

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL  
DE HUAMANGA**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA**



**TESIS:**

**Caracterización enzimática del cuajo porcino, bovino y de camélido  
utilizados en la elaboración de quesos artesanales de Pariahuanca  
(Cangallo)**

Para optar el título profesional de:

**BIÓLOGA, ESPECIALIDAD: BIOTECNOLOGÍA**

PRESENTADO POR:

**Bach. Nadeshha Jhenyfer CONTRERAS MANCILLA**

ASESOR:

**Dr. Fidel Rodolfo MUJICA LENGUA**

**AYACUCHO - PERÚ**

**2025**

A mis padres que me apoyaron en mi proceso de aprendizaje y que siguen guiándome en el camino de la vida.

## **AGRADECIMIENTO**

A la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, *Alma Mater*, por haberme formado como una profesional competente con habilidades, destrezas y conocimientos amplios en el campo de las ciencias biológicas.

A los docentes de la Escuela Profesional de Biología, quienes con su experiencia, conocimientos, paciencia y dedicación hicieron posible mi formación profesional y personal.

Al Dr. Fidel Rodolfo Mujica Lengua por asesorarme permanentemente con sus conocimientos, orientaciones y correcciones, las cuales fueron de suma importancia para el desarrollo y culminación de esta tesis.

Al Mg. Reynán Cóndor Alarcón por haberme brindado su tiempo, su apoyo y ser guía en la parte estadística de esta investigación.

A mi amiga Teresa Calderón De la Cruz quien me ayudó a iniciar este trabajo de investigación.

## ÍNDICE GENERAL

|  | Pág  |
|--|------|
| DEDICATORIA  | ii   |
| AGRADECIMIENTO                                     | iii  |
| ÍNDICE GENERAL                                     | iv   |
| ÍNDICE DE TABLAS                                   | vi   |
| ÍNDICE DE FIGURAS                                  | vii  |
| ÍNDICE DE ANEXOS                                   | viii |
| RESUMEN  | x    |
| I. INTRODUCCIÓN                                    | 1    |
| II. MARCO TEÓRICO                                  | 3    |
| 2.1. Antecedentes                                  | 3    |
| 2.2. Marco conceptual                              | 6    |
| 2.3.1. Cuajo animal                                | 7    |
| 2.3.2. Producción de cuajo animal                  | 8    |
| 2.3.3. Anatomía y fisiología digestiva             | 10   |
| 2.3.4. Actividad coagulante                        | 14   |
| 2.3.5. Proteínas totales                           | 16   |
| 2.3.6. Fuerza de cuajo                             | 16   |
| 2.3.7. Actividad proteolítica                      | 17   |
| 2.3.8. Actividad lipolítica                        | 19   |
| 2.3.9. Electroforesis SDS-PAGE                     | 20   |
| III. MATERIALES Y MÉTODOS                          | 22   |
| 3.1. Ubicación del lugar de estudio                | 22   |
| 3.2. Colecta de muestras                           | 22   |
| 3.3. Población y muestras                          | 22   |
| 3.4. Obtención del cuajo natural                   | 22   |
| 3.4.1. Colecta del abomaso fresco                  | 23   |
| 3.4.2. Preparación y secado del cuajo              | 23   |
| 3.4.3. Maceración del cuajo                        | 23   |
| 3.4.4. Obtención del extracto proteico total (EPT) | 24   |
| 3.5. Determinación de proteínas                    | 25   |
| 3.6. Determinación de fuerza de cuajo              | 26   |

|       |   |    |
|-------|---|----|
| 3.7.  | Determinación de actividad proteolítica | 26 |
| 3.8.  | Determinación de actividad lipolítica   | 28 |
| 3.9.  | Electroforesis SDS-PAGE                 | 29 |
| 3.10. | Análisis estadístico                    | 31 |
| IV.   | RESULTADOS                              | 32 |
| V.    | DISCUSIÓN                               | 50 |
| VI.   | CONCLUSIONES                            | 57 |
| VII.  | RECOMENDACIONES                         | 58 |
| VIII. | REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS              | 59 |
|       | ANEXOS                                  | 70 |

## ÍNDICE DE TABLAS

|  | Pág. |
|--|------|
| Tabla 1. Codificación de las muestras de cuajo animal obtenidas a partir de diversas especies y tiempo de maceración en condiciones de refrigeración (5°C), Ayacucho, 2024.                | 24   |
| Tabla 2. Fuerza de cuajo según el tiempo de maceración en condiciones de refrigeración.  | 33   |
| Tabla 3. Comparación de la fuerza de cuajo porcino en relación con el tiempo de maceración usando la prueba t pareada.   | 35   |
| Tabla 4. Comparación de la fuerza de cuajo bovino en relación con el tiempo de maceración usando la prueba de signos.  | 36   |
| Tabla 5. Comparación de la fuerza de cuajo de alpaca en relación con el tiempo de maceración usando la prueba t pareada.   | 37   |
| Tabla 6. Comparación de la fuerza de cuajo entre diferentes especies animales en relación con el tiempo de maceración usando la prueba estadística Mann-Whitney.                           | 38   |
| Tabla 7. Determinación de la actividad proteolítica del cuajo animal según el tiempo de maceración en condiciones de refrigeración.  | 39   |
| Tabla 8. Comparación de la actividad proteolítica del cuajo animal entre la misma especie en relación con el tiempo de maceración usando la prueba estadística t pareada.                  | 41   |
| Tabla 9. Comparación de la actividad proteolítica del cuajo animal entre diferentes especies en relación con el tiempo de maceración usando la prueba estadística t-student de 2 muestras. | 43   |
| Tabla 10. Determinación de la actividad lipolítica del cuajo animal según el tiempo de maceración en condiciones de refrigeración.   | 42   |
| Tabla 11. Comparación de la actividad lipolítica del cuajo animal entre la misma especie en relación con el tiempo de maceración usando la prueba estadística t pareada.                   | 44   |
| Tabla 12. Comparación de la actividad lipolítica del cuajo animal entre diferentes especies en relación con el tiempo de maceración usando la prueba estadística t-student de 2 muestras.  | 45   |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|            | Pág   |    |
|------------|---|----|
| Figura 1.  | Diagrama de la obtención de cuajo animal natural.   | 10 |
| Figura 2.  | Ilustración de estómago porcino.  | 11 |
| Figura 3.  | Ilustración de estómago bovino adulto y lactante.   | 13 |
| Figura 4.  | Ilustración de estómago de camélido sudamericano.   | 14 |
| Figura 5.  | Modelos de la micela de caseína.  | 15 |
| Figura 6.  | Ilustración de la pepsina porcina y quimosina mostrando la hendidura del sitio activo generado por Protein Data Bank-PDB. | 19 |
| Figura 7.  | Diagrama de elaboración de cuajo natural según el procedimiento de Pariahuanca (Cangallo)                                 | 32 |
| Figura 8.  | Promedio de la fuerza de cuajo porcino, bovino y de alpaca con relación al tiempo de maceración (días).                   | 34 |
| Figura 9.  | Promedio de la actividad proteolítica del cuajo porcino, bovino y de alpaca con relación al tiempo de maceración (días).  | 40 |
| Figura 10. | Promedio de la actividad lipolítica del cuajo porcino, bovino y de alpaca con relación al tiempo de maceración (días).    | 44 |
| Figura 11. | Perfil electroforético de cuajo porcino en diferentes tiempos de maceración.  | 47 |
| Figura 12. | Perfil electroforético de cuajo bovino en diferentes tiempos de maceración.   | 48 |
| Figura 13. | Perfil electroforético de cuajo alpaca en diferentes tiempos de maceración.   | 49 |

## ÍNDICE DE ANEXOS

|   | Pág. |
|---|------|
| Anexo 1. Curva patrón de tirosina ( $\mu\text{g/ml}$ )  | 71   |
| Anexo 2. Curva patrón de albúmina sérica bovina (BSA) ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )   | 71   |
| Anexo 3. Tiempo de coagulación de los extractos proteicos totales (EPT) de origen porcino, bovino y de alpaca                             | 72   |
| Anexo 4. Absorbancias para la determinación de la actividad proteolítica del cuajo porcino, bovino y de alpaca sobre caseína              | 73   |
| Anexo 5. Actividad proteolítica del cuajo porcino, bovino y de alpaca expresada en $\mu\text{g/ml}$ de tirosina                           | 74   |
| Anexo 6. Absorbancias obtenidas por la técnica Bradford para la cuantificación de proteínas totales del cuajo porcino, bovino y de alpaca | 75   |
| Anexo 7. Cuantificación de proteína total ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) del cuajo porcino, bovino y de alpaca                             | 76   |
| Anexo 8. Gasto de NaOH 0,01N para la determinación de actividad lipolítica del cuajo porcino, bovino y de alpaca.                         | 77   |
| Anexo 9. Preparación del cuajo natural  | 78   |
| Anexo 10. Secdo del cuajo natural   | 78   |
| Anexo 11. Maceración del cuajo  | 79   |
| Anexo 12. Obtención del extracto proteico total (EPT)   | 80   |
| Anexo 13. Determinación de la actividad coagulante  | 81   |
| Anexo 14. Determinación de la actividad lipolítica  | 82   |
| Anexo 15. Determinación de proteína totales por Bradford  | 83   |
| Anexo 16. Determinación de actividad proteolítica   | 84   |
| Anexo 17. Perfil electroforético SDS-PAGE   | 85   |
| Anexo 18. Buffer de carga o muestra   | 86   |

|           |                             |    |
|-----------|-----------------------------|----|
| Anexo 19. | Gel separador 13%           | 86 |
| Anexo 20. | Gel concentrador 3%         | 86 |
| Anexo 21. | Buffer de corrida o glicina | 86 |
| Anexo 22. | Colorante azul de Coomassie | 87 |
| Anexo 23. | Decolorante                 | 87 |
| Anexo 24. | Matriz de consistencia      | 88 |

## RESUMEN

El uso de cuajos naturales de origen animal para la elaboración de quesos artesanales es una práctica ancestral en las comunidades campesinas, donde se preservan métodos tradicionales transmitidos a lo largo de generaciones. Con el objetivo de caracterizar la actividad enzimática del cuajo porcino, bovino y de alpaca en 15, 30 y 45 días de maceración a 5°C, se elaboraron cuajos según el procedimiento tradicional utilizado por las queseras de la comunidad de Pariahuanca (Cangallo), se determinó la fuerza de cuajo, actividad proteolítica, actividad lipolítica y perfil electroforético SDS-PAGE. La fuerza de cuajo se realizó en base al tiempo de coagulación expresados en Unidades Soxhlet (US), la actividad proteolítica se realizó sobre caseína, la actividad lipolítica se determinó por hidrólisis de la tributirina y se cuantificó proteínas por Bradford. La fuerza de cuajo fue de 1:1157 US, 1:1195 US, 1:87,7 US para cuajo porcino, bovino y de alpaca, respectivamente. La actividad proteolítica fue de 19,690 UI, 14,860 UI, 11,110 UI para cuajo porcino, bovino y alpaca, respectivamente. La actividad lipolítica fue de 3,200 UI, 5,778 UI, 2,444 UI para cuajo porcino, bovino y alpaca, respectivamente. Se cargaron 50 µg de proteína en los carriles del gel de poliacrilamida. El perfil electroforético comprendió básicamente 13 bandas, con pesos moleculares estimados de 245 kDa, 150,5 kDa, 76,4 kDa, 72,4 kDa, 65,8 kDa, 56,4 kDa, 48,1 kDa, 41,9 kDa, 36,6 kDa, 32,2 kDa, 26,6 kDa. Las proteínas más abundantes presentes en todos los EPT tuvieron pesos moleculares de 65,8 kDa, 56,4 kDa y 26,6 kDa. En base a la literatura y el marcador utilizado, las bandas de 42,7 a 31,7 kDa corresponderían presuntamente a la quimosina y pepsina. Los resultados demuestran que el tiempo de maceración mayor a 15 días no influye en el aumento de la fuerza coagulante ni la actividad lipolítica, pero sí incide en la actividad proteolítica.

**Palabras claves:** *cuajo, fuerza de cuajo, actividad proteolítica, actividad lipolítica, perfil electroforético.*

## I. INTRODUCCIÓN

La producción de quesos en el Perú es realizada por productores industriales y artesanales, donde el número de productores de este último es de 388 450, la mayoría distribuidos en zonas altoandinas (MIDAGRI, 2021). Para la elaboración de este producto es de suma importancia el uso del cuajo, cuya preparación es una de las prácticas biotecnológicas más antiguas de la actividad humana (Siguenza, 2024). El cuajo natural se obtiene a partir de métodos tradicionales sencillos y de bajo costo. Sin embargo, actualmente se encuentra desplazado por el uso del cuajo comercial u otras enzimas purificadas industrialmente (Meza y Ochazara, 2021). Así mismo, aún prevalecen los productores que continúan elaborando y utilizando cuajos naturales de origen animal como es el caso del Centro Poblado Pariahuanca, distrito de Los Morochucos, provincia de Cangallo de la región de Ayacucho. Los productores de esta comunidad elaboran los quesos mediante procedimientos empíricos heredados por sus antecesores y la gran mayoría de ellos no emplean cuajos comerciales, sino, los elaboran a partir del estómago de ganado porcino, bovino y de alpaca.

Los queseros de Pariahuanca prefieren emplear el cuajo natural, porque otorga una textura peculiar y sabor particular a los quesos en comparación a los elaborados con cuajo comercial. Por tanto, lo siguen empleando y conocen empíricamente cuál de todos los cuajos naturales elaborados es el más efectivo en la producción de quesos artesanales. Este conocimiento no está reportado científicamente y para obtener esta evidencia se debe evaluar las muestras de cuajo natural empleando diversos métodos y procedimientos para determinar la fuerza de cuajo, actividad proteolítica, actividad lipolítica y establecer el perfil electroforético de las proteínas.

## **1.1. Objetivos**

### **1.1.1. Objetivo general**

Caracterizar la actividad enzimática y conocer las proteínas presentes en los cuajos porcino, bovino y de alpaca, según el tiempo de maceración.

### **1.1.2. Objetivos específicos**

1. Describir el proceso empírico de preparación y aplicación de cuajos naturales de origen animal para la obtención de quesos artesanales.
2. Determinar la fuerza de cuajo de las muestras obtenidas durante la maceración.
3. Determinar la actividad proteolítica y lipolítica de los cuajos naturales obtenidos durante la maceración.
4. Establecer el perfil electroforético de los cuajos naturales obtenidos durante la maceración.

## II. MARCO TEÓRICO

### 2.1. Antecedentes

Mujica y Hernández (2023) caracterizaron el cuajo líquido de alpaca, que se aplica directamente a la leche de vaca, y evaluaron su actividad coagulante. Para obtener el extracto enzimático centrifugaron los macerados en tubos Eppendorf a 6 330 rpm, se conservó el sobrenadante (cuajo) y se descartó el sedimento y la película superficial formada. Las muestras fueron usadas para determinar la cantidad de proteínas totales, tiempo de coagulación, actividad proteolítica y perfil electroforético. Los resultados de cantidad de proteínas totales fueron entre 29,80 a 52,91 mg/ml, el tiempo de coagulación fue en promedio 23 minutos y la electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) mostró siete proteínas con peso molecular entre 91,6 kDa y 15,3 kDa, mencionan que las proteínas con peso 18,4 kDa y 15,3 kDa fueron las más abundantes y corresponden a la quimosina y pepsina, respectivamente.

Bouras et al., (2022) tuvieron como objetivo optimizar los factores de pH y temperatura para la coagulación de la leche de camello con cuajo del mismo animal, cuajo de cabra y pepsina de pollo. Los abomasos fueron extraídos de camellos menores de un año, cabras de tres meses de edad y proventrículos de pollos menores de 50 días de edad. Así mismo, para la extracción enzimática cortaron los abomasos de alpaca y cabra en trozos pequeños y fueron macerados en NaCl 6% más ácido bórico 2%. La fuerza de cuajo resultó 1:4 166,67 US (Unidades Soxhelt) en cuajo de camello, 1:2 531,64 US en cuajo de cabra y 1:6 153,85 US en pepsina de pollo (US: 1ml o g de cuajo que cuaja cierta cantidad de leche en mililitros a 35 °C durante 40 minutos).

Guerrero (2019) evaluó la potencialidad de cuajos de crías lactantes de llama mediante la evaluación de su poder coagulante, actividad coagulante y el efecto

de la concentración y el pH en el tiempo de coagulación. Los cuajos fueron obtenidos a partir del compartimento III de alpacas con pocos días de haber nacido y que solo hayan ingerido leche, para luego ser macerados. El resultado obtenido en la fuerza de cuajo fue de 1:2 2018 US.

Martinez et al., (2019) tuvieron como objetivo evaluar los parámetros fisicoquímicos y microbiológicos de un coagulante lácteo proveniente de estómago de cerdo. Para la obtención del cuajo los estómagos fueron lavados, salados y deshidratados naturalmente. Los valores de pH del cuajo natural se encontraron en el intervalo de 4,44 a 4,90 y los de la fuerza de cuajo entre 1:840 US a 1:4 706 US, para los 15 cuajos evaluados.

Córdova y Paitan (2013) determinaron los parámetros para obtención y conservación de cuajo de bovino adulto. Los abomasos fueron comprados secos y pertenecían a bovinos de entre 4 a 6 años. Así mismo, para la extracción enzimática fueron cortados en trozos de 1cm por lado, se colocaron en HCl a cuatro diferentes pH (1,5; 2,0; 2,5 y 3,0) más solución salina al 3% y 5% y se dejó por 16 h a 18 °C. Las muestras de cuajo líquido fueron utilizadas para determinar la fuerza de cuajo según el porcentaje de sal y pH en la extracción y la temperatura de conservación. Los resultados obtenidos fueron de 1:513,52 con NaCl 3% y 1:451,34 US con NaCl 5%. Por otro lado, los cuajos extraídos con HCl a pH 1,5; 2,5 y 3,0 resultaron 1:0, 1:464,78 US y 1:338,82 US, respectivamente. Según la temperatura de conservación se obtuvo mayor poder coagulante a -198 °C siendo 1:683,76 US y a -7 °C con 1:418,58 US.

Alberto et al. (2014) estudiaron la digestibilidad *in vitro* de la proteína con crudos enzimáticos ricos en pepsina en sustitución de la enzima comercial. Para ello, obtuvieron las enzimas a partir del abomaso bovino y estómago de porcino adulto. Los crudos y sus fracciones purificadas fueron comparados según su cantidad de proteínas y actividad proteolítica. La determinación de proteínas totales fue realizada por espectrofotometría, también realizaron electroforesis SDS-PAGE para evaluar la presencia de la pepsina en los crudos enzimáticos y la actividad proteolítica se determinó empleando zimografía en gelatina como sustrato y en gel de poliacrilamida (15%). Los resultados en la electroforesis mostraron la presencia de pepsina con un peso molecular de 34 kDa y el pepsinógeno con 42 kDa, aproximadamente. También, Celis (2019) determinó los parámetros para la obtención y conservación del cuajo bovino, el cual fue preparado a partir del abomaso de bovinos de raza criolla de dos años. Para realizar la extracción

enzimática se cortaron trozos de tejido abomasal de 1cm<sup>2</sup> de tamaño, se colocó en HCl 0,032 M (pH 1,5; 2,0; 2,5 y 3,0), NaCl al 3% y 5% más benzoato de sodio al 0,1% como conservante. La extracción se dió durante 18 h a 14 °C. La fuerza de cuajo resultó 1:371 US.

Cisneros (2007) determinó la fuerza de cuajo y actividad proteolítica de siete cuajos artesanales de alpaca, llama, vicuña, ternero, cerdo, cabra y cordero. Estos cuajos se obtuvieron a partir del abomaso de crías lactantes (menores de 1 semana de vida), esta zona fue ubicada y luego rellena con trozos de manzana verde, sal y jugo de limón y secado durante un mes sobre fogón de una cocina rústica. Finalmente, terminado el secado, los abomasos desinfectados con alcohol 96%, fueron cortados en trozos medianos y macerados en suero de leche durante cuatro días. Los resultados reportados sobre la fuerza de cuajo fueron: vicuña 1:175 512 US, alpaca 1:120 519 US, ternera 1:108 127 US, llama 1:97 011 US, oveja 1:61 346 US, cabra 1:32 289 US y cerdo 1:26 561 US. Así mismo, los resultados sobre la actividad proteolítica fueron: vicuña 2,106 UI/mg, alpaca 1,282 UI/mg, vaca 1,257 UI/mg, llama 0,9040 UI/mg, oveja 0,439 UI/mg, cabra 0,241 UI/mg y cerdo 0,013 UI/mg (UI: una unidad equivale a la liberación de 1mg de L-tirosina por minuto a 35°C).

Bustamante et al., (2000) determinaron la actividad coagulante y lipolítica de pastas de cuajo artesanal de cordero. Para ello, utilizaron animales de 4 semanas de edad cuyos estómagos no contengan residuos de hierbas. Luego, el abomaso fue secado a 15 °C durante un mes y medio, se añadió cierta cantidad de sal (230, 330 y 500 g/kg del producto final) y se refrigeró a 4°C. Los resultados de la actividad lipolítica fueron expresados en unidad de actividad de lipasa (cantidad de enzima que produce 1 µmol de ácido butírico por minuto) y estos estuvieron en el intervalo de 5,9 a 26,9 UI/g. La mayor actividad lipolítica reportada fue en los cuajos secos: cuajos secos molidos con 230 g de sal resultó 24,5 UI/g y con 330g de sal se obtuvo 26,9 UI/g.

Calvo y Fontecha (2004) evaluaron la fuerza de cuajo, actividad proteolítica y lipolítica de pastas de cuajo artesanal elaborados a partir del abomaso de cabritos lactantes. La fuerza de cuajo obtenida fue de 1:8 000 US, la actividad proteolítica específica resultó 0,033 ± 0,033 UI/mg (µmol de ácido graso/min por mg, incrementos de 0,1 unidades de absorbancia a 440 nm por minuto y por mg de proteína) y la actividad lipolítica 0,87 ± 0,01 UI/mg (µmol de ácido butírico liberado de tributirina por minuto y por mg de proteína). También, realizaron la purificación

de una esterasa pregástrica y determinaron su masa molecular por filtración en gel FPLC en una columna Superdex 200 HR10/30 la cual resultó 53 kDa.

Kappeler et al., (2018) determinaron que el peso molecular de la quimosina recombinante de camello expresada en *Aspergillus niger* es de 40 kDa aproximadamente. Así mismo, Rho et al., (2019) estudiaron la estructura tridimensional de la pepsina de cerdo y su efecto frente a la desnaturalización con altas concentraciones de urea. Realizó electroforesis SDS-PAGE a la pepsina extraída de la mucosa del estómago de cerdo (SIGMA-ALDRICH) sin desnaturalizar para confirmar su pureza y el peso molecular resultó 38,3 kDa, cercano al valor teórico 34,55 kDa, como mencionan los autores. Attallah (2007) evaluó las características moleculares del gen de la quimosina aislada a partir del abomaso de crías lactantes de búfalo, bovino, camello y cerdo. Para el análisis molecular realizó electroforesis SDS-PAGE empleando un marcador Bio-Rad de peso molecular entre 14,4 y 200kDa. Los pesos moleculares de las bandas principales fueron 43 kDa, 40 kDa, 40 kDa y 30 kDa para el cuajo de camello, búfalo, vaca y de cerdo respectivamente. Así mismo, se observó una banda de menor tamaño de 16 kDa en la muestra de cuajo de vaca.

## **2.2. Marco conceptual**

**Cuajo:** producto que contiene enzimas coagulantes, principalmente la quimosina y pepsina, que es utilizado para la coagulación de la leche en la elaboración de quesos (Córdova y Paitan, 2013).

**Abomaso:** región del estómago de rumiantes donde se sintetizan enzimas coagulantes, se le denomina “estómago verdadero” porque es similar al de los animales no rumiantes. Es la principal fuente de cuajo natural (Álvarez et al., 2009).

**Maceración:** procedimiento mediante el cual se sumerge sustancias sólidas en medio líquido para extraer otros componentes (Ibáñez, 2015).

**Fuerza de cuajo:** expresa la capacidad coagulante determinado por el tipo de cuajo, concentración del cuajo, pH, temperatura e iones calcio. Determina la cantidad de leche que puede coagular 1ml o 1mg de cuajo natural (Barreto, 2010).

**Actividad proteolítica:** medida para expresar la capacidad proteolítica de las enzimas coagulante, determinado por el tipo de cuajo, concentración del cuajo, pH, temperatura e iones de calcio (Caal, 2015).

Actividad lipolítica: expresa la capacidad lipolítica de las enzimas coagulante para degradar lípidos en sus glicerol y ácidos grasos. La lipólisis está determinada por el tipo de cuajo, concentración del cuajo, pH, temperatura e iones de calcio (Ferrandini, 2006).

Electroforesis SDS-PAGE: técnica empleada para separar proteínas según el peso molecular. Emplea el dodecilsulfato sódico (SDS) que desnaturaliza y otorga carga negativa a las proteínas (Carillo, 2012).

## **2.3. Marco teórico**

### **2.3.1. Cuajo animal**

El cuajo es un producto obtenido mayormente de los cuajares de los rumiantes lactantes el cual posee ciertas enzimas capaces de lograr la coagulación de la leche (Ferrandini, 2006). Estas son dos proteasas aspárticas: quimosina y pepsina, las cuales son secretadas en la mucosa interna del abomaso (cuajar), en caso de los rumiantes (Córdova y Paitan, 2013), e hidrolizan la caseína sin generar una elevada proteólisis, lo cual permite la elaboración de quesos (Quijano, 2010) Existen distintos tipos de cuajo de acuerdo a su origen, estos son (Bravo, 2018) :

- Animal: donde el cuajo es obtenido a partir del cuajar de terneros, vacas adultas, cerdos, cabritos y camellos.
- Vegetal: proveniente de plantas como *Galium verum* “galio”, *Cynara cardunculus* “cardo”, ortigas, malva y hiedra de tierra.
- Microbiológico: el cuajo se obtiene a partir de los hongos: *Rhizomucor miehei*, *Endothia parasítica* y *Rhizomucor pusillus*.
- Transgénico: cuajo producido por *Escherichia coli*, *Kluyveromyces lactis* y *Aspergillus niger* a partir de una modificación genética.

El cuajo animal se puede preparar de dos formas: natural, donde el cuajo se obtiene directamente del cuajar (cuarto estómago en mamíferos rumiantes), presentándose ya sea en forma líquida o en pasta; y comercial, donde el cuajo se prepara industrialmente, posee mayor pureza y se venden en pastillas, polvo o líquido (Dubach, 2000).

#### **2.3.1.1. Características del cuajo animal**

El cuajo presenta las siguientes características (Córdova y Paitan, 2013):

- Su temperatura óptima es 40 °C (mejor actividad proteolítica) y se desnaturaliza a 60 °C.

- El pH óptimo para la actividad proteolítica es de 5,5 – 6,0.
- Resistente a la acción de ácidos.
- Se altera en presencia de luz.

### 2.3.2. Producción de cuajo animal

Existen diversas técnicas para la obtención del cuajo animal, estas se diferencian debido a las costumbres y características de cada región donde se realice. Pese a ello, todos los procedimientos poseen ciertas similitudes (Moschopoulou et al., 2007).

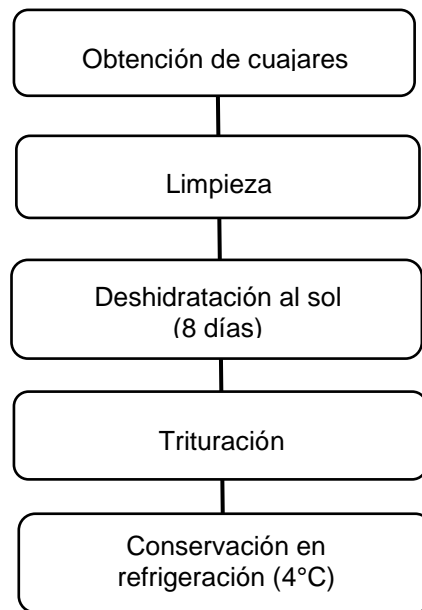
La coagulación de la leche varía ampliamente según la preparación e incorporación del cuajo que realiza cada productor, por ejemplo, algunos incorporan un trozo del cuajar directamente a la leche o realizan un raspado al cuajar para agregarlo después a la leche, otros prefieren rellenar el cuajar con leche o agua para dejarlo macerar unos días y después agregarlo a la leche. Por ello, las diversas cantidades de cuajo agregado afecta en el tiempo de coagulación de la leche (Molinos, 1981).

El cuajo animal líquido puede ser obtenido según los procedimientos realizados por Alais (2003), Bonafede (2017), López (2003), De Soroa (1990) e Ibañez (2015). El protocolo adaptado a partir de estos autores se ajusta a lo siguiente:

1. **Tratamiento de la materia prima.** Los abomasos de terneros y bovinos adultos se conservan en salmuera de 75 g NaCl por litro. Se recomienda que estos sean guardados en refrigeración a 4 °C (López, 2003).
2. **Acondicionamiento.** Los abomasos se colocan en salmuera, antes de ello no deben ser lavados ni volteados, para no generar pérdida de enzimas (De Soroa, 1990). Los estómagos que contienen residuos alimentarios y que necesiten ser lavados reiteradamente son descartados para la producción de cuajos de alta pureza (Talledo, 2020).
3. **Secado.** Ubicar los abomasos en un ambiente aireado con temperatura de 25 °C - 30 °C. Este procedimiento tiene objetivo insolubilizar tejidos u otros elementos adheridos al abomaso, lo cual facilitará el filtrado (Ibañez, 2015). Se recomienda realizar el secado durante 20 días (De Soroa, 1990).
4. **Cortado.** Para una fácil y mayor extracción enzimática se corta el abomaso en trozos pequeños, aquellos que son cercanos al píloro no serán de utilidad, porque estos poseen pocas enzimas que intervienen en la coagulación de la leche (Alais, 2003).

- 5. Macerado.** Este proceso permite una mayor extracción de las enzimas y proenzimas (precursores inactivos) ubicadas en la pared del abomaso (Alais, 2003). Este es colocado en una solución compuesta de sal y algún antiséptico para inhibir el desarrollo bacteriano y lograr una óptima extracción de las enzimas (Ibáñez, 2015). Según Rivera (2012), la solución del macerado debe contener 60% de cuajo, 25% de suero y 15% de jugo de limón. Las condiciones de acidez y salinidad deben ser óptimas para la extracción de las enzimas en su forma activa, debido a que los zimógenos de la quimosina y pepsina requieren de un pH ácido para adquirir su forma activa (Sandoval et al., 2008). La quimosina se sintetiza inicialmente como preproquimosina, la cual contiene una péptido señal de 16 aminoácidos que al ser escindida genera la proquimosina. Las condiciones ácidas permiten la eliminación de un fragmento de 42 aminoácidos de la proquimosina obteniendo finalmente la quimosina en su forma activa para la coagulación de la leche (Cano, 2015; Pedersen y Foltmann, 1975). El precursor de la pepsina se denomina pepsinógeno, el cual, en condiciones ácidas, sufre la eliminación de 44 aminoácidos, obteniendo finalmente pepsina activa (Bryksa et al., 2003; Sankalia et al., 2007). El tiempo de maceración es entre los 4-12 días, esto va depender del porcentaje de sal contenida en la solución (Talledo, 2020). Además, no es recomendable dejar la maceración por mayor tiempo debido a que la solución se enriquece de proteínas y genera mayor crecimiento microbiano (Alais, 2003).
- 6. Filtrado.** Este procedimiento tiene como objetivo separar los tejidos y otras impurezas de la solución macerada haciendo uso de lienzos o telas de algodón. Posteriormente, se puede realizar una clarificación con sustancias precipitantes (ácido acético, ácido láctico, etc), filtros o centrifugación, lo cual eliminará las impurezas restantes que afectan en la coagulación de la leche (Alais, 2003).
- 7. Activación.** En la maceración se obtienen enzimas y proenzimas a partir de la pared del abomaso, los precursores inactivos necesitan un tiempo de maduración para que estas puedan activarse (Quijano, 2010). Esta activación puede ser rápida a pH 2, donde la enzima pierde estabilidad en presencia de  $\text{CaCl}_2$  y lenta a pH 4-5. (Alais, 2003).
- 8. Conservación.** Algunos autores recomiendan una temperatura menor de 15 °C, si es mayor a esta las enzimas se degradarán y disminuirá la fuerza de

cuajo; además deberán protegerse de la acción de la luz o rayos solares y del aire (Torres, 2001).



**Figura 1.** Diagrama de la obtención de cuajo animal natural (Rivera, 2012).

### 2.3.3. Anatomía y fisiología digestiva

#### 2.3.3.1. Porcino

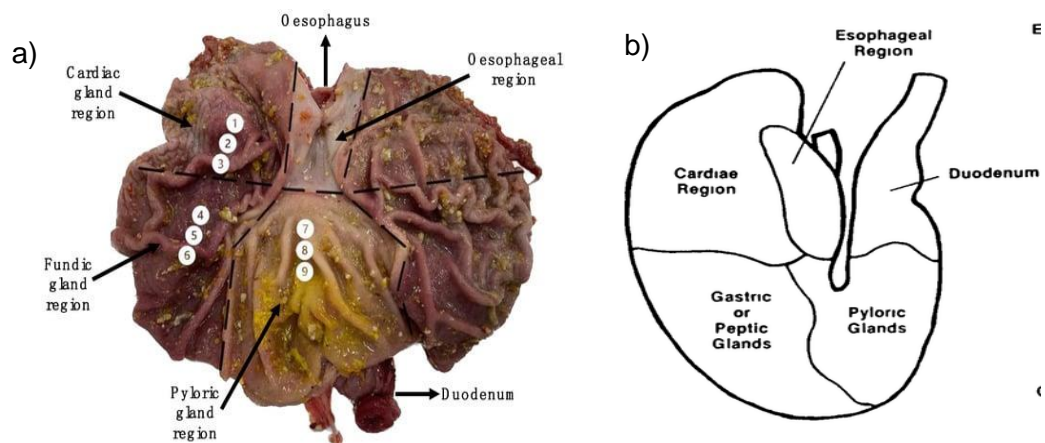
Este animal presenta un estómago monogástrico donde se almacena e inicia la degradación de los alimentos mediante enzimas y ácido gástrico (Valdivieso, 2019). Poseen un estómago menos complejo que los rumiantes y relativamente de mayor tamaño a comparación de otro monogástricos debido a su dieta omnívora (Navarro, 2022).

#### **Estómago**

Este órgano se encuentra situado entre el esófago y el intestino delgado. Los cerdos poseen un estómago con una sola cavidad, es decir, es monogástrico. Su función principal es la degradación de los alimentos ingeridos gracias a los jugos digestivos y las enzimas (Rojo y González, 2013). Estas son sintetizadas en la mucosa gástrica, la cual se diferencia de acuerdo a las regiones del estómago (Valdivieso, 2019). Existen 4 regiones:

- **Región esofágica.** Se encuentra en la entrada del estómago, aquí no se segregan enzimas digestivas ni mucosidad. Las úlceras gástricas tienden a formarse en esta región (DeRouchey, 2014).

- **Región cardias.** En esta región se encuentran las glándulas cardiales que segregan mucus el cual se mezclará con los alimentos (Rojo y González, 2013)
- **Región fúndica.** En esta región ocurre la degradación de los alimentos, debido a que aquí se encuentran las glándulas gástricas, las cuales segregan ácido clorhídrico (HCl), por ende, el pH de esta zona se encuentra entre 1,5 a 2,5 (DeRouche, 2014). Así mismo, las glándulas fúndicas segregan proenzimas de relevancia llamadas pepsinógeno y proquimosina, estas al encontrarse en condiciones de acidez sufrirán hidrólisis en sus estructuras transformándose finalmente el pepsinógeno en pepsina y la proquimosina en quimosina (Vilches y Núñez, 2005). La primera está involucrada mayormente en la degradación de proteínas durante la digestión y la segunda participa en la proteólisis de la caseína, lo cual genera la coagulación de la leche (Doyle et al., 2001).
- **Región pilórica.** En esta región se encuentran las glándulas pilóricas que segregan mucus cuya función es proteger la pared gástrica de esta zona, debido a que el alimento digerido tendrá un pH ácido al pasar por esta región (Rojo y González, 2013).



**Figura 2.** Ilustración de estómago porcino. a) Vista externa del estómago porcino (Kiernan et al., 2023), b) Compartimentos del estómago porcino (Van Hess, 2022).

### 2.3.3.2. Bovino

Los bovinos son animales poligástricos, es decir, presenta un estómago con más de una cavidad (Rojo y González, 2013). La anatomía de su estómago es compleja debido a la alimentación que posee, porque estos se alimentan de forrajes o pastos los cuales están compuestos por celulosa, hemicelulosa y

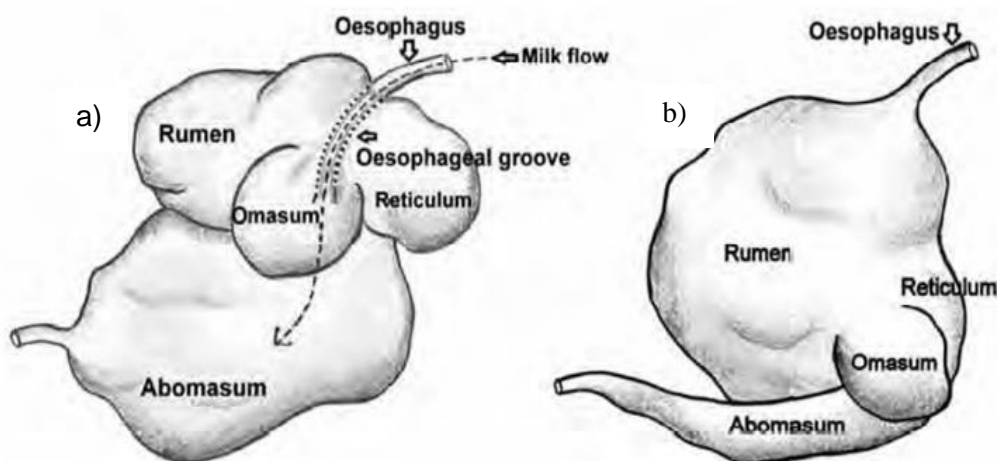
pectina que serán digeridos en su totalidad por estos animales a diferencia de los animales monogástricos quienes no pueden realizar la digestión de estos compuestos (Relling y Mattioli, 2002). Por ello, existe diferencia en la anatomía de sus estómagos, siendo el abomaso la estructura en común entre estos animales (Konig et al., 2005).

### **Estómago**

Los bovinos poseen un estómago poligástrico que ocupa gran parte de la región abdominal (Relling y Mattioli, 2002). Este órgano complejo presenta cuatro cavidades o compartimentos, estos son: el retículo o bonete, rumen o panza, omaso y abomaso (Sisson et al., 2000). Los tres primeros compartimentos se denominan proventrículos, debido a que están cubiertos por una membrana mucosa sin glándulas que secreten enzimas a diferencia del último compartimento que sí las posee y llevará a cabo una digestión verdadera como un estómago monogástrico (Caravaca et al., 2005).

- **Rumen.** Es el compartimento de mayor tamaño, está revestido por epitelio pluriestratificado, sin presencia de glándulas y consta de una capa muscular que permite su contracción (Rojo y González, 2013). Así mismo, presenta surcos que separan la cavidad en sacos: dorsal, ventral, caudal y craneal, este último saco permite la rumia porque participa directamente en el regreso del alimento hacia el retículo (Konig y Liebich, 2008). El rumen contiene microorganismos que fermentan los alimentos ingeridos y generan ácidos grasos como producto de la fermentación (Molina, 2020). Estos ácidos serán absorbidos por las papilas del rumen, las cuales presentan diversas formas dependiendo al tipo de alimentación del animal (Konig y Liebich, 2008)
- **Retículo.** Es el compartimento más pequeño, posee forma de pera y está conformado por epitelio plano estratificado con presencia de papilas tuberosas (Molina, 2020). Se le denomina así debido a que esta región posee pliegues dispuestos en forma de redes que se llaman crestas del retículo, las cuales generan celdillas dando una apariencia en forma de panal (Konig y Liebich, 2008). Así mismo, este comportamiento está conectado con el rumen a través de un pliegue el cual forma una unidad donde la función principal de esta es mover el alimento hacia el rumen para que se lleve a cabo la regurgitación (Álvarez et al., 2009).

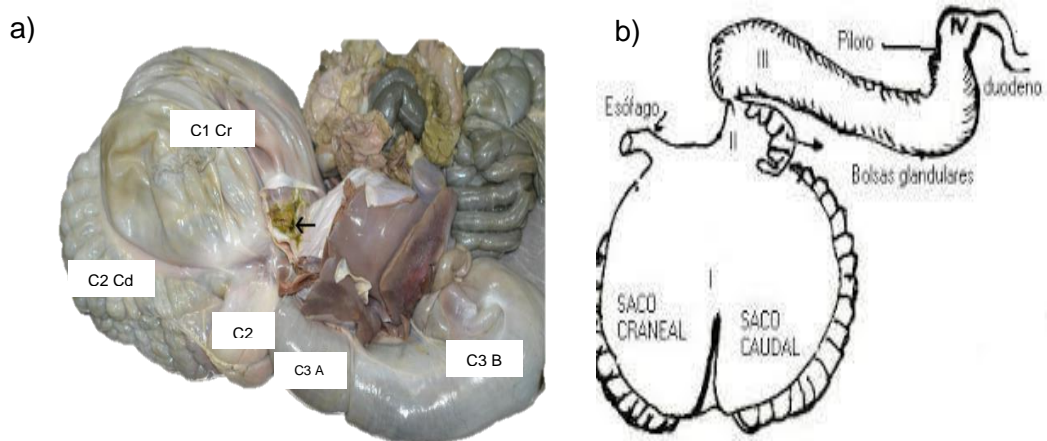
- **Omaso.** Posee forma esférica, compuesta de láminas de diverso tamaño que le otorga apariencia de librillo (Fidalgo et al., 2003). Este compartimento presenta dos regiones diferenciadas llamadas cuerpo y canal omasal que están revestidas por tejido muscular, lo cual permite la compresión de los alimentos ingeridos produciendo la reducción de su tamaño (Konig y Liebich, 2008). También, cumple la función de absorción de agua, sales minerales y ácidos grasos restantes; y participa en el transporte del bolo alimenticio hacia el abomaso (Molina, 2020). Además, el abomaso sufre ciertas modificaciones de acuerdo al tipo de alimentación mas no por la edad del animal (Álvarez et al., 2009).
- **Abomaso.** Es el cuarto compartimento llamado estómago verdadero, posee forma alargada, está ubicado entre el omaso y el rumen, recubierto de epitelio cilíndrico simple y contiene pliegues espirales (Rojo y González, 2013). Esta región es similar estructuralmente y funcionalmente al estómago de los animales monogástricos, porque posee fondo, cuerpo y extremo pilórico; y se da la digestión verdadera de los alimentos debido a su mucosa glandular que segrega ácidos y enzimas (Álvarez et al., 2009). Su función principal es la digestión de la leche en los lactantes, esto se debe a que sintetiza la proquimosina que en medio ácido se activa a su forma de quimosina, la cual desestabiliza la caseína de la leche y logra su coagulación (Caal, 2015). Este compartimento tiende a ser el de mayor tamaño a comparación de otros en los bovinos lactantes y a media que llega a la adultez este se reduce (Konig y Liebich, 2008).



**Figura 3.** Ilustración de estómago bovino adulto y lactante. a) Estómago de bovino lactante, b) Estómago de bovino adulto (Bakhteeva y Timofeev, 2022).

### 2.3.3.3. Camélidos sudamericanos (CSA)

Estos animales presentan un estómago poligástrico con tres compartimentos denominados: CI, CII y CIII (Yaranga, 2009). Aunque estos animales realicen la rumia poseen un estómago diverso al de los bovinos, donde el CI es análogo al rumen, el CII comparable con el retículo y el CIII análogo con el omaso en la sección proximal y con el abomaso en la sección distal (Bustinza, 2001; Wang et al., 2000). El compartimento CI es la de mayor tamaño, contiene sacos glandulares en la zona caudal, el CII es la de menor tamaño con presencia de trabéculas dispuestas en red con sacos glandulares y el CIII presenta forma alargada, tubular (Baroni y Suárez, 2017) con presencia de mucosa glandular secretora de ácido clorhídrico y enzimas (Dittmann et al., 2015). Este último compartimento secreta enzimas como la quimosina y pepsina, las cuales participan en la coagulación de la leche (Mujica y Hernández, 2023). Así mismo, todos los compartimentos cumplen la función de absorción de agua y nutrientes, pero la fermentación de los ingeridos solo se realiza en el CI y CII (Bustinza, 2001).



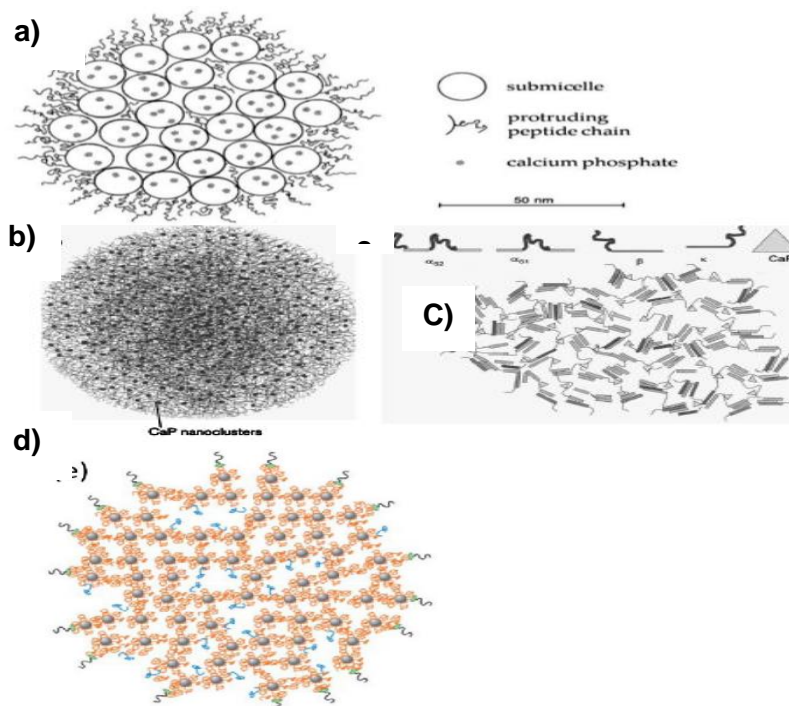
**Figura 4:** Ilustración de estómago de camélido sudamericano. a) Apariencia del estómago de camélido sudamericano, C1Cr: Cavidad1 craneal; C1Cd: cavidad 2 caudal; C2: cavidad 2; C3 A: cavidad 3 proximal; CE B: cavidad 3 distal (Baroni y Suárez, 2017), b) Compartimentos del estómago de camélido sudamericano (Yaranga, 2009).

### 2.3.4. Actividad coagulante

La coagulación de la leche consiste en la alteración fisicoquímica de la caseína presente y depende de factores como: pH, temperatura y presencia de iones calcio

(Llorente, 2000). La desestabilización de las micelas de caseína puede darse por tres métodos (Del Castillo y Metres, 2004):

- Por enzimas: la coagulación se realizará por acción de dos enzimas proteolíticas llamadas quimosina y pepsina, las cuales al hidrolizar la caseína producen su desestabilización generando la coagulación de la leche (Battro, 2010).
- Por acidificación: la coagulación ácido láctica se produce por la adición directa de ácidos o por la fermentación de las bacterias ácido lácticas (BAL) en la leche (Hallén, 2008). Este cambio de pH cercano al punto isoelectrico de la caseína (pH 4,5) produce su floculación formando una estructura reticular cuya característica va depender de la velocidad de acidificación (González et al., 2017). Es decir, al adicionar ácidos se desarrolla una acidificación rápida cuyo resultado es un cuajado grumoso y discontinuo, en cambio, al utilizar BAL se desarrolla una acidificación lenta donde el cuajado es continuo y firme (Del Castillo y Metres, 2004).
- Mixta: este método de coagulación une la acidificación y la acción de enzimas coagulantes, donde las características del cuajado van a depender de la proporción entre la acidez y la cantidad enzimas (González et al., 2017).



**Figura 5.** Modelos de la micela de caseína. a) Modelo de submicela (Walstra, 1999), b) Modelo nanocluster (Holt y Horne, 1996), c) Modelo de doble enlace (Horne, 1998), d) Modelo Dalglish (Dalglish y Corredig, 2012).

### 2.3.5. Proteínas totales

#### Método Bradford

Este método se usa ampliamente para la determinar la concentración de proteínas, debido a que es un protocolo fiable, rápido, repetible, estable y sensible a la presencia de proteínas (Bradford, 1976; Ernst y Zor, 2010). Consiste en la formación de un complejo coloreado a partir de la unión no covalente del colorante azul de Coomassie G-250 con las proteínas, específicamente con los aminoácidos básicos o aromáticos (Wenrich y Trumbo, 2012). El colorante presenta diversas formas iónicas y estas poseen diferentes espectros de absorción, las formas más catiónicas, roja y verde, tienen una absorbancia máxima de 470 nm y 650 nm, respectivamente (Kruger, 2009). Por el contrario, la forma aniónica presenta coloración azul y su absorbancia máxima es 595 nm (Kruger, 2009), la presencia de proteínas genera la formación de la forma aniónica debido a la interacción que se realiza entre el grupo sulfónico del colorante y el grupo catiónico de algunos aminoácidos como la lisina y arginina, principalmente (Compton y Jones, 1985). En consecuencia, se genera la coloración azul con la cual se estima la cantidad de proteína midiendo la absorbancia a 595 nm, donde la intensidad del color es proporcional a la concentración de proteínas (Harris, 2003).

### 2.3.6. Fuerza de cuajo

La fuerza de cuajo es la potencia que posee este para coagular la leche (Bastos y Fernandes, 2018), es decir la cantidad de mililitros o gramos de leche que es coagulado por un mililitro o un gramo de cuajo a 35 °C en 40 minutos (Barreto et al., 2010). Esta expresión cuantitativa se calcula mediante la siguiente fórmula (Osorio et al., 2008):

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

Donde:

F= fuerza de cuajo

V= cantidad de leche en mililitros (ml)

C=cantidad de cuajo en mililitros (ml)

T=tiempo de coagulación en segundos (s)

2400= 40 minutos en segundos, tiempo regular de coagulación de un cuajo estándar a 35 °C.

La fuerza de cuajo microbiano es de 1:25 000 US (Unidades Soxhelt), fuerza de cuajo en polvo es de 1:100 000 US y 1: 150 000 US (Gastalver, 2015), fuerza de cuajo líquido 1:2 000 US y 1:5 000 US, fuerza de extracto de cuajo 1:10 000 US y 1:15 000 US y fuerza de cuajo cristalizados es de 1:10 000 000 US (Alais, 2003).

### **2.3.7. Actividad proteolítica**

En diversas etapas de la elaboración del queso existe actividad proteolítica generada por proteasas de la leche, enzimas coagulantes y microorganismos (Ferrandini et al., 2011). Durante la coagulación de la leche ocurre la proteólisis de la caseína generada por el cuajo animal, el cual presenta dos enzimas coagulantes llamadas quimosina y pepsina, cuya proporción en el abomaso de animales rumiantes lactantes es de 80 a 90% de quimosina y 10 a 20% de pepsina, lo cual está influenciado por la edad del animal y su alimentación (Caal, 2015). Es decir, a medida que el animal se convierte adulto la proporción de estas enzimas se invierten conteniendo 10 a 20% de quimosina y 80 a 90% de pepsina (Bonafede, 2017).

#### **2.3.7.1. Quimosina**

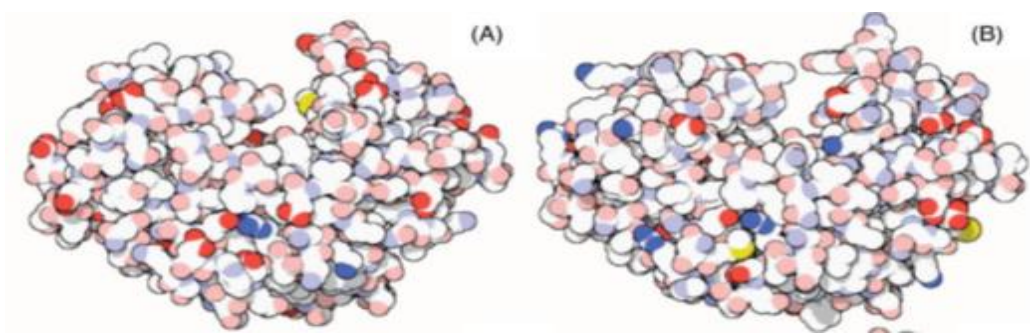
Esta enzima pertenece al grupo de las proteasas aspárticas, la cual es secretada y almacenada en su forma inactiva como pre y proquimosina, que se activa en medio ácido (pH 3,8 a 4,0) (Gomes, 2021). La proquimosina bovina presenta peso molecular de 40,7 kDa (Attallah, 2007) y la quimosina 31 kDa (Quijano, 2010), 35,6 kDa (Gilliland et al., 1990), 35 kDa (Kappeler et al., 2018). Esta enzima posee tres variantes, donde una mutación puntual en un residuo de la posición 244 distingue la forma A (Asp) de la B (Gly) (Mohanty et al., 1999). Por otro lado, la forma C es una variante separada producto de una mutación a partir de la forma A (Rampilli et al., 2005). La quimosina A posee mayor actividad proteolítica frente a la kappa-caseína que la quimosina B debido a que se genera mayor estabilidad electrostática al formarse el complejo quimosina A-caseína (Mohanty et al., 1999). La coagulación se desarrolla en dos etapas, en la primera la quimosina hidroliza el enlace entre los aminoácidos Phe105 y Met106 de la k-caseína (Bedolla et al., 2004), esto genera la desestabilización de la estructura de la caseína obteniendo dos fragmentos peptídicos: la parakappacaseína que contiene los aminoácidos de 1 al 105, es hidrofóbico, catiónico y de estructura secundaria estable (Mollé y Léonil, 2005) y el otro fragmento corto denominado caseinomacropéptido (hidrofílico) (Quijano, 2010; Sbodio y Revelli, 2012). En la segunda etapa, la

parakappacaseína se une con iones de calcio formando una estructura gelatinosa, esto se debe a que los residuos de fosfoserina, producto de la hidrólisis, permiten la fácil fijación de los iones calcio generando la unión con otra parakappacaseína mediante enlaces calcio generando la agregación de micelas (Lucey, 2002) y la caseinomacropéptido al ser polar estará contenido en el suero (Bedolla et al., 2004).

### **2.3.7.2. Pepsina**

La pepsina es una proteinasa aspártica con 326 aminoácidos, posee una estructura terciaria bilobal, donde los residuos 1-175 forman el lóbulo N-terminal y los residuos 176-327 constituyen el lóbulo C-terminal, presenta dos residuos de ácido aspártico en su sitio activo (Cooper et al., 1990), contiene fósforo en su estructura (Alais, 2003), y posee una masa molecular aproximada de 36 kDa, se sintetiza como proenzima llamada pepsinógeno con masa molecular 40 kDa, la cual se encuentra estable a pH > 6 y se activa en medio ácido (Raufman, 2004). La acidez genera la protonación de los grupos carboxilato y la repulsión de las cargas positivas netas que interrumpen las interacciones electrostáticas, lo cual desbloquea el sitio activo y activa a la enzima (Tang, 2013). Así mismo, un pH >7,2 o una temperatura >65 °C genera la desnaturalización irreversible de la pepsina mientras que el pepsinógeno es estable a un pH de 10 y 100 °C. (Raufman, 2004).

La pepsina posee ciertas similitudes a la quimosina como: son proteinasas del ácido gástrico, derivan de zimógenos (pepsinógeno y proquimosina, respectivamente), tienen aproximadamente los mismos pesos moleculares, 35,0 kDa (pepsina) y 35,6 kDa (quimosina) (Rolet et al., 2016) y actúan de manera similar sobre el enlace peptídico de la  $\kappa$ -caseína hidrolizando el enlace Phe105 y Met106 (Yang et al., 2022). Sin embargo, posee diferencias como: la sensibilidad al pH y la temperatura, y la relación entre actividad coagulante con la actividad proteolítica (Fox et al., 2017). Por ello, la proporción de quimosina y pepsina es importante ya que afecta en la actividad proteolítica de la leche (Rolet et al., 2016).



**Figura 6.** Ilustración de la pepsina porcina y quimosina mostrando la hendidura del sitio activo generado por Protein Data Bank-PDB. A) Pepsina porcina, B) Quimosina (Uniacke-Lowe, 2017).

### 2.3.8. Actividad lipolítica

La lipólisis es el proceso metabólico mediante el cual los triacilglicérols (TAG) se descomponen mediante hidrólisis en sus moléculas constituyentes: glicerol y ácidos grasos libres (AGL) (Nielsen et al., 2014). Este proceso enzimático es esencial para el desarrollo del sabor del queso, debido a que los AGL participan en diversas reacciones catabólicas cuyos productos (componentes volátiles) influyen en el sabor, aroma y textura del queso (Ivanov et al., 2016). Las enzimas lipolíticas participan en la lipólisis y provienen de la leche cruda (lipoproteínlipasa, asociada a las micelas de caseína), el cuajo (triacilglicérol lipasa en pasta de cuajos) (Lambré et al., 2021) y la microbiota iniciadora y no iniciadora del queso (Thierry et al., 2017). Por otro lado, las bacterias ácido lácticas poseen baja actividad lipolítica y cuentan con esterases ubicadas intracelularmente (Thierry et al., 2017). Así mismo, la actividad y la cantidad de las lipasas dependerán del tipo de cuajo utilizado, lo cual influye en las características finales del queso (Santillo et al., 2009).

La actividad lipolítica se determina según la cantidad de ácido grasos producidos por acción de las lipasas y esterases, las cuales son obtenidas mayormente a partir de tejido pancreático de porcino y del abomaso de rumiantes lactantes (Ferrandini, 2006). Adicionalmente, los productores industriales de queso obtienen estas enzimas del cuajo que utilizan en la coagulación y de cultivos iniciadores a base de moho (Gómez et al., 2002). Una de las lipasas más activas es la triacilglicérol acilhidrolasa.

- **Triacilglicérol acilhidrolasa.** Cataliza la hidrólisis de triacilglicérols a glicerol, diacilglicérols, monoglicérols y ácidos grasos libres (Treichel et al., 2010). Así mismo, hidroliza de preferencia enlaces éster en las posiciones uno y tres de la molécula de triacilglicérol, también hidroliza los enlaces éster de otros lípidos, incluidos los fosfolípidos y los glicolípidos (Lambré et al., 2021).

De Caro et al., (1995) menciona que estas lipasas gástricas son glicoproteínas con pesos moleculares de aproximadamente 50 kDa. También, esta enzima producida transgénicamente por el hongo *Rhizopus javanicus* posee un peso molecular de 36 kDa (Uyttenbroeck et al., 1993), la generada por *Aspergillus luchuensis* posee un peso de 36 kDa (Lambré et al., 2023) y el peso molecular de la lipasa gástrica humana recombinante es de aproximadamente 45 kDa (NovoPro Bioscience Inc. ®, cat. 502056) y la nativa pesa 50 kDa (Roussel et al., 1999).

### **2.3.9. Electroforesis SDS-PAGE**

La electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) fue descrita por Laemmli en 1970, donde emplea dodecilsulfato de sodio (SDS) con la finalidad de obtener una separación analítica de alta resolución de mezclas complejas de proteínas (Laemmli, 1970) para lograr su caracterización (Carrillo, 2012). Esta es una de las técnicas electroforéticas que se usa comúnmente para separar proteínas complejas según el peso molecular (Saraswathy y Ramalingam, 2011) aplicando cierto voltaje para su desplazamiento en la matriz porosa (Córscico et al., 2013). Este método no separa las proteínas por su carga neta, debido a que se formarán complejos cargados negativamente producto de la reacción con el detergente aniónico dodecilsulfato de sodio (SDS) (Roy y Kumar, 2012). Así mismo, las proteínas se desnaturalizan por acción del SDS debido a que este detergente elimina las estructuras proteicas secundarias y terciarias y se obtienen cadenas polipeptídicas (Roy y Kumar, 2012).

En la actualidad, existen dos sistemas de electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida que se diferencian según la aplicación del buffer, estos son:

**a) El sistema continuo de Weber y Osborn.** En este sistema se utiliza un solo amortiguador para la muestra, el gel y el tanque del gel a pH constante (Weber y Osborn, 1969). También, se utiliza un gel con una sola concentración continua, esto genera una matriz uniforme donde las proteínas avanzarán directamente en el gel (Singh y Kumar, 2022). Las proteínas se desplazarán a mayor velocidad en el pocillo que en el gel separador, lo cual genera una banda concentrada cuyo tamaño dependerá del volumen de carga de la muestra (Swamy, 2008). Esta formación genera inconvenientes en la corrida mayormente cuando las proteínas que se separan varían mucho en su tamaño (Singh y Kumar, 2022). La ausencia del efecto concentrador de las muestras genera bandas de proteínas difusas y de baja resolución (Gerstein, 2004), por

ello este sistema se usa inusualmente en el análisis de proteínas y se usa mayormente para el análisis de ácidos nucleicos (Steward, 2024). Así mismo, su preparación es más fácil y se puede emplear diversos tipos de buffers, siendo el tipo de proteínas a examinar el condicionante para la elección (Pérez et al., 2015).

**b) El sistema discontinuo o de Laemmli.** Este tipo de sistema utiliza diferentes amortiguadores con diversos pH en el gel y en el tanque del gel para la corrida. (Singh y Kumar, 2022). Estas diferencias afectan la fuerza iónica y la movilidad de las macromoléculas, siendo relevante para una separación óptima de las proteínas (Voet y Voet, 2006). También, se utiliza un gel separado en dos secciones por diferencia de tamaño de poro y distinta composición de buffer, estos se denominan gel concentrador y separador (Laemmli, 1970).

- **Gel concentrador.** Presenta menor longitud y poros de mayor tamaño que el gel separador; la concentración de acrilamida en este gel es menor para formar poros grandes donde se concentren las proteínas y así incrementar la resolución de las bandas (Zavala, 2005).
- **Gel separador.** Presenta mayor longitud y poros pequeños para separar las proteínas según su tamaño (Pérez et al., 2015). La concentración de acrilamida en este gel dependerá de la proteína en evaluación, si se desea observar proteínas de bajo peso molecular se debe incrementar el porcentaje de acrilamida (González, 2009).

En adición, este sistema permite colocar grandes volúmenes de proteína diluida y obtener bandas de alta resolución que la obtenida con los sistemas continuos (Singh y Kumar, 2022).

Después de realizar la electroforesis SDS-PAGE se obtienen proteínas separadas que requieren de técnicas para ser visualizadas y la más empleada es la coloración con azul de Coomassie debido a que es un método fácil y rápido (Gallagher y Chakavarti, 2008). Esta tinción muestra bandas de color azul y puede detectar hasta 0,1 µg de proteína (Voet y Voet, 2006). Además, existe otro método más sensible que es la tinción con plata, donde las proteínas se observan como bandas de color marrón o negro, pero su ejecución es más dificultosa (Dell y Bonifacino, 2001).

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Ubicación del lugar de estudio

La investigación se realizó en el Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, provincia de Huamanga, región Ayacucho a una altitud de 2 761 msnm.

#### 3.2. Colecta de muestras

El muestreo fue no probabilístico. Se colectaron 10 abomasos de *Bos taurus* “vaca” o “toro” de 13 a 17 meses de raza criolla, 10 abomasos de *Sus scrofa domestica* “cerdo” machos de edad entre 8 a 12 meses de raza criolla y 10 abomasos de *Vicugna pacos* “alpaca” hembras de 2 a 3 años fenotipo Huacaya, colectados en tres mataderos: Los Morochucos (distrito Morochucos, Ayacucho), Matadero de Quicapata (distrito Quicapata, Ayacucho) y Matadero Municipal de Huancavelica (Departamento de Huancavelica).

#### 3.3. Población y muestras

La población estuvo conformada por todos los cuajos naturales preparados a partir de porcino de edad entre 8 a 12 meses de raza criolla, de bovino de edad entre 13 a 17 meses de raza criolla y de alpaca de 2 a 3 años fenotipo Huacaya, y se tomó como muestra 10 cuajos naturales de cada especie, siendo en total 30 muestras.

#### 3.4. Obtención del cuajo natural

Se obtuvo el cuajo animal natural basado en los procedimientos tradicionales empleados por una productora local de Pariahuanca (Antonia de la Cruz de Calderón, comunicación personal, 2023).

#### **3.4.1. Colecta del abomaso fresco**

Se recolectaron las siguientes muestras de estómago:

- 10 muestras de abomaso fresco bovino (Matadero de Quicapata y Matadero Los Morochucos) de edad entre 13 -17 (vaquilla) de raza criolla.
- 10 muestras de estómago fresco porcino machos (Matadero Los Morochucos) de edad entre 8-12 meses de raza criolla.
- 10 muestras de compartimento III de estómago de alpaca de 2-3 años (camal Municipal de Huancavelica) de la raza Huacaya.

#### **3.4.2. Preparación y secado del cuajo**

- Se limpiaron los tejidos grasos mediante lavados con agua potable para eliminar el contenido alimentario.
- Se agregaron 3 ml de jugo de limón sobre el abomaso limpio para eliminar los microorganismos.
- Se molieron y pesaron 30 g de sal granulada, 40 g de *Muehlenbeckia volcanica* “mullaca” y 50 g de manzana verde.
- El abomaso se relleno con los materiales previamente molidos. Luego, se agregó 10 ml de leche fresca y se sujetaron ambos extremos con una cinta.
- El abomaso fue secado cerca al fogón de la cocina rústica durante 2,5 meses para deshidratar el tejido y así inhibir la proliferación de microorganismos.

#### **3.4.3. Maceración del cuajo**

- Después del secado del abomaso curado, se cortó y pesó 20 g de tejido abomasal, 4 g de *Muehlenbeckia volcanica* “mullaca”, 2 g de *Lobelia kalmii* “cuajera” y 20 g manzana verde.
- Todos estos materiales fueron colocados en un envase de plástico.
- Se agregó 200 ml de suero lácteo fresco y 5 g sal granulada sin yodo.
- Se realizaron 10 repeticiones por cada especie.
- La maceración fue durante 45 días en refrigeración (5 °C), colectando las muestras de cuajo cada 15, 30 y 45 días.

**Tabla 1.** Codificación de las muestras de cuajo animal obtenidas a partir de diversas especies y tiempo de maceración en condiciones refrigerantes (5°C), Ayacucho, 2024.

| Especie  | Tiempo de maceración (días) |        |        |
|--|-----------------------------|--------|--------|
|  | 15                          | 30     | 45     |
| <b><i>Sus scrofa domestica</i></b><br><b>(Porcino)</b> | P1-15                       | P1-30  | P1-45  |
|  | P2-15                       | P2-30  | P2-45  |
|  | P3-15                       | P3-30  | P3-45  |
|  | P4-15                       | P4-30  | P4-45  |
|  | P5-15                       | P5-30  | P5-45  |
|  | P6-15                       | P6-30  | P6-45  |
|  | P7-15                       | P7-30  | P7-45  |
|  | P8-15                       | P8-30  | P8-45  |
|  | P9-15                       | P9-30  | P9-45  |
|  | P10-15                      | P10-30 | P10-45 |
| <b><i>Bos taurus</i></b><br><b>(Bovino)</b>            | B1-15                       | B1-30  | B1-45  |
|  | B2-15                       | B2-30  | B2-45  |
|  | B3-15                       | B3-30  | B3-45  |
|  | B4-15                       | B4-30  | B4-45  |
|  | B5-15                       | B5-30  | B5-45  |
|  | B6-15                       | B6-30  | B6-45  |
|  | B7-15                       | B7-30  | B7-45  |
|  | B8-15                       | B8-30  | B8-45  |
|  | B9-15                       | B9-30  | B9-45  |
|  | B10-15                      | B10-30 | B10-45 |
| <b><i>Vicugna pacos</i></b><br><b>(Alpaca)</b>         | A1-15                       | A1-30  | A1-45  |
|  | A2-15                       | A2-30  | A2-45  |
|  | A3-15                       | A3-30  | A3-45  |
|  | A4-15                       | A4-30  | A4-45  |
|  | A5-15                       | A5-30  | A5-45  |
|  | A6-15                       | A6-30  | A6-45  |
|  | A7-15                       | A7-30  | A7-45  |
|  | A8-15                       | A8-30  | A8-45  |
|  | A9-15                       | A9-30  | A9-45  |
|  | A10-15                      | A10-30 | A10-45 |

P: porcino; B: bovino; A: alpaca

#### 3.4.4. Obtención del extracto proteico total (EPT)

- El macerado se extrajo con ayuda de una pipeta de 5 ml y se colocó en tubos Falcon de 15 ml. Se evitó extraer impurezas, sin embargo, aún había presencia de ellas. Por ello, se traspasó 1,5 ml del macerado a tubos Eppendorf de 1,5ml con una micropipeta de 1000 µl, esto se realizó con el fin de obtener un macerado con menos impurezas (tejidos u otros).
- Los cuajos fueron centrifugados usando una centrifuga refrigerada a 560 x g (6 330 rpm) durante 10 min a 4 °C.

- Después de la centrifugación se conservó el líquido traslúcido (cuajo) descartando el sedimento y el pellet superficial. El cuajo se traspasó a un Eppendorf de 1,5 ml, se rotuló adecuadamente y se conservó a -4 °C.

### **3.5. Determinación de proteínas**

Se utilizó el protocolo detallado para el ensayo de proteínas de Bradford mejorado por Ernst y Zor (2010).

#### **Elaboración de la curva de calibración**

- Se preparó una solución madre con albúmina sérica bovina (BSA-Sigma-Aldrich, USA) a una concentración de 10 mg/ml con agua desionizada.
- Se diluyó el reactivo Bradford (Bio-Rad, USA) con agua desionizada en proporción 1:2,5, respectivamente.
- Se prepararon las soluciones estándar a concentraciones de: 0 a 20 mg/ml de BSA (con intervalo de 1 mg/ml).
- Se añadió 100 µl de reactivo Bradford diluido a 100 µl de estándar.
- Después, se realizaron las lecturas a 595 nm en un espectrofotómetro BioPhotometer plus (Eppendorf, Germany) después de los 5 min y antes de los 60 min, tiempo en el cual ocurre el desarrollo del color (Bradford, 1976).
- Finalmente, con los valores de absorbancia se elaboró la curva de calibración y se obtuvo la ecuación de la recta con la cual se determinó la cantidad de proteína total en µg/µl.

#### **Determinación de proteínas por Bradford**

- Las muestras fueron diluidas con agua desionizada 1:1 000 (1 µl cuajo: 999 µl agua desionizada). Esto se realizó debido a que la muestra contenía concentraciones altas de proteína y no podían ser leídas en el espectrofotómetro. Estas fueron homogenizadas en el vórtex durante unos segundos.
- En un tubo Eppendorf se colocó 100 µl de muestra diluida y 100 µl de Bradford diluido. Se homogenizó en el vórtex durante unos segundos.
- Después de 10 min de reacción se leyeron las absorbancias de todas las muestras en un espectrofotómetro a 595 nm.

- Las lecturas obtenidas fueron reemplazadas en la ecuación de la recta calculada anteriormente y con ello se obtuvieron los valores de proteínas totales de cada cuajo.

### 3.6. Determinación de fuerza de cuajo

Se utilizó el ensayo de coagulación de la leche descrito por Wei et al. (2016).

- En tubos Eppendorf se colocaron 1000 µl de leche fresca de vaca. Se dejó atemperar durante 5 min a 35 °C en baño maría.
- Luego se añadió 137,5 µl CaCl<sub>2</sub> 0,1 M. Se homogenizó con ayuda de la micropipeta.
- Se añadió 50 µl de cuajo y se homogenizó rápidamente para registrar el tiempo exacto de coagulación.
- Finalmente, con los valores de tiempo de coagulación obtenidos se calculó la fuerza de cuajo empleando la siguiente fórmula:

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

F= fuerza de cuajo

V= cantidad de leche en mililitros (ml)

C=cantidad de cuajo en mililitros (ml)

t=tiempo de coagulación en segundos (s)

2 400: Tiempo, en segundos, en que normalmente cuaja la leche a 35 °C con un cuajo estándar.

- Los valores de fuerza de cuajo fueron expresados en Unidades Soxhlet (US).

US: cantidad de leche en mililitros que cuaja 1 ml o 1 g de cuajo a 35 °C durante 40 minutos (Osorio et al., 2008).

### 3.7. Determinación de actividad proteolítica

Se empleó el procedimiento de Azañero et al. (2000) y Enzyme Development Corporation (2012).

### **Elaboración de la curva de calibración**

- Se preparó una solución madre con Tirosina (Sigma, USA) a una concentración de 100 µg/ml con HCl 0,1 N. Se diluyó 0,1 g de tirosina en 1000 ml de HCl 0,1 N.
- Se prepararon las soluciones estándar a concentraciones de: 0; 20; 40; 60; 80 y 100 µg/ml de tirosina, por triplicado.
- Después, se realizaron las lecturas a 280 nm en un espectrofotómetro BioPhotometer plus (Eppendorf, Germany) utilizando HCl 0,1N como blanco de muestra
- Finalmente, con los valores de absorbancia se realizó la curva de calibración y se obtuvo la ecuación de la recta con la cual se determinó la cantidad de tirosina en µg/ml.

### **Determinación de actividad proteolítica**

- Se preparó caseína al 0,2% en buffer Tris HCl 0,2 M (pH 8,8), a esta solución se le denominará “preparado”.
- Se colocó 1,5 ml del preparado en un tubo Falcon de 15 ml, se agregaron 400 µl de agua destilada y 100 µl del cuajo natural.
- Se incubó durante 15 min a 35 °C.
- Después de este tiempo, se detuvo la reacción con 1,5 ml de ácido tricloroacético 0,44 M en frío.
- Luego se centrifugaron las muestras a 907 x g (3 000 rpm) durante 15 min.
- Los productos ácidos solubles obtenidos por centrifugación fueron leídos a 280 nm en un espectrofotómetro BioPhotometer Plus (Eppendorf, Germany).
- Blanco: 1,5 ml del preparado, 400 µl de agua desionizada y 1,5 ml de ácido tricloroacético 0,44 M; se incubó a 35 °C por 15 min, luego se centrifugó a 3 000 rpm durante 15 min y finalmente se realizaron las lecturas en el espectrofotómetro.
- Se calculó la unidad de actividad proteolítica convirtiendo los valores de absorbancia a µg de L-tirosina y expresados como unidad de actividad proteolítica usando la siguiente fórmula:

$$UI = \Delta A_{280} * \frac{V_{reacción}}{V_{enzima} * t} * \frac{1}{Pendiente} * FD$$

Donde:

$\Delta A_{280}$  = es la diferencia de la absorbancia de la muestra problema y el blanco

V enzima = volumen de la solución de la enzima (ml)

t = tiempo de hidrólisis (min)

V reacción = volumen empleado en la reacción (ml)

Pendiente = pendiente obtenida de la curva de tirosina

FD= factor de dilución

UI= una unidad equivale a la liberación de 1  $\mu$ g de L-tirosina por minuto a 35 °C y pH 8,8 (Takahashi y Ohsaka, 1970).

### 3.8. Determinación de actividad lipolítica

Se realizó empleando un método adaptado a partir de Mendoza et al. (2020), Bustamante et al. (2000) y Valivety et al. (1992).

#### Reactivo emulsionante:

- Se preparó una solución de glicerol conteniendo  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  10 mM; luego se preparó una solución de NaCl 0,25 M conteniendo goma arábica al 2%.
- Después, se mezclaron ambas soluciones (proporción 1:25 v/v).

#### Sustrato emulsionado:

- Se mezcló 20 ml de reactivo emulsionante con 80 ml de agua desionizada y 5 ml de tributirina comercial (ChemCruz, USA, Código SC-215083). Luego se mezcló vigorosamente por 5 min y se ajustó el pH a 4,6.
- Este preparado se conservó a temperatura ambiental y se agitó vigorosamente por 5 min antes de su uso.

#### Evaluación de la actividad lipolítica

- Se mezclaron 5 ml de sustrato emulsionado con 250  $\mu$ l del cuajo natural y se dejará reaccionar a 35 °C por 30 min.
- Luego se detuvo la reacción con 2,5 ml de etanol absoluto.

- El preparado fue titulado con NaOH 0,01 N, utilizando 03 gotas del indicador fenolftaleína al 0,5%. Se anotó el volumen gastado de NaOH para calcular la determinación del ácido butírico liberado.
- Se reportaron los resultados como unidad de actividad de lipasa usando la siguiente fórmula:

$$UI = \frac{\text{volumen de } 0.01M \text{ NaOH usado (ml)} * 10 (\mu M/ml)}{\text{tiempo de incubación (min)} * \text{volumen de solución enzimática (ml)}}$$

UI= Una unidad de actividad de lipasa se define como la cantidad liberada de 1 micromol de ácido graso por minuto a 35°C (Kumar et al., 2011).

### 3.9. Electroforesis SDS-PAGE

Se utilizó el protocolo detallado por Maldonado y Jorrín (2005).

- Se utilizó una cámara de electroforesis vertical Mini-Protean, modelo 1658029 (Bio-Rad, USA).

#### a. Ensamblaje de las placas de vidrio para formar los geles de electroforesis PAGE.

- Se utilizaron placas de vidrio para formar geles con espaciador de 0,75 mm de espesor.
- Estos se alinearon, se introdujeron y se ajustaron en el marco.
- Finalmente se colocó el marco en el soporte.

#### b. Preparación de las muestras

- Se preparó un buffer de carga 4x (Anexo 18).
- Luego se colocó 75 µl de la muestra en 25 µl de buffer de carga, para obtener un stock de 100 µl.
- Se mezclaron en vórtex durante 5 s y para la desnaturalización de proteínas se sometió a calentamiento a 100 °C durante 5 min.
- Después las muestras fueron colocadas en una mini centrífuga durante 1 min para su concentración en el fondo del tubo. Estas muestras pueden ser conservadas en refrigeración (4 °C) hasta su próximo uso.

### **c. Preparación del gel separador y concentrador**

- Primero se preparó un gel de acrilamida de 13% (separador) (Anexo 19).
- Se agregó el gel separador en el molde y se niveló la superficie del gel con agua destilada. Se dejó gelificar durante 40 min y pasado este tiempo se descarta el agua destilada.
- Después se preparó un gel de acrilamida de 3% (concentrador) (Anexo 20). Este se colocó sobre el gel separador evitando la formación de burbujas, una vez llenado el molde se colocó el peine para la formación de los pozos y se dejó gelificar durante 40 min.

### **d. Montaje, carga de la muestra y corrida electroforética**

- Los vidrios fueron desmontados del marco y se colocaron en el soporte de electrodos. Luego, este fue colocado dentro de la cubeta y se llenó con el tampón de corrida cerciorándose de que no haya fugas.
- Después se llenó la cubeta con el buffer de corrida según la cantidad de geles preparados.
- Se colocaron las guías y se cargaron en cada pocillo 50 µg de proteína de cada muestra. También, se colocó 5 µl del marcador Three-color Prestained Protein Marker, 11-245 kDa (WSHT, cat. MKP007-0250) y 5 µl del marcador Prestained low Range Protein Marker, 6,2- 66,2 kDa (WSHT, cat. MKP015-02200).
- Se colocaron 50 µg de quimosina de *Mucor miehei* tipo II (SIGMA- R5876-10G) y 50 µg de pepsina de mucosa gástrica porcina (SIGMA- P700-100G) en cada pocillo.
- Se conectaron los electrodos a la fuente de poder para iniciar la corrida a 110 V durante dos horas aproximadamente.
- Terminada la corrida, se desconectó la fuente de poder, se retiraron los vidrios que contienen el gel con mucho cuidado.

### **e. Coloración y decoloración del gel**

- En un recipiente limpio se colocó 30 a 50 ml de colorante azul de Coomassie y se dejará tiñendo en agitación durante 1 hora.
- Luego se retiró el gel del envase y se colocó en otro para ser enjuagado con agua bidestilada y remover el exceso de colorante.

- En otro recipiente se colocó 30 a 50 ml de decolorante (solución de ácido Acético glacial, metanol 95% y agua destilada) y se dejó decolorar en agitación durante 12 horas.
- Finalmente se colocó el gel en un analizador de geles y se guardó la imagen para su estudio.

### **3.10. Análisis estadístico**

Para la comparación de datos con distribución normal no relacionados se utilizó la prueba estadística t-student de dos muestras, para comparar datos relacionados con distribución normal se utilizó la prueba t pareada, para aquellos datos relacionados sin distribución normal se utilizó la prueba de signos y para comparar datos no relacionados sin distribución normal se utilizó la prueba estadística Mann-Whitney. Los datos fueron evaluados con un nivel de significancia de  $\alpha=0,05$  empleando el software estadístico Minitab 19 y el lenguaje de programación R-4.4.0.

#### IV. RESULTADOS

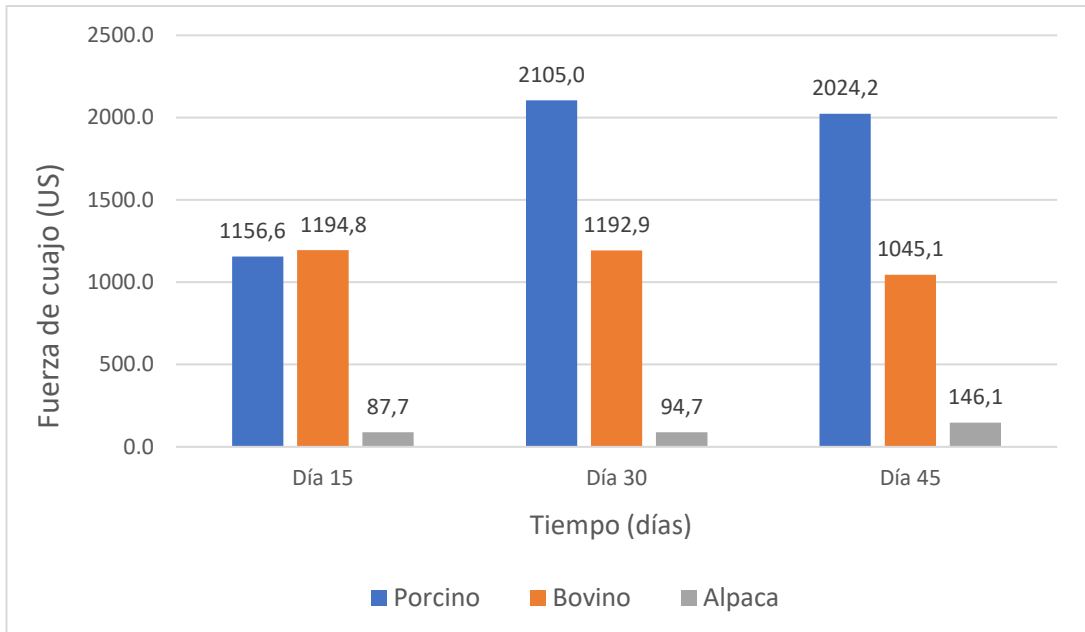
**Figura 7.** Diagrama de elaboración de cuajo natural según el procedimiento de Pariahuanca (Cangallo).



**Tabla 2.** Fuerza de cuajo según tiempo de maceración en condiciones de refrigeración.

| <b>Especie</b>                                   | <b>Tiempo (días)</b> | <b>Fuerza de cuajo (<math>\bar{x}</math>)</b> | <b>Error estándar de la media</b> | <b>Fuerza de cuajo (US)</b> |
|--|----------------------|---|-----------------------------------|-----------------------------|
| <b><i>Sus scrofa domestica</i><br/>(Porcino)</b> | 15                   | 1157,0±827,0                                  | 262,0                             | 1: 1157,0                   |
|  | 30                   | 2105,0±2099,0                                 | 664,0                             | 1: 2105,0                   |
|  | 45                   | 2024,0±1800,0                                 | 569,0                             | 1: 2024,0                   |
| <b><i>Bos taurus</i><br/>(Bovino)</b>            | 15                   | 1195,0±1352,2                                 | 427,6                             | 1: 1195,0                   |
|  | 30                   | 1193,0±1323,4                                 | 418,5                             | 1: 1193,0                   |
|  | 45                   | 1045,1±1119,6                                 | 354,0                             | 1: 1045,1                   |
| <b><i>Vicugna pacos</i><br/>(Alpaca)</b>         | 15                   | 87,7±64,4                                     | 26,3                              | 1: 87,7                     |
|  | 30                   | 94,7±65,3                                     | 26,7                              | 1: 94,7                     |
|  | 45                   | 146,1±141,2                                   | 57,7                              | 1: 146,1                    |

**US:** Unidad Soxhlet, cantidad de leche en mililitros que cuaja 1 ml o 1 g de cuajo a 35 °C durante 40 min.



**Figura 8.** Promedio de la fuerza de cuajo porcino, bovino y de alpaca con relación al tiempo de maceración (días)

**Tabla 3.** Comparación de la fuerza de cuajo porcino en relación con el tiempo de maceración usando la prueba estadística t pareada.

| Cuajo  | Tiempo (días) | Fuerza de cuajo ( $\bar{x}$ ) | Tiempos comparados (días) | Diferencia | Error estándar de la media | Valor p |
|--|---------------|-------------------------------|---------------------------|------------|----------------------------|---------|
| <b><i>Sus scrofa domestica</i></b><br><b>(Porcino)</b> | 15            | 1157,0                        | <b>15-30</b>              | -948,0     | 421,0                      | 0,051   |
|  | 30            | 2105,0                        |                           |            |                            |         |
|  | 45            | 2024,0                        | <b>15-45</b>              | -868,0     | 410,0                      | 0,064   |

**Tabla 4.** Comparación de la fuerza de cuajo bovino en relación con el tiempo de maceración usando la prueba de signos.

| Cuajo                                       | Tiempo (días) | Fuerza de cuajo ( $\bar{x}$ ) | Mediana | Tiempos comparados (días) | Diferencia | IC            | Valor p |
|---|---------------|-------------------------------|---------|---------------------------|------------|---------------|---------|
| <b><i>Bos taurus</i></b><br><b>(Bovino)</b> | 15            | 1195,0                        | 1194,8  | <b>15-30</b>              | 24,18      | (-77,0;219,7) | 0,754   |
|   | 30            | 1161,0                        | 1192,9  |                           |            |               |         |
|   | 45            | 1004,0                        | 1045,1  | <b>15-45</b>              | 23,43      | (-70,1;679,1) | 0,344   |

IC: Intervalo de confianza

**Tabla 5.** Comparación de la fuerza de cuajo de alpaca en relación con el tiempo de maceración usando la prueba estadística t pareada.

| <b>Especie</b>                           | <b>Tiempo (días)</b> | <b>Fuerza de cuajo (<math>\bar{x}</math>)</b> | <b>Tiempos comparados (días)</b> | <b>Diferencia</b> | <b>Error estándar de la media</b> | <b>Valor p</b> |
|--|----------------------|---|----------------------------------|-------------------|-----------------------------------|----------------|
| <b><i>Vicugna pacos</i><br/>(Alpaca)</b> | 15                   | 87,7  | <b>15-30</b>                     | -6,9              | 5,02                              | 0,201          |
|  | 30                   | 94,7  |                                  |                   |                                   |                |
|  | 45                   | 146,1   | <b>15-45</b>                     | -58,4             | 25,9                              | 0,051          |

**Tabla 6.** Comparación de la fuerza de cuajo entre diferentes especies animales en relación con el tiempo de maceración usando la prueba estadística Mann-Whitney.

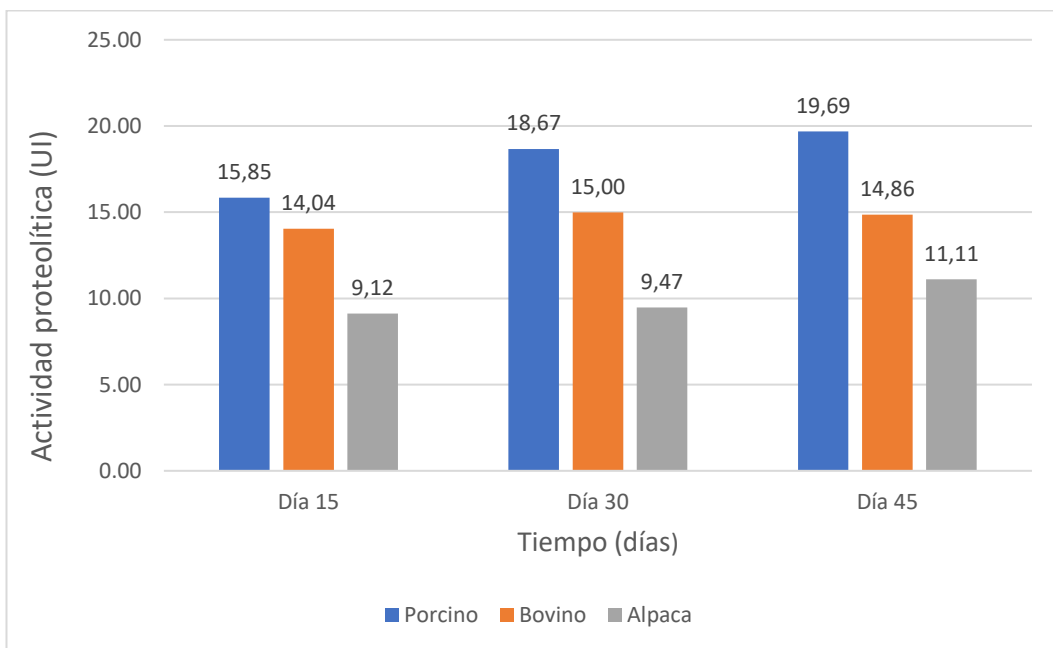
| Tiempo (días) | Especie | Fuerza de cuajo ( $\bar{x}$ ) | Mediana | Diferencia | IC           | Valor p |
|---------------|---------|-------------------------------|---------|------------|--------------|---------|
| <b>Día 15</b> | Porcino | 1157,0                        | 1115,38 | 162,844    | (-1452;1137) | 0,398   |
|               | Bovino  | 1195,0                        | 324,56  |            |              |         |
| <b>Día 30</b> | Porcino | 2105,0                        | 1189,72 | 684,455    | (-1137;2465) | 0,151   |
|               | Bovino  | 1193,0                        | 360,53  |            |              |         |
| <b>Día 45</b> | Porcino | 2024,0                        | 1434,34 | 772,171    | (-68;2718)   | 0,089   |
|               | Bovino  | 1045,1                        | 303,85  |            |              |         |
| <b>Día 15</b> | Porcino | 1157,0                        | 1115,38 | 999,673    | (254;1560)   | 0,000   |
|               | Alpaca  | 87,7                          | 62,09   |            |              |         |
| <b>Día 30</b> | Porcino | 2105,0                        | 1189,72 | 1079,57    | (443;3147)   | 0,000   |
|               | Alpaca  | 94,7                          | 67,77   |            |              |         |
| <b>Día 45</b> | Porcino | 2024,0                        | 1434,34 | 1180,55    | (370;2940)   | 0,000   |
|               | Alpaca  | 146,1                         | 92,16   |            |              |         |
| <b>Día 15</b> | Bovino  | 1195,0                        | 324,56  | 251,25     | (40;2487)    | 0,006   |
|               | Alpaca  | 107,1                         | 62,09   |            |              |         |
| <b>Día 30</b> | Bovino  | 1193,0                        | 360,53  | 263,29     | (23;2362)    | 0,011   |
|               | Alpaca  | 128,3                         | 67,77   |            |              |         |
| <b>Día 45</b> | Bovino  | 1045,1                        | 303,85  | 240,0      | (29;2121)    | 0,011   |
|               | Alpaca  | 207,8                         | 92,159  |            |              |         |

IC: Intervalo de confianza

**Tabla 7.** Actividad proteolítica del cuajo animal según el tiempo de maceración en condiciones refrigerantes.

| <b>Especie</b>                                   | <b>Tiempo de maceración</b> | <b>Actividad Proteolítica (UI) (<math>\bar{x}</math>)</b> | <b>Error estándar de la media</b> |
|--|-----------------------------|---|-----------------------------------|
| <b><i>Sus scrofa domestica</i><br/>(Porcino)</b> | Día 15                      | 15,850±3,330  | 1,050                             |
|  | Día 30                      | 18,670±4,560  | 1,440                             |
|  | Día 45                      | 19,690±4,810  | 1,520                             |
| <b><i>Bos taurus</i><br/>(Bovino)</b>            | Día 15                      | 14,040±3,060  | 0,970                             |
|  | Día 30                      | 15,000±3,470  | 1,100                             |
|  | Día 45                      | 14,860±3,310  | 1,050                             |
| <b><i>Vicugna pacos</i><br/>(Alpaca)</b>         | Día 15                      | 9,122±2,581   | 0,816                             |
|  | Día 30                      | 9,474±2,815   | 0,890                             |
|  | Día 45                      | 11,110±3,240  | 1,030                             |

\*UI: una unidad equivale a la liberación de 1 µg de L-tirosina por minuto a 35 °C y pH 8,8.



**Figura 9.** Promedio de la actividad proteolítica del cuajo porcino, bovino y de alpaca con relación al tiempo de maceración (días).

**Tabla 8.** Comparación de la actividad proteolítica del cuajo animal entre la misma especie en relación con el tiempo de maceración usando la prueba estadística t pareada.

| Especie  | Tiempo (días) | Actividad Proteolítica (UI) ( $\bar{x}$ ) | Tiempos comparados (días) | Diferencia | Error estándar de la media | Valor p |
|--|---------------|---|---------------------------|------------|----------------------------|---------|
| <b><i>Sus scrofa domestica</i></b><br><b>(Porcino)</b> | 15            | 15,850                                    | <b>15-30</b>              | -2,820     | 0,880                      | 0,011   |
|  | 30            | 18,670                                    |                           |            |                            |         |
|  | 45            | 19,690                                    | <b>15-45</b>              | -3,843     | 0,617                      | 0,000   |
| <b><i>Bos taurus</i></b><br><b>(Bovino)</b>            | 15            | 14,040                                    | <b>15-30</b>              | -0,955     | 0,435                      | 0,056   |
|  | 30            | 15,000                                    |                           |            |                            |         |
|  | 45            | 14,860                                    | <b>15-45</b>              | -0,818     | 0,260                      | 0,012   |
| <b><i>Vicugna pacos</i></b><br><b>(Alpaca)</b>         | 15            | 9,122                                     | <b>15-30</b>              | -0,352     | 0,187                      | 0,092   |
|  | 30            | 9,474                                     |                           |            |                            |         |
|  | 45            | 11,110                                    | <b>15-45</b>              | -1,986     | 0,373                      | 0,000   |

\*UI: una unidad equivale a la liberación de 1 µg de L-tirosina por minuto a 35 °C y pH 8,8

**Tabla 9.** Comparación de la actividad proteolítica del cuajo animal entre diferentes especies en relación con el tiempo de maceración usando la prueba estadística t-student de 2 muestras.

| Tiempo (días) | Especie | Actividad Proteolítica (UI) ( $\bar{x}$ ) | Diferencia | IC             | Valor p |
|---------------|---------|---|------------|----------------|---------|
| Día 15        | Porcino | 15,850                                    | -1,810     | (-4,82;1,21)   | 0,223   |
|               | Bovino  | 14,040                                    |            |                |         |
| Día 30        | Porcino | 18,670                                    | -3,670     | (-7,52;0,17)   | 0,060   |
|               | Bovino  | 15,000                                    |            |                |         |
| Día 45        | Porcino | 19,690                                    | -4,830     | (-8,77;-0,90)  | 0,019   |
|               | Bovino  | 14,860                                    |            |                |         |
| Día 15        | Porcino | 15,850                                    | -4,920     | (-7,59;-2,25)  | 0,001   |
|               | Alpaca  | 9,122                                     |            |                |         |
| Día 30        | Porcino | 18,670                                    | -5,520     | (-8,51;-2,54)  | 0,001   |
|               | Alpaca  | 9,474                                     |            |                |         |
| Día 45        | Porcino | 19,690                                    | -3,750     | (-6,84;-0,66)  | 0,020   |
|               | Alpaca  | 11,110                                    |            |                |         |
| Día 15        | Bovino  | 14,040                                    | -6,130     | (-9,55;-3,91)  | 0,000   |
|               | Alpaca  | 9,122                                     |            |                |         |
| Día 30        | Bovino  | 15,000                                    | -9,200     | (-12,83;-5,56) | 0,000   |
|               | Alpaca  | 9,474                                     |            |                |         |
| Día 45        | Bovino  | 14,860                                    | -8,590     | (-12,50;-4,67) | 0,000   |
|               | Alpaca  | 11,110                                    |            |                |         |

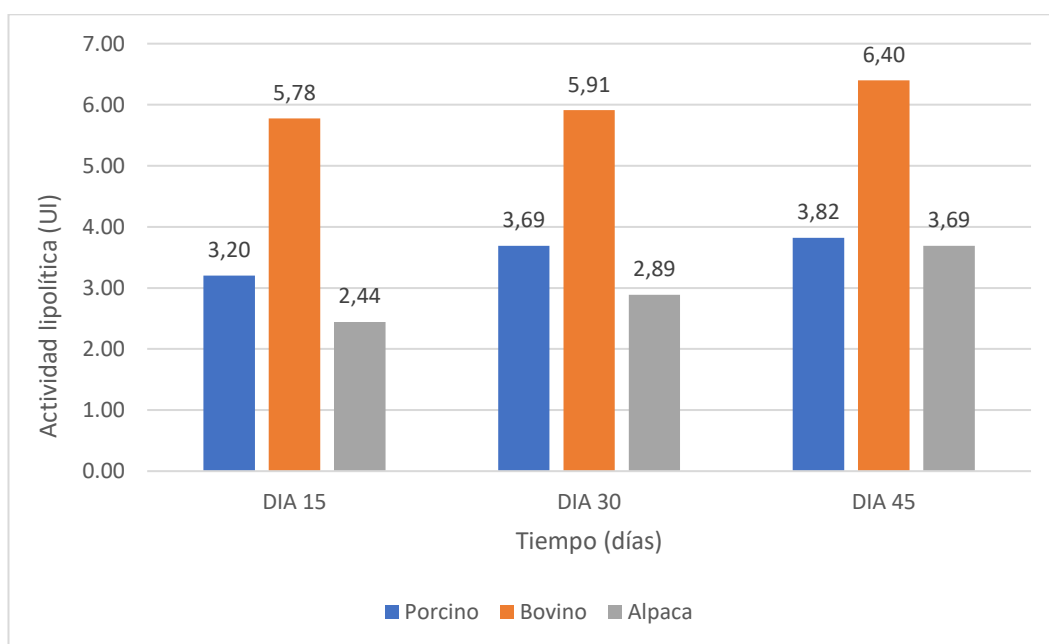
\*UI: una unidad equivale a la liberación de 1  $\mu\text{g}$  de L-tirosina por minuto a 35 °C y pH 8,8

\*IC: Intervalo de confianza

**Tabla 10.** Actividad lipolítica del cuajo animal según el tiempo de maceración en condiciones refrigerantes.

| Espece   | Tiempo (días) | Actividad Lipolítica (UI) ( $\bar{x}$ ) | Error estándar de la media |
|--|---------------|---|----------------------------|
| <b><i>Sus scrofa domestica</i></b><br><b>(Porcino)</b> | Día 15        | 3,200±0,133                             | 0,077                      |
|  | Día 30        | 3,686±0,407                             | 0,235                      |
|  | Día 45        | 3,822±0,539                             | 0,311                      |
| <b><i>Bos taurus</i></b><br><b>(Bovino)</b>            | Día 15        | 5,778±0,658                             | 0,380                      |
|  | Día 30        | 5,911±0,429                             | 0,247                      |
|  | Día 45        | 6,400±0,353                             | 0,204                      |
| <b><i>Vicugna pacos</i></b><br><b>(Alpaca)</b>         | Día 15        | 2,444±0,308                             | 0,178                      |
|  | Día 30        | 2,889±0,505                             | 0,291                      |
|  | Día 45        | 3,689±0,468                             | 0,270                      |

\*UI: Una unidad de actividad de lipasa se define como la cantidad liberada de 1 micromol de ácido graso por minuto a 35°C.



**Figura 10.** Promedio de la actividad lipolítica del cuajo porcino, bovino y de alpaca con relación al tiempo de maceración (días).

**Tabla 11.** Comparación de la actividad lipolítica del cuajo animal entre la misma especie en relación con el tiempo de maceración usando la prueba estadística t pareada.

| Espece                                | Tiempo (días) | Actividad lipolítica (UI) ( $\bar{x}$ ) | Tiempos comparados (días) | Diferencia | Error estándar de la media | Valor p |
|---------------------------------------|---------------|---|---------------------------|------------|----------------------------|---------|
| <i>Sus scrofa domestica</i> (Porcino) | 15            | 3,200                                   | <b>15-30</b>              | -0,489     | 0,222                      | 0,159   |
|                                       | 30            | 3,686                                   |                           |            |                            |         |
|                                       | 45            | 3,822                                   | <b>15-45</b>              | -0,622     | 0,291                      | 0,166   |
| <i>Bos taurus</i> (Bovino)            | 15            | 5,778                                   | <b>15-30</b>              | -0,133     | 0,133                      | 0,423   |
|                                       | 30            | 5,911                                   |                           |            |                            |         |
|                                       | 45            | 6,400                                   | <b>15-45</b>              | -0,622     | 0,194                      | 0,085   |
| <i>Vicugna pacos</i> (Alpaca)         | 15            | 2,444                                   | <b>15-30</b>              | -0,444     | 0,118                      | 0,063   |
|                                       | 30            | 2,889                                   |                           |            |                            |         |
|                                       | 45            | 3,689                                   | <b>15-45</b>              | -1,244     | 0,311                      | 0,057   |

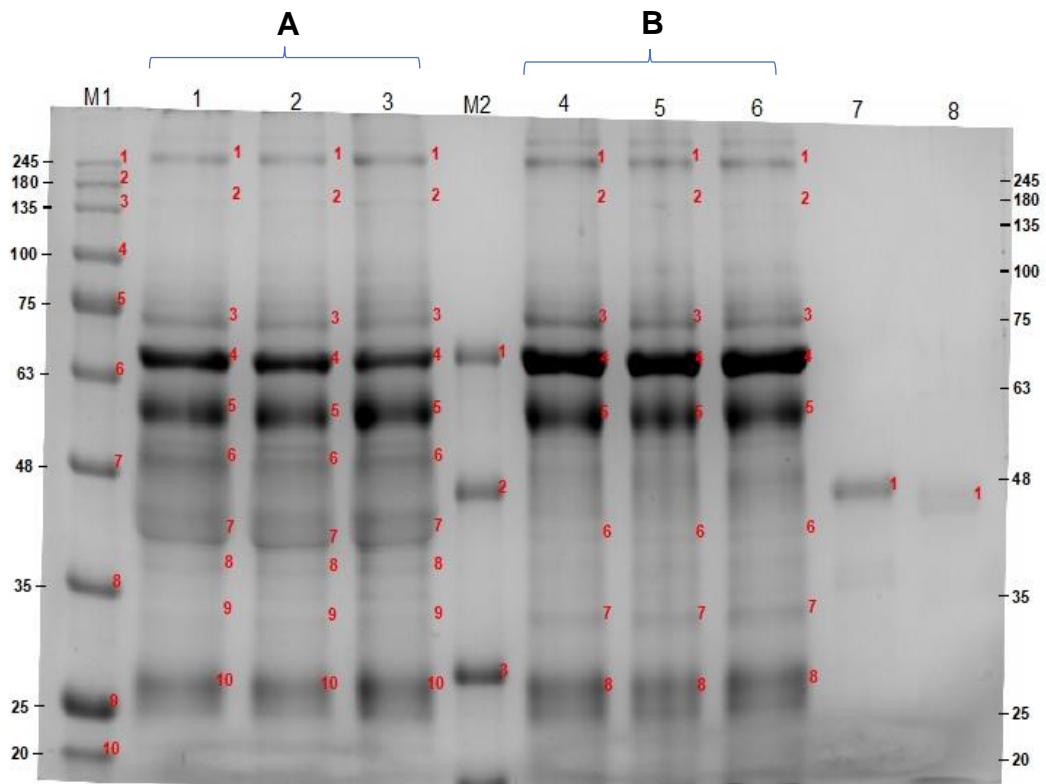
\*UI: Una unidad de actividad de lipasa se define como la cantidad liberada de 1 micromol de ácido graso por minuto a 35°C.

**Tabla 12.** Comparación de la actividad lipolítica del cuajo animal entre diferentes especies en relación con el tiempo de maceración usando la prueba estadística t-student de 2 muestras.

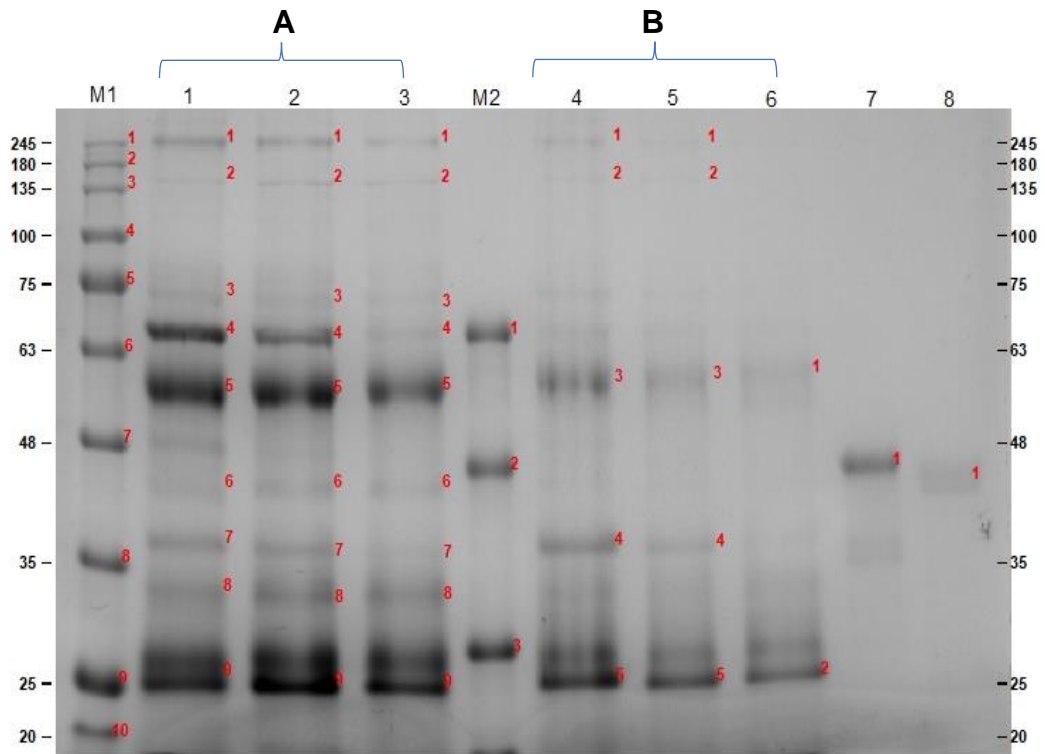
| Tiempo (días) | Especie | Actividad Lipolítica (UI) ( $\bar{x}$ ) | Diferencia | IC              | Valor p |
|---------------|---------|---|------------|-----------------|---------|
| Día 15        | Porcino | 3,200                                   | 2,578      | (0,911;4,245)   | 0,022   |
|               | Bovino  | 5,778                                   |            |                 |         |
| Día 30        | Porcino | 3,686                                   | 2,222      | (1,136;3,309)   | 0,007   |
|               | Bovino  | 5,911                                   |            |                 |         |
| Día 45        | Porcino | 3,822                                   | 2,578      | (1,394;3,761)   | 0,006   |
|               | Bovino  | 6,400                                   |            |                 |         |
| Día 15        | Porcino | 3,200                                   | -0,756     | (-1,589;0,078)  | 0,060   |
|               | Alpaca  | 2,444                                   |            |                 |         |
| Día 30        | Porcino | 3,686                                   | -0,800     | (-1,992;0,392)  | 0,122   |
|               | Alpaca  | 2,889                                   |            |                 |         |
| Día 45        | Porcino | 3,822                                   | -0,133     | (-1,445;1,178)  | 0,768   |
|               | Alpaca  | 3,689                                   |            |                 |         |
| Día 15        | Bovino  | 5,778                                   | -3,333     | (-5,137;-1,529) | 0,015   |
|               | Alpaca  | 2,444                                   |            |                 |         |
| Día 30        | Bovino  | 5,911                                   | -3,022     | (-4,239;-1,805) | 0,004   |
|               | Alpaca  | 2,889                                   |            |                 |         |
| Día 45        | Bovino  | 6,400                                   | -2,711     | (-3,788;-1,634) | 0,004   |
|               | Alpaca  | 3,689                                   |            |                 |         |

\*UI: Una unidad de actividad de lipasa se define como la cantidad liberada de 1 micromol de ácido graso por minuto a 35°C.

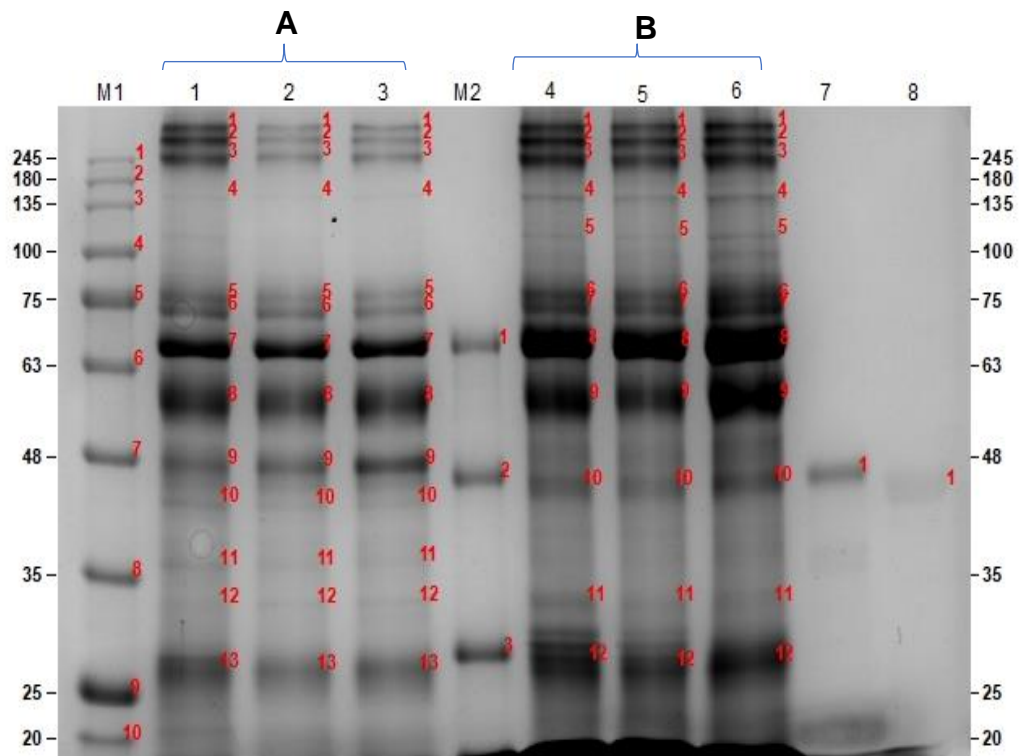
\*IC: Intervalo de confianza



**Figura 11.** Perfil electroforético de cuajo porcino en diferentes tiempos de maceración. **M1:** marcador de peso molecular 11-245 kDa (WSHT- MKP007-0250), **A:** muestras de cuajo porcino con mayor fuerza de cuajo promedio 1: 4 226,891, **1:** 15 días de maceración, **2:** 30 días, **3:** 45 días, **M2:** marcador de peso molecular 6,2- 66,2 kDa (WSHT- MKP003-0200), **B:** muestras de cuajo porcino con menor fuerza de cuajo promedio 1: 225,998, **4:** 15 días, **5:** 30 días, **6:** 45 días, **7:** quimosina microbiana, **8:** pepsina gástrica porcina. Todos los pocillos contienen 50 µg de cada muestra.



**Figura 12.** Perfil electroforético de cuajo bovino en diferentes tiempos de maceración. **M1:** marcador de peso molecular 11-245 kDa (WSHT-MKP007-0250), **A:** muestras de cuajo porcino con mayor fuerza de cuajo promedio 1: 2 398,666, **1:** 15 días, **2:** 30 días, **3:** 45 días, **M2:** marcador de peso molecular 6,2- 66,2 kDa (WSHT- MKP003-0200), **B:** muestras de cuajo bovino con menor fuerza de cuajo promedio 1: 319,403, **4:** 15 días, **5:** 30 días, **6:** 45 días, **7:** quimosina microbiana, **8:** pepsina gástrica porcina. Todos los pocillos contienen 50 µg de cada muestra.



**Figura 13.** Perfil electroforético de cuajo alpaca en diferentes tiempos de maceración. **M1:** marcador de peso molecular 11-245 kDa (W.SHT-MKP007-0250), **A:** muestras de cuajo de alpaca con mayor fuerza de cuajo promedio 1: 307,997, **1:** 15 días, **2:** 30 días, **3:** 45 días, **M2:** marcador de peso molecular 6,2-66,2 kDa (WSHT- MKP003-0200), **B:** muestras de cuajo de alpaca con menor fuerza de cuajo promedio 1: 25,083, **4:** 15 días, **5:** 30 días, **6:** 45 días, **7:** quimosina microbiana, **8:** pepsina gástrica porcina. Todos los pocillos contienen 50 µg de cada muestra.

## V. DISCUSIÓN

Los resultados de la fuerza de cuajo según tiempo de maceración se observan en la Tabla 2, el cuajo porcino resultó 1:1157 US, 1:2105 US y 1:2024 US en el día 15, 30 y 45, respectivamente; en el cuajo bovino se obtuvo 1: 1195 US, 1:1193 US y 1: 1045 US en el día 15, 30 y 45, respectivamente. Finalmente, en el cuajo de alpaca se registró 1:87.7 US en el día 15, 1: 94,7 US en el día 30 y 1: 146,1 US en el día 45 (US: 1ml o g de cuajo que cuaja cierta cantidad de leche en mililitros a 35 °C durante 40 minutos). En las Tablas 3, 4 y 5 se presenta la comparación de la fuerza coagulante de cuajos de diferentes especies según el tiempo de maceración, los resultados muestran que no existen diferencias significativas de la fuerza coagulante entre los días de maceración para todas las especies evaluadas. Esto indica que un tiempo de maceración mayor a 15 días, en abomasos de origen bovino, porcino y camélido sudamericano, no incrementa la fuerza coagulante.

En la Tabla 6 se observa la comparación de la fuerza coagulante entre cuajos de diferentes especies según el tiempo de maceración. Los valores del cuajo porcino y bovino no presentaron diferencia significativa entre sí en todos los tiempos de maceración, mostrando valores de fuerza de cuajo similares. Sin embargo, el cuajo de alpaca mostró diferencias significativas respecto a ambos, presentando la menor fuerza de cuajo entre las tres especies.

En la investigación realizada por Martínez et al. (2019) se elaboraron cuajos naturales a partir del estómago de cerdo (lechones) cuyo tiempo de maceración fueron 2 días, obteniendo valores de fuerza de cuajo entre 1:840 a 1:4 706 US. Este valor es similar al obtenido en la investigación debido a que los protocolos para la obtención del cuajo y la edad de los animales empleados fueron similares en ambos trabajos. Así mismo, Cisneros (2007) elaboró cuajos naturales con 4 días de maceración a partir de estómagos de crías lactantes de vicuña, alpaca, ternera, llama, oveja, cabra y cerdo, cuya fuerza de cuajo resultó 1:175 512 US,

1:120 519 US, 1:108 127 US, 1:97 011 US, 1:61 346 US, 1:32 289 US y 1:26 561 US, respectivamente. También, Bouras y Aissaoui (2022) produjeron cuajos con 4 días de maceración a partir del estómago de camellos menores de un año cuya fuerza de cuajo resultó 1:4 166,67 US. Guerrero (2019) obtuvo cuajos naturales a partir del cuarto estómago de llamas con pocos días de nacimiento cuya fuerza de cuajo resultó 1:22 018 US. Estos valores son mayores a los obtenidos en la investigación, lo cual podría deberse a que los autores emplearon estómagos de crías lactantes o menores de una año, las cuales sintetizan mayor porcentaje de proquimosina, fundamental para la coagulación de la leche, y a medida que los animales envejecen se reduce la síntesis de esta (Cano, 2015; Moschopoulou, 2011) y aumenta el de la pepsina, la cual desempeña un rol más amplio en la hidrólisis de proteínas contenidas en diversos alimentos (Addis et al., 2008). Por otro lado, Córdova (2013) elaboró cuajo natural de origen bovino de edad entre 4 a 6 años y evaluó su fuerza de cuajo resultando entre 1:338,82 a 1:607,59 US. Así mismo, Celis (2019) elaboró cuajo natural a partir de estómago bovino de 2 años, cuya fuerza de cuajo resultó 1:371 US. Estos valores son menores a los registrados en la presente investigación, lo cual podría deberse a que los autores emplearon estómagos de animales adultos cuyo porcentaje de quimosina es reducido y por ende la actividad coagulante es menor.

El tiempo típico de maceración se da entre 4 a 12 días cuyo objetivo es la extracción de las enzimas coagulantes (Quijano, 2010; Ibáñez, 2015) y no es recomendable dejar por más tiempo debido a que el macerado se enriquece de proteínas de la descomposición del abomaso, lo cual genera mayor crecimiento microbiano (Alais, 2003). Así mismo, la actividad de las enzimas coagulantes depende ampliamente del proceso y las condiciones de su extracción y activación (Moschopoulou, 2011). En el presente trabajo se obtuvo el cuajo natural a partir de maceración, la cual posee ciertas variaciones entre diversas localidades, como son: el porcentaje de sal, el cual afecta la extracción de las enzimas coagulantes del tejido de abomaso debido a la gradiente osmótica que genera y su concentración también inhibe el crecimiento de microorganismos patógenos que pueden afectar la calidad del cuajo (Moschopoulou, 2011); la temperatura de maceración puede influir en la velocidad de extracción de las enzimas y su conservación, puesto que a bajas temperaturas la extracción se ralentiza y a mayores temperaturas las enzimas podrían desnaturalizarse. Así mismo, la calidad y cantidad del tejido abomasal influyen en la concentración y actividad de

las enzimas coagulantes; el pH ácido permite la eliminación de los fragmentos de aminoácidos de la proquimosina y del pepsinógeno para obtener sus formas activas (quimosina y pepsina) (Bryksa et al., 2003; Sankalia et al., 2007) y la concentración de iones de calcio pueden afectar la coagulación debido a que estos influyen en la estabilidad de la caseína.

Los resultados de la actividad proteolítica según tiempo de maceración se observan en la Tabla 7, el cuajo porcino resultó 15,850 UI, 18,670 UI y 19,690 UI en el día 15, 30 y 45, respectivamente; en el cuajo bovino se obtuvo 14,040 UI, 15,000 UI y 14,860 UI en el día 15, 30 y 45, respectivamente; en el cuajo de alpaca se registró 9,112 UI en el día 15, 9,474 UI en el día 30 y 11,110 UI en el día 45. Estos valores expresados en UI/mg (una unidad equivale a la liberación de 1 mg de L-tirosina por minuto a 35 °C y pH 8,8 / mg de proteína contenida en la muestra) resultaron para cuajo porcino 11,256 UI/mg, 11,676 UI/mg y 10,957 UI/mg en el día 15, 30 y 45, respectivamente; en el cuajo bovino se obtuvo 10,920 UI/mg, 10,427 UI/mg y 12,484 UI/mg en el día 15, 30 y 45, respectivamente; en el cuajo de alpaca se registró 3,916  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  en el día 15, 5,311 UI/mg en el día 30 y 6,327 UI/mg en el día 45. Así mismo, La cantidad de proteína obtenida en el cuajo porcino fue de 14,082  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , 15,991  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , 17,973  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  el día 15, 30 y 45, respectivamente; en el cuajo bovino se obtuvo 12,859  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , 14,382  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  y 11,903  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  en el día 15, 30 y 45, respectivamente; el cuajo de alpaca presentó 23,297  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , 17,838  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  y 17,558  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  el día 15, 30 y 45, respectivamente.

La Tabla 8 muestra la comparación de la actividad proteolítica de los cuajos provenientes de diferentes especies en relación con el tiempo de maceración. Los resultados indican que la actividad proteolítica de los cuajos porcino, bovino y de alpaca son significativamente diferentes entre el día 15 y 45 de maceración. Se observa en todas las especies evaluadas que la actividad proteolítica tiende a incrementarse a medida que avanza el tiempo de maceración, alcanzando su punto máximo en el día 45 (porcino 19,690 UI, bovino 14,860 UI y alpaca 11,110 UI). Sin embargo, al expresar la actividad proteolítica en unidades UI/mg se evidencia una ligera disminución en la eficiencia específica de la enzima en el día 45 del cuajo porcino. Esto sugiere que, aunque haya mayor actividad proteolítica general de las enzimas contenidas en el cuajo, su capacidad específica para actuar puede reducirse, posiblemente debido a degradación o cambios en las condiciones enzimáticas durante la maceración. En los días 15 y 30 de maceración los valores de UI y UI/mg siguen la misma tendencia. El incremento

de la actividad proteolítica obtenida sugeriría que un mayor tiempo de maceración favorece la activación y extracción de enzimas responsables de la proteólisis en los cuajos estudiados, sin embargo, los resultados de la fuerza de cuajo demuestran que el tiempo de maceración mayor a 15 días no incrementa el poder coagulante. Esto puede deberse a un mayor porcentaje de pepsina en los cuajos, la cual posee una alta actividad proteolítica general a diferencia de la quimosina que posee una alta actividad de coagulación de la leche y una baja actividad proteolítica general (Andrén, 2021; Moschopoulou, 2011). Así mismo, los cuajos preparados artesanalmente no son productos purificados y podrían contener una fracción de enzima no coagulante asociada a diferentes actividades proteolíticas y lipolíticas (Rolet et al., 2013; Mamo y Balasubramanian, 2018).

En la Tabla 9 se observan los resultados de la comparación de la actividad proteolítica entre cuajos de diversas especies en distintos tiempos de maceración. El cuajo porcino y bovino no presentan diferencia significativa entre sí, excepto en el día 45 donde el cuajo porcino presentó 19,690 UI y el cuajo bovino 14,860 UI. Así mismo, estos cuajos poseen mayor actividad proteolítica que el cuajo de alpaca, en todos los tiempos de maceración. Los valores de la actividad proteolítica obtenida por Cisneros (2007) fueron: vicuña 2,106 UI/mg, alpaca 1,282 UI/mg, vaca 1,257 UI/mg, llama 0,9040 UI/mg, oveja 0,439 UI/mg, cabra 0,241 UI/mg y cerdo 0,013 UI/mg. Calvo y Fontecha (2004) obtuvieron  $0,033 \pm 0,033$  UI/mg en cuajo de cabritos lactantes. Estos valores son menores a los obtenidos en el presente trabajo de investigación. Así mismo, la actividad proteolítica del cuajo bovino y porcino son mayores al del cuajo de camélido, siendo opuesto a lo obtenido.

En la Tabla 10 se observa el promedio de la actividad lipolítica en cuajo animal según el tiempo de maceración el cuajo porcino resultó 3,200 UI, 3,696 UI y 3,822 UI en el día 15, 30 y 45, respectivamente; en el cuajo bovino se obtuvo 5,778 UI, 5,991 UI y 6,400 UI en el día 15, 30 y 45, respectivamente; en el cuajo de alpaca se registró 2,444 UI en el día 15, 2,889 UI en el día 30 y 3,689 UI en el día 45. Estos valores expresados en UI/mg (una unidad equivale a la cantidad liberada de 1 micromol de ácido graso a 35°C/ mg de proteína contenida en la muestra) resultaron para cuajo porcino 2,272 UI/mg, 2,307 UI/mg y 2,127 UI/mg en el día 15, 30 y 45, respectivamente; en el cuajo bovino se obtuvo 4,493 UI/mg, 4,110 UI/mg y 5,377 UI/mg en el día 15, 30 y 45, respectivamente; en el cuajo de alpaca

se registró 1,049 µg/µl en el día 15, 1,619 UI/mg en el día 30 y 2,101 UI/mg en el día 45.

En la Tabla 11 se observa la comparación de la actividad lipolítica de los cuajos provenientes de diferentes especies en relación con el tiempo de maceración, donde los valores no presentaron diferencia significativa entre los días de maceración. Es decir, el tiempo de maceración mayor a 15 días no influye en la actividad lipolítica de cuajos líquidos. Sin embargo, factores como la edad del animal, dieta, porcentaje de sal y estado de los abomasos para la preparación del cuajo (frescos o secos) pueden influir en la actividad enzimática (Bustamante et al., 2000; Moschopoulou, 2011).

En la Tabla 12 se observa la comparación de la actividad lipolítica entre cuajos de diversas especies en distintos tiempos de maceración. Los resultados demuestran que el cuajo de origen bovino (5,778 UI) presenta mayor actividad lipolítica a comparación del cuajo porcino (3,200 UI) y de alpaca (2,444 UI), siendo estos últimos no significativamente diferentes entre ellos. Bustamante et al. (2000) reportaron la actividad lipolítica de cuajos en pasta de cordero: cuajos secos molidos con 230 g de sal resultó 0,0245 UI/mg y con 330 g de sal se obtuvo 0,0269 U/mg. Calvo y Fontecha (2004) determinaron la actividad lipolítica de pastas de cuajo artesanal elaborados a partir del abomaso de cabritos que resultó  $0,87 \pm 0,01$  UI/mg (µmol de ácido butírico liberado de tributirina por minuto y por mg de proteína). Estos valores son menores a los obtenidos en la investigación, si bien los autores utilizaron cuajo en pasta, la cual, según la bibliografía, presenta mayor cantidad de lipasas útiles en la maduración del queso y mejora su actividad al provenir de abomasos de crías lactantes (Virto et al., 2003; Castillo et al., 2007, Rolet et al., 2013), los valores obtenidos en cuajo líquido de la presente investigación, son mucho mayores. Esto puede deberse a que no se realizó la purificación de los cuajos a diferencia de los autores mencionados. Al no purificar los cuajos, es posible que las muestras no solo contengan lipasas específicas, sino también otras enzimas y compuestos con actividad catalítica que puedan interactuar con el sustrato (tributirina) o influir en la medición de la actividad, sesgando los resultados hacia valores más altos.

La Figura 11 muestra el perfil electroforético de cuajo porcino en diferentes tiempos de maceración, se encontraron al menos 10 bandas con pesos moleculares de: 245,0 kDa, 153,3 kDa, 72,7 kDa, 65,7 kDa, 56,8 kDa, 49,3 kDa, 40,5 kDa, 37,0 kDa, 32,4 kDa, 26,6 kDa; con concentraciones relativas de 0,71;

0,03; 0,69; 4,97; 5,25; 0,88; 2,01; 0,06; 0,04; 4,01, respectivamente. Las proteínas encontradas en mayor concentración relativa en los EPT con mayor y menor fuerza de cuajo poseen pesos moleculares de 65,7 kDa, 56,8 kDa y 26,6 kDa y las encontradas en los EPT con mayor fuerza de cuajo poseen pesos moleculares de 40,5 kDa 37,0 kDa y 32,4 kDa, las cuales podrían corresponder a la quimosina y pepsina. Según Alberto et al. (2014) los resultados en la electroforesis mostraron la presencia de pepsina de cerdo con un peso molecular de 34 kDa y el pepsinógeno con 42 kDa. Así mismo, Moschopoulou (2011) reportó 34 kDa para la pepsina de cerdo lactante, aproximadamente. Rho et al. (2019) indica que la pepsina extraída de la mucosa del estómago de cerdo (SIGMA-ALDRICH) posee un peso molecular de 38,3 kDa. Attallah (2007) aisló quimosina del abomaso de cerdos lactantes obteniendo una banda de peso molecular 30 kDa. Por ello, las bandas proteicas de 32,4 kDa, 37,0 kDa y 40,5 kDa encontradas en mayor concentración en los EPT con mayor fuerza de cuajo podrían corresponder a la quimosina y pepsina.

La Figura 12 muestra el perfil electroforético de cuajo bovino en diferentes tiempos de maceración, se encontraron al menos 09 bandas con pesos moleculares de: 245,0 kDa, 147,5 kDa, 71,6 kDa, 65,6 kDa, 55,9 kDa, 42,7 kDa, 36,0kDa, 31,7 kDa, 25,0 kDa; con concentraciones relativas de 0,54; 0,11; 0,49; 3,11; 10,11; 0,20; 1,86; 5,44; 9,81, respectivamente. Las proteínas con mayor concentración relativa en los EPT de mayor y menor fuerza de cuajo poseen 65,6 kDa, 55,9 kDa y 25,0 kDa, y las bandas proteicas encontradas en los EPT de mayor fuerza de cuajo poseen 42,7 kDa, 37,0 kDa y 31,7 kDa las cuales podrían corresponder a la quimosina y pepsina. Según Rolet et al., (2013) el peso molecular de los cuajos de ternera comercial, la quimosina purificada (Sigma Aldrich) y quimosina recombinante poseen aproximadamente 34,5 kDa. Tyagi et al., (2017) menciona que la quimosina bovina comercial tiene un peso molecular de 35.6kDa. Attallah (2007) aisló quimosina del abomaso de vacas y búfalos lactantes obteniendo bandas de peso molecular 40 kDa. Chow y Kassell (1968) determinaron el peso molecular del pepsinógeno bovino resultando ser 38,9 kDa.

La Figura 13 muestra el perfil electroforético de cuajo de alpaca en diferentes tiempos de maceración, se encontraron al menos 13 bandas con pesos moleculares de: 245,0 kDa (bandas 1, 2 y 3), 150,6 kDa, 76,4 kDa, 73,1 kDa, 66,0 kDa, 56,6 kDa, 47,0 kDa, 42,5 kDa, 36,2 kDa, 32,5 kDa, 26,8 kDa; con concentraciones relativas de 1,11; 1,69; 2,05; 0,05; 1,20; 1,08; 5,28; 6,19; 2,92;

0,23; 0,14; 0,06; 4,77, respectivamente. Las proteínas con mayor concentración relativa en los EPT con mayor y menor fuerza de cuajo poseen pesos moleculares de 66,0 kDa, 56,6 kDa y 26,8 kDa, y las encontradas en los EPT con mayor fuerza de cuajo poseen pesos moleculares de 42,5 kDa, 36,2 kDa y 32,5 kDa, las cuales podrían corresponder a la quimosina y pepsina. Según Attallah (2007) la quimosina aislada del abomaso de camello lactante posee 43 kDa. Kappeler et al., (2006) obtuvieron quimosina recombinante de camello expresado en *Aspergillus niger* cuyo peso molecular resultó aproximadamente 40 kDa. Akishev et al., (2022) produjeron quimosina recombinante de camello expresado en *Pichia pastoris* cuyo peso molecular resultó 42 kDa. Abounaga (2019) produjo quimosina recombinante de camello expresado en *E. coli* cuyo peso molecular resultó 35,6 kDa y 40,6 kDa para la proquimosina. Así mismo, Vega et al., (2004) menciona que la quimosina pesa 35,6 kDa y su precursor inactivo, conocido como proquimosina posee 40,8 kDa. Existe la posibilidad de la presencia de lipasa pregástrica en los EPT, según Timmermans et al., (1994) la lipasa obtenida a partir de la lengua de ternera tiene un peso molecular de 42 kDa aproximadamente. Así mismo, Calvo y Fontecha (2004) realizaron la purificación de una esterasa pregástrica y determinaron su masa molecular la cual resultó 53 kDa similar al peso molecular de la lipasa pregástrica obtenidas de tejido faríngeo de ternera 55 kDa (Bernbäck et al., 1985) y de cordero 50 kDa (De Caro et al., 1995). Por ello, según la bibliografía revisada, las proteínas de mayor peso molecular encontradas en los EPT podrían corresponder a lipasas pregástricas o a las proenzimas (proquimosina y pepsinógeno). La maceración permitió la extracción de proteínas contenidas en el tejido abomasal, sin embargo, también permite la extracción de las proteínas contenidas en los diversos componentes que se añadieron: suero de leche bovina, *Muehlenbeckia volcanica* “mullaca” y *Lobelia kalmii* “cuajera”. Por ello, la diferencia de los perfiles polipeptídicos está relacionada con el método de extracción y la fuente de enzimas coagulantes (Rolet et al., 2013), permitiendo la posibilidad de observar diversas proteínas como las contenidas en el suero ( $\beta$ -lactoglobulina) (Rolet et al., 2013), aunque esto no se puede afirmar con total certeza.

## VI. CONCLUSIONES

1. Los cuajos naturales de origen porcino, bovino y de alpaca, que se elaboran en el Centro Poblado de Pariahuanca comprenden dos etapas, una referida a la preparación y secado; y otra concerniente a la maceración, antes de su aplicación directa en la leche.
2. Se determinó la fuerza de cuajo de origen bovino, porcino y de alpaca durante la maceración, siendo 1:1157 US, 1:1195 US, 1:87,7 US para cuajo porcino, bovino y alpaca, respectivamente. Los cuajos de origen porcino y bovino presentaron mayor fuerza coagulante y el tiempo de maceración mayor a 15 días no influyó en el incremento de la actividad coagulante.
3. Se determinó la actividad proteolítica obteniendo 19,690 UI, 14,860 UI y 11,110 UI para cuajo porcino, bovino y alpaca, respectivamente. Los cuajos de origen porcino y bovino presentaron mayor actividad proteolítica y el tiempo de maceración mayor a 15 días influyó en el incremento de la proteólisis enzimática. La actividad lipolítica resultó 3,200 UI, 5,778 UI y 2,444 UI para cuajo porcino, bovino y alpaca, respectivamente. El cuajo de origen bovino presentó mayor actividad lipolítica y el tiempo de maceración mayor a 15 días no influyó en el incremento de la actividad lipolítica.
4. Se estableció el perfil electroforético de los cuajos naturales por maceración, encontrando proteínas con pesos moleculares entre 31 y 48 kDa en muestras de cuajo bovino y porcino, las cuales corresponderían a la quimosina y pepsina. También, se observaron proteínas entre 25 a 31 kDa y 48 kDa a 75 kDa, las cuales están presentes en el cuajo porcino, bovino y de alpaca.

## **VII. RECOMENDACIONES**

- Realizar el estudio comparativo exclusivamente con crías lactantes de las tres especies.
- Realizar estudios de purificación de las proteínas presentes en los EPT utilizando cromatografía líquida en columna.
- Caracterizar e identificar la quimosina y la pepsina del cuajo de alpaca mediante espectrofotometría de masas (MS/ MALDI -TOF).

## VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aboulnaga, E. (2019). Cloning and Expression of Camel Pro-Chymosin Encoding Gene in *E. coli* and Characterization of the Obtained Active Enzyme. *Journal of Food and Dairy Sciences*, 10(3), 71-78. <https://doi.org/10.21608/jfds.2019.36156>
- Addis, M., Piredda, G., & Pirisi, A. (2008). The use of lamb rennet paste in traditional sheep milk cheese production. *Small Ruminant Research*, 79(1), 2-10. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2008.07.002>
- Akischev, Z., Aktayeva, S., Kiribayeva, A., Abdullayeva, A., Baltin, K., Mussakhmetov, A., Tursunbekova, A., Ramankulov, Y., & Khassenov, B. (2022). Obtaining of Recombinant Camel Chymosin and Testing Its Milk-Clotting Activity on Cow's, Goat's, Ewes', Camel's and Mare's Milk. *Biology*, 11(11), 1545. <https://doi.org/10.3390/biology11111545>
- Alais, C. (2003). *Ciencia de la leche: Principios de Técnica Lechera* (4.<sup>a</sup> ed.). Reverté S.A. [https://books.google.com.pe/books?id=bW\\_ULacGBZMC&pg=PA674&dq=fuerza+de+cuajo+soxhlet&hl=es&newbks=1&newbks\\_redir=0&sa=X&ved=2ahUKEwjfyvLtmpeEAXVeD7kGHf38DA4Q6AF6BAgMEAI#v=onepage&q=fuerza%20de%20cuajo%20soxhlet&f=false](https://books.google.com.pe/books?id=bW_ULacGBZMC&pg=PA674&dq=fuerza+de+cuajo+soxhlet&hl=es&newbks=1&newbks_redir=0&sa=X&ved=2ahUKEwjfyvLtmpeEAXVeD7kGHf38DA4Q6AF6BAgMEAI#v=onepage&q=fuerza%20de%20cuajo%20soxhlet&f=false)
- Alberto, M., Savón, L., Del Rivero, M., & Farruggia, B. (2014). Digestibilidad *in vitro* de la proteína con crudos enzimáticos, obtenidos de residuos de matadero. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, 48(4), 353-357.
- Álvarez Díaz, A., Pérez Esteban, H., De la Cruz Martín, T., Quincosa Torres, J., & Sánchez Puzo, A. (2009). *Fisiología animal aplicada*. Universidad de Antioquia. [https://books.google.com.pe/books?id=vyAj6ngqa0UC&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs\\_ge\\_summary\\_r&cad=0#v=onepage&q&f=false](https://books.google.com.pe/books?id=vyAj6ngqa0UC&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false)
- Andrén, A. (2021). Chapter 14: Milk-Clotting Enzymes. En *Agents Of Change. Enzymes in Milk and Dairy Products* (pp.349-362). Food Engineering Series. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-55482-8\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-030-55482-8_1)
- Attallah, A. (2007). *Characters of Chymosin Gene Isolated from Different Animal sources at Molecular level. Journal of Applied Sciences Research*, 3(9), 904-907.
- Azañero, M., Escobar, E., & Yarlequé, A. (2000). Purificación de una enzima proteolítica del veneno de *Bothrops brazili* y estudio de su actividad sobre fibrinógeno. *Revista Peruana de Biología*, 7(1), 55-66. <https://doi.org/10.15381/rpb.v7i1.6728>
- Bakhteeva, I., & Timofeev, V. (2022). Some Peculiarities of Anthrax Epidemiology in Herbivorous and Carnivorous Animals. *Life*, 12(6), 870. <https://doi.org/10.3390/life12060870>
- Baroni Casas, M. F. B., & Suárez Díaz, H. G. S. (2017). *Anatomía del estómago de la alpaca* [Tesis doctoral, Universidad de la República]. <https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/bitstream/20.500.12008/24917/1/FV-32841.pdf>
- Barreto Argilagos, G., Sedrés Cabrera, M., Rodríguez Torrens, H., & Guevara Viera, G. (2010). *Comportamiento de brotes debidos a enfermedades transmitidas por alimentos* (Vol. 10). ReCiTeIA. [https://books.google.com.pe/books?id=\\_9vZd0PWY5MC&newbks=1&newbks\\_redir=0&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs\\_ge\\_summary\\_r&cad=0#v=onepage&q&f=false](https://books.google.com.pe/books?id=_9vZd0PWY5MC&newbks=1&newbks_redir=0&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false)
- Bastos P, J., & Fernandes F, A. (2018). *Diseño de propuesta para el proceso de elaboración de cuajo derivado del abomaso para una empresa de insumos*

- lácteos [Tesis de licenciatura, Universidad Católica Andrés Bello]. <http://biblioteca2.ucab.edu.ve/anexos/biblioteca/marc/texto/AAU2253.pdf>
- Battro, P. (2010). *Quesos artesanales*. Albatros.
- Bedolla Bernal, S., Dueñas Gallegos, C., Esquivel Ibarra, I., Favela Torres, T., Guerrero Huerta, R., Mendoza Madrid, E., Navarrete López, A., Olguín Martínez, L., Ortiz Gama, J., Pacheco Puc, O., Quiroz Bravo, M., Ramírez Shoettlin, A., & Trujillo Castillo, M. (2004). *Introducción a la tecnología de alimentos* (2.<sup>a</sup> ed.). LIMUSA. [https://books.google.com.pe/books?id=V2lqmVapJWkC&newbks=1&newbks\\_redir=0&printsec=frontcover&hl=es#v=onepage&q&f=false](https://books.google.com.pe/books?id=V2lqmVapJWkC&newbks=1&newbks_redir=0&printsec=frontcover&hl=es#v=onepage&q&f=false)
- Bernbäck, S., Hernell, O., & Bläckberg, L. (1985). Purification and molecular characterization of bovine pregastric lipase. *European Journal of Biochemistry*, 148(2), 233-238. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1985.tb08830.x>
- Bonafede, M. (2017). *Coagulantes en la industria láctea artesanal: Análisis del cuajo de cabrito en la tecnología quesera del noroeste Argentino* [Tesis de maestría, Universidad Nacional del Litoral]. <https://bibliotecavirtual.unl.edu.ar:8443/bitstream/handle/11185/1135/TFI.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Bouras, B., & Aïssaoui, O. (2022). Optimization of flocculation and clotting time of camel milk with camel and goat rennets, and chicken pepsin in comparison with cow milk using response surface method (RSM). *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 34(7), 575-585. <https://doi.org/10.9755/ejfa.2022.v34.i7.2881>
- Bradford, M. M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Bravo, E. (2018). *Cuajo Transgénico y el control empresarial en la producción quesera* (1.<sup>a</sup> ed.). RALLT. [http://www.rallt.org/PUBLICACIONES/cuajo%20control%20empresarial\\_web.pdf](http://www.rallt.org/PUBLICACIONES/cuajo%20control%20empresarial_web.pdf)
- Bryksa, B. C., Tanaka, T., & Yada, R. Y. (2003). N-Terminal Modifications Increase the Neutral-pH Stability of Pepsin. *Biochemistry*, 42(45), 13331-13338. <https://doi.org/10.1021/bi0348112>
- Bustamante, M., Chávarri, F., Santisteban, A., Ceballos, G., Hernández, I., Miguélez, M. J., Aranburu, I., Barrón, L. J. R., Virto, M., & De Renobales, M. (2000). Coagulating and lipolytic activities of artisanal lamb rennet pastes. *Journal of Dairy Research*, 67(3), 393-402. <https://doi.org/10.1017/S0022029900004350>
- Bustinza Choque, V. (2001). *La alpaca* (1.<sup>a</sup> ed.). UNA.
- Caal Martínez, G. M. (2015). *Extracción de la quimosina producida de forma natural a través del cuarto estómago de ternero a partir de diferentes tiempos de extracción y edades del bovino a escala laboratorio* [Tesis de licenciatura, Universidad de San Carlos de Guatemala]. <http://www.repositorio.usac.edu.gt/id/eprint/3359>
- Calvo, M. V., & Fontecha, J. (2004). Purification and Characterization of a Pregastric Esterase From a Hygienized Kid Rennet Paste. *Journal of Dairy Science*, 87(5), 1132-1142. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(04\)73261-0](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)73261-0)
- Cano Salazar, V. M. (2015). *Extracción y caracterización físicoquímica de quimosina bovina para la producción de cuajo sometida a variación térmica*

- y de pH a escala de laboratorio [Tesis de pregrado, Universidad de San Carlos de Guatemala].
- Caravaca Rodríguez, F., Castel Genís, J., Guzmán Guerrero, J., Delgado Pertíñez, M., Mena Guerrero, Y., Alcalde Aldea, M., & González Redondo, P. (2005). *Bases de la producción animal*. Universidad de Sevilla. [https://books.google.com.pe/books?id=DiOfx1bOfdUC&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs\\_ViewAPI&redir\\_esc=y#v=onepage&q&f=false](https://books.google.com.pe/books?id=DiOfx1bOfdUC&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_ViewAPI&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false)
- Carrillo Soto, J. G. (2012). *Evaluación de Procedimientos de tinción para el análisis de proteínas por electroforesis (SDS-PAGE)* [Tesis de licenciatura, Universidad de Sonora]. <http://repositorioinstitucional.uson.mx/handle/20.500.12984/2145>
- Castillo, I., Calvo, M., Alonso, L., Juárez, M., & Fontecha, J. (2007). Changes in lipolysis and volatile fraction of a goat cheese manufactured employing a hygienized rennet paste and a defined strain starter. *Food Chemistry*, *100*(2), 590-598. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.09.081>
- Celis Ramos, M. G. (2019). *Determinación de parámetros para la obtención y conservación de cuajo bovino en el distrito de Cajamarca*. [Tesis de licenciatura, Universidad Nacional de Cajamarca]. <https://repositorio.unc.edu.pe/handle/20.500.14074/3056>
- Chow, R. B., & Kassell, B. (1968). Bovine Pepsinogen and Pepsin. *Journal of Biological Chemistry*, *243*(8), 1718-1724. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)93505-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)93505-2)
- Cisneros García, S. (2007). *Manejo y caracterización bioquímica de cuajos utilizados en la elaboración tradicional de los quesos* [Tesis de licenciatura, Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga]. <https://repositorio.unsch.edu.pe/handle/UNSCH/6382>
- Compton, S. J., & Jones, C. G. (1985). Mechanism of Dye Response and Interference in the Bradford Protein Assay'. *Analytical Biochemistry*, *151*(2), 369-374. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(85\)90190-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(85)90190-3)
- Cooper, J. B., Khan, G., Taylors, G., Tickle, I. . J., & Blundell, T. L. (1990). X-ray analyses of aspartic proteinases. Three-dimensional structure of the hexagonal crystal form of porcine pepsins at 2.3 Å resolution. *Journal of Molecular Biology*, *214*(1), 199-222. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(90\)90156-G](https://doi.org/10.1016/0022-2836(90)90156-G)
- Córdova, J. S., & Paitan, E. (2013). Determinación de parámetros para obtención y conservación de cuajo de bovino adulto. *Ciencia e Investigación*, *16*(1), 9-11. <https://doi.org/10.15381/ci.v16i1.8625>
- Córsico, B., Lockhart, L. J. F., Franchini, G. R., & Scaglia, N. (2013). *Análisis estructural y funcional de macromoléculas* (1.<sup>a</sup> ed.). EDULP. <https://libros.unlp.edu.ar/index.php/unlp/catalog/book/74>
- Dalgleish, D. G., & Corredig, M. (2012). The Structure of the Casein Micelle of Milk and Its Changes During Processing. *Annual Review of Food Science and Technology*, *3*(1), 449-467. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-022811-101214>
- De Caro, J., Ferrato, F., Verger, R., & De Caro, A. (1995). Purification and molecular characterization of lamb pregastric lipase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, *1252*(2), 321-329. [https://doi.org/10.1016/0167-4838\(95\)00134-G](https://doi.org/10.1016/0167-4838(95)00134-G)
- De Soroa, J. (1990). *Industrias lácteas*. Editex S.A.
- Del Castillo Shelly, R. R., & Metres Lagarriga, J. (2004). *Productos lácteos. Tecnología*. Univversidad Politécnica de Catalunya. [https://books.google.com.pe/books?id=HUugK6Ep\\_JkC&pg=PA143&dq=coagulacion+de+la+leche&hl=es&newbks=1&newbks\\_redir=0&sa=X&ved](https://books.google.com.pe/books?id=HUugK6Ep_JkC&pg=PA143&dq=coagulacion+de+la+leche&hl=es&newbks=1&newbks_redir=0&sa=X&ved)

- =2ahUKEwj9rsKI3liEAxX-  
DrkGHXWBAaQQ6AF6BAgNEAI#v=onepage&q=coagulacion%20de%20a%20leche&f=false
- Dell, E., & Bonifacino, J. (2001). Staining Proteins in Gel. *Current Protocols in Cell Biology*, 6.6.1-6.6.14. <https://doi.org/10.1002/0471143030.cb0606s06>
- DeRouchey, J. (2014). *Sistema digestivo del cerdo: Anatomía y funciones*. El Sitio Porcino. <https://www.elsitioporcino.com/articles/2513/sistema-digestivo-del-cerdo-anatoomaa-y-funciones/>
- Dittmann, M. T., Runge, U., Ortmann, S., Lang, R. A., Moser, D., Galeffi, C., Schwarm, A., Kreuzer, M., & Clauss, M. (2015). Digesta retention patterns of solute and different-sized particles in camelids compared with ruminants and other foregut fermenters. *Journal of Comparative Physiology B*, 185(5), 559-573. <https://doi.org/10.1007/s00360-015-0904-x>
- Doyle, M., Beuchat, L., & Montville, T. (2001). *Microbiología de los alimentos*. ACRIBIA.
- Dubach, J. (2000). *El ABC para la quesería rural del Ecuador. Proyecto queserías rurales del Ecuador*. FAO.90.
- Enzyme Development Corporation. (2012). *Tyrosina unit (TU) method*. 1(212), 716-1580.
- Ernst, O., & Zor, T. (2010). Linearization of the Bradford Protein Assay. *Journal of Visualized Experiments*, 38, 1918. <https://doi.org/10.3791/1918>
- Ferrandini Banchemo, E. (2006). *elaboración de queso de Murcia al vino con cuajo natural en pasta* [Tesis doctoral, Universidad de Murcia]. <https://www.tesisenred.net/handle/10803/11055>
- Ferrandini, E., López, M. B., Castillo, M., & Laencina, J. (2011). Influence of an artisanal lamb rennet paste on proteolysis and textural properties of Murcia al Vino cheese. *Food Chemistry*, 124(2), 583-588. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.06.079>
- Fidalgo Álvarez, L. E., Rejas López, J., Gopegui Fernández, R. R., & Ramos Antón, J. J. (2003). *Patología Médica Veterinaria: Libro de Texto para la Docencia de la Asignatura*. Universidad de León.
- Fox, P., Guinee, T., Cogan, T., & McSweeney, P. (2017). Enzymatic Coagulation of Milk. En *Fundamentos de la Ciencia del queso* (2.ª ed., pp. 185-229). Springer. [https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4899-7681-9\\_7#citeas](https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4899-7681-9_7#citeas)
- Gallagher, S., & Chakavarti, D. (2008). Staining Proteins in Gels. *Journal of Visualized Experiments*, 17, 760. <https://doi.org/10.3791/760>
- Gastalver Robles, M. del C. (2015). *Procesos básicos de elaboración de quesos*. Elearning S.L. [https://books.google.com.pe/books?id=2oFXDwAAQBAJ&pg=PA277&dq=fuerza+de+cuajo&hl=es&newbks=1&newbks\\_redir=0&sa=X&ved=2ahUKEwjf46DThJeEAXUFIrkGHcdAArYQ6AF6BAgFEAI#v=onepage&q=fuerza%20de%20cuajo&f=false](https://books.google.com.pe/books?id=2oFXDwAAQBAJ&pg=PA277&dq=fuerza+de+cuajo&hl=es&newbks=1&newbks_redir=0&sa=X&ved=2ahUKEwjf46DThJeEAXUFIrkGHcdAArYQ6AF6BAgFEAI#v=onepage&q=fuerza%20de%20cuajo&f=false)
- Gerstein, A. (2004). *Molecular Biology Problem Solver: A Laboratory Guide*. [https://books.google.com.pe/books?id=Jv-3O9rL6RUC&pg=PA349&dq=Electrophoresis+buffer+continuous&hl=es&newbks=1&newbks\\_redir=0&sa=X&ved=2ahUKEwi3uvLemM-EAXVPFbkGHVtsDS4Q6AF6BAgIEAI#v=onepage&q=Electrophoresis%20buffer%20continuous&f=false](https://books.google.com.pe/books?id=Jv-3O9rL6RUC&pg=PA349&dq=Electrophoresis+buffer+continuous&hl=es&newbks=1&newbks_redir=0&sa=X&ved=2ahUKEwi3uvLemM-EAXVPFbkGHVtsDS4Q6AF6BAgIEAI#v=onepage&q=Electrophoresis%20buffer%20continuous&f=false)
- Gilliland, G. L., Winborne, E. L., Nachman, J., & Wlodawer, A. (1990). The three-dimensional structure of recombinant bovine chymosin at 2.3 Å resolution. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 8(1), 82-101. <https://doi.org/10.1002/prot.340080110>

- Gomes Goncalves, P. (2021). *Síntesis heteróloga de quimosina bovina en Escherichia coli para su uso en alimentación* [Tesis doctoral, Universidad Autónoma de Madrid]. [https://repositorio.uam.es/bitstream/handle/10486/702545/gomes\\_gon%C3%A7alves\\_paulina.pdf?sequence=1](https://repositorio.uam.es/bitstream/handle/10486/702545/gomes_gon%C3%A7alves_paulina.pdf?sequence=1)
- Gómez, J., Ballesteros, C., González M., Cabezas, L., & Martínez, I. (2002). Relationships between volatile compounds and odour in Manchego cheese: Comparison between artisanal and industrial cheeses at different ripening times. *Le Lait*, 82(5), 613-628. <https://doi.org/10.1051/lait:2002037>
- González Cocaro, I. R. G., Rabaquino Sarti, L., & Rodríguez Muniz, G. (2017). *Uso de Optigraph para estimar capacidad coagulativa de leche de vaca en un rodeo comercial* [Tesis doctoral, Universidad de la República Uruguay]. <https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/bitstream/20.500.12008/24969/1/FV-33038.pdf>
- González Riopedre, M. (2009). *Purificación y caracterización de una isoforma calcio dependiente de proteína quinasa C en Mytilus galloprovincialis Lmk.* [Tesis doctoral, Universidad de Santiago de Compostela]. [https://books.google.com.pe/books?id=rBV8j8sQWb8C&pg=PA90&dq=gel+separador&hl=es&newbks=1&newbks\\_redir=0&sa=X&ved=2ahUKEwjf6Y7wvs-EAxWoLbkGHc3ACzcQ6AF6BAgFEAl#v=onepage&q=gel%20separador&f=false](https://books.google.com.pe/books?id=rBV8j8sQWb8C&pg=PA90&dq=gel+separador&hl=es&newbks=1&newbks_redir=0&sa=X&ved=2ahUKEwjf6Y7wvs-EAxWoLbkGHc3ACzcQ6AF6BAgFEAl#v=onepage&q=gel%20separador&f=false)
- Guerrero, D. (2019). Coagulación láctea inducida por enzimas de cuajo de llama (*Lama glama*). *Ciencia & Desarrollo*, 2, 45-51. <https://doi.org/10.33326/26176033.1995.2.42>
- Hallén, E. (2008). *Coagulation Properties of Milk. Association with milk protein composition and genetic polymorphism* [Tesis doctoral, Swedish University of Agricultural Sciences]. [https://pub.epsilon.slu.se/1879/1/EH\\_kappa\\_EH.pdf](https://pub.epsilon.slu.se/1879/1/EH_kappa_EH.pdf)
- Harris, D. C. (2003). *Análisis químico cuantitativo* (3.ª ed.). Reverté S.A. [https://books.google.com.pe/books?id=H-\\_8vZYdL70C&newbks=1&newbks\\_redir=0&printsec=frontcover&hl=es#v=onepage&q&f=false](https://books.google.com.pe/books?id=H-_8vZYdL70C&newbks=1&newbks_redir=0&printsec=frontcover&hl=es#v=onepage&q&f=false)
- Holt, C., & Horne, D. S. (1996). The hairy casein micelle: Evolution of the concept and its implications for dairy technology. *Netherlands Milk & Dairy Journal*, 50, 85-111.
- Horne, D. S. (1998). Casein Interactions: Casting Light on the Black Boxes, the Structure in Dairy Products. *International Dairy Journal*, 8(3), 171-177. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(98\)00040-5](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(98)00040-5)
- Ibáñez Castillo, A. M. (2015). *Evaluación del tiempo de cuajado en las características organolépticas del queso fresco* [Tesis de licenciatura, Universidad Politécnica Salesiana]. <https://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/8883>
- Ivanov, G., Balabanova, T., Ivanova, M., & Vlaseva, R. (2016). Comparative study of Bulgarian white brined cheese from cow and buffalo milk. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 22(4), 643-646.
- Kappeler, S. R., Van Den Brink, H. (J.) M., Rahbek-Nielsen, H., Farah, Z., Puhan, Z., Hansen, E. B., & Johansen, E. (2006). Characterization of recombinant camel chymosin reveals superior properties for the coagulation of bovine and camel milk. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 342(2), 647-654. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.02.014>

- Kappeler, S., Zakaria, F., Budtz, P., Rahbek, H., & Van Den Brink, J. M. (2018). *Método de producción de quimosina no bovina y uso de la misma* (Oficina Española de Patentes y Marcas Patent No. 2669299).
- Kiernan, D. P., O'Doherty, J. V., Connolly, K. R., Ryan, M., & Sweeney, T. (2023). Exploring the Differential Expression of a Set of Key Genes Involved in the Regulation and Functioning of the Stomach in the Post-Weaned Pig. *Veterinary Sciences*, *10*(7), 473. <https://doi.org/10.3390/vetsci10070473>
- Konig, H. E., & Liebich, H. (2008). *Anatomía de los animales domésticos: Texto y atlas en color. Órganos, sistema circulatorio y sistema nervioso* (2.<sup>a</sup> ed.). Médica Panamericana. [https://books.google.com/books?id=PvmrtwAACAAJ&dq=Anatom%C3%ADa+de+los+animales+dom%C3%A9sticos:+texto+y+atlas+en+color.+Tom+2,+%C3%93rganos,+sistema+circulatorio+y+sistema+nervioso&hl=es&newbks=1&newbks\\_redir=1&sa=X&ved=2ahUKEwjPkM2aqvCDAXUjrkGHZy5AwIQ6AF6BAgMEAI](https://books.google.com/books?id=PvmrtwAACAAJ&dq=Anatom%C3%ADa+de+los+animales+dom%C3%A9sticos:+texto+y+atlas+en+color.+Tom+2,+%C3%93rganos,+sistema+circulatorio+y+sistema+nervioso&hl=es&newbks=1&newbks_redir=1&sa=X&ved=2ahUKEwjPkM2aqvCDAXUjrkGHZy5AwIQ6AF6BAgMEAI)
- Konig, H. E., Liebich, H., & Bragulla, H. (2005). *Anatomía de los animales domésticos: Texto y atlas en color. Órganos, sistema circulatorio y sistema nervioso* (2da ed.). Médica Panamericana. [https://books.google.com/books?id=PvmrtwAACAAJ&dq=Anatom%C3%ADa+de+los+animales+dom%C3%A9sticos:+texto+y+atlas+en+color.+Tom+2,+%C3%93rganos,+sistema+circulatorio+y+sistema+nervioso&hl=es&newbks=1&newbks\\_redir=1&sa=X&ved=2ahUKEwjPkM2aqvCDAXUjrkGHZy5AwIQ6AF6BAgMEAI](https://books.google.com/books?id=PvmrtwAACAAJ&dq=Anatom%C3%ADa+de+los+animales+dom%C3%A9sticos:+texto+y+atlas+en+color.+Tom+2,+%C3%93rganos,+sistema+circulatorio+y+sistema+nervioso&hl=es&newbks=1&newbks_redir=1&sa=X&ved=2ahUKEwjPkM2aqvCDAXUjrkGHZy5AwIQ6AF6BAgMEAI)
- Kruger, N. J. (2009). The Bradford Method For Protein Quantitation. *The Protein Protocols Handbook*, 17-24. [https://doi.org/10.1007/978-1-59745-198-7\\_4](https://doi.org/10.1007/978-1-59745-198-7_4)
- Kumar, R., Mahajan, S., Kumar, A., & Singh, D. (2011). Identification of variables and value optimization for optimum lipase production by *Bacillus pumilus* RK31 using statistical methodology. *New Biotechnology*, *28*(1), 65-71. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2010.06.007>
- Laemmli, U. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature Publishing Group*, *227*(5259), 680-685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
- Lambré, C., Barat Baviera, J. M., Bolognesi, C., Cocconcelli, P. S., Crebelli, R., Gott, D. M., Grob, K., Lampi, E., Mengelers, M., Mortensen, A., Rivière, G., Steffensen, I., Tlustos, C., Van Loveren, H., Vernis, L., Zorn, H., Glandorf, B., Herman, L., ... Chesson, A. (2021). Safety evaluation of the food enzyme rennet paste from the abomasum of suckling goats, lambs and calves. *EFSA Journal*, *19*(12), 7006. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.7006>
- Lambré, C., Barat Baviera, J. M., Bolognesi, C., Cocconcelli, P. S., Crebelli, R., Gott, D. M., Grob, K., Lampi, E., Mengelers, M., Mortensen, A., Rivière, G., Steffensen, I., Tlustos, C., Van Loveren, H., Vernis, L., Zorn, H., Herman, L., Roos, Y., ... Chesson, A. (2023). Safety evaluation of the food enzyme triacylglycerol lipase from the genetically modified *Aspergillus luchuensis* strain FL108SC. *EFSA Journal*, *21*(10), 8260. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2023.8260>
- Llorente, B. E. (2000). *Aislamiento, purificación, caracterización y producción in vitro de peptidasas de alcaucil coagulantes de la leche* [Tesis doctoral, Universidad Nacional de La Plata]. <https://doi.org/10.35537/10915/2211>
- López Chegne, S. (2003). *Mejoremos nuestro quesillo*. ITDG. <http://www.funsepa.net/soluciones/pubs/NDA=.pdf>

- Lucey, J. A. (2002). Formation and Physical Properties of Milk Protein Gels. *Journal of Dairy Science*, 85(2), 281-294. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(02\)74078-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(02)74078-2)
- Maldonado, A., & Jorrín, J. (2005). Electroforesis desnaturizante en geles de poliacrilamida. Análisis de proteínas de hojas de *Arabidopsis thaliana*. *Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Campus universitario de Rabanales*, 1-17.
- Mamo, A., & Balasubramanian, N. (2018). Calf rennet production and its performance optimization. *Journal of Applied and Natural Science*, 10(1), 247-252. <https://doi.org/10.31018/jans.v10i1.1612>
- Martínez Álvarez, M., Remón Díaz, D., Hernández Monzón, A., Riverón Alemán, Y., & Martínez Vasallo, A. (2019). Evaluación de parámetros físico-químicos y microbiológicos de un coagulante lácteo de estómago de cerdo. *Revista de Salud Animal*, 41(1), 2224-4700.
- Mendoza, D., Lopez, M., & Montaña, A. (2020). Evaluación de la adición de bacterias lipolíticas autóctonas para estimular a escala de laboratorio la biodegradación de efluentes grasos de una industria aceitera. *Acta Nova*, 9(4), 618-640.
- Meza Villegas, G. L. y Ochazara Quispe, M. F. (2021). *Evaluación de la producción de queso de ovino elaborado con cuajo artesanal y cuajo comercial* [Tesis de licenciatura, Universidad Nacional de Huancavelica]
- MIDAGRI. (2021, 27 de marzo). *En el Perú existen 388 450 productores que elaboran más de 50 variedades de queso* [comunicado de prensa]. <https://www.gob.pe/institucion/midagri/noticias/350417-midagri-en-elperu-existen-388-450-productores-que-elaboran-mas-de-50-diferentes-variedades-de-queso>
- Mohanty, A. K., Mukhopadhyay, U. K., Grover, S., & Batish, V. K. (1999). Bovine chymosin: Production by rDNA technology and application in cheese manufacture. *Biotechnology Advances*, 17, 205-217. [https://doi.org/10.1016/s0734-9750\(99\)00010-5](https://doi.org/10.1016/s0734-9750(99)00010-5)
- Molina Santiago, P. C. (2020). *Elaboración de comprimidos nucleados de mezquite con antiparasitaria para ovinos* [Tesis de licenciatura, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco]. <https://repositorio.xoc.uam.mx/jspui/bitstream/123456789/26690/1/250121.pdf>
- Molinos, J. (1981). *Análisis de queso de cabra* [Tesis de licenciatura]. Universidad Católica de Chile.
- Mollé, D., & Léonil, J. (2005). Quantitative determination of bovine  $\kappa$ -casein macropeptide in dairy products by Liquid chromatography/Electrospray coupled to mass spectrometry (LC-ESI/MS) and Liquid chromatography/Electrospray coupled to tandem mass spectrometry (LC-ESI/MS/MS). *International Dairy Journal*, 15(5), 419-428. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2004.08.013>
- Moschopoulou, E. (2011). Characteristics of rennet and other enzymes from small ruminants used in cheese production. *Small Ruminant Research*, 101(1-3), 188-195. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2011.09.039>
- Moschopoulou, E., Kandarakis, I., & Anifantakis, E. (2007). Characteristics of lamb and kid artisanal liquid rennet used for traditional Feta cheese manufacture. *Small Ruminant Research*, 72(2-3), 237-241. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2006.10.018>
- Mujica Lengua, F. R., & Hernández Mavila, J. E. (2023). Actividad coagulante del extracto enzimático de tejido abomasal de alpaca sobre leche bovina.

- Revista de Investigaciones Altoandinas - Journal of High Andean Research*, 25(1), 32-40. <https://doi.org/10.18271/ria.2023.493>
- Nelson, J. H., Jensen, R. G., & Pitas, R. E. (1977). Pregastric Esterase and other Oral Lipases—A Review. *Journal of Dairy Science*, 60(3), 327-362. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(77\)83873-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(77)83873-3)
- Navarro Ríos, M. J. (2022). *Bases de la producción animal. Volumen II. Anatomía y fisiología digestiva de animales de interés zootécnico*. Universidad Miguel Hernández.
- Nielsen, T. S., Jessen, N., Jørgensen, J. O. L., Møller, N., & Lund, S. (2014). Dissecting adipose tissue lipolysis: Molecular regulation and implications for metabolic disease. *Journal of Molecular Endocrinology*, 52(3), R199-R222. <https://doi.org/10.1530/JME-13-0277>
- Osorio, A., Gómez, N., & Sánchez, C. (2008). Evaluación de diferentes fuentes de carbono y de nitrógeno para la producción de renina a partir del mohó *Mucor miehei*. *Revista Facultad de Ingeniería Universidad de Antioquia*, 45, 17-26.
- Pedersen, V. B., & Foltmann, B. (1975). Amino-Acid Sequence of the Peptide Segment Liberated during Activation of Prochymosin (Prorennin). *European Journal of Biochemistry*, 55(1), 95-103. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1975.tb02141.x>
- Pérez, M. de L., Soriano, J., Ponce, E., & Díaz, M. (2015). Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS como herramienta en el estudio de las proteínas miofibrilares. Una revisión. Polyacrylamide gel electrophoresis-SDS as a tool to study myofibrillar proteins. A review. *NACAMEH*, 9(2), 77-96.
- Quijano Velasco, J. D. (2010). *Quimosinas* (Vol. 10). Recite IA. <https://www.google.com.pe/books/edition/Quimosinas/K-souR1jtE8C?hl=es&gbpv=0>
- Rampilli, M., Larsen, R., & Harboe, M. (2005). Natural heterogeneity of chymosin and pepsin in extracts of bovine stomachs. *International Dairy Journal*, 15(11), 1130-1137. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2004.10.003>
- Raufman, J. P. (2004). Pepsin. En *Encyclopedia of Gastroenterology* (pp. 147-148). Elsevier. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B012386860200561X>
- Relling, A., & Mattioli, G. (2002). *Fisiología digestiva y metabólica de los rumiantes*. EDULP.
- Rho, Y., Kim, J. H., Min, B., & Jin, K. S. (2019). Chemically Denatured Structures of Porcine Pepsin using Small-Angle X-ray Scattering. *Polymers*, 11(12), 2104. <https://doi.org/10.3390/polym11122104>
- Rivera Guerra, V. E. (2012). *Evaluación de distintos cuajos naturales y procesados (bovinos, ovinos y cuy) para la realización de queso fresco* [Tesis de pregrado, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo].
- Rojo Salvador, C., & González Martínez, E. (2013). *Estómago monocavitario. Anatomías externa e interna. Posición y relaciones anatómicas. Sujeciones. Anatomía comparada*. 5(2), 16-27.
- Rolet, O., Arnould, C., Dupont, D., Gavoye, S., Beuquier, E., & Achilleos, C. (2016). Quantification of pepsin in rennet using a monoclonal antibody-based inhibition ELISA. *LWT - Food Science and Technology*, 76, 190-196. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.10.059>
- Rolet, O., Berthier, F., Beuquier, E., Gavoye, S., Notz, E., Roustel, S., Gagnaire, V., & Achilleos, C. (2013). Characterization of the non-coagulating enzyme fraction of different milk-clotting preparations. *LWT - Food Science and Technology*, 50(2), 459-468. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.08.021>

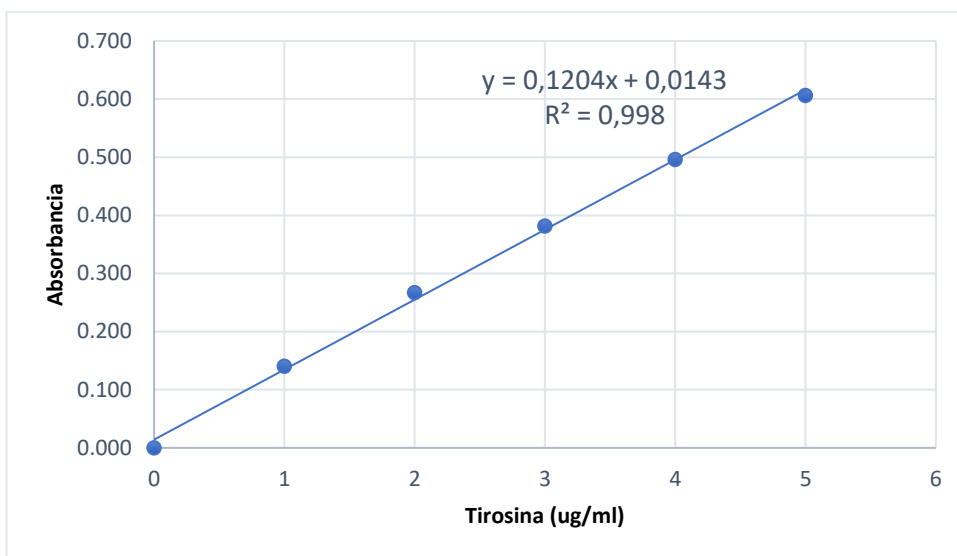
- Roussel, A., Canaan, S., Egloff, M.-P., Rivière, M., Dupuis, L., Verger, R., & Cambillau, C. (1999). Crystal Structure of Human Gastric Lipase and Model of Lysosomal Acid Lipase, Two Lipolytic Enzymes of Medical Interest. *Journal of Biological Chemistry*, 274(24), 16995-17002. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.24.16995>
- Roy, S., & Kumar, V. (2012). A Practical Approach on SDS PAGE for Separation of Protein. *International Journal of Science and Research*, 3(8), 955-960.
- Sandoval, M., Ayala, S., Oré, R., Loli, R., y Huamán, O. (2008). Estimulación de la actividad peptíca del jugo gástrico, inducida por látex de *Croton palanostigma*. *An Fac Med*, 69(3), 164-167.
- Sankalia, M., Sankalia, J., Sutariya, V., & Mashru, R. (2007). Pepsina capturada en gránulos gelificados de κ-carragenato reticulados mediante actividad ionotrópica para una mejora de la estabilidad: Optimización y caracterización fisicoquímica mediante el diseño de Box-Behnken. *Ars Pharm*, 48(3), 213-247.
- Santillo, A., Albenzio, M., Quinto, M., Caroprese, M., Marino, R., & Sevi, A. (2009). Probiotic in lamb rennet paste enhances rennet lipolytic activity, and conjugated linoleic acid and linoleic acid content in Pecorino cheese. *Journal of Dairy Science*, 92(4), 1330-1337. <https://doi.org/10.3168/jds.2008-1598>
- Saraswathy, N., & Ramalingam, P. (2011). Phosphoproteomics. En *Concepts and Techniques in Genomics and Proteomics* (pp. 203-211). Elsevier. <https://doi.org/10.1533/9781908818058.203>
- Sbodio, O., & Revelli, G. (2012). Coagulación de la leche. Desarrollo de un dispositivo para el "monitoreo" online del proceso. Avances en la Argentina. *Revista de investigación agropecuaria*, 38(3). <http://www.scielo.org.ar/pdf/ria/v38n3/v38n3a06.pdf>
- Siguenza Campoverde, A.F. (2024). *Protocolo de elaboración de quesos con enzimas de origen animal procedentes del cuajar de cabrito* [Tesis de licenciatura, Universidad Católica de Cuenca].
- Singh, B., & Kumar, R. (2022). *Practical Techniques in Molecular Biotechnology*. Cambridge University Press. [https://books.google.com.pe/books?id=U2IHEAAAQBAJ&pg=PA161&dq=Electrophoresis+buffer+continuous&hl=es&newbks=1&newbks\\_redir=0&sa=X&ved=2ahUKEwi3uvLemM-EAxVPFbkGHVtsDS4Q6AF6BAgJEAl#v=onepage&q=Electrophoresis%20buffer%20continuous&f=false](https://books.google.com.pe/books?id=U2IHEAAAQBAJ&pg=PA161&dq=Electrophoresis+buffer+continuous&hl=es&newbks=1&newbks_redir=0&sa=X&ved=2ahUKEwi3uvLemM-EAxVPFbkGHVtsDS4Q6AF6BAgJEAl#v=onepage&q=Electrophoresis%20buffer%20continuous&f=false)
- Sisson, S., Grossman, J., Getty, R., Ghoshal, N., Hillmann, D., & Ellenport, C. (2000). *Anatomía de los animales domésticos* (5.<sup>a</sup> ed.). MASSON. [https://books.google.com.pe/books?id=DiOfx1bOfdUC&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs\\_ViewAPI&redir\\_esc=y#v=onepage&q&f=false](https://books.google.com.pe/books?id=DiOfx1bOfdUC&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_ViewAPI&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false)
- Steward, K. (2024). *Polyacrylamide Gel Electrophoresis, How It Works, Technique Variants and Its Applications* [Científica]. Technology Networks. Analysis and separations. <https://www.technologynetworks.com/analysis/articles/polyacrylamide-gel-electrophoresis-how-it-works-technique-variants-and-its-applications-359100>
- Swamy, P. (2008). *Laboratory Manual on Biotechnology*. Rastogi Publications. [https://books.google.com.pe/books?id=\\_oFtJObOYTIC&newbks=1&newbks\\_redir=0&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs\\_ge\\_summary\\_r&cad=0#v=onepage&q&f=false](https://books.google.com.pe/books?id=_oFtJObOYTIC&newbks=1&newbks_redir=0&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false)
- Takahashi, T., & Ohsaka, A. (1970). Purification and characterization of a proteinase in the venom of *Trimeresurus flavoviridis*. Complete separation

- of the enzyme from hemorrhagic activity. *Biochimica et Biophysica Acta*, 198(2), 293-307. [https://doi.org/10.1016/0005-2744\(70\)90062-8](https://doi.org/10.1016/0005-2744(70)90062-8)
- Talledo Castillo, L. M. (2020). *Evaluación de la calidad y rendimiento del queso fresco elaborado con leche de vaca utilizando dos tipos de cuajo: Natural y artificial* [Tesis de licenciatura, Universidad Nacional de Piura]. <https://repositorio.unp.edu.pe/handle/20.500.12676/2457>
- Tang, J. (2013). Pepsin A. *Handbook of Proteolytic Enzymes* (pp. 27-35). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-382219-2.00003-X>
- Thierry, A., Collins, Y., Abeijón, M., McSweeney, P., Wilkinson, M., & Spinnler, H. (2017). Chapter 17: Lipolysis and Metabolism of Fatty Acids in Cheese. En *Cheese. Chemistry, Physics and Microbiology* (4.<sup>a</sup> ed., pp. 423-444). Academic Press. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B978012417012400017X>
- Timmermans, M., Teuchy, H., & Kupers, L. (1994). The cDNA sequence encoding bovine pregastric esterase. *Gene*, 147(2), 259-262. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(94\)90077-9](https://doi.org/10.1016/0378-1119(94)90077-9)
- Torres Egas, H. A. (2001). *El queso maduro y sus secretos* (serie de documentos de trabajo PRODAR-N°16). IICA. <https://repositorio.iica.int/handle/11324/10385>
- Treichel, H., De Oliveira, D., Mazutti, M., Di Luccio, M., & Oliveira, J. V. (2010). A Review on Microbial Lipases Production. *Food and Bioprocess Technology*, 3(2), 182-196. <https://doi.org/10.1007/s11947-009-0202-2>
- Tyagi, A., Kumar, A., Mohanty, A., Kaushik, J., Grover, S., & Batish, V. K. (2017). Expression of buffalo chymosin in *Pichia pastoris* for application in mozzarella cheese. *LWT*, 84, 733-739. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.06.033>
- Uniacke-Lowe, T. (2017). Chymosin, Pepsins and Other Aspartyl Proteinases: Structures, Functions, Catalytic Mechanism and Milk-Clotting Properties. En *Cheese. Chemistry, Physics and Microbiology* (4.<sup>a</sup> ed., pp. 69-113). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417012-4.00004-1>
- Uyttenbroeck, W., Hendriks, D., Vriend, G., De Baere, I., Moens, L., & Scharpé, S. (1993). Molecular Characterization of an Extracellular Acid-Resistant Lipase Produced by *Rhizopus javanicus*. *Biological Chemistry Hoppe-Seyler*, 374(1-6), 245-254. <https://doi.org/10.1515/bchm3.1993.374.1-6.245>
- Valdivieso Espinoza, I. G. (2019). *Evaluación de tres niveles de Oligosacáridos Mánanos (Saccharomyces cerevisiae) adicionados en dietas balanceadas de Lechones post destete, en la granja porcícola "San Francisco", Arenillas, El Oro*. [Tesis de licenciatura, Universidad Técnica de Babahoyo]. <http://dspace.utb.edu.ec/handle/49000/6069>
- Valivety, R., Halling, P., Peilow, A., & Macrae, A. (1992). Lipases from different sources vary widely in dependence of catalytic activity on water activity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1122(2), 143-146. [https://doi.org/10.1016/0167-4838\(92\)90316-6](https://doi.org/10.1016/0167-4838(92)90316-6)
- Van Hess, H. (2022). *Fibre in the diet of the suckling pig: Opportunities for the maturation of the gastrointestinal tract and post-weaning resilience* [Tesis doctoral, Ghent University]. <http://hdl.handle.net/1854/LU-8747841>
- Vega, M., Gómez, A., Villar, J., & Claverie-Martín, F. (2004). Molecular cloning and expression in yeast of caprine prochymosin. *Journal of Biotechnology*, 114(1-2), 69-79. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2004.06.002>

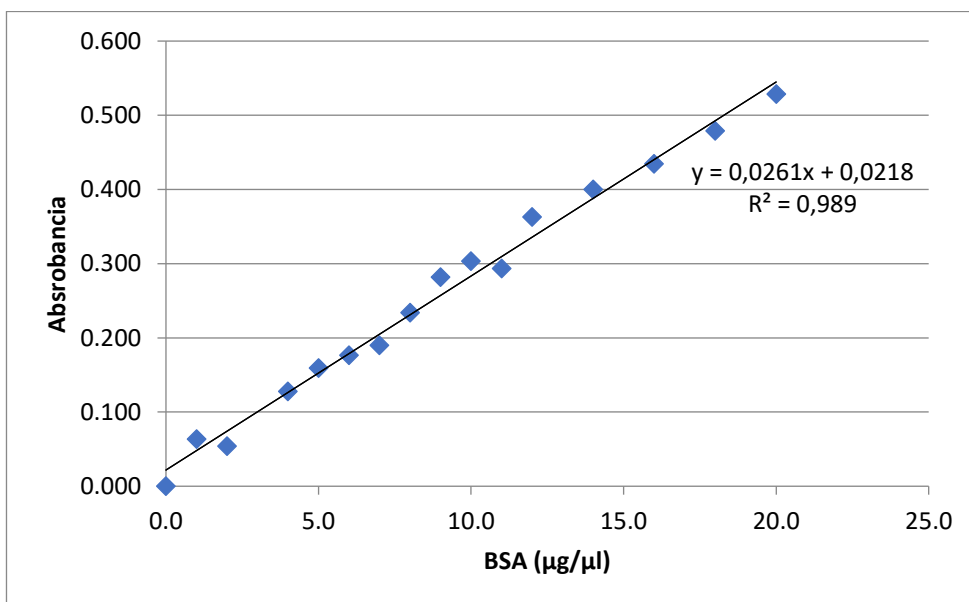
- Vilches León, E. E., & Núñez Amaro, S. (2005). *Manual de biología animal* (1.<sup>a</sup> ed.). Poligráfica Félix Valera.
- Virto, M., Chávarri, F., Bustamante, M., Barron, L., Aramburu, M., Vicente, M., Pérez-Elortondo, F., Albisu, M., & De Renobales, M. (2003). Lamb rennet paste in ovine cheese manufacture. Lipolysis and flavour. *International Dairy Journal*, 13(5), 391-399. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(03\)00007-4](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(03)00007-4)
- Voet, D., & Voet, J. (2006). *Bioquímica* (3.<sup>a</sup> ed.). Ed. Médica Panamericana. [https://books.google.com.pe/books?id=r5bedH\\_aST0C&pg=PA153&dq=buffers+funci%C3%B3n+electroforesis&hl=es&newbks=1&newbks\\_redir=0&sa=X&ved=2ahUKEwju78zJ08-EAxWXHbkGHZbgAdIQ6AF6BAgMEAl#v=onepage&q=buffers%20funci%C3%B3n%20electroforesis&f=false](https://books.google.com.pe/books?id=r5bedH_aST0C&pg=PA153&dq=buffers+funci%C3%B3n+electroforesis&hl=es&newbks=1&newbks_redir=0&sa=X&ved=2ahUKEwju78zJ08-EAxWXHbkGHZbgAdIQ6AF6BAgMEAl#v=onepage&q=buffers%20funci%C3%B3n%20electroforesis&f=false)
- Walstra, P. (1999). Casein sub-micelles: Do they exist?. *International Dairy Journal*, 9(3-6), 189-192. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(99\)00059-X](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(99)00059-X)
- Wang, J., Lan, G., Wang, G., Li, H., & Xie, Z. (2000). Anatomical subdivisions of the stomach of the Bactrian camel (*Camelus bactrianus*). *Journal of Morphology*, 245(2), 161-167. [https://doi.org/10.1002/1097-4687\(200008\)245:2<161::AID-JMOR6>3.0.CO;2-B](https://doi.org/10.1002/1097-4687(200008)245:2<161::AID-JMOR6>3.0.CO;2-B)
- Weber, K., & Osborn, M. (1969). The Reliability of Molecular Weight Determinations by Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis. *Journal of Biological Chemistry*, 244(16), 4406-4412. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)94333-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)94333-4)
- Wei, Z., Zhang, Y., Wang, Y., Fan, M., Zhong, X., Xu, N., Lin, F., & Xing, S. (2016). Production of Bioactive Recombinant Bovine Chymosin in Tobacco Plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(5), 624. <https://doi.org/10.3390/ijms17050624>
- Wenrich, B., & Trumbo, T. (2012). Interaction of nucleic acids with Coomassie Blue G-250 in the Bradford assay. *Analytical Biochemistry*, 428(2), 93-95. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2012.06.014>
- Yang, M., Ye, A., Yang, Z., Everett, D. W., Gilbert, E. P., & Singh, H. (2022). Kinetics of pepsin-induced hydrolysis and the coagulation of milk proteins. *Journal of Dairy Science*, 105(2), 990-1003. <https://doi.org/10.3168/jds.2021-21177>
- Yaranga Cano, R. M. (2009). *Alimentación de camélidos sudamericanos y manejo de pastizales*. Consorcio Andino para el Desarrollo.
- Zavala Castro, J. E. (2005). *Manual de Técnicas Básicas de Biología Molecular* (Vol. 7). UADY.

## **ANEXOS**

### Anexo 1. Curva patrón de Tirosina ( $\mu\text{g/ml}$ )



### Anexo 2. Curva patrón de albúmina sérica bovina (BSA) ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )



**Anexo 3.** Tiempo de coagulación de los extractos proteicos totales (EPT) de origen bovino, porcino y de alpaca

| MUESTRA         | TIEMPO DE COAGULACIÓN (s)  |      |      |        |       |       |        |       |       |
|-----------------|----------------------------|------|------|--------|-------|-------|--------|-------|-------|
|                 | PORCINO                    |      |      | BOVINO |       |       | ALPACA |       |       |
|                 | Tiempo de maceración (día) |      |      |        |       |       |        |       |       |
|                 | 15                         | 30   | 45   | 15     | 30    | 45    | 15     | 30    | 45    |
| C1              | 57                         | 47   | 46   | 14     | 14    | 20    | 308    | 238   | 161   |
| C2              | 48                         | 43   | 27   | 23     | 20    | 22    | 448    | 374   | 340   |
| C3              | 25                         | 12   | 8    | 19     | 20    | 18    | 2112   | 1925  | 1740  |
| C4              | 151                        | 84   | 105  | 165    | 114   | 170   | 1216   | 1287  | 792   |
| C5              | 35                         | 15   | 15   | 275    | 327   | 368   | 230    | 204   | 100   |
| C6              | 30                         | 19   | 16   | 134    | 160   | 160   | 1264   | 739   | 800   |
| C7              | 270                        | 211  | 176  | 738    | 1080  | 1020  | 1600   | 1259  | 1600  |
| C8              | 170                        | 180  | 120  | 512    | 780   | 740   | 800    | 903   | 800   |
| C9              | 17                         | 7    | 16   | 17     | 19    | 26    | 317    | 240   | 187   |
| C10             | 39                         | 38   | 44   | 480    | 240   | 405   | 748    | 680   | 388   |
| <b>PROMEDIO</b> | 84,2                       | 65,6 | 57,3 | 237,7  | 277,4 | 294,9 | 904,3  | 784,9 | 690,8 |

**Anexo 4.** Absorbancias para la determinación de la actividad proteolítica del cuajo porcino, bovino y de alpaca sobre caseína

| <b>ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA (ABS)</b> |                                   |           |           |               |           |           |               |           |           |
|-------------------------------------|-----------------------------------|-----------|-----------|---------------|-----------|-----------|---------------|-----------|-----------|
| <b>MUESTRA</b>                      | <b>PORCINO</b>                    |           |           | <b>BOVINO</b> |           |           | <b>ALPACA</b> |           |           |
|                                     | <b>Tiempo de maceración (día)</b> |           |           |               |           |           |               |           |           |
|                                     | <b>15</b>                         | <b>30</b> | <b>45</b> | <b>15</b>     | <b>30</b> | <b>45</b> | <b>15</b>     | <b>30</b> | <b>45</b> |
| C1                                  | 0,738                             | 0,799     | 0,857     | 0,922         | 1,025     | 1,052     | 0,679         | 0,699     | 0,759     |
| C2                                  | 0,890                             | 0,944     | 1,057     | 0,957         | 0,920     | 0,928     | 0,428         | 0,451     | 0,509     |
| C3                                  | 0,983                             | 1,297     | 1,374     | 0,864         | 0,884     | 0,933     | 0,410         | 0,419     | 0,502     |
| C4                                  | 0,710                             | 1,116     | 0,869     | 0,761         | 0,787     | 0,791     | 0,511         | 0,532     | 0,565     |
| C5                                  | 0,785                             | 0,898     | 0,964     | 0,598         | 0,670     | 0,629     | 0,623         | 0,592     | 0,665     |
| C6                                  | 0,950                             | 1,075     | 1,182     | 0,691         | 0,688     | 0,712     | 0,378         | 0,359     | 0,485     |
| C7                                  | 0,645                             | 0,757     | 0,778     | 0,629         | 0,642     | 0,659     | 0,415         | 0,458     | 0,527     |
| C8                                  | 0,801                             | 0,707     | 0,836     | 0,681         | 0,669     | 0,701     | 0,399         | 0,419     | 0,472     |
| C9                                  | 1,209                             | 1,386     | 1,489     | 0,931         | 1,118     | 0,987     | 0,734         | 0,809     | 0,988     |
| C10                                 | 0,762                             | 0,897     | 0,979     | 0,539         | 0,645     | 0,588     | 0,548         | 0,562     | 0,641     |

**Anexo 5.** Actividad proteolítica de cuajo porcino, bovino y de alpaca expresada en µg/ml de tirosina

| MUESTRA    | TIROSINA (µg/ml)           |        |        |        |       |       |        |       |       |
|------------|----------------------------|--------|--------|--------|-------|-------|--------|-------|-------|
|            | PORCINO                    |        |        | BOVINO |       |       | ALPACA |       |       |
|            | Tiempo de maceración (día) |        |        |        |       |       |        |       |       |
|            | 15                         | 30     | 45     | 15     | 30    | 45    | 15     | 30    | 45    |
| <b>C1</b>  | 6,098                      | 6,624  | 7,123  | 7,683  | 8,570 | 8,803 | 0,679  | 0,699 | 0,759 |
| <b>C2</b>  | 7,407                      | 7,873  | 8,846  | 7,984  | 7,666 | 7,735 | 0,428  | 0,451 | 0,509 |
| <b>C3</b>  | 8,208                      | 10,913 | 11,576 | 7,183  | 7,356 | 7,778 | 0,410  | 0,419 | 0,502 |
| <b>C4</b>  | 5,857                      | 9,354  | 7,227  | 6,296  | 6,520 | 6,555 | 0,511  | 0,532 | 0,565 |
| <b>C5</b>  | 6,503                      | 7,476  | 8,045  | 4,892  | 5,512 | 5,159 | 0,623  | 0,592 | 0,665 |
| <b>C6</b>  | 7,924                      | 9,001  | 9,922  | 5,693  | 5,668 | 5,874 | 0,378  | 0,359 | 0,485 |
| <b>C7</b>  | 5,297                      | 6,262  | 6,443  | 5,159  | 5,271 | 5,418 | 0,415  | 0,458 | 0,527 |
| <b>C8</b>  | 6,641                      | 5,831  | 6,942  | 5,607  | 5,504 | 5,780 | 0,399  | 0,419 | 0,472 |
| <b>C9</b>  | 10,155                     | 11,680 | 12,567 | 7,761  | 9,371 | 8,243 | 0,734  | 0,809 | 0,988 |
| <b>C10</b> | 6,305                      | 7,468  | 8,174  | 4,384  | 5,297 | 4,806 | 0,548  | 0,562 | 0,641 |

**Anexo 6.** Absorbancias obtenidas por la técnica Bradford para la cuantificación de proteínas totales del cuajo porcino, bovino y de alpaca.

| <b>BRADFORD (ABS)</b> |                                   |           |           |               |           |           |               |           |           |
|-----------------------|-----------------------------------|-----------|-----------|---------------|-----------|-----------|---------------|-----------|-----------|
| <b>MUESTRA</b>        | <b>PORCINO</b>                    |           |           | <b>BOVINO</b> |           |           | <b>ALPACA</b> |           |           |
|                       | <b>Tiempo de maceración (día)</b> |           |           |               |           |           |               |           |           |
|                       | <b>15</b>                         | <b>30</b> | <b>45</b> | <b>15</b>     | <b>30</b> | <b>45</b> | <b>15</b>     | <b>30</b> | <b>45</b> |
| C1                    | 0,420                             | 0,550     | 0,568     | 0,367         | 0,425     | 0,261     | 0,576         | 0,527     | 0,429     |
| C2                    | 0,427                             | 0,365     | 0,414     | 0,378         | 0,331     | 0,301     | 0,415         | 0,511     | 0,444     |
| C3                    | 0,360                             | 0,425     | 0,766     | 0,368         | 0,349     | 0,373     | 0,728         | 0,558     | 0,564     |
| C4                    | 0,355                             | 0,424     | 0,384     | 0,336         | 0,435     | 0,230     | 0,796         | 0,575     | 0,459     |
| C5                    | 0,487                             | 0,515     | 0,476     | 0,268         | 0,386     | 0,223     | 0,629         | 0,513     | 0,356     |
| C6                    | 0,465                             | 0,468     | 0,424     | 0,371         | 0,286     | 0,328     | 0,599         | 0,359     | 0,379     |
| C7                    | 0,368                             | 0,448     | 0,349     | 0,292         | 0,456     | 0,340     | 0,522         | 0,424     | 0,572     |
| C8                    | 0,322                             | 0,345     | 0,518     | 0,306         | 0,438     | 0,382     | 0,588         | 0,420     | 0,470     |
| C9                    | 0,367                             | 0,471     | 0,481     | 0,490         | 0,426     | 0,437     | 0,838         | 0,521     | 0,626     |
| C10                   | 0,300                             | 0,358     | 0,503     | 0,378         | 0,416     | 0,430     | 0,577         | 0,442     | 0,477     |

**Anexo 7.** Cuantificación de proteína total ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) del cuajo porcino, bovino y de alpaca

| PROTEINAS TOTALES ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) |                            |        |        |        |        |        |        |        |        |
|---|----------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| MUESTRA   | PORCINO                    |        |        | BOVINO |        |        | ALPACA |        |        |
|   | Tiempo de maceración (día) |        |        |        |        |        |        |        |        |
|   | 15                         | 30     | 45     | 15     | 30     | 45     | 15     | 30     | 45     |
| C1  | 15,346                     | 20,346 | 21,038 | 13,295 | 15,551 | 9,231  | 21,346 | 19,449 | 15,679 |
| C2  | 15,615                     | 13,231 | 15,103 | 13,731 | 11,923 | 10,756 | 15,167 | 18,833 | 16,269 |
| C3  | 13,051                     | 15,526 | 28,667 | 13,359 | 12,615 | 13,538 | 27,179 | 20,654 | 20,897 |
| C4  | 12,859                     | 15,487 | 13,962 | 12,103 | 15,936 | 8,038  | 29,795 | 21,321 | 16,846 |
| C5  | 17,923                     | 18,987 | 17,500 | 9,487  | 14,026 | 7,769  | 23,372 | 18,923 | 12,897 |
| C6  | 17,090                     | 17,205 | 15,513 | 13,462 | 10,205 | 11,808 | 22,231 | 12,987 | 13,769 |
| C7  | 13,359                     | 16,410 | 12,615 | 10,436 | 16,731 | 12,282 | 19,269 | 15,487 | 21,179 |
| C8  | 11,564                     | 12,449 | 19,115 | 10,949 | 16,038 | 13,872 | 21,821 | 15,333 | 17,256 |
| C9  | 13,295                     | 17,295 | 17,679 | 18,051 | 15,590 | 16,000 | 31,423 | 19,218 | 23,256 |
| C10   | 10,718                     | 12,974 | 18,538 | 13,718 | 15,205 | 15,731 | 21,372 | 16,179 | 17,526 |

**Anexo 8.** Gasto de NaOH 0,01 N para la determinación de actividad lipolítica del cuajo porcino, bovino y de alpaca.

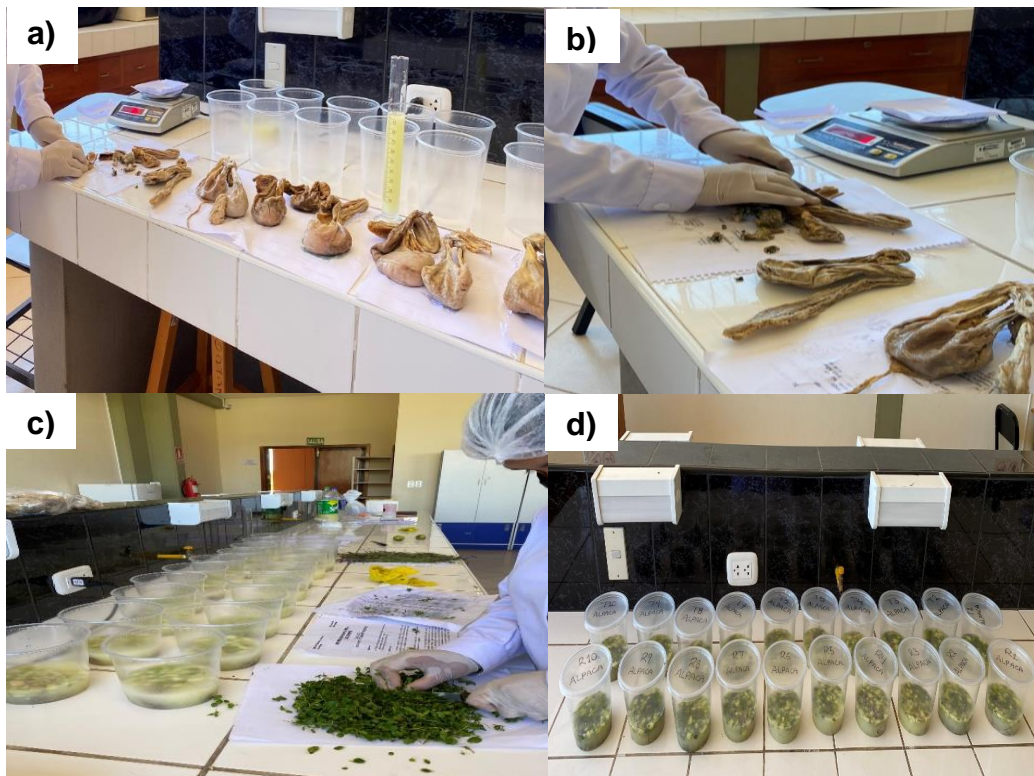
| <b>GASTO NaOH 0,01N</b> |                                   |           |           |               |           |           |               |           |           |
|-------------------------|-----------------------------------|-----------|-----------|---------------|-----------|-----------|---------------|-----------|-----------|
| <b>MUESTRA</b>          | <b>PORCINO</b>                    |           |           | <b>BOVINO</b> |           |           | <b>ALPACA</b> |           |           |
|                         | <b>Tiempo de maceración (día)</b> |           |           |               |           |           |               |           |           |
|                         | <b>15</b>                         | <b>30</b> | <b>45</b> | <b>15</b>     | <b>30</b> | <b>45</b> | <b>15</b>     | <b>30</b> | <b>45</b> |
| C1                      | 2,4                               | 3,1       | 3,3       | 4,9           | 4,8       | 5,1       | 1,7           | 1,9       | 2,4       |
| C2                      | 2,5                               | 2,7       | 2,8       | 4,0           | 4,2       | 4,7       | 1,7           | 2,0       | 3,1       |
| C3                      | 2,3                               | 2,5       | 2,5       | 4,1           | 4,3       | 4,6       | 2,1           | 2,6       | 2,8       |



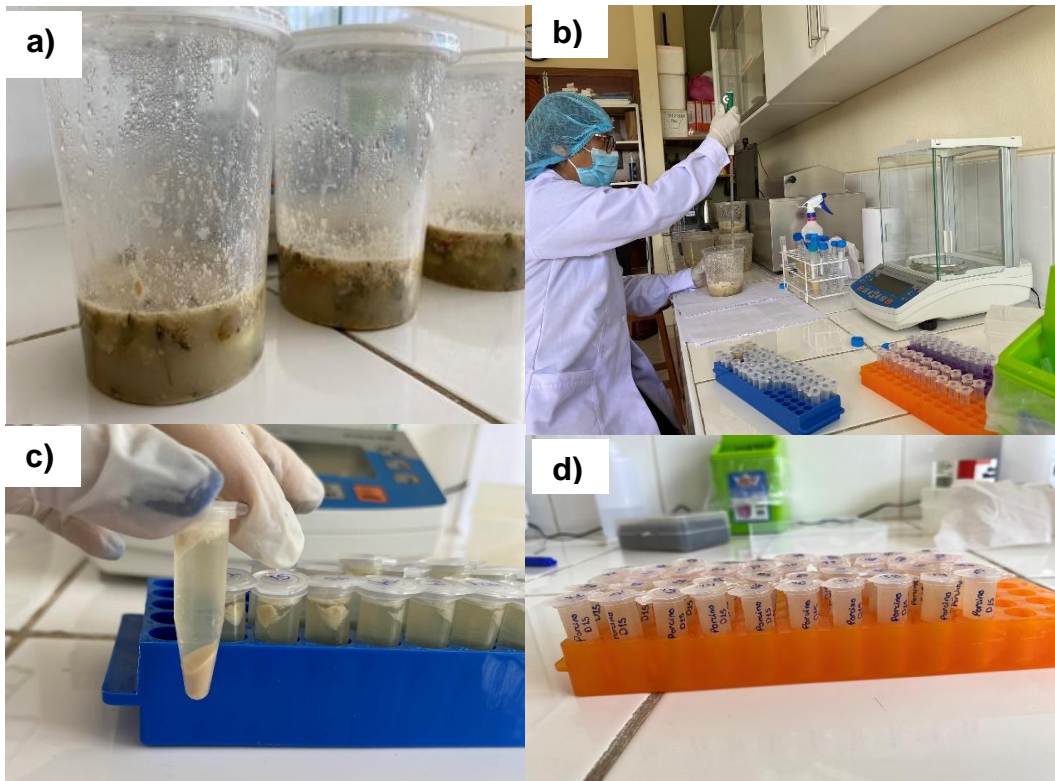
**Anexo 9.** Preparación del cuajo natural según el proceso empírico de la región de Pariahuanca (Cangallo).



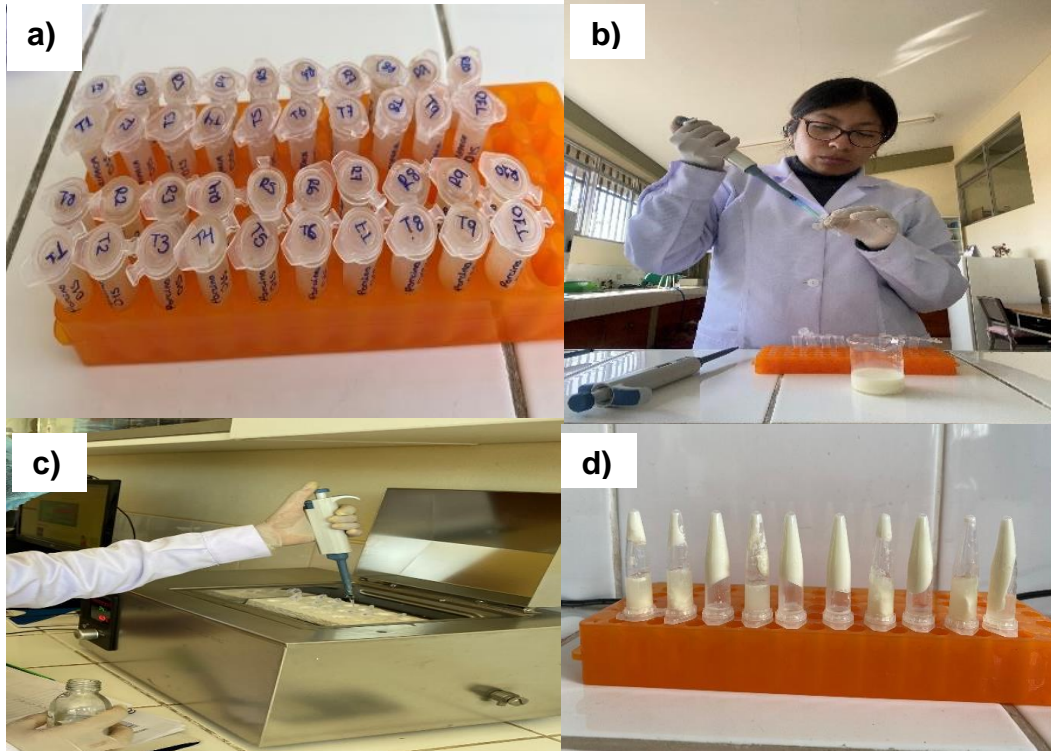
**Anexo 10.** Secado del cuajo natural según el proceso empírico de la región de Pariahuanca (Cangallo).



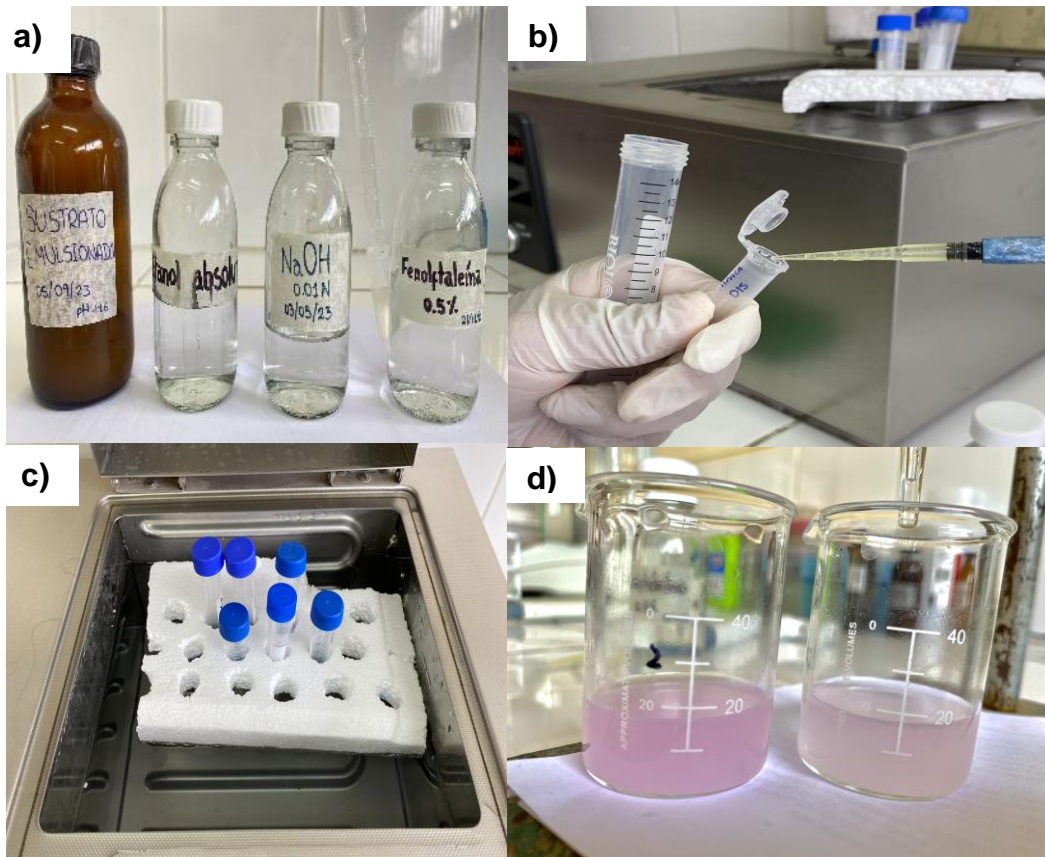
**Anexo 11.** Maceración del cuajo. a) Estómagos deshidratados. b) Corte y pesaje del abomaso. c) Tejido abomasal, *Muehlenbeckia volcanica* “mullaca”, *Lobelia kalmii* “cuajera”, manzana verde, sal granulada y suero de leche bovina colocados en recipientes para su maceración. d) Recipientes de maceración (repeticiones).



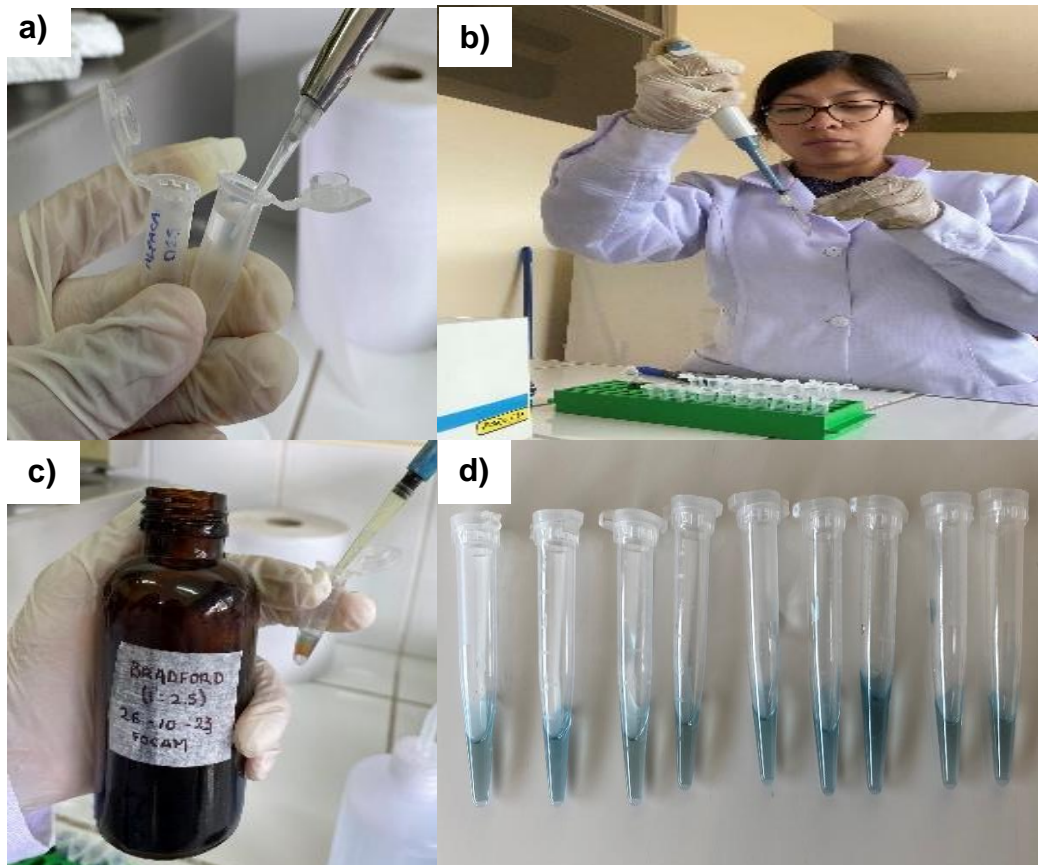
**Anexo 12.** Obtención del Extracto Proteico Total (EPT). a) Macerados. b) Extracción del macerado con pipeta 5ml. c) Macerados centrifugados. d) Traspaso del líquido traslúcido (EPT) a tubos Eppendorf 1 ml.



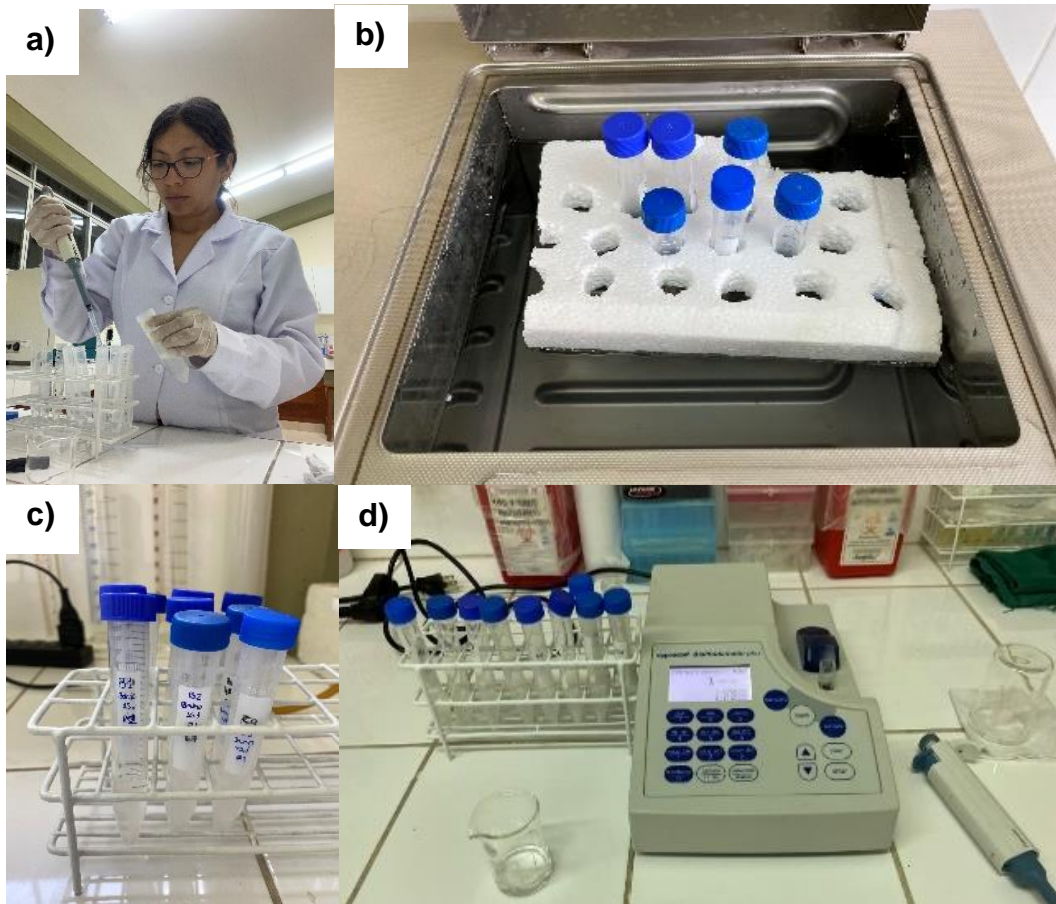
**Anexo 13.** Determinación de la actividad coagulante. a) Tubos con EPT (extracto proteico total). b) Leche bovina fresca colocada en tubos Eppendorf 1 ml. c) Incorporación de  $\text{CaCl}_2$  y EPT a las muestras de leche fresca bovina. d) Leche bovina coagulada.



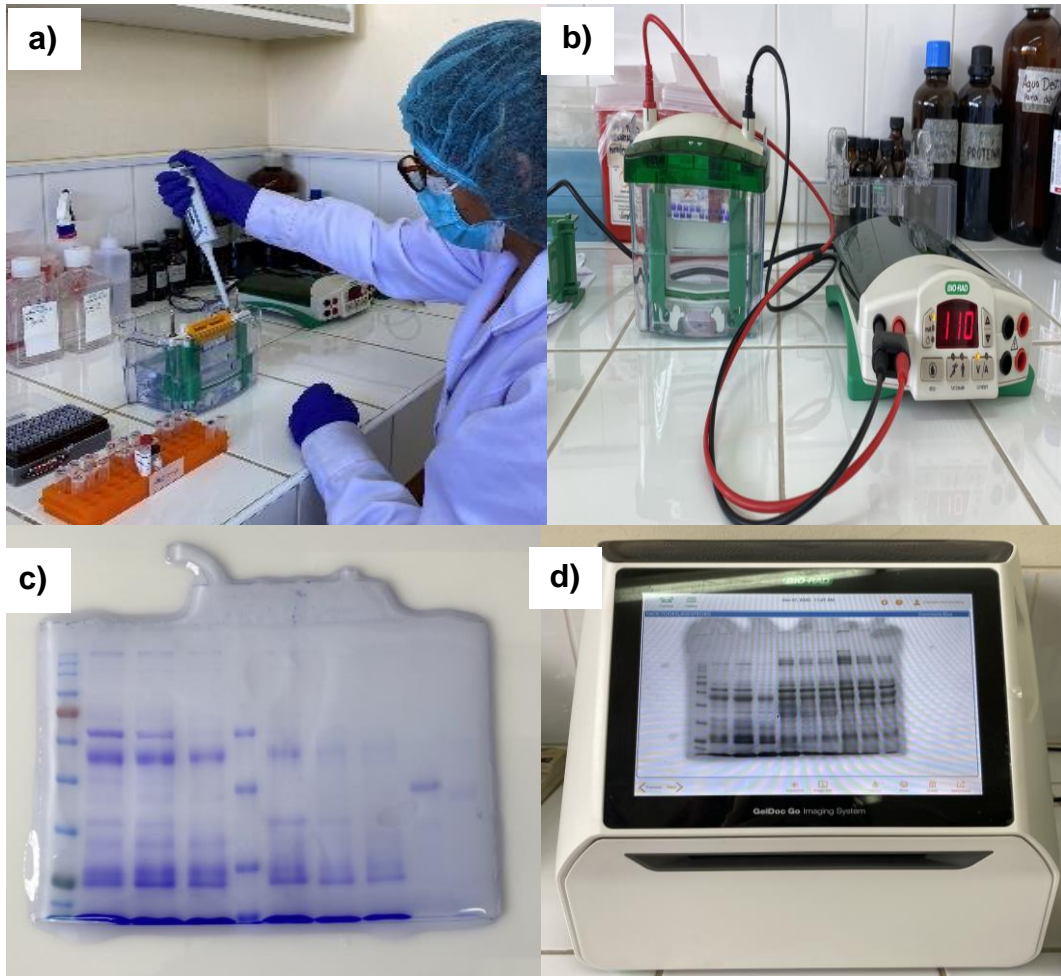
**Anexo 14.** Determinación de la actividad lipolítica. a) Reactivos para la determinación de actividad lipolítica. b) Mezcla de sustrato emulsionado y EPT en tubo Eppendorf 15 ml. c) Reacción a 35 °C por 30 min. d) Mezclas tituladas.



**Anexo 15.** Determinación de proteína totales por Bradford. a) ETP añadido b) Diluido tras pasado en otro tubo Eppendorf 1 ml. c) Reactivo Bradford añadido al diluido. d) Reacción Bradford durante 10 minutos para su posterior lectura en espectrofotómetro 595 nm.



**Anexo 16.** Determinación de actividad proteolítica. a) Preparación de Tris HCl 0,2 M (pH 8,5) más Caseína 0,2% en Tubo Eppendorf 50 ml. b) EPT añadido al preparado e incubado a 15 min a 37 °C. c) Reacción frenada por adición de ATA 0,44 M d) Lectura en espectrofotómetro a 280 nm.



**Anexo 17.** Perfil electroforético SDS-PAGE. a) 50  $\mu$ g de EPT cargados en cada pocillo. b) Corrida electroforética a 110 V durante 2 horas. c) Gel listo para su análisis. d) Analizador de geles.

**Anexo 18.** Buffer de carga o muestra

| <b>Reactivo</b>         | <b>X</b> | <b>2X</b> | <b>4X</b> |
|-------------------------|----------|-----------|-----------|
| Tris base 0,5M (pH 6,8) | 0.3785 g | 0,747 g   | 1,514 g   |
| SDS 10%                 | 1g       | 2 g       | 4 g       |
| Glicerol                | 5 ml     | 10 ml     | 20 ml     |
| 2-mercaptoetanol        | 2,5 ml   | 5 ml      | 10 ml     |
| Azul de bromofenol      | 50mg     | 100 mg    | 200 mg    |
| Agua destilada          |          |           | 10 ml     |

**Anexo 19.** Gel separador

| <b>Gel separador 13%</b>            |                    |
|-------------------------------------|--------------------|
| <b>Componente</b>                   | <b>1 gel (7ml)</b> |
| Agua destilada                      | 2,132 ml           |
| Tampón de separación pH 8,8         | 1,75 ml            |
| Mezcla Acrilamida/bisacrilamida 35% | 3,01 ml            |
| SDS 10%                             | 70 $\mu$ l         |
| APS 10%                             | 35 $\mu$ l         |
| Temed                               | 7 $\mu$ l          |

**Anexo 20.** Gel concentrador

| <b>Gel concentrador 3%</b>          |                     |
|-------------------------------------|---------------------|
| <b>Componente</b>                   | <b>1 gel (3 ml)</b> |
| Agua destilada                      | 1,89 ml             |
| Tampón de separación pH 6,8         | 0,75 ml             |
| Mezcla Acrilamida/bisacrilamida 40% | 300 $\mu$ l         |
| SDS 10%                             | 30 $\mu$ l          |
| APS 10%                             | 30 $\mu$ l          |
| Temed                               | 3 $\mu$ l           |

**Anexo 21.** Buffer de corrida o glicina

| <b>Buffer de corrida 10X (1000 ml) (pH 8,3)</b> |       |
|---|-------|
| 25 mM Tris-base                                 | 30 g  |
| 192 mM Glicina                                  | 144 g |
| SDS 1%  | 10 g  |

**Anexo 22.** Colorante azul de Coomassie

| <b>Colorante azul de Coomassie (2000 ml)</b> |         |
|--|---------|
| Azul de Coomassie G-250                      | 1 g     |
| Sulfato de cobre. 5H <sub>2</sub> O          | 2 g     |
| Metanol 95%                                  | 600 ml  |
| Ácido acético glacial                        | 200 ml  |
| H <sub>2</sub> O destilada                   | 1200 ml |

**Anexo 23.** Decolorante

| <b>Decolorante (2000 ml)</b> |         |
|------------------------------|---------|
| Ácido acético glacial        | 200 ml  |
| Metanol 95%                  | 600 ml  |
| Agua destilada               | 1200 ml |

**Anexo 24.** Matriz de consistencia.

**Título:** Caracterización enzimática de cuajo porcino, bovino y de camélido utilizados en la elaboración de quesos artesanales de Pariahuanca (Cangallo).

| TÍTULO  | PROBLEMA  | OBJETIVOS   | MARCO TEÓRICO  | HIPÓTESIS  | VARIABLES   | METODOLOGÍA  |
|---|---|---|--|--|---|--|
| Caracterización enzimática de cuajo porcino, bovino y de camélido utilizados en la elaboración de quesos artesanales de Pariahuanca (Cangallo). | ¿Cuál será la caracterización enzimática del cuajo porcino, bovino y de camélido, utilizados en la elaboración de quesos artesanales de Pariahuanca (Cangallo)? | <p><b>Objetivo general</b><br/>Caracterizar la actividad enzimática y conocer las proteínas presentes en el cuajo porcino, bovino y de camélido según el tiempo de maceración.</p> <p><b>Objetivos específicos</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Describir el proceso empírico de preparación y aplicación de cuajos naturales de origen animal para la obtención de quesos artesanales.</li> <li>2. Evaluar la actividad coagulante de los extractos obtenidos durante la maceración.</li> <li>3. Evaluar la actividad proteolítica y lipolítica de los extractos obtenidos durante la maceración.</li> <li>4. Establecer el perfil electroforético de los extractos obtenidos durante la maceración.</li> </ol> | <p><b>Antecedentes</b></p> <p><b>Marco conceptual</b></p> <p>Cuajo Animal<br/>Anatomía y fisiología digestiva (bovino, porcino y camélido sudamericano)<br/>Producción de cuajo animal<br/>Actividad coagulante<br/>Proteínas totales<br/>Actividad coagulante<br/>Actividad proteolítica<br/>Actividad lipolítica<br/>Fuerza de cuajo<br/>Electroforesis de proteínas</p> | Existen diferencias significativas en la caracterización enzimática del cuajo porcino, bovino y de alpaca según el tiempo de maceración. | <p><b>Variables de estudio:</b><br/>Caracterización enzimática del cuajo bovino, porcino y de camélido.</p> <p><b>Indicadores:</b><br/>Tiempo de maceración: Días (15,30 y 45)<br/>Actividad coagulante: Unidades Soxhlet (SU), 1 ml o g de cuajo que coagula cierta cantidad de leche en mililitros a 35 °C en 40 minutos.<br/>Actividad proteolítica: expresado en unidades de actividad proteolítica (UI), donde una unidad equivale a la liberación de 1 mg de L-tirosina por minuto a 35°C y pH 8.8.<br/>Actividad lipolítica: Unidad de actividad de lipasa (UI) (1 micromol de ácido graso liberado por minuto a 35°C en 30 minutos).<br/>Perfil electroforético: Peso molecular (kDa)</p> | <p><b>Diseño de investigación:</b><br/>No experimental</p> <p><b>Tipo de investigación:</b><br/>Descriptiva</p> <p><b>Población</b><br/>Porcinos de raza criolla, bovinos de raza criolla y alpacas de raza Huacaya.</p> <p><b>Muestra</b><br/>10 muestras de abomaso fresco bovino de edad entre 13 -17 meses (matadero “Los Morochucos”) de raza criolla.<br/>10 muestras de estómago fresco porcino (matadero “Los Morochucos”) de edad entre 8-12 meses de raza criolla.<br/>10 muestras de abomaso fresco de alpaca (camal municipal de Huancavelica) de 2 a3 años de la raza Huacaya.</p> <p><b>Técnica</b><br/>Preparación de los cuajos naturales (bovino, porcino y alpaca).<br/>Determinar las proteínas totales según la técnica Bradford mejorado por Ernst y Zor (2010).<br/>Determinar la fuerza de cuajo según Wei <i>et al.</i> (2016).<br/>Analizar la actividad lipolítica según el método adaptado de Mendoza <i>et al.</i> (2020), Bustamante <i>et al.</i> (2000) y Valivety <i>et al.</i> (1992). y la actividad proteolítica según de Azañero <i>et al.</i> (2000)<br/>Realizar el perfil electroforético según el protocolo detallado por Maldonado y Jorrín (2001).</p> |



# UNSCH

## FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

### ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

Bach. Nadeshsha Jhenyfer CONTRERAS MANCILLA

RESOLUCIÓN DECANAL N° 529-2024-UNSCH-FCB-D

En la ciudad de Ayacucho, siendo las diez de la mañana del día jueves cinco de diciembre del año dos mil veinticuatro; se reunieron los miembros del Jurado Evaluador en el Auditorio de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, participando como presidente encargado el Dr. Carlos Emilio CARRASCO BADAJOZ con memorando N° 389-2024-UNSCH-FCB con fecha cuatro de diciembre del año dos mil veinticuatro, la Dra. Roberta Brita ANAYA GONZÁLEZ (Miembro – Jurado), Mg. Paula GARCÍA GODOS ALCÁZAR (Miembro – Jurado), Dr. Fidel Rodolfo MUJICA LENGUA (Miembro – Asesor), actuando como secretario docente el Mg. Luis Uriel MOSCOSO GARCÍA; para presenciar la sustentación de tesis titulada: **Caracterización enzimática del cuajo porcino, bovino y de camélido utilizados en la elaboración de quesos artesanales de Pariahuanca (Cangallo)**, presentado por la Bach. Nadeshsha Jhenyfer CONTRERAS MANCILLA; el presidente luego de verificar la documentación presentada, indicó al secretario docente dar lectura a la documentación generada que refrenda el presente acto académico, luego de ello dispuso el inicio del acto de sustentación, indicando a la sustentante que dispone de cuarenta y cinco minutos para exponer su trabajo de investigación tal como establece el Reglamento de Grados y Títulos de la Escuela Profesional de Biología de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. Culminada la exposición, el presidente invitó a cada uno de los Miembros del Jurado a participar con sus observaciones, sugerencias y preguntas a la sustentante. Culminada esta etapa, el presidente invitó a la sustentante y al público asistente a abandonar momentáneamente el Auditorio de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga para que los miembros del jurado evaluador puedan realizar las deliberaciones y calificaciones; cuyos resultados son los que se consignan a continuación:

| Miembros del Jurado Evaluador     | Exposición | Respuesta/preguntas | Promedio |
|-----------------------------------|------------|---------------------|----------|
| Dra. Roberta Brita ANAYA GONZÁLEZ | 18         | 17                  | 18       |
| Mg. Paula GARCÍA GODOS ALCÁZAR    | 18         | 17                  | 18       |
| PROMEDIO                          |            |                     | 18       |

La sustentante alcanzó el promedio de 18 aprobatorio. Acto seguido, el presidente autorizó el ingreso de la sustentante y el público al Auditorio de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga dando a conocer los resultados e indicando que de este modo se da por finalizado el presente acto académico, siendo las doce del mediodía con treinta minutos; firmando al pie del presente en señal de conformidad.

  
Dr. Carlos Emilio CARRASCO BADAJOZ  
Presidente (e)

  
Dra. Roberta Brita ANAYA GONZÁLEZ  
Miembro – Jurado

  
Mg. Paula GARCÍA GODOS ALCÁZAR  
Miembro – Jurado

  
Dr. Fidel Rodolfo MUJICA LENGUA  
Miembro - Asesor

  
Mg. Luis Uriel MOSCOSO GARCÍA  
Secretario Docente



FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA

DECANATURA - ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA

CONSTANCIA DE ORIGINALIDAD DE TRABAJO DE TESIS

Nº 012-2025-FCB-D

Yo, FIDEL RODOLFO MUJICA LENGUA, Director de la Escuela Profesional de Biología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga; autoridad encargada de verificar la tesis titulada: **Caracterización enzimática del cuajo porcino, bovino y de camélido utilizados en la elaboración de quesos artesanales de Pariahuanca (Cangallo)**, por NADESSHA JHENYFER CONTRERAS MANCILLA; he constatado por medio del uso de la herramienta TURNITIN, procesado CON DEPÓSITO, una similitud de 4%, grado de coincidencia, menor a lo que determina la ausencia de plagio definido por el Reglamento de Originalidad de Trabajos de Investigación de la UNSCH, aprobado con Resolución del Consejo Universitario Nº 039-2021-UNSCH-CU.

En consecuencia, la tesis cumple con las normas para el uso de citas y referencias establecidas por la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. Se acompaña el INFORME FINAL DE TURNITIN correspondiente.

Ayacucho, 20 de marzo de 2025.

  
UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL DE HUAMANGA  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
Escuela Profesional de Biología  
Dr. Fidel R. Mujica Lengua  
DIRECTOR

# Caracterización enzimática del cuajo porcino, bovino y de camélido utilizados en la elaboración de quesos artesanales de Pariahuanca (Cangallo)

por NADESSHA JHENYFER CONTRERAS MANCILLA

---

**Fecha de entrega:** 19-mar-2025 05:12p.m. (UTC-0500)

**Identificador de la entrega:** 2619451826

**Nombre del archivo:** NTRERAS\_MANCILLA-\_Nadessha-\_Jhenyfer-\_pregrado-2025\_TURNITIN.pdf (2.29M)

**Total de palabras:** 15230

**Total de caracteres:** 73474

# Caracterización enzimática del cuajo porcino, bovino y de camélido utilizados en la elaboración de quesos artesanales de Pariahuanca (Cangallo)

## INFORME DE ORIGINALIDAD

**4** %  
INDICE DE SIMILITUD

**4** %  
FUENTES DE INTERNET

**0** %  
PUBLICACIONES

**2** %  
TRABAJOS DEL  
STUDIANTE

## FUENTES PRIMARIAS

|          |   |              |
|----------|---|--------------|
| <b>1</b> | <a href="http://www.scielo.org.pe">www.scielo.org.pe</a><br>Fuente de Internet              | <b>1</b> %   |
| <b>2</b> | Submitted to Universidad Nacional de San de Cristóbal de Huamanga<br>Trabajo del estudiante | <b>1</b> %   |
| <b>3</b> | <a href="http://repositorio.unc.edu.pe">repositorio.unc.edu.pe</a><br>Fuente de Internet    | <b>1</b> %   |
| <b>4</b> | <a href="http://revistas.censa.edu.cu">revistas.censa.edu.cu</a><br>Fuente de Internet      | < <b>1</b> % |
| <b>5</b> | <a href="http://atlantachosun.org">atlantachosun.org</a><br>Fuente de Internet              | < <b>1</b> % |
| <b>6</b> | <a href="http://www.dspace.espol.edu.ec">www.dspace.espol.edu.ec</a><br>Fuente de Internet  | < <b>1</b> % |
| <b>7</b> | <a href="http://idoc.pub">idoc.pub</a><br>Fuente de Internet                                | < <b>1</b> % |
| <b>8</b> | <a href="http://repository.its.ac.id">repository.its.ac.id</a><br>Fuente de Internet        | < <b>1</b> % |

Excluir citas  Activo

Excluir bibliografía  Activo

Excluir coincidencias < 30 words