 - 35° C ya que entonces es necesario aumentar la dosis de cuajo, lo que tiene ciertas ventajas:

- ✓ Una dosis más alta de cuajo hace que el coágulo sea menos duro.
- ✓ Se estimula el desarrollo bacteriano.
- ✓ Se favorece la maduración.

Cuanto mas elevada es la temperatura (20 - 40° C), más cortos son los tiempos de floculación y coagulación. A una temperatura de 20°C es escasa la acción del cuajo y por debajo de los 10 °C ya no se produce prácticamente ningún entramado a base de puentes calcio salino (Tomadijo y col, 1998).

### **2.8.2. Acidez.**

La acidez de la leche supone un aumento en la actividad de los tipos de cuajos. Por ello es importante la premaduración de la leche con fermentos

lácticos que producen ácido láctico. Cuanto más intensa sea la acidez, con mayor rapidez discurren los procesos de coagulación y espesamiento de la leche, y mejor es así mismo el desuerado (Escobar, 1997; Mahuat y col, 2003).

### **2.8.3. Concentraciones en iones calcio y sodio.**

Adicionando cloruro cálcico a la leche aumenta la concentración de iones de calcio, facilitando la actuación de los diversos tipos de cuajo. Su uso permite tener una cuajada mas firme a la vez que permite acortar el tiempo de coagulación. Los iones de sodio también afectan a la actividad de los cuajos, pero en una proporción diez veces menor (Mahuat y col, 2003).

### **2.8.4. Cantidad de cuajo.**

Con la cantidad de cuajo a añadirse regula el tiempo deseado de coagulación. Cuanto mayor sea la cantidad de cuajo incorporado, más corto será el tiempo de floculación, puesto que entonces se dispone de mayor cantidad de principio activo. Se evitará añadir grandes cantidades de cuajo, pues ello podrá luego conferir a los quesos sabor amargo (Escobar, 1997).

### **2.8.5. Contenido de grasa.**

Cuanta más alta es la proporción de grasa existente en la leche, peores son las condiciones para el desuerado. Así la cuajada obtenida de leche descremada sede el suero con más facilidad que la de leche entera. El contenido graso no ejerce ninguna influencia sobre los tiempos de coagulación y espesamiento (Escobar, 1997; Ward, 1991).

### **2.8.6. Calentamiento de leche.**

Cuanto más intenso es el calentamiento son bajas las condiciones para la coagulación y espesamiento de la leche. El rápido calentamiento de la leche hasta 70°C seguido de una inmediata refrigeración todavía permite una buena fabricación de queso. Si se calienta la leche a temperaturas por encima de 70°C, no se puede fabricar queso con ella, ya que entonces precipita la proteína y la fijación de agua a la proteína impide la formación de puentes de calcio - salinos y con ella el espesamiento de la leche (Escobar, 1997).

### 2.8.7. Tiempo.

Así la cuajada es tanto más consistente cuanto más se tarde en contarla; y la expulsión de suero es más abundante cuanto más prolongado sea el tiempo de desuerado. Para que la cuajada expulse más suero, debe elevarse la temperatura (Mahuat y col, 2003).

### 2.8.8. Caseínas.

El contenido de caseínas tiene gran influencia en el grado de firmeza del gel, existiendo estrechas correlaciones entre ambos parámetros de ahí lo interesante que resulta en quesería de disponer en una leche rica en caseínas. En cuanto a la composición de las caseínas y las dimensiones micelares esta perfectamente demostrado que el aumento de la proporción de caseína  $\alpha_s$ , la dimensión de las micelas conlleva una disminución de la velocidad de endurecimiento del gel y de su firmeza máxima (Tomadijo y col, 1998).

## 2.9. APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS.

Actualmente, cerca de 16 millones de toneladas de queso son producidas en todo el mundo anualmente, de las cuales alrededor de 13 millones son producidas con cuajo y coagulantes. De los quesos producidos enzimáticamente, el 50% es elaborado con quimosina producida por fermentación, el 30% con cuajo animal y el 20% restante con cuajo microbiano.

Debido a múltiples y variados problemas acaecidos en los últimos años, han hecho que la relación se volcara a favor de la quimosina producida por fermentación (García, 1993).

Los coagulantes, usualmente son comercializados como soluciones de enzimas y al igual que las proteínas son susceptibles de degradaciones por microbios y por propia digestión. En consecuencia, estos deben ser almacenados en condiciones controladas de temperatura, siendo aconsejable por debajo de 8 °C y por encima de 0 °C y a resguardo de la luz solar (Luquett, 1996).

### 2.9.1. Cuajo recombinante.

El ADN que codifica la enzima quimosina se introduce dentro de un vector en la célula bacteriana que se cultivará y producirá la cantidad comercial de quimosina. Este tipo de producción es de gran importancia por disminuir el costo comparativo con la producción a partir del estómago de terneros.

En *Escherichia coli*, la proquimosina se condensa en los cuerpos de inclusión. Esta es solubilizada, así la proquimosina es aislada, purificada y tratada con ácido para producir una quimosina genéticamente activa. La solubilización de los cuerpos de inclusión es hecho mediante un tratamiento con urea. La diálisis bajo las condiciones alcalinas es necesaria para garantizar el adecuado doblamiento de la proquimosina (Salerno, 2004).

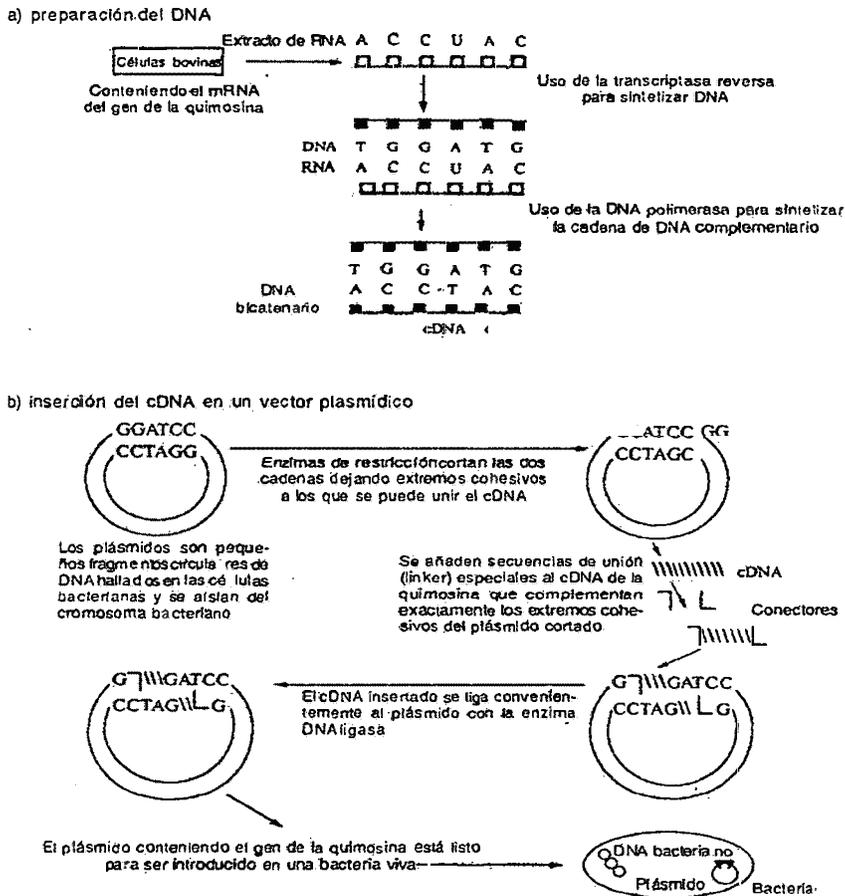


Fig. 7.- Proceso general de producción de quimosina empleando *Kluyveromyces lactis* recombinante (Lee, 1996)

Esta enzima también está siendo producida a partir de microorganismos eucarióticos modificados genéticamente como *Kluyveromyces lactis*, *Aspergillus niger*. Estos microorganismos son modificados con la misma secuencia de ADN que codifica para la enzima en los terneros, ya que con esta enzima la calidad del queso es mayor que la obtenida con quimosina de otros animales o microorganismos. En 1980 la quimosina fue la primera enzima obtenida genéticamente de un microorganismo modificado, siendo aceptada para el uso en los alimentos (Biotol, 1991). Tres de estas fueron aceptadas en varios países de Europa y en los Estados Unidos.

Esta enzima es exactamente la misma que se obtiene de terneros pero con un grado alto de pureza. La quimosina clonada en *Saccharomyces cerevisiae* se ha comercializado por Gis Brocades. Hoy aproximadamente el 90% de los quesos fabricados en Reino Unido se producen con quimosina obtenido de microorganismos modificados genéticamente. Este tipo de tecnología se usa ampliamente en USA y en Reino Unido, quienes utilizan quimosina recombinante cuyo costo es 40 a 50% menos que la enzima natural (Lee, 1996) (Biotol, 1991).

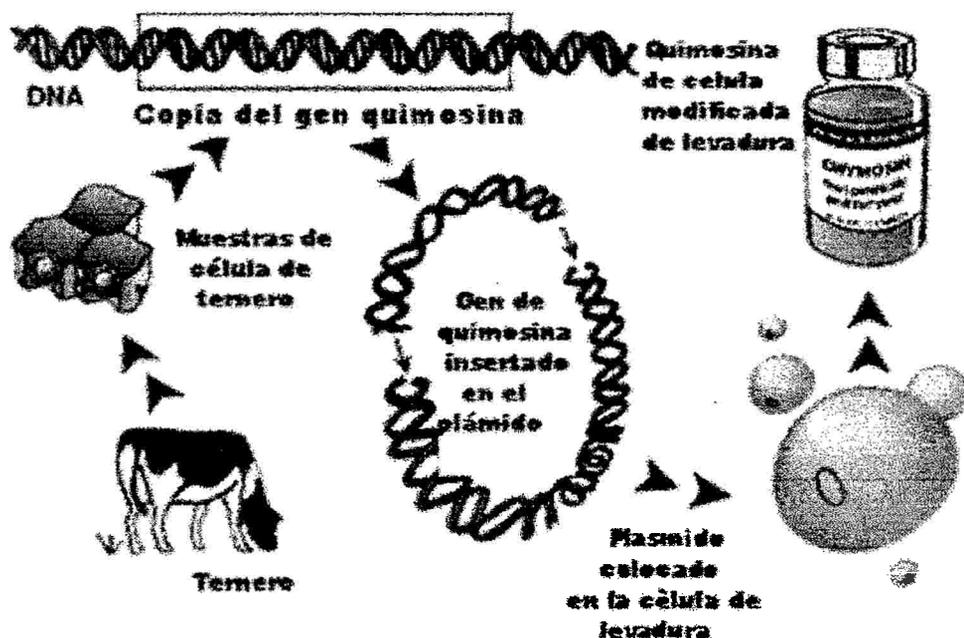


Fig. 8.- Producción de micorrenina producido por *Mucor pusillus* (Salermo, 2004).

Recientemente se han introducido en el mercado tres productos a base de quimosina recombinante: Chymogens, Maxiren, Chymax y Chymogen, del Laboratorio Hansen en colaboración con Genecor, (USA), se produce mediante una fermentación controlada en *Aspergillus niger*, se creó para satisfacer la demanda de un producto con la misma composición enzimática del cuajo de ternero que contiene quimogen (90%) y pepsina bovina (10%). También se producen otras quimosinas recombinantes, como son Maxiren (GistBrocades, Países Bajos) con la levadura *Kluyveromyces lactis* (ver Fig. 7) y Chymax con *Echerichia coli* (Lee, 1996).

La Micorrenina, producido por *Mucor pusillus* fue clonado en una levadura. Esto mantiene las mismas propiedades que se obtuvieron por el hongo y hasta el momento ha estado mostrando ser tan eficaz, en la producción de queso. La Micorrenina es un producto del origen microbiano obtenido por las técnicas de ADN recombinante (ver Fig. 8), introduciendo el gen del hongo productor de la enzima en una levadura no patógena. Es obtenida directamente del medio de cultivo y su actividad coagulante es diferente a la obtenida directamente de microorganismo (Biotol, 1991).

### III. MATERIAL Y MÉTODOS

#### 3.1. MATERIAL.

##### 3.1.1. Población y muestra.

Se tomó como población los cuajos naturales de animales de "vaca" *Bos taurus*, "oveja" *Ovis arius*, "cabra" *Capra aegagrus*, "llama" *Lama glama*, "alpaca" *Vicugna pacos*, "vicuña" *Vicugna vicugna* y "cerdo" *Sus scrofa* utilizados en el departamento de Ayacucho tomando las muestras de los distintos distritos como:

El Distrito de Paras, se encuentra en la Provincia de Cangallo, departamento de Ayacucho, ubicado a una altitud de 3,330 m.s.n.m; entre las coordenadas geográficas de 12°32'54" L.S y 74°37'36" L.O corresponde a la Zona de Vida (bh- MS) bosque húmedo Montano Sub tropical.

El Distrito de Sancos, se encuentra en la Provincia de Huancasancos, departamento de Ayacucho, ubicado a una altitud de 3,408 m.s.n.m; entre las coordenadas geográficas de 13°55'07" L.S y 74°19'55" L.O corresponde a la Zona de Vida (bh - MS) bosque húmedo Montano Sub tropical.

El Distritito de Huamanquiquia, se encuentra en la Provincia de Víctor Fajardo , departamento de Ayacucho, ubicado a una altitud de 3,350 m.s.n.m; entre las coordenadas geográficas de 13°43'30" L.S y 74°16'18" L.O corresponde a la Zona de Vida (bh - MS) bosque húmedo Montano Sub tropical.

El Distrito de Cangallo, se encuentra en la Provincia de Cangallo, departamento de Ayacucho, ubicado a una altitud de 2,577 m.s.n.m; entre las coordenadas geográficas de 13°37'30" L.S y 74°06'28" L.O corresponde a la Zona de Vida (bs – M BS) bosque seco Montano Bajo Sub tropical.

El Distrito de Pampacangallo, se encuentra en la Provincia de Cangallo, departamento de Ayacucho, ubicado a una altitud de 3,330 m.s.n.m; entre las coordenadas geográficas de 13°13'15" L.S y 74°11'36" L.O corresponde a la Zona de Vida (bh - MS) bosque húmedo Montano Sub tropical (Ramirez, 1985).

De estos lugares se recolectaron los cuajos de 7 especies de animales y obteniendo 3 muestras por especie; siendo un total de 21 cuajos secos de diferentes animales, extraídas de las visitas a dichos lugares.

### **3.1.2. Recolección de cuajos**

Las muestras fueron tomadas al azar de diferentes provincias de la región de Ayacucho, para conseguir los cuajos secos se tuvo que realizar viajes a las zonas de Cangallo, Pampacangallo, Huancasancos, Huamanquiya, Paras. Donde la población utiliza estos cuajos naturales para la elaboración del queso, estos cuajos secos y puros fueron recolectados en un recipiente apropiado, para luego ser transportados al Laboratorio de Biotecnología Microbiana, de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional San Cristóbal de Huamanga, para ser estudiadas.

## **3.2. MÉTODOS:**

### **3.2.1. Descripción del proceso artesanal de elaboración de cuajos naturales.**

#### **3.2.1.1. Encuestas**

Con la finalidad de describir cómo era el proceso de obtención y elaboración de cuajos artesanales, se visitaron los siguientes lugares del Departamento de Ayacucho: Cangallo, Pampacangallo, Huancasancos, Huamanquiya y Paras. Se elaboró una encuesta, en la que se recabó información importante de dicha obtención y proceso.

Se entrevistaron un total de 22 personas dedicadas exclusivamente a la elaboración tradicional de hacer quesos con cuajos naturales y crianza de ganado.

En cada uno de estos lugares visitados, se recolectaron los datos en forma ordenada en las que se realizó las siguientes preguntas:

**I. PROCEDENCIA DE CUAJO**

Nombre de informante

Nombre de la comunidad

Distrito

Provincia

Departamento

**II. MANEJO DE CUAJO**

1. Tipo de ganado

2. Edad de cría

3. Forma de obtención

4. Preparación de cuajo

5. Conservación de cuajo

6. Forma de empleo

7. Vida útil del cuajo

8. Rendimiento (número de veces en que se utiliza)

9. Proporción de uso

**3.2.2. Evaluación de cuajos.**

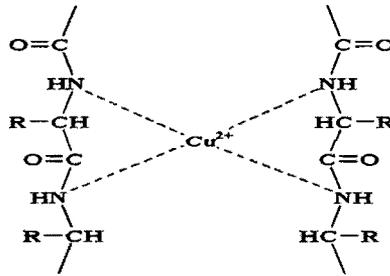
**3.2.2.1. Obtención del extracto enzimático.**

- Se cortaron los cuajos en pequeños trozos.
- Se pesaron los cuajos, con la ayuda de una balanza analítica.
- Se desinfectó el cuajo, utilizando alcohol al 96%.
- En un recipiente estéril, que contenía suero de leche, se incorporó el cuajo.
- Este fue llevado a agitación constante a una temperatura ambiental durante 4 días.
- Pasado este tiempo el extracto fue utilizado para las pruebas de: proteína total soluble, actividad proteolítica, fuerza de cuajo, análisis microbiológico.

### 3.2.2.2. Determinación de Proteína total soluble.

#### Fundamento:

La presencia de proteínas en una mezcla se puede determinar mediante la reacción del Biuret. El reactivo de Biuret contiene  $\text{CuSO}_4$  en solución acuosa alcalina (gracias a la presencia de  $\text{NaOH}$  o  $\text{KOH}$ ). La reacción se basa en la formación de un compuesto de color violeta, debido a la formación de un complejo de coordinación entre los iones  $\text{Cu}^{2+}$  y los pares de electrones no compartidos del nitrógeno que forma parte de los enlaces peptídicos.



La reacción debe su nombre al biuret, una molécula formada a partir de dos de urea ( $\text{H}_2\text{N}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CO}-\text{NH}_2$ ), que es la más sencilla que da positiva esta reacción, común a todos los compuestos que tengan dos o más enlaces peptídicos consecutivos en sus moléculas.

#### Reactivos:

- $\text{NaOH}$  3 N
- $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  al 2.5 %.

#### Procedimiento:

- En un tubo de ensayo de centrifuga se tomó 5 ml del extracto enzimático el cual se centrifugó a 4000 rpm por 10 minutos.
- Se descartó el sobrenadante, y luego se adicionó 5 ml de agua destilada se repitió la operación cuatro veces.
- Se resuspendió las células en 5 ml de agua destilada a partir de este se separó 1 ml de suspensión y se vertió a un tubo de prueba.
- A la suspensión se añadió 2 ml de  $\text{NaOH}$  3 N y se puso a baño María hirviendo por 5 minutos.

- Se dejó enfriar al medio ambiente y se añadió 2 ml de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  al 2.5%.
- Luego se centrifugó a 2000 rpm por 5 minutos.
- Las lecturas de absorbancia se realizaron a partir del sobrenadante a 554 nm en un espectrómetro Spectronic 21 D, Milton Roy. Previa calibración del equipo a transmitancia cero, y absorbancia cero con agua destilada.
- Paralelamente se preparó el blanco utilizando agua destilada en lugar del extracto enzimático.
- Los resultados se expresarán en mg de proteína /ml extrapolando las lecturas en una curva patrón.

#### **Curva patrón:**

La curva patrón se elaboró preparando una solución estándar de albúmina de huevo (2, 4, 6, 8 y 10 mg/ml), las cuales fueron tratadas de la misma forma que la muestra problema y luego se leyó la absorbancia usando como blanco agua destilada. Se ajustaron los datos mediante regresión lineal. Los resultados se expresaron en mg de proteínas/ml.

#### **3.2.2.3. Determinación de la actividad proteolítica.**

##### **Fundamento:**

La acción de las proteasas sobre la azocaseína resulta en la liberación de grupos peptídicos que determinan la producción de color y que son útiles en la detección y estimación cuantitativa de la proteína (caseína). Es así que la azocaseína tiene ventajas con respecto a la caseína normal. Este nuevo compuesto presenta una reacción coloreada, una reacción específica, y es soluble en agua. La actividad viene expresada en U/0.1 ml de extracto enzimático, a partir de una curva estándar obtenida plotando diferentes concentraciones de proteasa alcalina.

Una unidad enzimática hidrolizará la caseína para producir el color equivalente a 1.0  $\mu$  moles (1.81 $\mu$ g) tyrosina por minuto a un pH 7.5 y a 37°C (Juscamaita, 1993).

**Reactivos:**

- Azocaseína
- Buffer Borato 0.2M; pH 7.5
- Ácido tricloroacético 10% (ATA)
- Hidróxido de sodio 2N
- Proteasa alcalina de *Aspergillus oryzae*
- Agua desionizada

**Procedimiento:**

- En un tubo de ensayo se colocó 1.8 ml de la solución de azocaseína tamponada y se estabilizó a 37° por 15 minutos.
- Se añadió seguidamente 1 ml de extracto enzimático se incubo a 37°C por 60 minutos y cumpliéndose el tiempo se detuvo la reacción por adición de 2 ml de ATA.
- El blanco de sustrato estuvo constituido de 1.8 ml de azocaseína, 2 ml de ATA y 0.2 ml. de extracto y; el blanco de reactivos de 2 ml de agua destilada y 2 ml de ATA.
- Los tres tubos se centrifugaron a 3000 rpm por 10 minutos y se separó una alícuota de 3 ml de sobrenadante se le añadió 1.5ml de NaOH 2 N, para estabilizar la reacción.
- Las lecturas de absorbancia se realizaron a una longitud de onda de 445 nm en un espectrofotómetro Spectronic 21D, Milton Roy.

**Curva patrón:**

La curva patrón se realizó, con proteasa alcalina a concentraciones: 0. 0.5, 0.10, 0.15, 0.20, 0.25, 0.30 mg/ml

**3.2.2.4. Determinación del título o fuerza de cuajo.****Fundamento:**

El título o fuerza de cuajo se define como la cantidad de leche en mililitros, coagulados por un volumen de cuajo. A condiciones de 35 °C y 40 minutos (Mahuat y col, 2003).

### Procedimiento.

- Se midió el tiempo que transcurre entre el momento de la adición del cuajo y la aparición de los primeros flóculos, que corresponde a la ruptura de la suspensión coloidal.
- Se tomaron 10 ml de leche colocándolos en tubos de ensayos.
- Los tubos fueron colocados a baño María a unos 35°C, con un termómetro se mido la temperatura de la leche, siendo esta de 35°C.
- Se adicionó 0.1 ml de extracto enzimático, a los tubos con el contenido de leche.
- Los tubos de vidrio fueron inclinados ligeramente, se les hizo girar lentamente.
- Se tomó el tiempo que transcurría con la aparición de los flóculos, con la ayuda de un cronómetro.
- Se anotaron los resultados, para los cálculos necesarios.
- Se calculó la fuerza de cuajo mediante la formula de Soxhlet. (Luquet, 1993)

$$F = \frac{V \times 2400}{C \times t}$$

Donde: F : Fuerza de Cuajo  
V : cantidad de leche (ml o g)  
C : cantidad de cuajo (ml o g)  
T : tiempo (segundos)  
40 min x 60 = 2400 segundos

### 3.2.3. Análisis microbiológico.

Se realizó mediante la recuento de *Staphylococcus aureus*, coliformes fecales y mesófilos (Refai, 1981).

#### 3.2.3.1. Recuento de *Staphylococcus aureus*.

##### Procedimiento.

1. Se tomó del extracto enzimático 10 ml. con una pipeta estéril, en 90 ml de agua peptonada.

2. Se realizó diluciones sucesivas en 9 ml de agua peptonada al 0.1% hasta  $10^{-3}$ .
3. Se Tomó 0.1 ml de cada dilución y se sembró por extensión sobre Agar Baird- Parker.
4. Se Incubó a 37°C por 24 a 48 horas.
5. Luego se contó aquellas colonias negras que tuvieron halo de precipitación (Refai, 1981).

### **3.2.3.2. Numeración de coliformes fecales.**

#### **Procedimiento.**

- Se tomó del extracto enzimático 10 ml. con una pipeta estéril, en 90 ml de agua peptonada.
- Se realizó diluciones sucesivas en 9 ml de agua peptonada al 0.1% hasta  $10^{-3}$ .
- Se distribuyó 1 ml de cada dilución en 3 tubos con 10 ml de Caldo de Triptosa y Sulfato de Lauril, provistas de campanitas de Durham.
- Se Incubó los tubos a 37°C por 24 – 48 horas.
- Se repicó por asada los tubos que produzcan gas, en 10 ml de caldo EC, provistas de campanitas de Durhan.
- Los tubos fueron incubados a 45.5°C por 24 – 48 horas.
- Se observó y anotó los tubos que producían gas.
- Se remitió a las tabla del Número Mas Probable (NMP) (Refai, 1981).

### **3.2.2.3. Recuento de Mesófilos.**

#### **Procedimiento.**

1. Se tomó del extracto enzimático 10 ml. con una pipeta estéril, para 90 ml de agua peptonada.
2. Se tomó del extracto enzimático 1 ml. con una pipeta estéril.
3. Se realizó diluciones sucesivas en 9 ml de agua peptonada al 0.1% hasta  $10^{-3}$ .
6. Se Tomó 1 ml de cada dilución y se sembró por incorporación en Agar Recuento.

7. Se incubó a 37°C por 24 a 48 horas (Refai, 1981).
8. Luego se contó las colonias y se tomaron los datos.

### **3.2.4. Análisis físico -químico de la leche.**

#### **3.2.4.1. Densidad.**

Se precisa como la masa de la unidad de volumen a una presión de temperatura dada, y se expresa en el sistema métrico, en gramos por centímetro cúbico. Para medir la densidad se utilizó el Lactómetro o Lactodensímetro, un hidrómetro especial para la leche. Con el lactodensímetro uno determina la gravedad específica de la leche. La densidad de la leche depende de su composición y se ve afectada por la temperatura (León y col, 2003).

#### **Procedimiento:**

- En una probeta de 250 ml se añadió suficiente leche bien mezclada.
- Se sumergió el lacto-densímetro haciéndolo rotar lentamente hasta que el nivel de la leche llegó hasta el borde de la probeta. El lacto-densímetro debe flotar libremente, estabilizar por unos 30 a 45 segundos.
- Se tomó la temperatura y se leyó la densidad. Con estos dos datos (densidad aparente y temperatura) se calculó la densidad corregida.
- El factor de corrección utilizado fue de 0.0002.

#### **3.2.4.2. Acidez titulable**

#### **Fundamento.**

Se trata de medir la cantidad de ácido existente y que se encuentra diseminado en el suero de leche, por medio de una solución de hidróxido de sodio valorado, la cantidad de ácido que se encuentra en la leche se expresa como porcentaje de ácido láctico (León y col, 2003).

#### **Reactivos:**

- Solución indicadora.

- Hidróxido de sodio 0.1 N

**Procedimiento:**

- Se tomó 10 ml de leche se puso en un matraz.
- Se tomó 10 ml de la misma leche en otro matraz, sirvió de patrón.
- Al primer matraz con leche se añadió tres gotas de solución indicadora.
- Luego se descartó; gota a gota la solución valorada de hidróxido de sodio 0.1 N, removiendo suavemente el matraz homogenizando la mezcla.
- Se detuvo la descarga del hidróxido de sodio 0.1 N en el momento que aparezca un color ligeramente rosado.
- Se comparó con el color del control, que mantiene la coloración 10 a 15 segundos.
- Se midió el gasto en ml de la bureta
- Se aplicó la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Acidez} = \frac{\text{Gasto(ml)} \times N \times 0.090 \times 100}{\text{ml de muestra}}$$

Acidez expresada en termino de ácido láctico

**3.2.4.3. Sólidos totales.**

**Fundamento:**

Consiste en la pérdida de peso por la evaporación de agua que contienen los alimentos, cualquier método de industrialización que haya sido sometido detectándose en mayor o menor proporción.

El agua se encuentra en los alimentos como agua de cristalización o ligadas a proteínas y a las moléculas de sacárido y absorbida sobre la superficie de las partículas coloidales. Estas forman requieren para su eliminación en forma de vapor para su calentamiento de distinta intensidad. Parte de la misma permanece ligada al alimento incluso a temperaturas que lo carbonizan (León y col, 2003).

**Procedimiento:**

- Se pesó 2 g de leche con la ayuda de una pipeta.
- Se puso la leche sobre un recipiente pesado.
- Luego se extendió la leche formando una película fina sobre todo el fondo del recipiente.
- Se llevó el recipiente a un horno caliente a 180°C.
- El recipiente se calentó hasta que aparezcan las primeras trazas de color marrón.
- Se transportó el recipiente al horno al vacío a temperatura de 100°C, durante 10 minutos.
- Luego se transfirió el recipiente al desecador hasta que enfrie se mantuvo allí durante 5 minutos.
- Se pesó rápidamente, se anotó los resultados y se calculó el porcentaje de sólidos totales.

**3.2.4.4. Determinación de proteínas (Método de Kjeldahl).****Fundamento:**

El fundamento del método de Kjeldahl consiste en transformar el nitrógeno de la materia orgánica en sulfato de amonio mediante la digestión de la proteína por ácido sulfúrico concentrado en presencia de  $\text{SO}_4\text{Cu}$ ,  $\text{SO}_4\text{K}_2$ , u otro catalizador conveniente. El sulfato de amonio formado se separa entonces de la proteína digerida por destilación en corriente de vapor, a continuación se titula.

El método de Kjeldahl sirve para la determinación de nitrógeno de cualquier sustancia: y comprende tres etapas que son las siguientes:

**a) Digestión**

En este método se usa el sulfato de cobre como catalizador y el sulfato de potasio para aumentar la temperatura de la mezcla y acelerar la digestión. (León, Hermoza, 2003).

El nitrógeno es liberado como  $\text{SO}_4 (\text{NH}_4)_2 + \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$ .

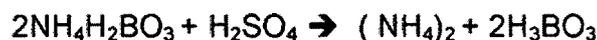
#### **b) Destilación.**

Es la segunda etapa del método que consiste en la separación del  $\text{NH}_3$  de la sustancia digerida con  $\text{NaOH}$ , recibiendo el destilado en cualquier ácido valorado ( $\text{H}_3\text{BO}_3$  al 2%), el  $\text{NH}_3$  al condensarse pasa en forma de  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{BO}_3$  el cual se reconoce por su reactivo característico (León y col, 2003).



#### **c) Titulación.**

Es la tercera etapa del método que consiste en la neutralización del ácido con una solución de ácido sulfúrico valorado ( $\text{H}_2\text{SO}_4$  0.025N) (León y col, 2003).



#### **Reactivos:**

- $\text{NaOH}$  4%
- solución catalizadora 30 ml.
- Fenoftaleína
- Ácido sulfúrico
- Anaranjado de metilo

#### **Procedimiento:**

##### **Digestión:**

- Se pesó 100 mg. de muestra problema, introducir en el matraz de Kjeldahl.
- Se agregó 4 ml de la solución digestora para mezclar con ligero giro del balón de Kjeldahl.
- Se digirió un blanco que tenga todo los reactivos menos la muestra, con el fin de corrección.
- Se llevó los balones a la cámara de digestión. La temperatura osciló entre 360–410° C.

- Se dio por terminada la digestión cuando el líquido tomo una coloración blanca lechosa. Esto ocurrirá en un periodo de dos a tres horas. Luego se retiró los balones de la fuente calorífica.

### Destilación:

- Primeramente se calentó el destilador Marckman o de Parnas, hasta que el agua hierva por unos minutos en el condensador y salga vapor de agua.
- Se colocó un vaso de precipitación de 250 ml. en el extremo del tubo de salida del destilador, conteniendo exactamente 20 ml. de solución de ácido bórico 2%, con el indicador Tashiro. La salida del tubo estuvo sumergido en ácido bórico con la finalidad de que el amonio no se evapore y se atrape todo el  $\text{NH}_3$  amoniaco.
- Se colocó la muestra digerada en el condensador, se llevó el balón de Kjeldahl por tres veces con agua destilada. Inmediatamente se agregó una solución alcalina de NaOH al 40% hasta que se produzca cambio de color (terroso).
- Seguidamente se tapó y llenó con agua destilada 1/3 de la boquilla de entrada del condensador.
- La destilación se culminó cuando hubo aproximadamente 100 ml en el vaso donde se recepcionó el destilado.
- A medida que la solución digerada reaccionó con el NaOH al 40% el ácido bórico conteniendo el indicador virará de un morado a un verde cristalino (León y col, 2003).

### Titulación

- El destilado (100 ml), se tituló con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,025N valorado hasta que la solución viere de un color verde a un color gris azulado.
- Se anotó el gasto de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0.025N de la muestra y el blanco, por diferencia se halló el gasto real en la titulación de la muestra (León y col, 2003).

$$\% \text{ N} = \frac{\text{ml } \text{H}_2\text{SO}_4 \times \text{N} \times 14 \times 100}{\text{Peso de muestra en mg}}$$

$$\% \text{ Proteínas} = \% \text{ Nitrógeno} \times 6.38$$

#### **3.2.4.5. pH.**

##### **Fundamento.**

Es la medida de la acidez o basicidad de una solución. Se define como el menos logaritmo de la concentración de iones de hidrógeno, expresada en moles por litro. La escala de pH varía de 0 a 14. Las soluciones neutras tienen un pH 7, las ácidas menor que 7 y las básicas o alcalinas, mayor que 7 (León y col, 2003).

##### **Procedimiento.**

- Previa calibración del equipo
- En un vaso precipitado se colocó 100 ml de leche.
- Se introdujo el peachimetro en la leche.
- Se dejó 1 minuto hasta obtener una lectura estable.
- Se tomó nota del dato.

## **IV. RESULTADOS**

### **A. DESCRIPCIÓN DEL PROCESO ARTESANAL DE ELABORACIÓN DE CUAJOS NATURALES.**

#### **1. Tipo de ganado.**

De acuerdo al sitio y zona, el ganado que se encontró para la extracción de cuajo en el departamento de Ayacucho es variado. La distribución del tipo de ganado está influenciada, por la disponibilidad de pastos naturales y la fisiografía de la zona.

Entre los ganados más empleados encontramos las crías de: vaca, oveja, cabra, cerdo, alpaca y llama. No es muy utilizado el cuajo de vicuña por que es patrimonio del Estado y está prohibida su tenencia y caza, sin embargo existe una comercialización indiscriminada de cuajo y de su piel.

#### **2. Edad de cría.**

Al realizarse la encuesta, la gran mayoría de encuestados coincidió, que el cuajo extraído de los animales tiernos, corresponde a los primeros días después de su nacimiento a lo mucho una semana. Ya que cuando la cría lacta, la leche limpia y elimina gran parte de las enzimas que se encuentran dentro del cuajo, y por tanto el cuajo no será muy concentrado. Sucede todo lo contrario con el cerdo ya que su edad no influye, pues a este cuajo luego se le agregan otros aditivos para potenciar su fuerza.

### **3. Forma de obtención**

El cuajo es el producto del sacrificio del animal tierno. Esta obtención se da a consecuencia de accidentes surgidos en la faena del pastoreo donde la cría muere. Estos accidentes pueden ser al nacer la cría, cuando la madre no atiende a la cría, cuando muere aplastada por el rebaño y por diversas enfermedades. Una vez que la cría está muerta, lo primero que se le extrae es el cuajo, para lo cual con la ayuda de un cuchillo se hace un corte a la altura del estómago, se encuentra el cuajo, y antes de cortarlo primero se amarra la parte inicial y terminal del cuajo, luego se corta ambos extremos.

### **4. Preparación del cuajo.**

Luego de extraído el cuajo, este puede ser preparado o no, dependiendo de la cantidad de biomasa que se encuentre en la bolsa. La preparación del cuajo consistirá en agregar al cuajo (bolsa), pedazos de manzana verde, jugo de limón y sal. Para el trabajo de investigación se tomaron cuajos puros sin ningún aditivo para poder comparar su composición y fuerza.

### **5. Conservación del cuajo**

Es un proceso importante que se realiza con el fin de darle al cuajo una adecuada conservación y una mayor concentración mediante la deshidratación. El cuajo se somete a un desecado completo al calor del fogón de una cocina a leña, luego es coigado en una parte superior cerca del fogón, el humo actúa como repelente contra las moscas que podrían causar su alteración. Cuando el cuajo es desecado por exposición directa al sol, adquiere un olor desagradable.

### **6. Vida útil**

El cuajo seco puede conservarse por un espacio de aproximadamente un año. El cuajo disuelto en suero se puede conservar por un espacio de 3 a 6 meses a temperatura ambiental

## **7. Forma de empleo**

El cuajo secado puede utilizarse en partes o en su totalidad, dependiendo de la cantidad que se requiere. Se troza y se coloca en un envase limpio que contenga suero de leche, moviéndose constantemente para que se diluya en la solución por un espacio de 4 días, luego es utilizado para la elaboración del queso.

## **8. Rendimiento**

En la elaboración artesanal de queso el rendimiento del cuajo es muy variado ya que va a depender primero de la cantidad y calidad de enzimas que se encuentren en el cuajar. En segundo lugar depende de la manipulación del cuajo, es decir, si hay nuevas incorporaciones de suero de leche, por tanto el rendimiento es muy variado.

## **9. Proporción de uso**

La proporción de uso dependerá de la fuerza que tenga el cuajo para coagular la leche. Un método artesanal para saber si el cuajo es bueno es colocando en la palma de la mano 1 gota de cuajo (disuelto), con 4 gotas de leche, si es fuerte entonces la coagulación será rápida, de esta manera se puede calcular la cantidad de cuajo a emplear, pero esta proporción es muy variada, no existe una medida exacta.

## **B. EVALUACIÓN DE CUAJOS.**

Para realizar la evaluación de cuajos se realizaron 4 pruebas, tales como:

- Determinación de proteínas totales en extracto enzimático de cuajo cuyos resultados se pueden apreciar en el CUADRO I,
- Actividad proteolítica en extracto enzimático de cuajo, según el CUADRO II observamos los resultados obtenidos
- Fuerza de cuajo en 1 g de cuajo / ml de leche, los resultados se muestran según el CUADRO III.

### C. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO

- Además se pudo realizar el análisis microbiológico de los cuajos para ello se realizó el recuento en *Staphylococcus aureus* (CUADRO IV) y Mesófilos (CUADRO V) y la numeración de coliformes fecales (CUADRO VI), a partir de extracto enzimático.

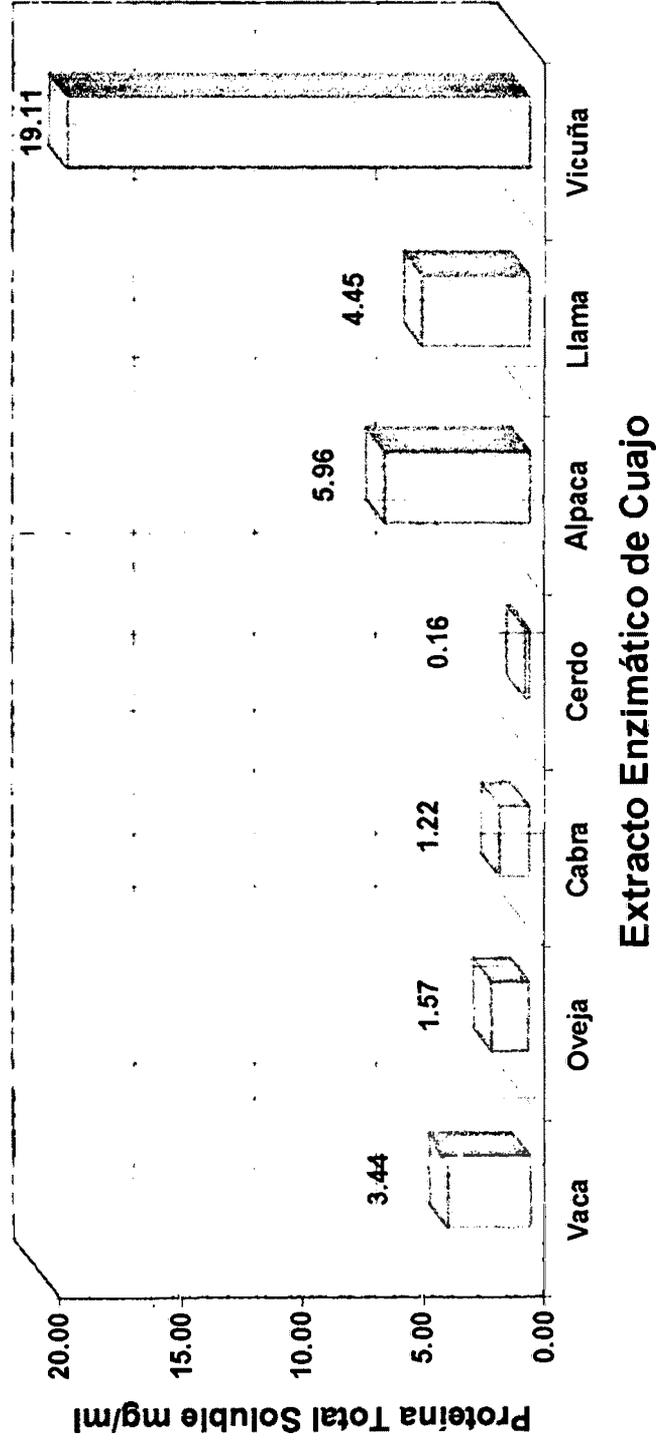
### D. ANÁLISIS FÍSICO QUÍMICO DE LA LECHE.

La leche utilizada para poder determinar la fuerza de cuajo, provino del Fundo Alpachaca (UNSCH). La caracterización de esta leche se observa en el CUADRO VII.

**CUADRO I**

**DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA TOTAL SOLUBLE (PTS) EN  
EXTRACTO ENZIMÁTICO DE CUAJO.  
AYACUCHO – 2005.**

<b>Cuajo</b>	<b>Absorvancia (554nm)</b>	<b>[PTS], g/ml</b>
Vaca	0.08	3.44
Oveja	0.04	1.57
Cabra	0.04	1.22
Cerdo	0.02	0.16
Alpaca	0.15	5.96
Llama	0.11	4.45
Vicuña	0.25	19.11

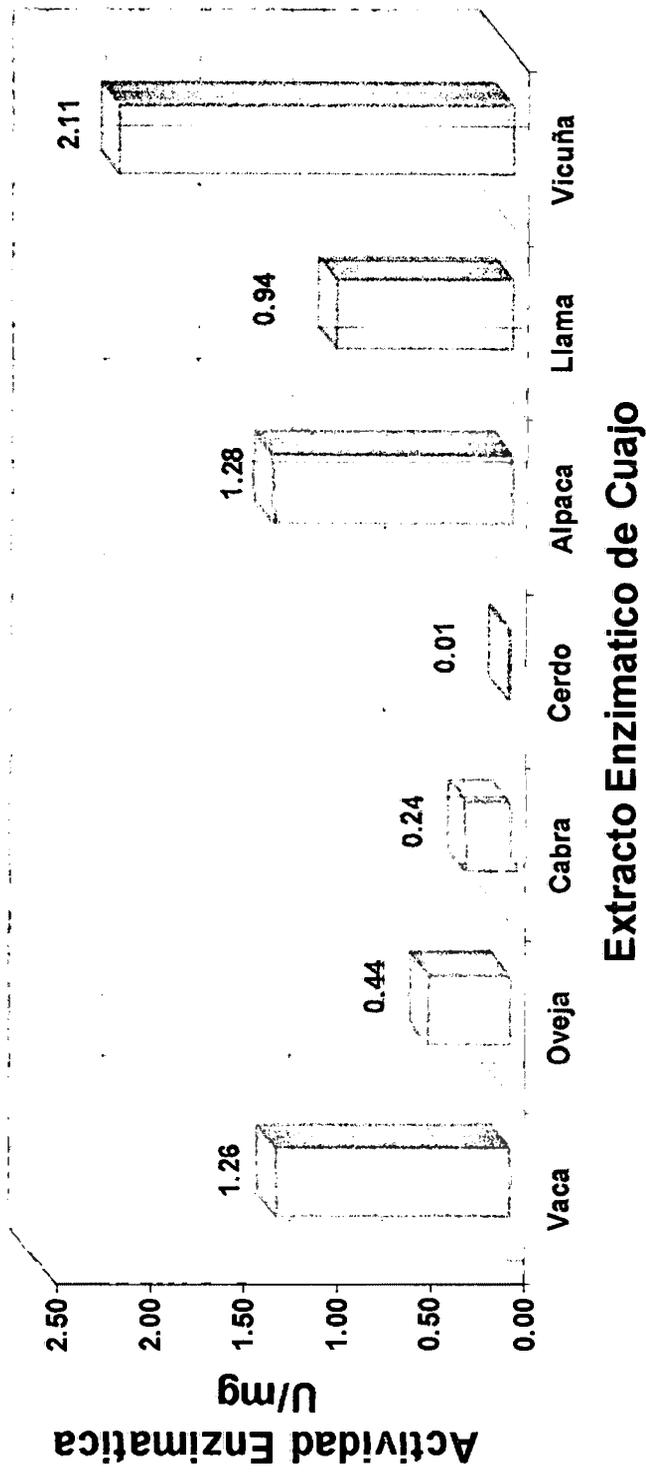


**Figura 01.-** Determinación de proteína total soluble en extracto enzimático de cuaajo.  
Ayacucho - 2005.

**CUADRO II**

**DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA EN EXTRACTO ENZIMÁTICO DE CUAJO. AYACUCHO - 2005.**

<b>Cuajos</b>	<b>Absorvancia (445nm)</b>	<b>Actividad Enzimática (U/mg)</b>
Vaca	1.081	1.257
Oveja	0.327	0.439
Cabra	0.260	0.241
Cerdo	0.106	0.013
Alpaca	1.079	1.282
Llama	0.517	0.940
Vicuña	1.470	2.106



**Figura 02.** - Determinación de la actividad proteolítica en extracto enzimático de cuajo. Ayacucho - 2005.

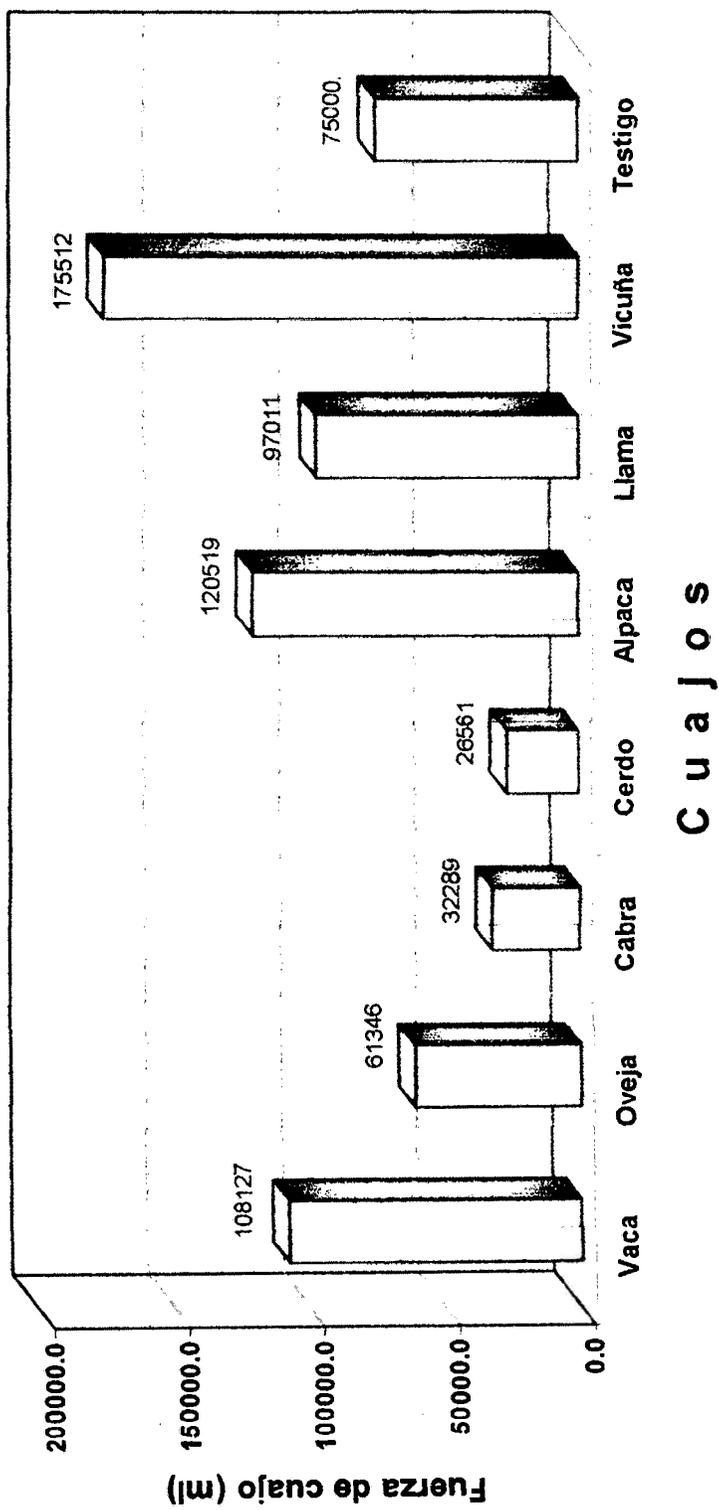
### **CUADRO III**

**DETERMINACIÓN DE FUERZA DE CUAJO  
(1g de cuajo puro)  
AYACUCHO – 2005.**

<b>Cuajo</b>	<b>Fuerza de Cuajo (ml) (*)</b>
Vaca	108127
Oveja	61346
Cabra	32289
Cerdo	26561
Alpaca	120519
Llama	97011
Vicuña	175512
Testigo(**)	75000

(\*) Cantidad de leche (en mililitros) que es coagulada por un gramo de cuajo.

(\*\*) El testigo comercial fue el cuajo animal de Chr. Hansen NATUREN® procede de la extracción del estómago de ternero (cuajares) o bovino.



**Figura 03.- Determinación de fuerza de cuajo Ayacucho - 2005.**

**CUADRO IV**  
**RECuento de *Staphylococcus aureus* EN EXTRACTO ENZIMÁTICO DE CUAJO AYACUCHO – 2005**

<b>Cuaajo</b>	<b>Recuento promedio (a) (UFC/ml)</b>	<b>Límites microbiológicos (b) (UFC/ml)</b>
<b>Vaca</b>	23 X 10 <sup>5</sup>	Ausencia
<b>Oveja</b>	65 X 10	Ausencia
<b>Cabra</b>	44 X 10 <sup>3</sup>	Ausencia
<b>Cerdo</b>	19 X 10 <sup>4</sup>	Ausencia
<b>Alpaca</b>	27 X 10 <sup>5</sup>	Ausencia
<b>Llama</b>	49 X 10	Ausencia
<b>Vicuña</b>	18 X 10 <sup>3</sup>	Ausencia

(a) Promedios en base a tres determinaciones.

(b) Valores según el código alimentario español

**CUADRO V**  
**RECuento de MESÓFILOS VIABLES EN EXTRACTO ENZIMÁTICO DE CUAJO. AYACUCHO – 2005**

Cuajo	Recuento promedio (a) (UFC/ml)	Límites microbiológicos (b) (UFC/ml)
Vaca	49 X 10 <sup>5</sup>	1 X 10 <sup>5</sup>
Oveja	82 X 10 <sup>4</sup>	1 X 10 <sup>5</sup>
Cabra	21 X 10 <sup>7</sup>	1 X 10 <sup>5</sup>
Cerdo	17 X 10 <sup>5</sup>	1 X 10 <sup>5</sup>
Alpaca	28 X 10 <sup>8</sup>	1 X 10 <sup>5</sup>
Llama	60 X 10 <sup>7</sup>	1 X 10 <sup>5</sup>
Vicuña	94 X 10 <sup>7</sup>	1 X 10 <sup>5</sup>

(a) Promedios en base a tres determinaciones.

(b) Valores según el código alimentario español.

**CUADRO VI**  
**NUMERACIÓN DE COLIFORMES FECALES EN EXTRACTO ENZIMÁTICO DE CUAJO. AYACUCHO – 2005.**

Cuajo	Numero mas probable (a) (NMP/ml)	Límites microbiológicos (b) (NMP/ml)
Vaca	75	<2
Oveja	< 3	<2
Cabra	93	<2
Cerdo	< 3	<2
Alpaca	< 3	<2
Llama	< 3	<2
Vicuña	64	<2

(a) Promedios en base a tres determinaciones.

(b) Valores según el código alimentario español

**CUADRO VII**  
**ANÁLISIS FÍSICO QUÍMICO DE LA LECHE .**

<b>Características</b>	<b>(a)</b>	<b>Requisitos Físico químicos (b)</b>
pH	6.76	
Densidad	1.024 g/cm <sup>3</sup>	Min. 1.026 g/cm <sup>3</sup> Max. 1.0340 g/cm <sup>3</sup>
% Acidez	0.225 g ac. Lac/100g	Min. 0.14 g ac. Lac/100g Max. 0.18 g ac. ac/100g
% Sólidos totales	9.695(g/100g)	Min 11.4 (g/100g)
% Proteínas	3.796 %	3.48 %

(a) Leche proveniente del Fundo Alpachaca.

(b) Norma oficial de la leche fuente NTP 2002.0001

## V. DISCUSIÓN.

El proceso de elaboración de quesos artesanalmente es una técnica de mucha antigüedad, son recientes las investigaciones hechas en uno de los factores importantes de este proceso, como es el cuajo. Más aún no se ha llevado a cabo estudios, en camélidos sudamericanos resultando un potencial de amplia investigación.

Los resultados presentados en el capítulo anterior corresponden a un total de 22 encuestados dedicados a la crianza de ganado y la actividad de elaborar quesos. Se recolectó un total de 21 cuajos puros de 7 diferentes especies, cada uno con 3 repeticiones. Tanto las encuestas y las muestras recolectadas fueron tomadas de los distritos de Paras, Sancos, Huamanquiya, Cangallo y Pampacangallo.

Las muestras fueron obtenidas de ganaderos dedicados a la crianza de vacas, ovejas, cabras, cerdos, alpacas y llamas, pero en caso de la vicuña, fue proporcionada por un ganadero alpaquero que compra dicho cuajo a cazadores tanto peruanos y bolivianos que los obtiene de las zonas alto andinas de Ayacucho y Huancavelica.

El cuajo obtenido para la elaboración de quesos, es de un animal tierno de pocos días de nacido, se ata los extremos del cuajo, para colgarlo y ponerlo a secar en ramas altas con suficiente aeración, o en la parte superior del fogón de una cocina a leña por espacio de un mes aproximadamente. El secado se realiza en la sombra siendo un detalle de gran importancia pues el cuajo es un medio que contiene enzimas y los rayos solares afectan su poder coagulante coincidiendo con Dubach y Sánchez.

Para la utilización del cuajo, este se remoja en suero y se macera por espacio de 4 días, y este sirve para hacer varias veces quesos frescos o quesillo típico citado también por Dubach. Con respecto al tiempo de utilización del cuajo no existe uniformidad ni proporción de uso; pero sí existe similitud en la elaboración del mismo. La cuajada es obtenida, inmediatamente después de ordeño, aprovechando el calor natural de la leche recién ordeñada citado también por Sánchez.

En el CUADRO I se observan los resultados de la concentración de proteína total soluble (PTS) en extracto enzimático de cuajo a  $A_{554}$  nm, reportando una mayor concentración de proteínas en las especies de camélidos sudamericanos; siendo la vicuña con 19.11 mg/ml la que presenta una mayor concentración, seguida de alpaca con 5.96 mg/ml y llama 4.45 mg/ml. En comparación con las demás especies de animales.

El cerdo fue la especie que presentó menor concentración de proteínas totales solubles, que fue de 0.16 mg/ml, lo cual se visualiza en la FIGURA 01. No se encontró referencias bibliográficas debido a que es un tema inédito.

Los camélidos sudamericanos, son rumiantes cuyo aparato digestivo presenta ventajas en el aprovechamiento del alimento sobre los otros rumiantes domésticos explotados en la zona, como los vacunos y ovinos.

Estos animales tienen una digestión más eficiente ya que la dieta es de calidad baja o mediana en proteínas. Esto implica que están bien adaptadas a los pastos altos andinos. Esta mayor eficiencia está relacionada con varias propiedades del estómago que son: el mayor tiempo de permanencia de la digesta en el tracto digestivo, la mayor frecuencia de contracciones del estómago, los ciclos de rumia, tamaño del estómago, finalmente estas peculiaridades permiten un mayor mezclado, digestión y absorción de la digesta. En la alimentación y nutrición de los Camélidos Sudamericanos es necesario tener en cuenta la total dependencia alimenticia de estos animales a los pastizales naturales, lo anterior significa que están adaptados al consumo de pastos estacionales, muy toscos, de baja calidad nutricional y de una relativa baja variedad y disponibilidad (Bustanza, 2001; Raggi, 1998).

En el CUADRO II, se reportan los resultados de la actividad proteolítica a  $A_{445}$  nm en extracto enzimático de cuajo, también se obtuvo una mayor actividad en los camélidos, siendo la vicuña con 2.106 U/mg la que obtuvo la mayor actividad seguida de alpaca 1.282 U/mg, vaca 1.257 U/mg, llama 0.9040 U/mg, oveja 0.439 U/mg, cabra 0.241 U/mg y el menor de cerdo con 0.013 U/mg. Dichos resultados se aprecian con mayor detalle en la FIGURA 02. Sobre la actividad proteolítica no existe normas las cuales nos permiten establecer límites, Luquett, 1993 nos señala los posibles factores que influyen sobre la actividad enzimática como: las elevadas temperaturas, los reactivos químicos fuertes, otras enzimas que pueden romper las proteínas y los metales pesados que se unen a proteínas estos pueden inactivar la actividad enzimática, un aumento de la temperatura acelera la velocidad y dado que el calor hace que las proteínas se coagulen y a temperaturas por encima de los 50°C la mayor parte de la actividad enzimática se destruye completamente citado por Luquett, 1993.

Los mecanismos que intervienen en la proteólisis de las caseínas nos permite una mejor identificación de los productos formados y de sus sustratos. La degradación tiene lugar sobre una importante fracción de la caseína, en ella interviene varios procesos enzimáticos en el transcurso de la proteólisis (Madrid, 1999).

En el CUADRO III, se presenta los valores de fuerza de cuajo, esta prueba nos permite determinar la cantidad en g o ml de leche que puede coagular 1 (g/ml) de cuajo a 35 ° C. Los resultados obtenidos nos muestra que el cuajo de vicuña tiene una fuerza de cuajo de 1/175512 ml, para alpaca tenemos 1/120519 ml, vaca 1/108127 ml, llama 1/97011 ml, oveja 1/61346 ml, cabra 1/32289 ml, y por último el cerdo con 1/ 26561 ml. Por tanto podemos decir que el cuajo de camélidos es de mayor poder coagulante, las otras pruebas bioquímicas realizadas, proteína total soluble y actividad proteolítica corroboran esta propiedad. Estos resultados se pueden visualizar en la FIGURA 03. Comparando con Veisseyre que refiere que los extractos líquidos tienen por lo general una fuerza de 1/10 000 y los cuajos en polvo alcanzan una fuerza de 1/ 100000 y aún mas elevada. Por lo tanto los datos obtenidos se encuentra conforme la referencia bibliográfica.

La formación del coágulo es el cambio del estado líquido al estado semisólido. En tanto que el tiempo de coagulación corresponde al tiempo transcurrido entre la adición de enzima coagulante y el comienzo de la floculación (Mahuat y col, 2003).

Con el fin de comparar la actividad coagulante de los distintos tipos de cuajo, se realiza la determinación de la fuerza de cuajo generalmente, las preparaciones enzimáticas se estandarizan a una fuerza determinada.

La medición de la fuerza de cuajo se realizó en forma indirecta tomando como dato experimental el tiempo cronométrico de inicio de la coagulación mediante el método visual, tomando como tiempo de coagulación el momento en que se forman los primeros flóculos, este método es sugerido por Veisseryre, 1980.

De acuerdo con Sánchez, 1971 para las personas que se dedican a la actividad de realizar quesos el mejor cuajo que existe y ha existido es el de la vicuña, por su gran poder de coagulación y el sabor agradable que proporciona a los quesos.

En el CUADRO IV, se reportan los resultados de recuento de *Staphilococcus aureus* en extracto enzimático de cuajo, se encontró un mayor carga microbiana en alpaca con  $27 \times 10^5$  UFC/ml; seguido de  $23 \times 10^5$  UFC/ml en vaca;  $44 \times 10^3$  UFC/ml en cabra;  $18 \times 10^3$  UFC/ml en vicuña,  $65 \times 10$  UFC/ml en oveja y por ultimo  $49 \times 10$  UFC/ml en llama. Realizando una comparación con valores del código alimentario español (Anexo 07) dice que debe haber ausencia de *Staphilococcus aureus*. Existe una mayor carga microbiana en la alpaca, pudiendo deberse a las pocas condiciones higiénico-sanitarias en la cuales son extraídas estos cuajos.

En el CUADRO V, se exponen los datos de recuento de mesófilos en extracto enzimático de cuajo, donde se halló una mayor carga microbiana que fue de  $28 \times 10^8$  UFC/ml en cuajo de alpaca seguida de;  $94 \times 10^7$  UFC/ml en cuajo de vicuña;  $60 \times 10^7$  UFC/ml en cuajo de llama;  $21 \times 10^7$  UFC/ml en cuajo

último  $82 \times 10^4$  UFC/ml en cuajo de oveja. Para mesófilos de acuerdo con los valores del Código alimentario español es de  $1 \times 10^5$  UFC/ml, evidenciando una falta de higiene.

En el CUADRO VI se exhiben los resultados de numeración de coliformes fecales en extracto enzimático, obteniendo un resultado máximo que es de 93 NMP en cabra, seguido de 75 NMP en vaca, 64 NMP en vicuña y valores similares de  $< 3$  NMP en oveja, cerdo, alpaca y llama. De acuerdo con los valores del código alimentario español el límite permisible deben ser  $< 2$  NMP/ml. Por tanto ningunas de las muestras se encuentran dentro de dichos límites, demostrando una contaminación del cuajo, por la falta de Buenas Practicas de Manipulación.

El análisis microbiológico de los cuajos frescos indica la presencia de carga microbiana, se justifica si consideramos la influencia de parámetros tales como características propias del animal, condiciones sanitarias del sacrificio del animal, grado de instrucción, condición socioeconómica.

En el CUADRO VII se presentan los resultados de la caracterización de la leche del fundo de Alpachaca utilizada en los ensayos teniendo los siguientes valores: pH 6.76; densidad 1.024; % Acidez 0.225; %sólidos totales 9.695, % proteínas 3.796. Estos resultados fueron comparados con la Norma Oficial de la Leche fuente Normas Técnicas Peruanas (NTP) 2002.0001 encontrándose fuera de las especificaciones requeridas (Anexo 06).

## VI. CONCLUSIONES

1. La obtención de un cuajo artesanal, tiene similares etapas de elaboración, sus parámetros son: tipos de cuajo: vicuña, alpaca, llama, vaca, oveja, cabra, cerdo; obtención del cuajo: cría con un máx. de 7 días; tiempo de secado del cuajo: promedio 1 mes conservación del cuajo seco: promedio 3 meses; uso: promedio 6 meses; cantidad de cuajo: relativo; tiempo de cuajado: 30 a 45 minutos; temperatura de cuajado 35 – 37 °C. Sin embargo en caso del mal llamado "cuajo de cerdo", se obtiene como cuajo la membrana interna que recubre al estómago
2. El cuajo de vicuña reportó una actividad enzimática 2.106 U/mg y una fuerza de cuajo 1/175512 ml, el cual reportó valores superiores en cambio el cuajo de cerdo reportó una actividad enzimática 0.013 U/mg y una fuerza de cuajo 1/26561 ml, siendo estos valores inferiores en comparación con los cuajos de alpaca, llama, vaca, oveja y cabra.
3. El análisis microbiológico de los cuajos de vicuña, alpaca, llama, vaca, oveja, cabra, y cerdo se reportaron valores superiores a los establecidos por el código alimentario español, por el cual pasa los estándares para *Staphylococcus aureus*, *Mesófilos* y *Coliformes fecales*; debido a la falta de higiene y Buenas Practicas de Manipulación.

## VII. RECOMENDACIONES

1. Realizar la caracterización de las enzimas existentes en los cuajos nativos.
2. Realizar un estudio sobre la calidad de cuajos de camélidos sudamericanos, especialmente en "vicuña".
3. Analizar la afinidad entre cuajos y leches de la misma especie.

### VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

1. ALAIS, CH. (1970). Ciencia de la Leche Principios de Técnica Lechera Edit. Continental. México.
2. AGULAR, S. (1992). Bromatología-Leche, Edit. Hemisferio Sur Argentina. Argentina.
3. AQUARONE, E.; DE ALMEIDA, U. e BORZANI, W. (1993). Biotecnología. Alimentos e Bebidas producidos por Fermentacao. Edit. Edgard Blucher Ltda. Sao Paulo – Brasil.
4. BIOTOL (1991). Biotechnological Innovations in Food Processing. Edit. Butterworth Heinemann Netherlands. Estados Unidos de América
5. BLANCO T. y ALVARADO, C. (2003). Alimentos – Bromatología Edit. Fundación Aji-No.Moto para el Desarrollo de la Comunidad Lima.
6. BONE, J. (1983). Fisiología y Anatomía Animal, Edit. El Manual Moderno. México.
7. BRUCHMAN, E. (1980). Bioquímica Técnica: Química Alimentaria, de las Fermentaciones Agrícolas, Edit. Acribia S.A. Zaragoza – España.
8. BUSTINZA, V. (2001). La Alpaca. Edit. Universidad Nacional del Altiplano Facultad de Medicina Veterinaria. Puno– Perú.

9. CASTEJON, F. FRAILE, A. y PONZ. F. (1979). Fundamentos de Fisiología Animal, Edit EUNSA, Ediciones Universidad de Navarra, Pamplona – España.
10. COÚLTATE, T. (1998). Manual de Química y Bioquímica de los Animales. Edit. Acribia S.A., 2da. Edic. Zaragoza – España.
11. CRUGER, W. (1993). Biotecnología: Manual de Microbiología Industrial. Edit. Acribia, S.A. Zaragoza - España.
12. CHURC, D. (1974). Fisiología Digestiva y Nutrición de los Rumiantes, Edit. Acribia, S.A. Zaragoza - España.
13. DUBACH, J. (1998). El "ABC" Para la Quesería Rural de los Andes, Edit. Quito – Ecuador. URL:[http://www.ecuarural.gov.ec/ecuagro/paginas/tec\\_agroind/QUESOS/quesos.htm](http://www.ecuarural.gov.ec/ecuagro/paginas/tec_agroind/QUESOS/quesos.htm).
14. DUBACH, J. (1973). Quesos Andinos del Perú, Ministerio de Agricultura Lima.
15. ESCOBAR, E. (1997). Elaboración de Quesos de Oveja y Cabra. Edit. Acribia, S.A. Zaragoza - España.
16. GARCÍA, M. QUINTERO, R. (1993). Biotecnología Alimentaria Edit. Limusa México.
17. GARCÍA, W. (2005). Manual del Técnico Alpaquero. Instituto Veterinario de Investigaciones Tropicales y de Altura (IVITA) de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima.
18. GASESA, P. (1990). Tecnología de las Enzimas, Edit Acribia, S.A. Zaragoza - España.
19. GOLDSTEIN, L. (1981). Fisiología Comparada, Edit. Nueva Editorial Interamericana. México.

20. GRIFFIN, N. (1970). *Animal Structure and Function*. Edit. Rinehart and Winston, 2da EDit. EUA.
21. JOHNSOM, W. y ALFARD, P. (1990). *Camélidos Sudamericanos*, FAO. Roma.
22. JUSCAMAITA, R. (1993). *Producción de Amilasas y Proteasas de *Aspergillus oryzae* ATCC20386 por Fermentación en Sustrato Sólido, para la Optimización de la Elaboración de Siyao de "tarwi" (*Lupinus mutabilis*)*. Tesis, UNSCH Fac. Cs. Bs. Ayacucho– Perú.
23. LEE, B. (1996). *Fundamentos de Biotecnología de los Alimentos*. Edit. Interamericana, Zaragoza – España.
24. LEÓN, E. y HERMOZA, E. (2003). *Guía Práctica de Bromatología*, Fac. Cs. Bs. UNSCH. Ayacucho – Perú.
25. LUQUET, F. (1993). *Leche y Productos Lácteos* Edit. Acribia S.A. Zaragoza- España.
26. MADRID, A. (1999). *Tecnología Quesera*. Edit. Mundi Prensa. Madrid.
27. MADRID, A (1996). *Curso de Industrias Lácteas*. Edit. Mundi Prensa. Madrid.
28. MAHUAT, M. JEANTET, R. y GERÁRD B. (2003). *Introducción a la Tecnología Quesera*. Edit. Acribia, S.A. Zaragoza – España.
29. MARTINEZ, E. (2003). *Bases Fisiológicas y Nutricionales de la Vaca – Ternero*. Universidad autónoma de Chile, Santiago de Chile.
30. MEYER, M. (1993). *Elaboración de Productos Lácteos*. Edit. Trillas. México.

31. WARD, O. (1991). Biotecnología de la Fermentación. Edit. Acribia, S. A. Zaragoza – España.
32. PALACIOS, G. (2005). Red de Información y Capacitación Agropecuaria. Perú. URL: <http://www.perulactea.com/pdf/perulactea/per0010.htm>.
33. PECK, H. (2001). Bioquímica Analítica Edit. Acribia S.A. Zaragoza – España.
34. PÉREZ, J (1996). Bioquímica y Microbiología de la Leche, Edit. Limusa, México.
35. RAGGI, L. (1998). Manejo de Camélidos y Fomento de su Producción. En: "Avances en Ciencias Veterinarias", Vol 13 (1): 3-15. Universidad de Chile FONDECYT. Chile.
36. RAMÍREZ, A. (1985). Ecología de las Zonas de Vida de la Provincia de Huamanga. Rev. Invest. Biol. UNSCH. Ayacucho – Perú VOL. I. Nº 1: 94 –123.
37. REFAI, M. (1981). Manuales para el Control de Calidad de los Alimentos. Edit FAO, Roma.
38. SALERMO, R. (2004). Enzima – Quimosina. Universidad Federal de Viosa. Brasil. URL. <http://www.ufv.br/dbg/trab2002/OUTROS/DVS002.htm>.
39. SALINAS, R. (1988). Alimento y Nutrición. Bromatología Aplicada a la Salud Edit. Ateneo. Buenos Aires.
40. SÁNCHEZ, B. (1971). La elaboración de quesos en el departamento de Ayacucho, Tesis - UNSCH. Fa. Cs. Agrá. Ayacucho – Perú.
41. SCHMIDT, N. (1983). Fisiología Animal. Ediciones Omega. Barcelona – España.

42. TORNADIJO, E. MARRA, A. y CARBALLO J, (1998). Alteración y Defectos de los Quesos, Facultad de Ciencias de Orense, Universidad de Vigo – España. En: "Revista Alimentación Equipos y Tecnología" Julio – Agosto, año XVII Nº 6, pag. 67 – 76.
43. VEISSERYRE, R. (1980). Lactología Técnica. Edit. Acribia, S.A. Zaragoza – España.
44. WALSTRA, P; GEURTS, T.; JELLMA, A. y VAN BOE, K. (2000). Ciencia de la Leche y Tecnología de los Productos Lácteos. Edit. Acribia S.A. Zaragoza – España.
45. WISEMAN, A. (1991). Biotecnología de Enzimas Edit. Acribia, S.A. Zaragoza – España.

URL1: [http://www .members.tripod.com.ve/tecnologia/queso.htm](http://www.members.tripod.com.ve/tecnologia/queso.htm).

URL2: <http://www.secnetpro.com/fepale/foro2/Enzimas%20Coagulantes%201.doc>.

URL3: <http://www.mychr-hansen.com/>.

URL4: [http://www.boe.es/g/es/bases\\_datos/doc.php?coleccion=iberlex&id=1988/01153](http://www.boe.es/g/es/bases_datos/doc.php?coleccion=iberlex&id=1988/01153).

# **ANEXOS**

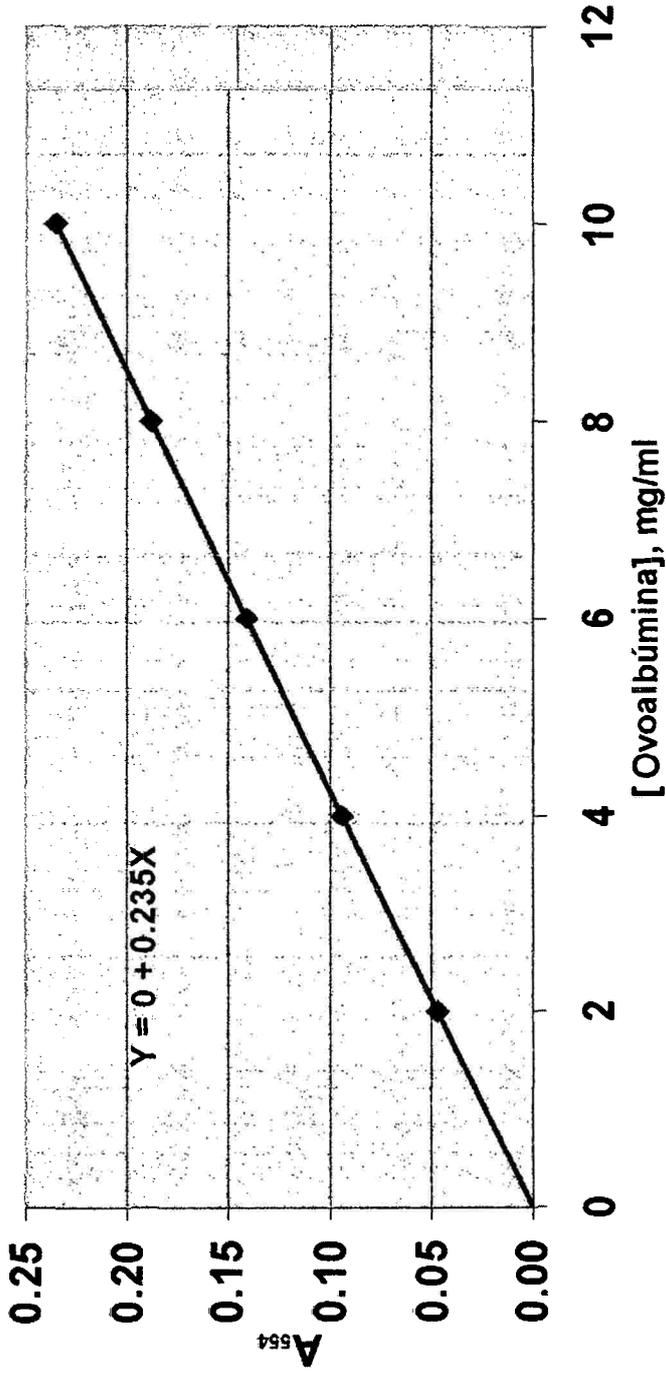
ANEXO 01

DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA TOTAL SOLUBLE EN EXTRACTO ENZIMÁTICO DE CUAJO.  
AYACUCHO – 2005.

Cuajo	Muestra	Peso Total de cuajo (g)	Dilución (ml)	A <sub>real</sub> (554 nm)	[PTS], mg/ml	[Extracto Enzimático] (g/ml)	Absorvancia (0.1g/ml de Extracto Enzimático)	[PTS] mg/ml (0.1g/ml de Extracto Enzimático)	A Promedios	Promedios de [PTS],mg/ml
Vaca	1	30.600	200	0.202	8.420	0.153	0.132	5.503	0.082	3.437
	2	77.070	200	0.211	8.890	0.385	0.055	2.307		
	3	68.150	200	0.204	8.520	0.341	0.060	2.500		
Oveja	1	33.050	50	0.095	2.790	0.661	0.014	0.422	0.037	1.571
	2	18.820	50	0.218	9.260	0.376	0.058	2.460		
	3	36.800	50	0.298	13.470	0.736	0.040	1.830		
Cabra	1	25.030	100	0.105	3.310	0.250	0.042	1.322	0.038	1.225
	2	27.250	100	0.092	2.630	0.273	0.034	0.965		
	3	35.260	100	0.135	4.890	0.353	0.038	1.387		
Cerdo	1	107.500	250	0.051	0.470	0.430	0.012	0.109	0.016	0.165
	2	51.700	250	0.054	0.630	0.207	0.026	0.305		
	3	129.600	250	0.05	0.420	0.518	0.010	0.081		
Alpaca	1	15.730	150	0.097	2.890	0.105	0.092	2.756	0.152	5.665
	2	23.740	150	0.192	7.890	0.158	0.121	4.985		
	3	12.750	150	0.206	8.630	0.085	0.242	10.153		
Llama	1	32.630	150	0.145	5.420	0.218	0.067	2.492	0.108	4.451
	2	9.630	150	0.164	0.096	2.840	0.146	0.066		
	3	21.840	150	0.096	2.840	0.146	0.066	1.951		
Vicuña	1	12.210	50	0.512	77.380	0.244	0.210	31.687	0.251	19.109
	2	8.020	50	0.368	17.160	0.160	0.229	10.698		
	3	7.010	50	0.44	20.950	0.140	0.314	14.943		

Fuente: Elaboración propia.

**ANEXO 02.- Curva Estándar para la Determinación de Proteína Total Soluble (PTS)**



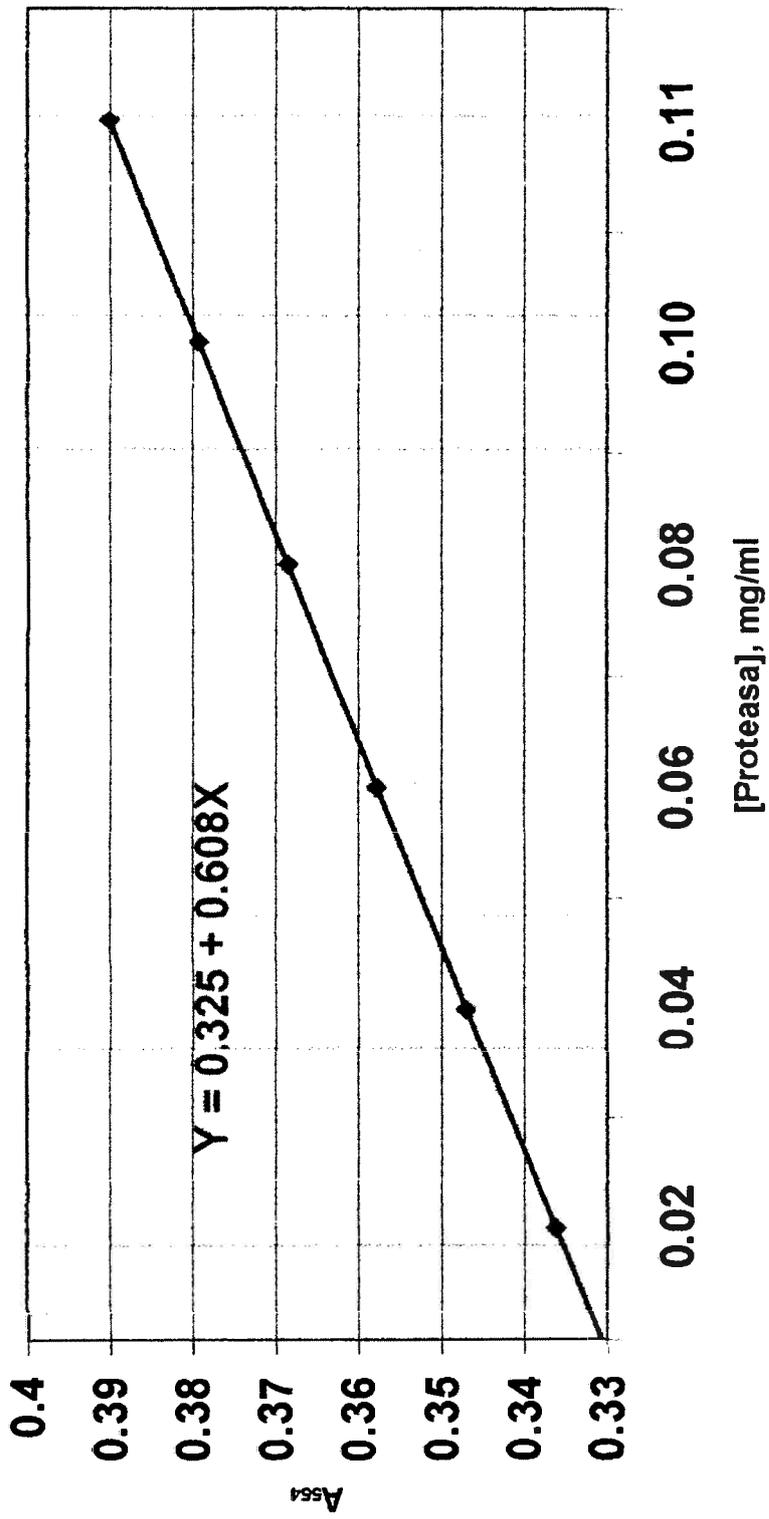
ANEXO 03

DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA EN EXTRACTO ENZIMÁTICO DE CUAJO.  
AYACUCHO – 2005.

Cuajo	Muestra	Peso Total de cuajo (g)	Dilución (ml)	A <sub>Real</sub> (445nm)	Actividad Enzimática (U/ml)	[Extracto Enzimático] (g/ml)	Absorvancia (0.1g/ml de Extracto Enzimático)	Actividad Enzimática (0.1gr/ml de Extracto Enzimático)	A <sub>Promedio</sub> (445nm)	Promedio Actividad Enzimática (U/ml)
Vaca	1	30.600	200	2.641	2.565	0.153	1.726	1.676	1.026	1.257
	2	77.070	200	2.238	3.788	0.385	0.581	0.983		
	3	68.150	200	2.632	3.782	0.341	0.772	1.113		
Oveja	1	33.050	50	1.512	1.952	0.661	0.229	0.295	0.327	0.439
	2	18.820	50	1.998	2.750	0.376	0.531	0.731		
	3	36.800	50	1.627	2.141	0.736	0.221	0.291		
Cabra	1	25.030	100	0.709	0.632	0.250	0.283	0.252	0.260	0.241
	2	27.250	100	0.652	0.538	0.273	0.239	0.197		
	3	35.250	100	0.911	0.964	0.353	0.258	0.273		
Cerdo	1	107.500	250	0.382	0.094	0.430	0.089	0.022	0.106	0.013
	2	51.700	250	0.336	0.019	0.207	0.162	0.009		
	3	129.600	250	0.350	0.042	0.518	0.068	0.008		
Alpaca	1	15.750	150	1.396	1.597	0.105	1.331	1.522	1.144	1.282
	2	23.740	150	1.328	1.649	0.158	0.839	1.042		
	3	12.750	150	1.073	1.090	0.085	1.262	1.283		
Llama	1	32.650	150	0.934	1.002	0.218	0.429	0.460	0.865	0.940
	2	9.630	150	1.006	1.120	0.064	1.567	1.744		
	3	21.840	150	0.871	0.898	0.146	0.598	0.617		
Vicuña	1	12.210	50	2.118	2.948	0.244	0.867	1.207	1.470	2.106
	2	8.020	50	2.598	3.736	0.160	1.620	2.329		
	3	7.010	50	2.698	3.901	0.140	1.924	2.782		

Fuente: Elaboración propia

ANEXO 04.- Curva Estándar para la Determinación de la Actividad Proteolítica



ANEXO 05

DETERMINACIÓN DE FUERZA DE CUAJO. AYACUCHO – 2005.  
(1 g de Cuajo puro)

Cuajo	Muestra	Peso Total de cuajo (g)	Dilución (ml)	[Extracto Enzimático], (g/ml)	Tiempo de coagulación (seg)	Gramos de cuajo en 0.1 ml de E.E. (g)	Tiempo (1 g de cuajo)	F	F promedio
	1	30.6	200	0.153	71	0.0153	4640.5	51718.31	108126.7
	2	77.07	200	0.385	60	0.0385	1557.0	154140.00	
	3	68.15	200	0.341	69	0.0341	2024.9	118521.74	
Vaca	1	33.05	50	0.661	250	0.0661	3782.1	63456.00	61346.3
	2	18.82	50	0.376	280	0.0376	7438.9	32262.86	
	3	36.8	50	0.736	200	0.0736	2717.4	88320.00	
Oveja	1	25.03	100	0.250	218	0.0250	8709.5	27555.96	32289.4
	2	27.25	100	0.273	235	0.0273	8623.9	27829.79	
	3	35.26	100	0.353	204	0.0353	5785.6	41482.35	
Cabra	1	107.5	250	0.430	378	0.0430	8790.7	27301.59	26560.6
	2	51.7	250	0.207	455	0.0207	22001.9	10908.13	
	3	129.6	250	0.518	300	0.0518	5787.0	41472.00	
Cerdo	1	15.73	150	0.105	29	0.0105	2765.4	86786.21	120519.5
	2	23.74	150	0.158	18	0.0158	1137.3	211022.22	
	3	12.75	150	0.085	32	0.0085	3764.7	63750.00	
Alpaca	1	32.63	150	0.218	40	0.0218	1838.8	130520.00	97011.0
	2	9.63	100	0.193	57	0.0193	2959.5	81094.74	
	3	21.84	100	0.146	44	0.0146	3022.0	79418.18	
Llama	1	12.21	50	0.244	21	0.0244	860.0	279085.71	175512.1
	2	8.02	00	0.160	25	0.0160	1558.6	153984.00	
	3	7.01	00	0.140	36	0.0140	2567.8	93466.67	
Testigo	Hansen	1.31							75000

Nota.- En condiciones de laboratorio se trabajo con 0.1 ml de E. E de cuajo con 10 ml de leche Fuente: Elaboración propia

Como se aprecia en el cuadro anterior las leches difieren ampliamente en su composición de acuerdo a especie de la que proviene: la humana es más rica en hidratos de carbono y más pobre en proteínas; la de oveja, búfalo y rena son las más ricas en energía debido a su alto contenido de grasas y proteínas.

En la actualidad, el hombre utiliza para alimentarse en gran escala, un sucedáneo de la leche materna de su propia especie, la leche de vaca. Las razas vacunas que hemos creado, más difundidas en el mundo destinadas a la producción lechera, pertenecen a la especie *Bos Taurus*: Jersey, Brown Swiss, Holstein, Simmental, Normanda, etc.; sin embargo son también importantes las razas descendientes del *Bos Indicus* provenientes de la India y del norte de África adaptadas a los climas tropicales: Nelore, Guserat, Gyr, Brama y sus cruces, y *Bubalus Bubalis* o búfalo de agua.

### COMPOSICIÓN MÉDIA REPRESENTATIVA DE LA LECHE DE VACA DE LAS RAZAS MÁS COMUNES EN EL PERÚ

Raza	Agua	Grasa	Proteínas	Lactosa	Cenizas	Sólidos totales
Jersey	85.47	5.05	3.78	5.00	0.70	14.53
Brown Swiss	86.87	3.85	3.48	5.08	0.72	13.13
Holstein	87.72	3.41	3.32	4.87	0.68	12.28

Fuente: O.R. Fennema.

### INFLUENCIA DE ALIMENTACIÓN SOBRE LA COMPOSICIÓN DE LA LECHE

Dieta	Grasa	Proteína	S. Totales
Maximizar CTA	>	+0.21.63	>
> frecuencia de alimentos (concentrado)	+0.2-0.3	>ligero	>
> 40 % C NE	-1 ó +	+0.1-0.2	<
< de 26 % FND	-1 ó más	+0.2-0..3	<
Pequeño tamaño de partícula	1 ó más	+0.2-0..3	<
Exceso de fibra	ligero	0.1-0.4	<
Exceso de proteína bruta	-----	poco efecto	--

Fuente: Dr. S. Miralles de la Torre, CTA Consumo total de alimentos, CNE Carbohidatos no estructurales, FND Fibra neutro detergente

La leche se define caracterizándola en lo que denominamos normas:

### NORMA OFICIAL DE LA LECHE

Tengamos en cuenta algunas definiciones, según la última Norma Oficial Peruana vigente del 2003:

**Leche:** es el producto íntegro de la secreción mamaria normal sin adición ni sustracción alguna y que ha sido obtenida mediante el ordeño.

**Leche cruda entera:** es el producto íntegro no alterado ni adulterado del ordeño higiénico, regular y completo de vacas sanas y bien alimentadas, sin calostro y exento de color, olor, sabor y consistencia anormales y que no ha sido sometido a procesamiento o tratamiento alguno.

## REQUISITOS FISICOS Y QUIMICOS DE LA LECHE DE VACA

Materia Grasa (g/100g)	Min. 3.2
Sólidos no graso (g/100g)	Min. 8.2
Sólidos totales (g/100g)	Min. 11.4
Impurezas macroscópicas, expresadas en mg de impurezas por 500 cm <sup>3</sup> de leche	Max. 0.5 mg (grado 2)
Acidez, expresada en g de ácido láctico por 100 g de leche	Min. 0.14 % Máx. 0.18 %
Densidad a 20° C (g/cm <sup>3</sup> )	Min. 1.0296 Máx. 1.0340
Índice de refracción del suero, 20°C (Lectura refractométrica 37.5)	Min. 1.34179
Ceniza total (g/100g)	Máx. 0.7
Alcalinidad de la ceniza total mi HCL 0.1 N/100 g	Máx. 0.7 cm <sup>3</sup>
Índice crioscópico	Máx. -0.540°C
Sustancias conservadoras y cualquier otra sustancia extraña a su naturaleza	Ausencia
Prueba de alcohol (74% V/V Mínimo)	No cuagulable
Tratamiento que disminuye o modifique sus componentes originales	Ninguno
Prueba de la reductasa con azul de metileno	Min. 4h

## REQUISITOS MICROBIOLÓGICOS

Conteo de células somáticas	Máx. 500,000 unidades por ml
Numeración de microorganismos mesófilos, serobios y facultativos viables, por ml.	Máx. 1,000,000 ufc
Numeración de coliformes, por ml	Máx. 1,000 ufc

Fuente: NTP 2002.001

Otras definiciones según la norma precedente ITINTEC 202.085, 1991-03-12:

**Leche pasteurizada:** es aquella que ha sido sometida a un tratamiento térmico específico y por un tiempo determinado, para lograr la destrucción total de los organismos patógenos que pueda contener, sin alterar en forma considerable su composición, sabor ni valor alimenticio.

**Leche ultra pasteurizada:** es la que ha sido sometida a un proceso rápido de alta temperatura, sin causar modificaciones considerables, en su composición, sabor, ni valor alimenticio, obteniéndose un producto comercialmente estéril.

**Leche Higienizada:** es aquella considerada como Leche, Leche cruda y Leche íntegra o entera que ha sido sometida a uno de los procesos de Leche pasteurizada, Leche ultra pasteurizada y Esterilización comercial.

**Leche homogenizada:** es aquella que ha sido procesada de manera tal, que los glóbulos grasos han sido fragmentados a tal grado que después de 48 horas de mantener la leche en reposo, no ocurre ninguna separación visible de la crema.

## ANEXO 07

### NORMA GENERAL DE IDENTIDAD Y PUREZA PARA EL CUAJO Y OTRAS ENZIMAS COAGULANTES DE LECHE DESTINADOS AL MERCADO INTERIOR.

#### 1. Nombre de la Norma:

Norma general de identidad y pureza para el cuajo y otras enzimas coagulantes de la leche.

#### 2. Objeto de la norma:

Esta norma tiene por objeto definir las condiciones y características que deben reunir el cuajo y otras enzimas coagulantes de leche para su comercialización

#### 3.Ámbito de aplicación:

La presente norma se aplica al cuajo y a otras enzimas coagulantes de leche destinados a su comercialización en el mercado interior.

#### 4. Definiciones:

4.1. Enzimas coagulantes de la leche son las de origen animal, vegetal o microbiano y sus mezclas capaces de provocar el desdoblamiento de la molécula de caseína, bajo las condiciones tecnológicas habituales en el proceso al que van destinados.

Se clasifican en:

4.1.1. **CUAJO:** Es el producto líquido, pastoso o sólido, cuyo componente activo está constituido por la mezcla de las enzimas obtenidas por extracción de los cuajares de rumiantes exclusivamente.

4.1.2. **COAGULANTE DE LA LECHE:** Es el producto líquido, pastoso o sólido, cuyo componente activo está constituido por otra(s) enzima(s) diferente(s) de los incluidos en 4.1.1.

4.2. **TÍTULO:** Es la indicación de la actividad coagulante (AC) de las enzimas presentes, expresadas en unidades de coagulación (UC) de acuerdo con el método y técnica FIL 110.

#### 5. Denominaciones:

5.1. Se denominará "Extracto de cuajo" a aquellas preparaciones que, ajustándose a lo definido en 4.1.1, presentan una actividad coagulante (AC), debido a quimosina, igual o mayor al 75% de la actividad coagulante (AC) total.

5.2. Se denominará "Cuajo" a aquellas preparaciones que, ajustándose a lo definido en 4.1.1, presenten una actividad coagulante (AC), debido a quimosina, entre un 75 y un 25% de la actividad coagulante (AC) total.

5.3. Se denominará "Cuajo bovino" a aquellas preparaciones que, ajustándose a lo definido en 4.1.1, presenten una actividad coagulante (AC), debido a quimosina, igual o menor al 25% de la actividad coagulante (AC) total.

5.4. Se denominará "Coagulante de leche" a cualquier otra preparación que, cumpliendo la presente norma, se ajuste a lo dispuesto en 4.1.2. La palabra "coagulante de la leche" Deberá ir seguida por las expresiones "animal", "vegetal", o "microbiano", de conformidad con el o los orígenes de las enzimas que contengan la preparación.

Debajo se indicará:

- La especie, en el caso de origen animal.
- El género y la especie, en el caso de origen vegetal.
- El género y la especie, en el caso de origen microbiano.

5.5. En todos los casos la denominación deberá incluir el Título expresado de acuerdo con la definición que figura en 4.2, admitiéndose una tolerancia intrínseca al método empleado de +/- 15%.

#### 6. Factores esenciales de composición y calidad:

##### 6.1. Ingredientes esenciales:

- Quimosina, pepsina bovina y otras enzimas coagulantes de leche.
- Cloruro Sódico en dosis máximas de 20% p/v en los líquidos, en los pastosos y sólidos, BPF.

##### 6.2 .Características físico-químicas:

Humedad máxima del 6% en el caso de productos sólidos.

#### 7. Aditivos autorizados:

Las siguientes estipulaciones relativas a los aditivos y sus especificaciones han sido sancionadas por la Subsecretaría del Ministerio de Sanidad y Consumo. Este Ministerio, previo informe de la Comisión Interministerial para la ordenación Alimentaria, podrá modificar en cualquier momento, mediante la correspondiente Orden, la presente relación de aditivos, en caso de que posteriores conocimientos científicos o técnicos lo aconsejen y para mantener su adecuación a la normativa CEE, siendo permanentemente revisable por razones de salud pública.

##### 7.1. Conservadores:

ADITIVOS	DOSIS MÁXIMA EN PRODUCTO TERMINADO
E-200 ÁCIDO SORBICO	0'5 % m/m SÓLOS O EN CONJUNTO, EXPRESADO EN ÁCIDO SORBICO.
E-201 SORBATO SÓDICO	
E-202 SORBATO POTÁSICO	
E- 203 SORBATO CÁLCICO	
E-210 ÁCIDO BENZOICO	
E-211 BENZOATO SÓDICO	
E-212 BENZOATO POTÁSICO	

E-213 BENZOATO CÁLCICO	1 % m/m SÓLOS O EN CONJUNTO, EXPRESADOS EN ÁCIDO BENZOICO.
E-214 PARAHIDROXI BENZOATO DE ETILO	
E-215 DERIVADO SÓDICO DEL ESTER ETÍLICO DEL ÁCIDO PARAHIDROXI BENZOICO.	
ADITIVOS	DÓSIS MÁXIMA EN PRODUCTO TERMINADO
E-216 PARAHIDROXI BENZOATO DE PROPILOS	1 % m/m SÓLOS O EN CONJUNTO, EXPRESADOS EN ÁCIDO BENZOICO.
E-217 DERIVADO SÓDICO DEL ESTER PROPÍLICO DEL ÁCIDO PARAHIDROXI BENZOICO	
E-218 PARAHIDROXI BENZOATO DE METILO	
E- DERIVADO SÓDICO DEL ESTER METÍLICO DEL ÁCIDO PARAHIDROXI BENZOICO.	

## 7.2 Colorantes:

E-150 Caramelo (Excepto el obtenido mediante el tratamiento con amoníaco y sales amónicas), BPF para obtener la normalización del producto.

En la elaboración de productos donde se utilicen cuajos se aplicará el principio de transferencia, de acuerdo con lo dispuesto en el artículo 2º del Real Decreto 3177/1983, de 16 de noviembre, por el que se aprueba el Reglamento Técnico-Sanitario de aditivos alimentarios.

## 7.3 Agentes Aromáticos:

Pueden utilizarse ACEITES ESENCIALES, siendo la dosis máxima con respecto al producto terminado las BPF (Buenas Prácticas de Fabricación).

7.4 En la elaboración de los productos en los que se utilicen cuajos y otras enzimas coagulantes de leche se aplicará el principio de transferencia, en particular de aquellos aditivos no contemplados en las listas positivas de las normas específicas de

acuerdo con el artículo 2º del Real Decreto 3177/1983 de 16 de noviembre, por el que se aprueba el Reglamento Técnico-Sanitario de aditivos alimentarios.

## 8. Norma microbiológica y contaminantes:

Los siguientes niveles de contaminación relativos a la higiene alimentaria de estos productos han sido sancionados por la Subsecretaría de Sanidad y Consumo. Este Ministerio, previo informe de la Comisión Interministerial para la Ordenación Alimentaria, podrá modificar en cualquier momento la presente relación de contaminantes, mediante la correspondiente Orden, atendiendo a razones de salud pública.

### 8.1. Norma microbiológica:

Los productos contemplados en la presente norma, deberán estar exentos de microorganismos o toxinas peligrosas para la salud pública y satisfacer a la siguiente norma microbiológica expresada en colonias por mL o g. según sea el producto líquido o de otra forma física, respectivamente.

DETERMINACIONES (UNIDADES)	RESULTADO
• Enterobacterias	1.10 u.f.c./gr.
• Gérmenes aerobios mesófilos	1. 10 <sup>5</sup> u.f.c. /gr
• Staphylococcus aureus enterotoxigénico	Ausencia/gr.
• Clostridium sulfito reductores	Máximo 1/gr.
• <i>Escherichia coli</i> .	< 2
• Mohos y levaduras	Máximo 10/gr.
• <i>Salmonella /Shigella</i>	Ausencia en 25 gr.

### 8.2 Contaminantes:

Las tolerancias de productos contaminantes y sustancias tóxicas, no deberán sobrepasar los límites contenidos en la legislación vigente y, en defecto, en las normas internacionales aceptadas por el Estado español, que velará por su cumplimiento como garante de las mismas, con la determinación y exigencia de responsabilidades en ese punto por el órgano del Estado correspondiente.

## 9. Prohibiciones:

Queda expresamente prohibido:

9.1. Que el contenido en calcio iónico sea superior a 1.000 ppm.

9.2. La adición de cualquier producto que falsee su composición enzimática y/o su poder coagulante.

9.3. La comercialización y uso de cualquier producto que se destine a los mismos fines y no se ajuste a la presente norma.

9.4. La tendencia por la industria de aditivos alimentarios no autorizados para alguno de los productos que elabore dicha industria.

## 10. Higiene:

10.1. El fabricante se responsabilizará de los controles de las materias primas y aditivos empleados en la fabricación de cuajos y coagulantes conforme a lo dispuesto en el apartado 4.5.1 del Real Decreto 3177/1983 de 16 de noviembre, por el que se aprueba la Reglamentación Técnico-Sanitaria de aditivos alimentarios.

10.2. El fabricante se responsabilizará de los controles higiénico-sanitarios necesarios en el proceso de fabricación, para que resulte un producto acabado que cumple lo exigido en la presente norma.

## 11. Envasado:

11.1. El material empleado para los envases podrán ser metálico, de vidrio, o de tipo macromolecular, pero siempre debe encontrarse entre los autorizados para este fin por el Ministerio de Sanidad y Consumo.

11.2. Los productos se presentarán para su comercialización en recipientes íntegros, en perfectas condiciones de higiene y limpieza, cerrados herméticamente, y con un sistema de precinto que garantice al usuario la no manipulación del producto con posterioridad a su fabricación.

11.3. Los envases no podrán ser recuperables.

## 12. Etiquetado:

En el etiquetado de los envases de los cuajos y otras enzimas coagulantes de la leche dispuestos para su comercialización deberán figurar, expresados al menos, en la lengua española oficial del Estado, los datos que figuren en los apartados 8.3.1 y 8.3.2 del artículo 8 del Real Decreto 3177/1983 de 16 de noviembre, por el que se aprueba el Reglamento Técnico Sanitario de Aditivos Alimentarios, con excepción de lo dispuesto en los apartados 8.3.1.1, 8.3.1.2, 8.3.1.7, 8.3.1.8, 8.3.2.1, 8.3.2.2, 8.3.2.7 y 8.3.2.8, que se sustituirán por lo siguiente:

- Denominación del producto se efectuará de conformidad con lo dispuesto con el apartado 5 de la presente disposición.
- Composición cualitativa irá precedida del Título "Ingredientes" y se mencionarán todos por orden decreciente de sus pesos en el momento de su incorporación al proceso de fabricación.

Para el caso de los cuajos, en esta lista, cada enzima irá seguida del porcentaje que indique su actividad coagulante con respecto a la total de la preparación.

En el caso de utilizar aditivos será necesaria la designación del grupo genérico y del norme específico correspondiente. Dicho nombre específico podrá sustituirse por su norma de identificación.

- Identificación de la Empresa: Se hará constar el norme o la razón social o la denominación del fabricante, envasador o vendedor, establecido en la Comunidad Económica Europea y, en todo caso, su domicilio.

Cuando la comercialización de cuajos o coagulantes se realice bajo marca de un distribuidor, además de figurar su nombre, razón social o denominación y domicilio, se incluirán los de la industria elaboradora o su número de Registro Sanitario, precedido por la expresión..... "Fabricado por...".

- País de Origen: Los productos importados, además de cumplir lo establecido en este apartado, excepto la identificación del lote de fabricación, deberán hacer constar en su etiquetado el país de origen, salvo los procedentes de países pertenecientes a la Comunidad Económica Europea.

### **13. Especificaciones:**

Los productos alimenticios que se elaboren con destino exclusivo para su exportación y no cumplan las disposiciones vigentes para su comercialización en el mercado interior, deberán estar envasados y etiquetados de forma que se identifiquen como tales, inequívocamente, para evitar su consumo en el mercado nacional.

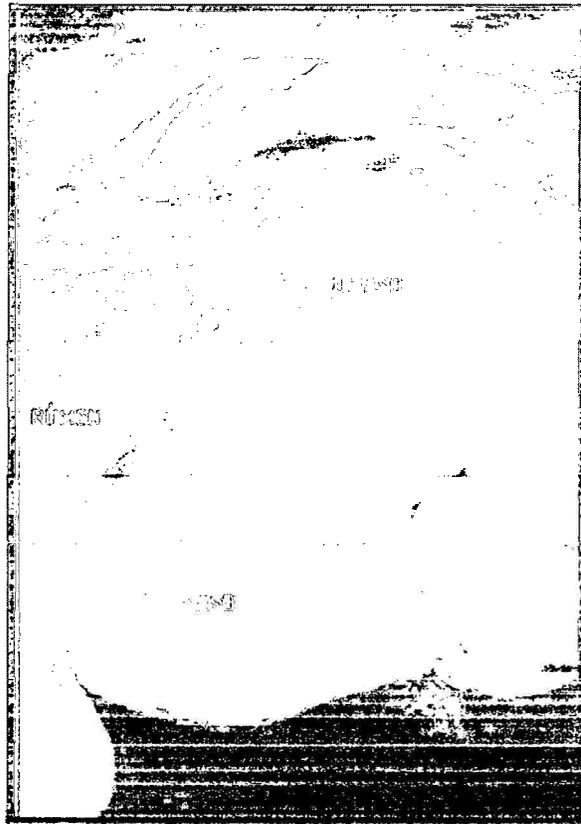
### **14 Responsabilidades:**

14.1 La Responsabilidad inherente a la identidad del producto contenido en envases no abiertos e íntegros corresponde al fabricante elaborado o importador en su caso.

14.2 La responsabilidad inherente a la identidad de los productos contenidos en envases abiertos corresponde al tenedor de los mismos.

14.3 Asimismo, corresponde al tenedor del producto la responsabilidad inherente a la mala conservación del mismo, estén en envases abiertos o no.

ANEXO 08



(FOTO 01) Sistema digestivo de ruminante



(FOTO 02) Ubicación del abomaso

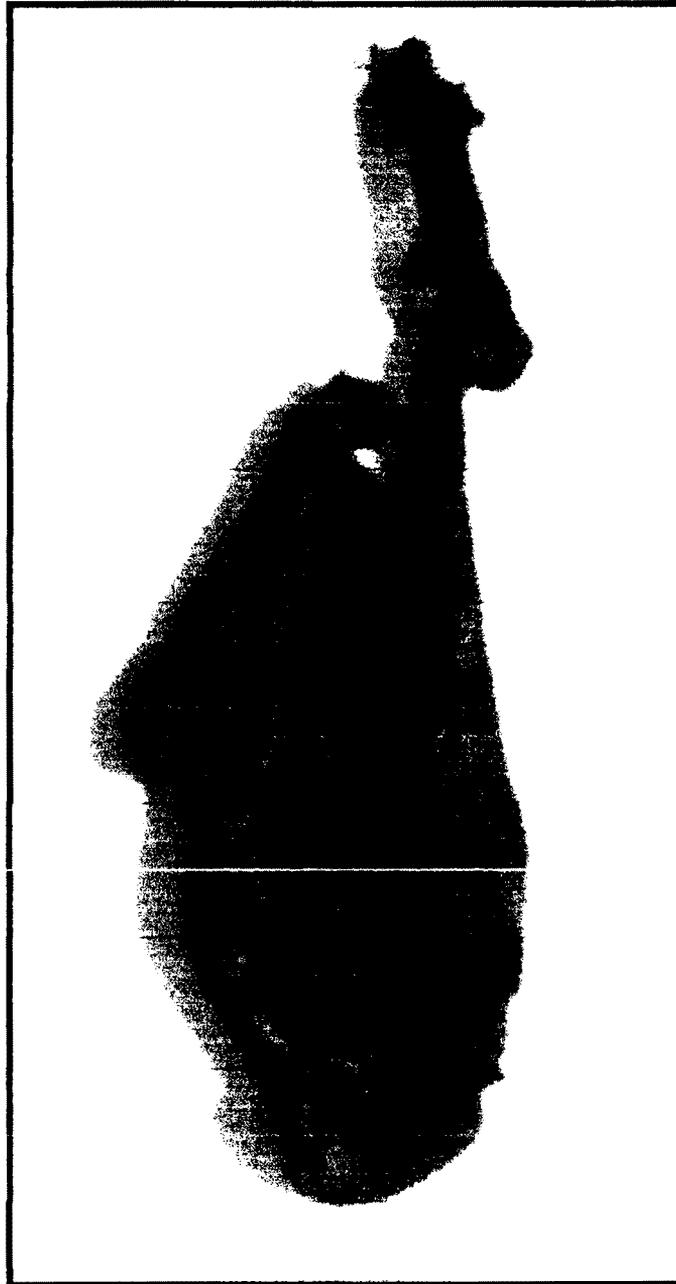
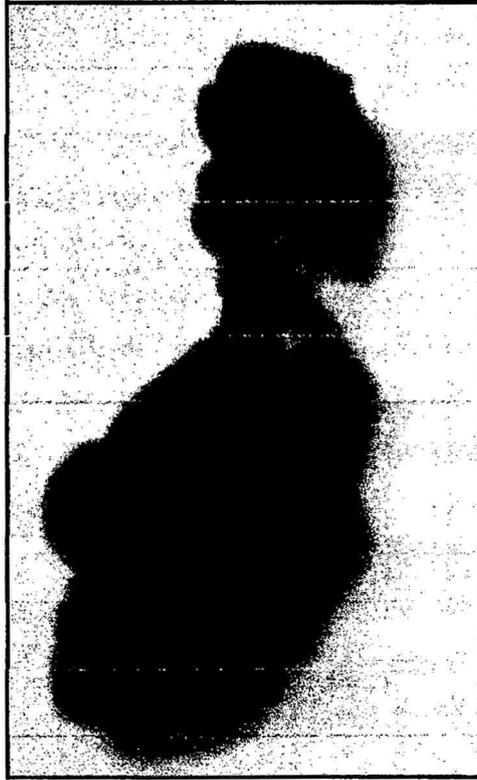
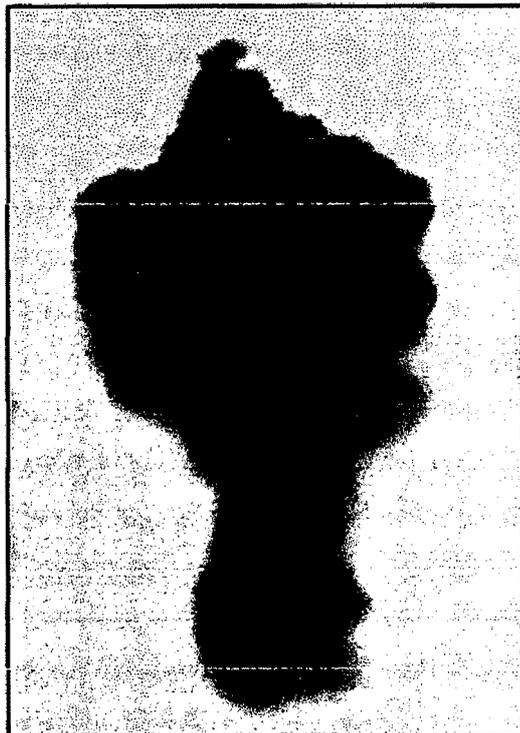


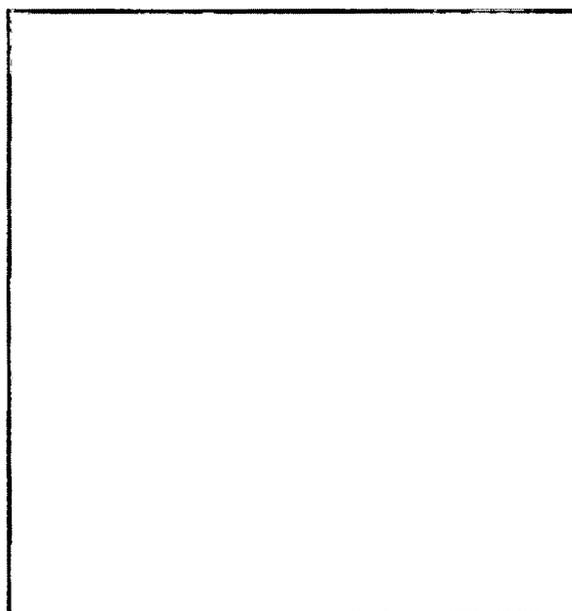
FOTO 03 Cuajo seco de vaca



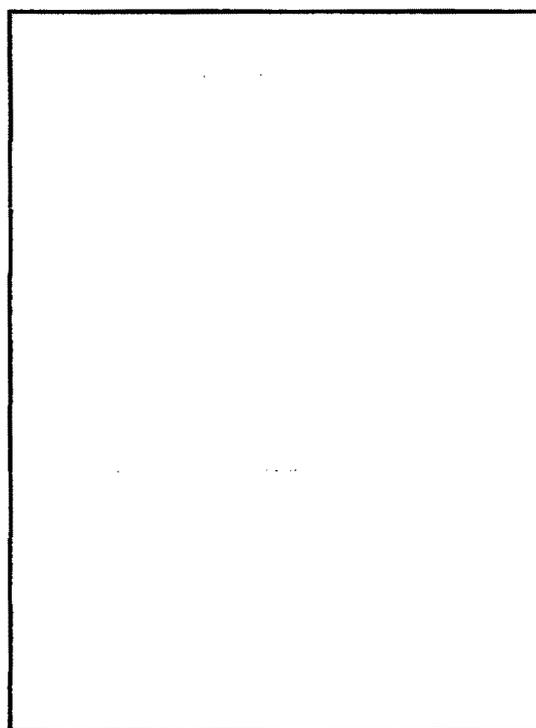
**FOTO 04.- Cuajo seco de oveja**



**FOTO 05 Cuajo seco de cabra**



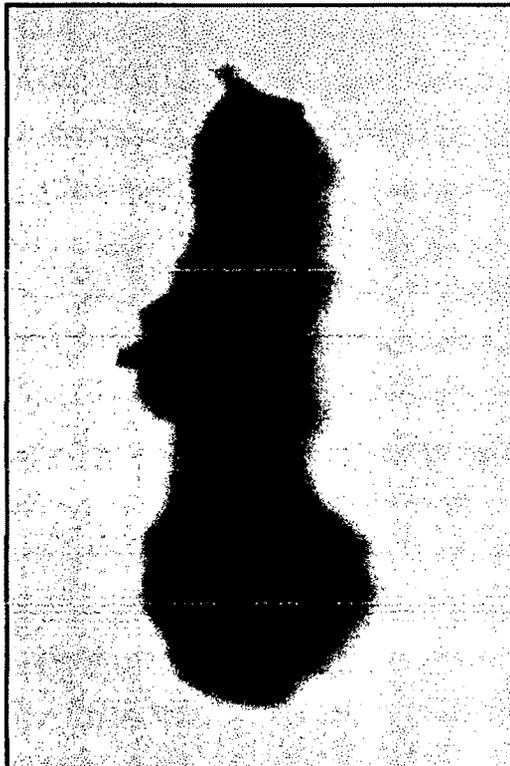
**FOTO 06.- Cuajo seco de cerdo**



**FOTO 07.- Cuajo seco de vicuña**



**FOTO 08.- Cuajo seco de alpaca**



**FOTO 09.- Cuajo seco de llama**

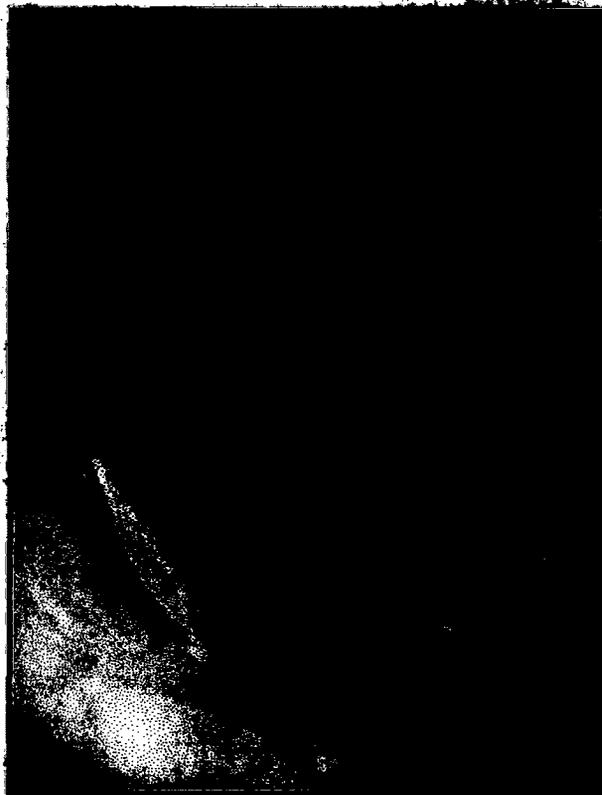


FOTO 10.- Cuajo artesanal



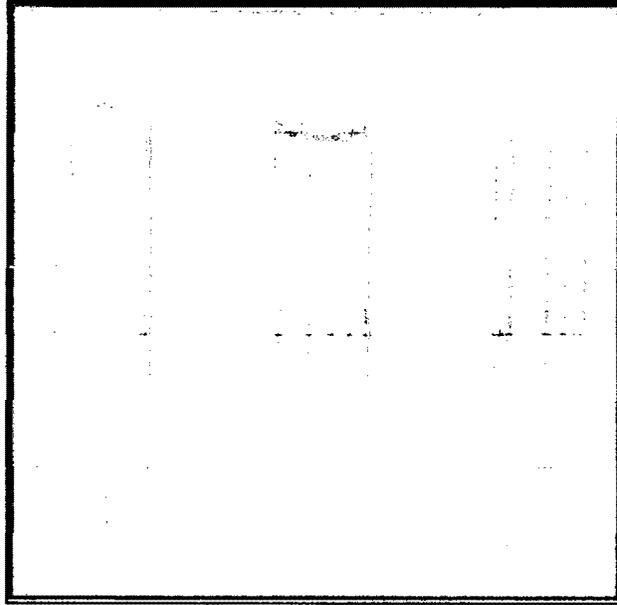
FOTO 11.- Limpieza de cuajo seco



**FOTO 12.- Corte del cuajo en trozos**



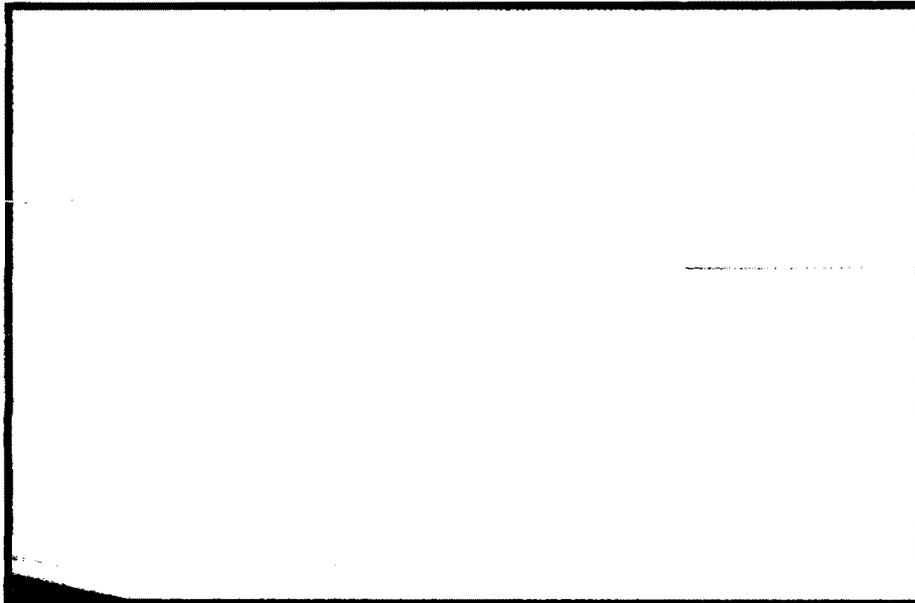
**FOTO 13.- Extracto enzimático**



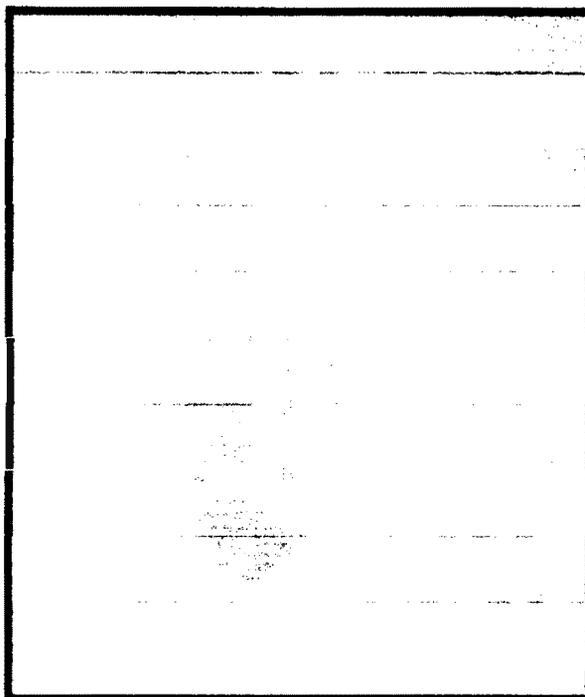
**FOTO 14.- Determinación de Proteína Total Soluble**



**FOTO 15.- Determinación de fuerza de cuajo**



**FOTO 16.- Formación del cuajado**



**FOTO 17.- Determinación del Tiempo de coagulación**

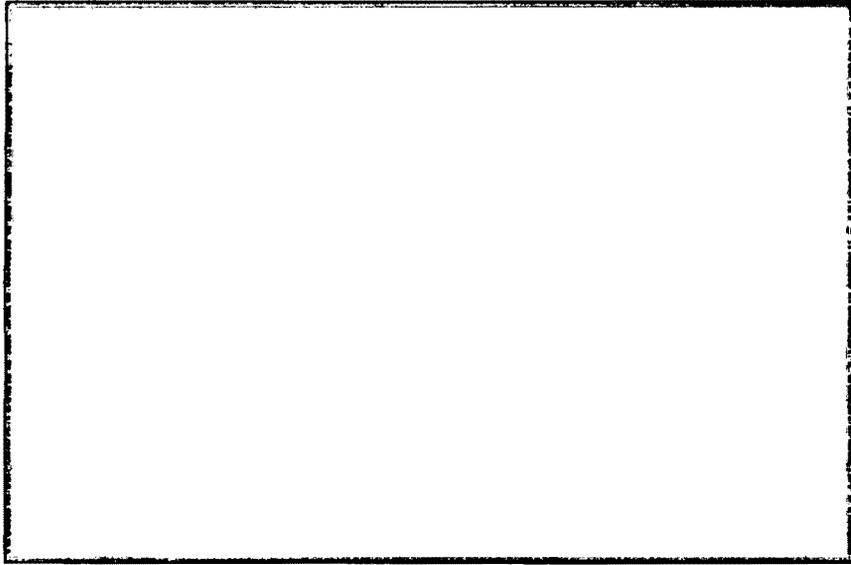


FOTO 18.- Formación de flóculos

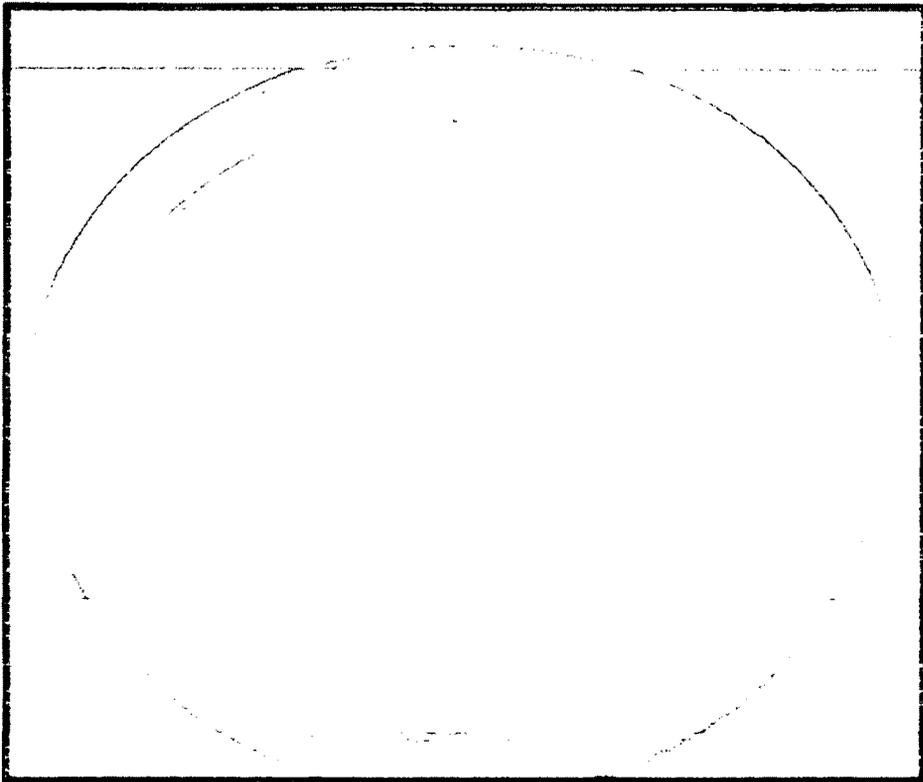
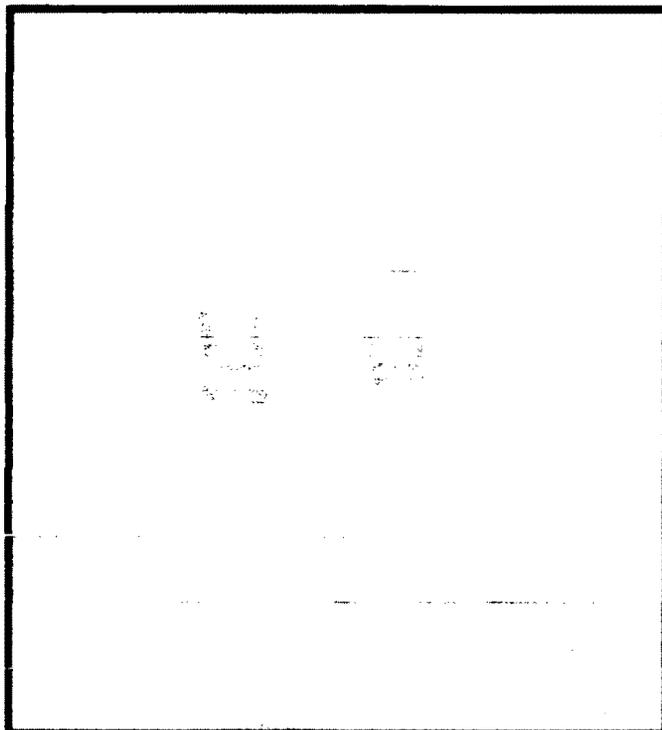


FOTO 19.- Recuento de mesófilos



**FOTO 20.- Recuento de *Staphylococcus aureus***



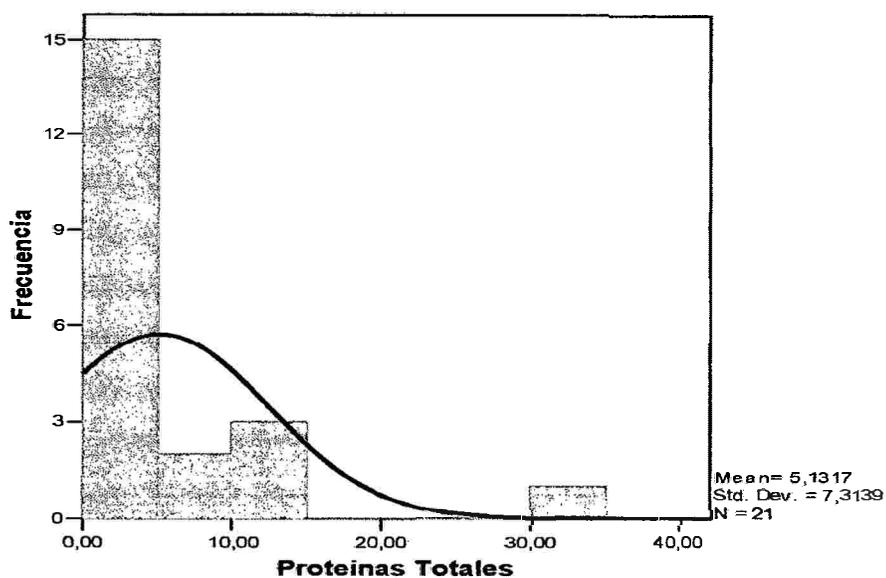
**FOTO 21.- Muestra positiva de coliformes fecales**

## ANEXO Nº 9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

**TABLA I. Análisis estadístico para proteínas totales solubles para el total de muestras analizadas.**

N de casos	21
Media	5.1317
Mediana	2.4600
Moda	.08(a)
Desv. Típ.	7.31390
Varianza	53.493
Rango	31.61
Mínimo	.08
Máximo	31.69
Suma	107.77

a Existen varias modas. Se mostrará el menor de los valores.

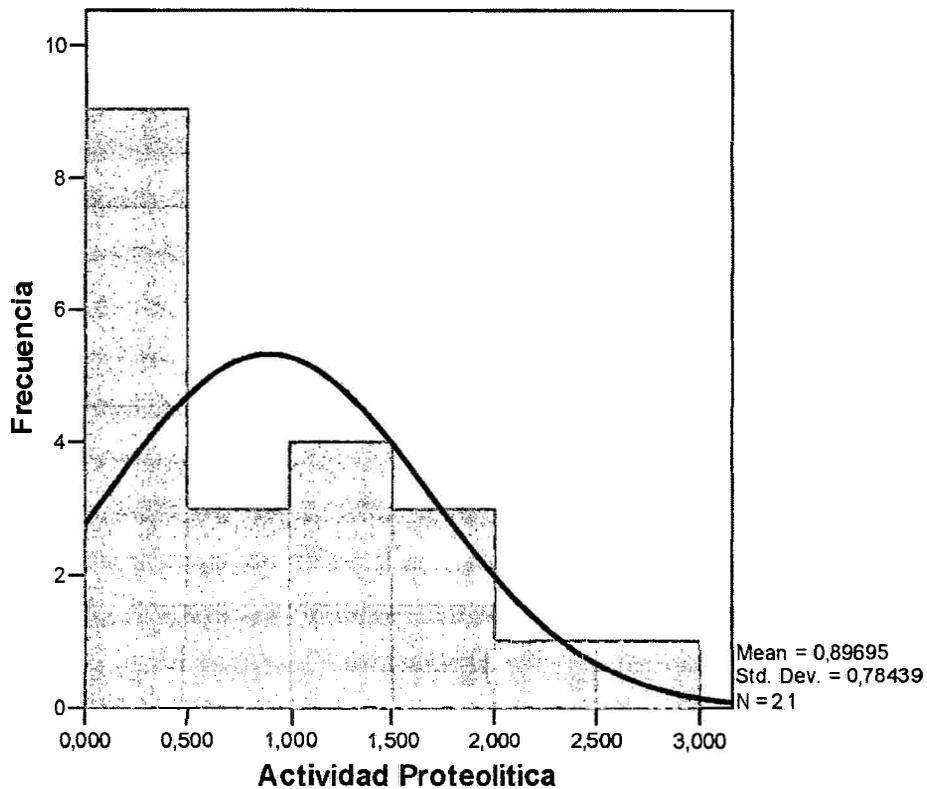


**Figura 04 Histograma para proteínas totales solubles**

**TABLA II. Análisis estadístico para actividad proteolítica para el total de muestras analizadas.**

N de casos	21
Media	.89695
Mediana	.73100
Moda	.008(a)
Desv. típ.	.784390
Varianza	.615
Rango	2.774
Mínimo	.008
Máximo	2.782
Suma	18.836

a Existen varias modas. Se mostrará el menor de los valores.

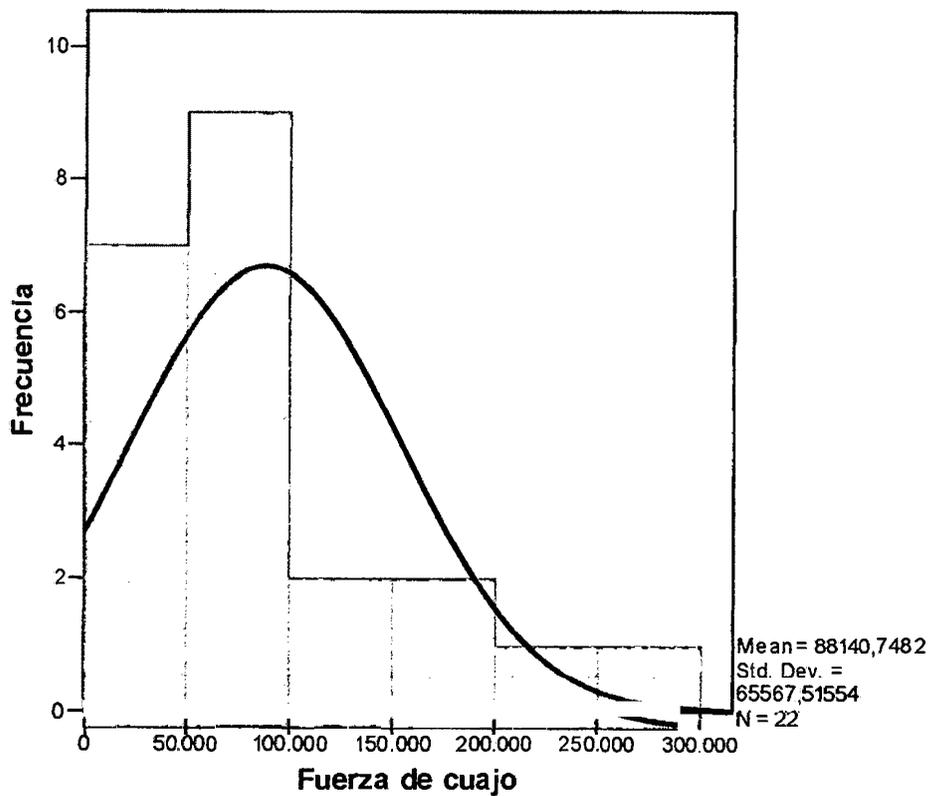


**Figura 05 Histograma para actividad proteolítica.**

**TABLA III. Análisis estadístico para fuerza de cuajo para el total de muestras analizadas.**

N	Válidos	22
	Perdidos	0
Media		88140.7482
Mediana		77209.0900
Moda		10908.13(a)
Desv. típ.		65567.51554
Varianza		4.3E +09
Mínimo		10908.13
Máximo		279085.71
Suma		1939096.46

a Existen varias modas. Se mostrará el menor de los valores.



**Figura 06 Histograma para fuerza de cuajo.**

## ANEXO 10 PARÁMETROS PARA TECNOLOGÍA CACERA.

PARÁMETROS	
<b>Tipos de cuajo</b>	Vicuña, alpaca, llama, vaca, oveja, cabra, cerdo
<b>Obtención del cuajo</b>	Cría con un máx. de 7 días
<b>Tiempo de secado del cuajo</b>	Promedio. 1 mes
<b>Conservación del cuajo seco</b>	Promedio. 3 meses
<b>Uso</b>	Promedio. 6 meses
<b>Cantidad de cuajo</b>	Relativo
<b>Tiempo de cuajado</b>	30 a 45 minutos
<b>Temperatura de cuajado</b>	35–37 °C

## ANEXO 11. FUNDAMENTOS DE LOS ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS

### **Recuento de *Staphylococcus aureus*.**

*Staphylococcus aureus* es un microorganismo que puede causar intoxicación alimentaria. En el medio de agar de Baird – Parker, este contiene varias sustancias inhibitoras que no impiden el desarrollo de *Staphylococcus aureus*, como este reduce el telurito potásico e hidroliza la yema de huevo que contiene el medio, se forman colonias negras rodeadas de una zona clara, característica de *Staphylococcus aureus*.

### **Numeración de coliformes fecales.**

Bacterias coniformes fecales son de origen fecal son aquellas, capaces de fermentar la lactosa con producción de ácido y de gas a 45.5 °C, en un tiempo máximo de veinticuatro horas.

Determinación del número de coliformes mediante siembra de distintos volúmenes del agua a analizar en series de tubos conteniendo medio de cultivo líquido lactosado y resiembra en medios de cultivo selectivos con incubación a temperaturas adecuadas.

El procedimiento comprende las pruebas: presuntiva, de confirmación de coliformes totales y de confirmación de coliformes fecales.

### **Recuento de Mesófilo.**

Las bacterias mesófilas son aerobias o anaerobias facultativas, capaces de crecer en agar nutritivo. El Método recuento en placa. Se basa en contar el número de colonias desarrolladas en una placa de medio de cultivo sólido, donde se ha sembrado un volumen conocido demuestra, transcurrido un tiempo de 24 – 48 horas y a una temperatura de incubación de 37°C.

TITULO	PROBLEMA	OBJETIVOS	MARCO TEORICO	VARIABLES	METODOLOGIA
<p>Manejo y caracterización bioquímica de cuajos utilizados en la elaboración tradicional de quesos</p>	<p>¿Cuál será el manejo y caracterización bioquímica de los cuajos utilizados en la elaboración tradicional de quesos?</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ Describir la tecnología artesanal de obtención, preparación y manipulación de cuajos durante la elaboración del queso.</li> <li>◆ Caracterizar los cuajos de vaca, oveja, cabra, cerdo, llama, alpaca, y vicuña en base a su actividad proteolítica y su capacidad de coagulación.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Anatomía del sistema digestivo de los rumiantes.</li> <li>▪ Digestión en no rumiantes</li> <li>▪ La leche</li> <li>▪ Generalidades sobre el queso</li> <li>▪ Enzimas coagulantes.</li> <li>▪ Coagulación de la leche.</li> <li>▪ Factores que afectan la coagulación de la leche</li> <li>▪ Aplicaciones biotecnológicas.</li> </ul>	<p><b>Variabes Independientes:</b></p> <p>Origen del cuajo.</p> <p><b>Variabes dependiente:</b></p> <p>Actividad proteolítica y fuerza del cuajo.</p>	<p><b>Población:</b></p> <p>Comunidades campesinas que conservan la tradición de utilizar cuajos naturales en la elaboración de quesos.</p> <p><b>Muestra:</b></p> <p>Cuajos de los distritos de Ayacucho.</p> <p><b>Metodología :</b></p> <p>Descripción del proceso artesanal de elaboración de cuajos naturales, determinación de proteína total soluble, determinación de la actividad proteolítica, determinación del título o fuerza de cuajo, análisis microbiológico, análisis físico químico de la leche</p> <p><b>Análisis estadístico.</b></p> <p>Se realizó análisis descriptivo de los datos y fueron presentados en cuadros e histogramas.</p>

**Manejo y caracterización bioquímica de cuajos utilizados en la elaboración tradicional de quesos**  
Sheila Cisneros<sup>1</sup>, Fidel Mujica<sup>2</sup>, Paula García Godos<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Escuela de Formación Profesional de Biología, Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional De San Cristóbal de Huamanga, Ayacucho, Perú.

<sup>2</sup> Laboratorio de Biotecnología Microbiana, Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional De San Cristóbal de Huamanga, Ayacucho, Perú.

**RESUMEN**

El objetivo fue describir la tecnología artesanal de obtención, preparación y manipulación de cuajos durante la elaboración de queso y caracterizar los cuajos de ternero, cordero, cabra, llama, alpaca, vicuña y cerdo en base a su actividad proteolítica y su capacidad de coagulación y a partir de los resultados explorar su potencial biotecnológico como insumo en la elaboración de quesos entre los años 2005 y 2006.

Se trabajó con un total de 21 muestras provenientes de 7 cuajos puros de diferentes especies, cada uno con 3 repeticiones, las cuales fueron recolectados de los distritos de Paras, Sancos, Huamanquiya, Cangallo y Pampacangallo.

Se obtuvo el extracto enzimático a partir del cuajo seco mezclando un volumen de cuajo con 5 volúmenes de suero lácteo, luego se dejó en agitación constante por espacio de 4 días, para realizar las siguientes determinaciones: proteína total soluble, actividad proteolítica, fuerza de cuajo y el análisis microbiológico.

Los diferentes cuajos de animales, son los camélidos sudamericanos, los que reportan mayor actividad proteolítica, siendo la vicuña con 2.106 U/mg la que obtuvo la mayor actividad y el menor de cerdo con 0.013 U/mg. Para la fuerza de cuajo muestran que el cuajo de vicuña tiene mayor fuerza de cuajo 1/175512 ml y cerdo con 1/26561 ml. Por tanto los cuajos de camélidos tienen mayor poder coagulante

Palabras clave: Cuajo, quimosina, fuerza de cuajo, quesos artesanales.

**ABSTRACT**

Study was carried out in 2005-2006, to describe artisanal technology for obtaining, preparing and manipulation of local indigenous different animals' breedings rennets, so from calf, lamb, goat, llama, vicuna, alpaca and pig, all of them on basis to their proteolytic activity, and capability of coagulation, and then from these results explore their biotechnological power as raw material for cheese elaboration.

It was tested 21 samples from 7 purified rennets of above breedings; each one with three repetitions. Animals' rennets were collected from Paras, Sancos, Huamanquiya, Cangallo and Pampacangallo districts, in Ayacucho.

To get enzymatic extract it was taken a volume of dried rennet and mixed with five volumes of lactic serum, after that it was left in permanent agitation for four days, in order to do following determinations: total soluble protein, proteolytic activity, rennet's power, and microbiological analysis.

From all rennets submitted to investigation the rennet of Southamerican camelids revealed the highest proteolytic activity; being the vicuna, into this group, who showed the best activity, 2.106 U/mg, whereas pig's rennet showed the lower, 0.013 U/mg. On the other hand, about rennet power, again, vicuna's rennet revealed the highest, 1/175512 ml, and the pig the lowest with 1/26561 ml. Therefore southamerican camelids revealed the best power of coagulation.

Key words: rennet, chymosin, rennet's power, artisanal cheese

**INTRODUCCIÓN**

El cuajo es uno de los más importantes insumos en la industria quesera. En la actualidad poco se conoce respecto a la caracterización enzimática de cuajos y coagulantes provenientes de especies nativas, particularmente de camélidos sudamericanos, como la alpaca, llama y la vicuña. Probablemente, la práctica de transportar la leche en bolsas hechas con estómagos de animales, común en algunas zonas de Europa oriental y Asia occidental en la antigüedad, dio lugar a la elaboración más o menos accidental de los primeros quesos. Los romanos fueron los primeros en describir con detalle el proceso de elaboración, se mezclaba una preparación rica en enzimas extraída del estómago de cabras, corderos e, incluso, liebres, con la leche de cabra u oveja (la leche de vaca no empezó a producirse a gran escala hasta el siglo XIII). La cuajada separada del suero se salaba y se almacenaba para su posterior consumo. Artesanalmente en el Perú, el proceso de elaboración del cuajo, donde primero se extrae el cuajar de animales tiernos es decir que solo tenga días de nacido, luego se le espolvorea sal, se hace secar en la parte superior de un fogón de una cocina a leña, durante el tiempo que sea necesario.

Cuando el cuajo este listo para ser utilizado se coloca en un recipiente, se le agrega suero de leche y se hace remojar hasta que libere sus enzimas, este cuajo es utilizado varias veces así se obtienen el queso fresco o "quesillos" típicos que hoy se elaboran en el Perú que son muy reconocidos compitiendo con los europeos. Los animales recién nacidos, nacen con un rumen pequeño y el cuarto estómago es, el más grande de sus compartimientos gástricos. Por lo tanto, la digestión del animal de corta edad se parece mucho más al animal de estómago simple que a la del rumiante (Bone, 1983; Churc, 1974). El principio activo que se encuentra en el cuajo es una enzima conocida como quimosina (proteasa ácida), esta enzima abunda en el cuajar de los terneros, corderos y cabritos tiernos, que son los animales de los cuales se extrae, pero a medida que su alimentación láctea va siendo reemplazada por el pasto, la quimosina va siendo substituido por la pepsina (Bone, 1983 y Coultate, 1998). La quimosina, renina o quimasa junto con la pepsina hacen parte de las enzimas que constituyen los jugos gástricos. La quimosina coagula la leche porque actúa sobre una proteína que posee la leche, llamada caseína y la descompone para facilitar la unión con el calcio. Este enzima continúa su trabajo, más lentamente durante la maduración del queso.

El cuajo se emplea en muy pequeña cantidad. Para coagular la leche, ésta debe tener una temperatura que varía entre 30 y 40 °C. Cuando la leche está ácida, el cuajo trabaja rápidamente (Walstra y col, 2000). La

Sheila Cisneros (shccis76@hotmail.com)

Fac. Cs. Biológicas. UNSCH. Ciudad Universitaria. Av.

Independencia s/n. Telef.: (066) 312510 Anexo 145,

Teléfono directo: (066) 31-8553

[Biounsch\\_decano@latinmail.com](mailto:Biounsch_decano@latinmail.com)

fuerza del cuajo, es decir su poder de coagulación, decrece cuando es expuesto al agua, al calor y a la luz. Este producto se debe siempre conservar en un recipiente muy cerrado para que no entre la humedad y en lugares secos, fríos y oscuros. Debido a la alta demanda del cuajo para la fabricación de quesos, han realizado investigaciones con la enzima quimosina con tanta rapidez es así que en el año 1980 fue la primera enzima, obtenida de un microorganismo genéticamente modificado, esta enzima es la misma obtenida en becerros con un alto grado de pureza en *Saccharomyces cerevisiae*. En la actualidad la quimosina es obtenida de *Mucor pusillus* obtenido por técnicas de DNA recombinante (Salerno, 2004). Con base en estos fundamentos se realizó el presente trabajo de investigación, teniendo en cuenta los siguientes objetivos:

- ♦ Describir la tecnología artesanal de obtención, preparación y manipulación de cuajos durante la elaboración del queso.
- ♦ Caracterizar los cuajos de vaca, oveja, cabra, cerdo, llama, alpaca, y vicuña en base a su actividad proteolítica y su capacidad de coagulación.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Población y muestra

Se tomó como población los cuajos naturales de animales de "vaca" *Bos taurus*, "oveja" *Ovis aries*, "cabra" *Capra aegagrus*, "llama" *Lama glama*, "alpaca" *Vicugna pacos*, "vicuña" *Vicugna vicugna* y "cerdo" *Sus scrofa* utilizados en el departamento de Ayacucho tomando las muestras de los distintos distritos como: El Distrito de Paras, se encuentra en la Provincia de Cangallo, departamento de Ayacucho, ubicado a una altitud de 3,330 m.s.n.m; entre las coordenadas geográficas de 12°32'54" L.S y 74°37'36" L.O corresponde a la Zona de Vida (bh - MS) bosque húmedo Montano Sub tropical. El Distrito de Sancos, se encuentra en la Provincia de Huancasancos, departamento de Ayacucho, ubicado a una altitud de 3,408 m.s.n.m; entre las coordenadas geográficas de 13°55'07" L.S y 74°19'55" L.O corresponde a la Zona de Vida (bh - MS) bosque húmedo Montano Sub tropical. El Distrito de Huamanquiú, se encuentra en la Provincia de Víctor Fajardo, departamento de Ayacucho, ubicado a una altitud de 3,350 m.s.n.m; entre las coordenadas geográficas de 13°43'30" L.S y 74°16'18" L.O corresponde a la Zona de Vida (bh - MS) bosque húmedo Montano Sub tropical. El Distrito de Cangallo, se encuentra en la Provincia de Cangallo, departamento de Ayacucho, ubicado a una altitud de 2,577 m.s.n.m; entre las coordenadas geográficas de 13°37'30" L.S y 74°06'28" L.O corresponde a la Zona de Vida (bs - M BS) bosque seco Montano Bajo Sub tropical. El Distrito de Pampacangallo, se encuentra en la Provincia de Cangallo, departamento de Ayacucho, ubicado a una altitud de 3,330 m.s.n.m; entre las coordenadas geográficas de 13°13'15" L.S y 74°11'36" L.O corresponde a la Zona de Vida (bh - MS) bosque húmedo Montano Sub tropical (Ramírez, 1985). De estos lugares se recolectaron los cuajos de 7 especies de animales y obteniendo 3 muestras por especie; siendo un total de 21 cuajos secos de diferentes animales, extraídas de las visitas a dichos lugares.

### Recolección de cuajos

Las muestras fueron tomadas al azar de diferentes provincias de la región de Ayacucho, para conseguir los cuajos secos se tuvo que realizar viajes a las zonas de

Cangallo, Pampacangallo, Huancasancos, Huamanquiú, Paras. Donde la población utiliza estos cuajos naturales para la elaboración del queso, estos cuajos secos y puros fueron recolectados en un recipiente apropiado, para luego ser transportados al Laboratorio de Biotecnología Microbiana, de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional San Cristóbal de Huamanga, para ser estudiadas.

Descripción del proceso artesanal de elaboración de cuajos naturales.

### Encuestas

Con la finalidad de describir cómo era el proceso de obtención y elaboración de cuajos artesanales, se visitaron los siguientes lugares del Departamento de Ayacucho: Cangallo, Pampacangallo, Huancasancos, Huamanquiú y Paras. Se elaboró una encuesta, en la que se recabó información importante de dicha obtención y proceso. Se entrevistaron un total de 22 personas dedicadas exclusivamente a la elaboración tradicional de hacer quesos con cuajos naturales y crianza de ganado.

Evaluación de cuajos.

Obtención del extracto enzimático.

Se cortaron los cuajos en pequeños trozos, se pesaron los cuajos, con la ayuda de una balanza analítica, se desinfectó el cuajo, utilizando alcohol al 96%. En un recipiente estéril, que contenía suero de leche, se incorporó el cuajo. Este fue llevado a agitación constante a una temperatura ambiental durante 4 días. Pasado este tiempo el extracto fue utilizado para las pruebas de: proteína total soluble, actividad proteolítica, fuerza de cuajo, análisis microbiológico.

Determinación de Proteína Total Soluble.

• En un tubo de ensayo de centrifuga se tomó 5 ml del extracto enzimático el cual se centrifugó a 4000 rpm por 10 minutos.

• Se descartó el sobrenadante, y luego se adicionó 5 ml de agua destilada se repitió la operación cuatro veces.

• Se resuspendió las células en 5 ml de agua destilada a partir de este se separó 1 ml de suspensión y se vertió a un tubo de prueba.

• A la suspensión se añadió 2 ml de NaOH 3 N y se puso a baño María hirviendo por 5 minutos.

• Se dejó enfriar al medio ambiente y se añadió 2 ml de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  al 2.5 %. Luego se centrifugó a 2000 rpm por 5 minutos.

• Las lecturas de absorbancia se realizaron a partir del sobrenadante a 554 nm en un espectrómetro Spectronic 21 D, Milton Roy. Previa calibración del equipo a transmitancia cero, y absorbancia cero con agua destilada.

• Paralelamente se preparó el blanco utilizando agua destilada en lugar del extracto enzimático.

• Los resultados se expresaron en mg de proteína /ml extrapolando las lecturas en una curva patrón.

Determinación de la actividad proteolítica

• En un tubo de ensayo se colocó 1.8 ml de la solución de azocaseína tamponada y se estabilizó a 37° por 15 minutos.

• Se añadió seguidamente 1 ml de extracto enzimático se incubó a 37°C por 60 minutos y cumpliéndose el tiempo se detuvo la reacción por adición de 2 ml de ATA.

• El blanco de sustrato estuvo constituido de 1.8 ml de azocaseína, 2 ml de ATA y 0.2 ml de extracto y; el blanco de reactivos de 2 ml de agua destilada y 2 ml de ATA.

- Los tres tubos se centrifugaron a 3000 rpm por 10 minutos y se separó una alícuota de 3 ml de sobrenadante se le añadió 1.5ml de NaOH 2 N, para estabilizar la reacción.
- Las lecturas de absorbancia se realizaron a una longitud de onda de 445 nm en un espectrofotómetro Spectronic 210, Milton Roy.

**Determinación del título o fuerza de cuajo.**

- Se midió el tiempo que transcurre entre el momento de la adición del cuajo y la aparición de los primeros flocúlos, que corresponde a la ruptura de la suspensión coloidal.
- Se tomaron 10 ml de leche colocándolos en tubos de ensayos. Los tubos fueron colocados a baño María a unos 35°C, con un termómetro se mido la temperatura de la leche, siendo esta de 35°C.
- Se adicionó 0.1 ml de extracto enzimático, a los tubos con el contenido de leche.
- Los tubos de vidrio fueron inclinados ligeramente, se les hizo girar lentamente.
- Se tomó el tiempo que transcurría con la aparición de los flocúlos, con la ayuda de un cronómetro.
- Se anotaron los resultados, para los cálculos necesarios. Se calculó la fuerza de cuajo mediante la formula de Soxhlet. (Luquet, 1993)

**Análisis microbiológico.**

Se realizó mediante la recuento de *Staphylococcus aureus*, coliformes fecales y mesófilos (Refai, 1981).

**Recuento de *Staphylococcus aureus*.**

Se tomó del extracto enzimático 10 ml. con una pipeta estéril, en 90 ml de agua peptonada, se realizó diluciones sucesivas en 9 ml de agua peptonada al 0.1% hasta 10<sup>-3</sup>, se Tomó 0.1 ml de cada dilución y se sembró por extensión sobre Agar Baird- Parker, se Incubó a 37°C por 24 a 48 horas, luego se contó aquellas colonias negras que tuvieron halo de precipitación (Refai, 1981).

**Numeración de coliformes fecales.**

Se tomó del extracto enzimático 10 ml. con una pipeta estéril, en 90 ml de agua peptonada se realizó diluciones sucesivas en 9 ml de agua peptonada al 0.1% hasta 10<sup>-3</sup>, se distribuyó 1 ml de cada dilución en 3 tubos con 10 ml de Caldo de Triptosa y Sulfato de Lauril, provistas de campanitas de Durham, se Incubó los tubos a 37°C por 24 – 48 horas, se repicó por asada los tubos que produzcan gas, en 10 ml de caldo EC, provistas de campanitas de Durham, los tubos fueron incubados a 45.5°C por 24 – 48 horas, se observó y anotó los tubos que producían gas, se remitió a las tabla del Número Mas Probable (NMP) (Refai, 1981).

**Recuento de Mesófilo.**

Se tomó del extracto enzimático 10 ml. con una pipeta estéril, para 90 ml de agua peptonada. se tomó del extracto enzimático 1 ml. con una pipeta estéril, se realizó diluciones sucesivas en 9 ml de agua peptonada al 0.1% hasta 10<sup>-3</sup>, se Tomó 1 ml de cada dilución y se sembró por incorporación en Agar Recuento, se Incubó a 37°C por 24 a 48 horas (Refai, 1981), luego se contó las colonias y se tomaron los datos.

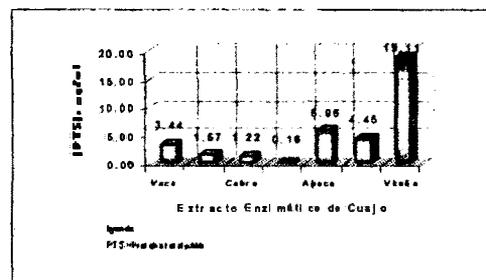
**Análisis físico -químico de la leche**

Se realizó análisis fisicoquímico de la leche considerando la densidad, Acidez titulable, Sólidos totales, Determinación de proteínas (Método de Kjeldahl), Medición de pH.

**CUADRO I. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA TOTAL SOLUBLE (PTS) EN EXTRACTO ENZIMÁTICO DE CUAJO. AYACUCHO-2005.**

Cuajo	Absorbancia (554nm)	[PTS], g/ml
Vaca	0.08	3.44
Oveja	0.04	1.57
Cabra	0.04	1.22
Cerdo	0.02	0.16
Alpaca	0.15	5.96
Llama	0.11	4.45
Vicuña	0.25	19.11

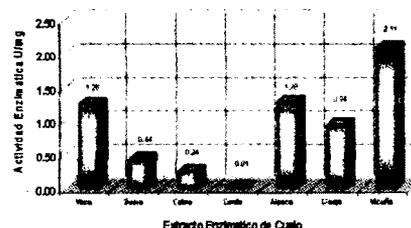
Figura 01.- Determinación de proteína total soluble en extracto enzimático de cuajo. Ayacucho – 2005



**CUADRO II. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA EN EXTRACTO ENZIMÁTICO DE CUAJO. AYACUCHO - 2005.**

Cuajos	Absorbancia (445nm)	Actividad Enzimática (U/mg)
Vaca	1.081	1.257
Oveja	0.327	0.439
Cabra	0.260	0.241
Cerdo	0.106	0.013
Alpaca	1.079	1.282
Llama	0.517	0.940
Vicuña	1.470	2.106

Figura 02.- Determinación de la actividad proteolítica en extracto enzimático de cuajo. Ayacucho - 2005.

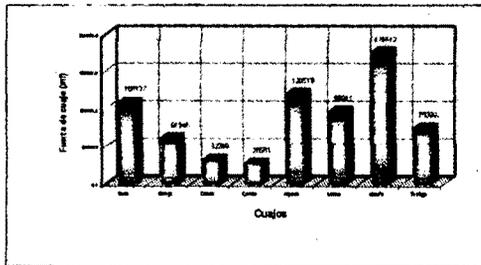


**CUADRO III. DETERMINACIÓN DE FUERZA DE CUAJO (1g de cuajo puro) AYACUCHO– 2005.**

Cuajo	Fuerza de Cuajo (ml) (*)
Vaca	108127
Oveja	61346
Cabra	32289
Cerdo	26561
Alpaca	120519
Llama	97011
Vicuña	175512
Testigo (**)	75000

(\*) Cantidad de leche (en mililitros) que es coagulada por un gramo de cuajo.  
 (\*\*) El testigo comercial fue el cuajo animal de Chr. Hansen NATUREN® procede de la extracción del estómago de ternero (cuajares) o bovino.

**Figura 03.- Determinación de fuerza de cuajo Ayacucho - 2005.**



**CUADRO IV. RECUENTO DE Staphylococcus aureus EN EXTRACTO ENZIMÁTICO DE CUAJO AYACUCHO–2005**

Cuajo	Recuento promedio (a) (UFC/ml)	Límites microbiológicos (b) (UFC/ml)
Vaca	23 X 10 <sup>5</sup>	Ausencia
Oveja	65 X 10 <sup>5</sup>	Ausencia
Cabra	44 X 10 <sup>6</sup>	Ausencia
Cerdo	19 X 10 <sup>4</sup>	Ausencia
Alpaca	27 X 10 <sup>5</sup>	Ausencia
Llama	49 X 10 <sup>5</sup>	Ausencia
Vicuña	18 X 10 <sup>3</sup>	Ausencia

(a) Promedios en base a tres determinaciones.  
 (b) Valores según el código alimentario español

**CUADRO V. RECUENTO DE MESOFILOS VIABLES EN EXTRACTO ENZIMÁTICO DE CUAJO. AYACUCHO –2005.**

Cuajo	Recuento promedio (*) (UFC/ml)	Límites microbiológicos (UFC/ml)
Vaca	49 X 10 <sup>5</sup>	1 X 10 <sup>5</sup>
Oveja	82 X 10 <sup>5</sup>	1 X 10 <sup>5</sup>
Cabra	21 X 10 <sup>7</sup>	1 X 10 <sup>5</sup>
Cerdo	17 X 10 <sup>5</sup>	1 X 10 <sup>5</sup>
Alpaca	28 X 10 <sup>5</sup>	1 X 10 <sup>5</sup>
Llama	60 X 10 <sup>7</sup>	1 X 10 <sup>5</sup>
Vicuña	94 X 10 <sup>7</sup>	1 X 10 <sup>5</sup>

(a) Promedios en base a tres determinaciones.  
 (b) Valores según el código alimentario español

**CUADRO VI. NUMERACIÓN DE COLIFORMES FECALES EN EXTRACTO ENZIMÁTICO DE CUAJO. AYACUCHO – 2005.**

Cuajo	Numero mas probable (a) (NMP/ml)	Límites microbiológicos (b) (NMP/ml)
Vaca	75	<2
Oveja	< 3	<2
Cabra	93	<2
Cerdo	< 3	<2
Alpaca	< 3	<2
Llama	< 3	<2
Vicuña	64	<2

(a) Promedios en base a tres determinaciones.  
 (b) Valores según el código alimentario español

**DISCUSIÓN**

El proceso de elaboración de quesos artesanalmente es una técnica de mucha antigüedad, son recientes las investigaciones hechas en uno de los factores importantes de este proceso, como es el cuajo. Más aún no se ha llevado a cabo estudios, en camélidos sudamericanos resultando un potencial de amplia investigación. Los resultados presentados en el capítulo anterior corresponden a un total de 22 encuestados dedicados a la crianza de ganado y la actividad de elaborar quesos. Se recolectó un total de 21 cuajos puros de 7 diferentes especies, cada uno con 3 repeticiones. Tanto las encuestas y las muestras recolectadas fueron tomadas de los distritos de Paras, Sancos, Huamanquiua, Cangallo y Pampacangallo. Las muestras fueron obtenidas de ganaderos dedicados a la crianza de vacas, ovejas, cabras, cerdos, alpacas y llamas, pero en caso de la vicuña, fue proporcionada por un ganadero alpaquero que compra dicho cuajo a cazadores tanto peruanos y bolivianos que los obtiene de las zonas alto andinas de Ayacucho y Huancavelica. El cuajo obtenido para la elaboración de quesos, es de un animal tierno de pocos días de nacido, se ata los extremos del cuajo, para colgarlo y ponerlo a secar en ramas altas con suficiente aeración, o en la parte superior del fogón de una cocina a leña por espacio de un mes aproximadamente. El secado se realiza en la sombra siendo un detalle de gran importancia pues el cuajo es un medio que contiene enzimas y los rayos solares afectan su poder coagulante coincidiendo con Dubach y Sánchez. Para la utilización del cuajo, este se remoja en suero y se macera por espacio de 4 días, y este sirve para hacer varias veces quesos frescos o quesillo típico citado también por Dubach. Con respecto al tiempo de utilización del cuajo no existe uniformidad, ni proporción de uso; pero si existe similitud en la elaboración del mismo. La cuajada es obtenida, inmediatamente después de ordeño, aprovechando el calor natural de la leche recién ordeñada citado también por Sánchez. En el CUADRO I se observan los resultados de la concentración de proteína total soluble (PTS) en extracto enzimático de cuajo a A554 nm, reportando una mayor concentración de proteínas en las especies de camélidos sudamericanos; siendo la vicuña con 19.11 mg/ml la que presenta una mayor concentración, seguida de alpaca con 5.96 mg/ml y llama 4.45 mg/ml. En comparación con las demás especies de animales. El cerdo fue la especie que presentó menor concentración de proteínas totales solubles, que fue de 0.16 mg/ml, lo cual se visualiza en la FIGURA 01. No se encontró referencias bibliográficas debido a que es un tema inédito. Estos animales tienen una digestión más eficiente ya que la dieta es de calidad baja o mediana en proteínas. Esto implica que están bien adaptados a los pastos altos andinos. Esta mayor eficiencia está relacionada con varias propiedades del estómago que son: el mayor tiempo de permanencia de

la digesta en el tracto digestivo, la mayor frecuencia de contracciones del estómago, los ciclos de rumia, tamaño del estómago, finalmente estas peculiaridades permiten un mayor mezclado, digestión y absorción de la digesta. En el CUADRO II, se reportan los resultados de la actividad proteolítica a  $A_{445}$  nm en extracto enzimático de cuajo, también se obtuvo una mayor actividad en los camélidos, siendo la vicuña con 2.106 U/mg la que obtuvo la mayor actividad seguida de alpaca 1.282 U/mg, vaca 1.257 U/mg, llama 0.9040 U/mg, oveja 0.439 U/mg, cabra 0.241 U/mg y el menor de cerdo con 0.013 U/mg. Dichos resultados se aprecian con mayor detalle en la FIGURA 02. Sobre la actividad proteolítica no existe normas las cuales nos permiten establecer límites, un aumento de la temperatura acelera la velocidad y dado que el calor hace que las proteínas se coagulen y a temperaturas por encima de los 50°C la mayor parte de la actividad enzimática se destruye completamente citado por Luquet, 1993. Los mecanismos que intervienen en la proteólisis de las caseínas nos permite una mejor identificación de los productos formados y de sus sustratos. La degradación tiene lugar sobre una importante fracción de la caseína, en ella interviene varios procesos enzimáticos en el transcurso de la proteólisis (Madrid, 1999). En el CUADRO III, se presenta los valores de fuerza de cuajo, esta prueba nos permite determinar la cantidad en g o ml de leche que puede coagular 1 (g/ml) de cuajo a 35 ° C. Los resultados obtenidos nos muestra que el cuajo de vicuña tiene una fuerza de cuajo de 1/175512 ml, para alpaca tenemos 1/120519 ml, vaca 1/108127 ml, llama 1/97011 ml, oveja 1/61346 ml, cabra 1/32289 ml, y por último el cerdo con 1/ 26561 ml. Por tanto podemos decir que el cuajo de camélidos es de mayor poder coagulante, las otras pruebas bioquímicas realizadas, proteína total soluble y actividad proteolítica corroboran esta propiedad. Estos resultados se pueden visualizar en la FIGURA 03. Comparando con Veisseryre que refiere que los extractos líquidos tienen por lo general una fuerza de 1/10 000 y los cuajos en polvo alcanzan una fuerza de 1/ 100000 y aún mas elevada. Por lo tanto los datos obtenidos se encuentra conforme la referencia bibliográfica. La formación del coágulo es el cambio del estado líquido al estado semisólido. En tanto que el tiempo de coagulación corresponde al tiempo transcurrido entre la adición de enzima coagulante y el comienzo de la floculación (Mahuat y col, 2003). Con el fin de comparar la actividad coagulante de los distintos tipos de cuajo, se realiza la determinación de la fuerza de cuajo generalmente, las preparaciones enzimáticas se estandarizan a una fuerza determinada. La medición de la fuerza de cuajo se realizó en forma indirecta tomando como dato experimental el tiempo cronométrico de inicio de la coagulación mediante el método visual, tomando como tiempo de coagulación el momento en que se forman los primeros flóculos, este método es sugerido por Veisseryre, 1980. De acuerdo con Sánchez, 1971 para las personas que se dedican a la actividad de realizar quesos el mejor cuajo que existe y ha existido es el de la vicuña, por su gran poder de coagulación y el sabor agradable que proporciona a los quesos. En el CUADRO IV, se reportan los resultados de recuento de *Staphylococcus aureus* en extracto enzimático de cuajo, se encontró un mayor carga microbiana en alpaca con  $27 \times 10^5$  UFC/ml; seguido de  $23 \times 10^5$  UFC/ml en vaca; luego  $44 \times 10^3$  UFC/ml en cabra;  $18 \times 10^3$  UFC/ml en vicuña,  $65 \times 10$  UFC/ml en oveja y por último  $49 \times 10$  UFC/ml en llama. Realizando una comparación con valores del código alimentario español (Anexo 07) dice que debe haber ausencia de *Staphylococcus aureus*. Existe una mayor carga microbiana en la alpaca, pudiendo deberse a las pocas

condiciones higiénico-sanitarias en la cuales son extraídas estos cuajos. En el CUADRO V, se exponen los datos de recuento de mesófilos en extracto enzimático de cuajo, donde se halló una mayor carga microbiana que fue de  $28 \times 10^8$  UFC/ml en cuajo de alpaca seguida de;  $94 \times 10^7$  UFC/ml en cuajo de vicuña;  $60 \times 10^7$  UFC/ml en cuajo de llama;  $21 \times 10^7$  UFC/ml en cuajo de cabra,  $49 \times 10^5$  UFC/ml en cuajo de vaca;  $17 \times 10^5$  en cuajo de cerdo; por último  $82 \times 10^4$  UFC/ml en cuajo de oveja. Para mesófilos de acuerdo con los valores del Código alimentario español es de  $1 \times 10^5$  UFC/ml, evidenciando una falta de higiene. En el CUADRO VI se exhiben los resultados de numeración de coliformes fecales en extracto enzimático, obteniendo un resultado máximo que es de 93 NMP en cabra, seguido de 75 NMP en vaca, 64 NMP en vicuña y valores similares de < 3 NMP en oveja, cerdo, alpaca y llama. De acuerdo con los valores del código alimentario español el límite permisible deben ser < 2 NMP/ml. Por tanto ningunas de las muestras se encuentran dentro de dichos límites, demostrando una contaminación del cuajo, por la falta de Buenas Prácticas de Manipulación. El análisis microbiológico de los cuajos frescos indica la presencia de carga microbiana, se justifica si consideramos la influencia de parámetros tales como características propias del animal, condiciones sanitarias del sacrificio del animal, grado de instrucción, condición socioeconómica. En el CUADRO VII se presentan los resultados de la caracterización de la leche del fundo de Alpachaca utilizada en los ensayos teniendo los siguientes valores: pH 6.76; densidad 1.024; % Acidez 0.225; %sólidos totales 9.695, % proteínas 3.796. Estos resultados fueron comparados con la Norma Oficial de la Leche fuente Normas Técnicas Peruanas (NTP) 2002.0001 encontrándose fuera de las especificaciones requeridas.

#### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

1. ALAIS, CH. (1970). Ciencia de la Leche Principios de Técnica Lechera Edit. Continental. México.
2. DUBACH, J. (1973). Quesos Andinos del Perú, Ministerio de Agricultura Lima
3. MADRID, A. (1999). Tecnología Quesera. Edit. Mundi Prensa. Madrid.
4. MAHUAT, M. JEANTET, R. y GERÁRD B. (2003). Introducción a la Tecnología Quesera. Edit. Acribia, S.A. Zaragoza – España.
5. LUQUET, F. (1993). Leche y Productos Lácteos Edit. Acribia S.A. Zaragoza- España
6. REFAL, M. (1981). Manuales para el Control de Calidad de los Alimentos. Edit. FAO, Roma.
7. SÁNCHEZ, B. (1971). La elaboración de quesos en el departamento de Ayacucho, Tesis - UNSCH. Fa. Cs. Agra. Ayacucho – Perú
8. VEISSERYRE, R. (1980). Lactología Técnica. Edit. Acribia, S.A. Zaragoza – España.
9. WALSTRA, P; GEURTS, T.; JELLMAN, A. y VAN BOE, K. (2000). Ciencia de la Leche y Tecnología de los Productos Lácteos. Edit. Acribia S.A. Zaragoza – España.
10. URL4:  
[http://www.boe.es/ges/bases\\_datos/doc.php?coleccion=iberlex&id=1988/01153](http://www.boe.es/ges/bases_datos/doc.php?coleccion=iberlex&id=1988/01153).

## ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

R.D. N° 104-2007-FCB-D

En la ciudad de Ayacucho a las 11 días del mes de junio del 2007, siendo las 4:15pm, se reunieron en el auditorio de la Facultad de Ciencias Biológicas, presidido por el Mg. Fidel Mujica Lengua, encargado con memorando N° 441 – 2007 – FCB de fecha 11 de junio del 2007, mediante el cual se le encarga la presidencia del acto de sustentación de tesis, actuando como secretaria docente la Q.F. Yadira Fernández Jerí, encargado con memorando N° 442 –2007 – FCB, de fecha 11 de junio del 2007, mediante el cual se le encarga la secretaria docente del acto de sustentación actuando como miembros del jurado Mg Vidalina Andía Ayme, Mg. Fidel Mujica Lengua, Blga Edna León Palomino, QF. Yadira Fernández Jerí, quienes recepcionan en acto público la sustentación titulada: Manejo y caracterización bioquímica de cuajos utilizados en la elaboración tradicional de quesos, presentado por la Bach. Sheila Cisneros García, quién pretende obtener el título de Bióloga con mención en la especialidad de Biotecnología. Acto seguido el presidente invitó a la sustentante a exponer su trabajo en un tiempo de 45 minutos, tal como explica el reglamento general de la UNSCH. finalizado el acto de sustentación el Sr. presidente (e) invito a los miembros del jurado, para que realicen la preguntas, observaciones y correcciones, que crean convenientes al trabajo de investigación. Acto seguido el presidente (e) invitó a la sustentante a abandonar el auditorio por unos minutos con la finalidad de que los miembros del jurado calificador puedan deliberar y calificar en privado, cuyos resultados son los siguientes:

Miembro del jurado	Exposición	Rta a Preguntas	Promedio
Mg Vidalina Andía Ayme	15	14	15
Mg. Fidel Mujica Lengua	17	16	17
Blga Edna León Palomino	17	15	16
QF. Yadira Fernández Jerí	15	14	15
		Promedio final	16

Como resultado de las deliberaciones y calificaciones, la sustentante obtuvo una calificación promedio de dieciséis de la cual dan fe los miembros del jurado calificador, estampando sus firmas al pie, del presente acto, finalizando el acto de sustentación, siendo las 6.20 pm.



**Mg. Fidel Mujica Lengua**  
**Presidente (e) - Miembro**



**Mg. Vidalina Andia Ayime**  
**Miembro**



**Blga. Edna León Palomino**  
**Miembro**



**QF. Yadira Fernández Jeri**  
**Miembro – Secretario Docente (e)**