

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL
DE HUAMANGA**

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA



TESIS:

**Perfil electroforético del extracto proteico total obtenido de
tejido gástrico de fetos y crías de *Vicugna pacos* "alpaca"**

Para optar el título profesional de:
BIÓLOGA, ESPECIALIDAD: MICROBIOLOGÍA

PRESENTADO POR:
Bach. Jaqueline Susan HUAMAN PEREZ

ASESOR:
Dr. MUJICA LENGUA, Fidel Rodolfo

AYACUCHO - PERÚ

2025

Con toda mi gratitud, amor,
eternamente a mi madre Leonilda,
por su paciencia, amor, apoyo y
comprensión, sobre todo las
noches donde sentía que no podía
seguir.

AGRADECIMIENTOS

A mi *Alma Mater*, Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, a la Facultad de Ciencias Biológicas, Escuela Profesional de Biología y la Especialidad de Microbiología, por permitirme formarme profesionalmente.

Al Laboratorio de Biotecnología de Facultad de Ciencias Biológicas, por todas las facilidades para el uso de los ambientes, equipos, materiales y reactivos.

Al Dr. Fidel Rodolfo Mujica Lengua; asesor del presente trabajo de investigación, por su amistad, comprensión, sugerencias, apoyo y orientaciones, por haber depositado toda su confianza y por todo el apoyo brindado para iniciar, desarrollar y culminar mi tesis.

Al Blgo. Reynán Cóndor Alarcón, por el apoyo en la evaluación estadística y consejos durante la etapa experimental. A mis compañeros tesisistas con los que compartimos tantos días y momentos inolvidables: Rosmery, Rubén, Alex, Crissthel, Kevin y Harumi, compartiendo consejos y experiencias para que este trabajo pueda concluirse. A mis hermanos por su apoyo durante toda la ejecución de la tesis.

ÍNDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS	ii
ÍNDICE GENERAL	iii
ÍNDICE DE TABLAS	v
ÍNDICE DE FIGURAS	vi
ÍNDICE DE ANEXOS	viii
RESUMEN	ix
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	3
2.1 Antecedentes	3
2.1.1 Antecedentes internacionales	3
2.1.2 Antecedentes nacionales	4
2.2 Marco conceptual	5
2.2.1 Anatomía y fisiología digestiva de la alpaca	5
2.2.2 Cuajos animales	7
2.2.3 Proteínas de la leche	7
2.2.4 Enzimas coagulantes	11
2.2.5 Variación de la proporción quimosina/pepsina	12
2.2.6 Coagulación de la leche	13
2.2.7 Extracción y purificación de proteínas	14
2.2.8 Electroforesis SDS-PAGE	15
2.2.9 Fotodocumentación, densitometría y análisis de imágenes	21
III. MATERIALES Y MÉTODOS	22
3.1 Ubicación de la zona de estudio	22
3.2 Población y muestra	22
3.2.1 Población	22
3.2.2 Muestra	22
3.2.3 Tipo de muestreo	22
3.3 Metodología experimental	23
3.3.1 Colecta de estómagos de fetos de alpaca	23
3.3.2 Colecta de estómagos de crías lactantes de alpaca	23
3.3.3 Obtención del Extracto Proteico Total (EPT)	23
3.3.4 Cuantificación de proteínas por Bradford	24
3.3.5 Electroforesis SDS-PAGE	25
3.3.6 Fotodocumentación y procesamiento de imágenes.	28

3.4 Técnicas de procesamiento y análisis de datos	29
IV. RESULTADOS	30
V. DISCUSIÓN	40
VI. CONCLUSIONES	45
VII. RECOMENDACIONES	46
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47
ANEXOS	55

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Contenido de proteína (medianas) del Extrado Proteico Total (EPT) de los tres compartimentos CI, CII y CIII de los estómagos de fetos y crías de <i>Vicugna pacos</i> “alpaca”, Ayacucho 2024.	31
Tabla 2. Concentración relativa (medianas) de la banda correspondiente a quimosina del Compartimento I (CI), Compartimento II (CII) y Compartimento III (CIII) de los estómagos de fetos y crías de <i>Vicugna pacos</i> “alpaca” en aproximadamente 30 µg de proteína, Ayacucho 2024	35
Tabla 3. Concentración relativa (medianas) de la banda correspondiente a pepsina del Compartimento I (CI), Compartimento II (CII) y Compartimento III (CIII) de los estómagos de fetos y crías de <i>Vicugna pacos</i> “alpaca” en aproximadamente 30 µg de proteína, Ayacucho 2024.	36
Tabla 4. Relación Quimosina/Pepsina del Compartimento I (CI), Compartimento II (CII) y Compartimento III (CIII) de los estómagos de fetos y crías de <i>Vicugna pacos</i> “alpaca”, Ayacucho 2024.	37

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Proceso de coagulación de la leche por la enzima quimosina. La enzima quimosina actúa sobre las micelas de caseína (<i>k</i> -caseína) causando la desestabilización de las micelas produciendo la coagulación (Chen et al., 2021).	14
Figura 2. Electroforesis discontinua en gel de poliacrilamida: (A) se dispensa la muestra. (B) se aplica corriente y la muestra se concentra en el gel. (C) separación de proteínas por su peso molecular (Stringer, 2005).	16
Figura 3. Componentes de la cámara de electroforesis vertical (Bio-Rad, s. f.-d)	20
Figura 4. Procesamiento y análisis de un gel con ocho muestras de EPT del Compartimento III, en la aplicación Image Lab.	29
Figura 5. Electroforesis SDS-PAGE del Extracto Proteico Total (EPT) de tejido gástrico de feto de alpaca. M, marcador de peso molecular; 1, EPT de tejido gástrico de feto de <i>Vicugna pacos</i> “alpaca” que resalta las bandas que podrían corresponder a la quimosina (Q) y pepsina (P) con pesos moleculares de 36,87 kDa y 30,82 kDa, respectivamente; 2, estándar de pepsina porcina (Sigma-Aldrich, USA) con peso molecular de 36,2 kDa; 3, estándar de quimosina bovina expresada en <i>Mucor miehei</i> Tipo II (Sigma-Aldrich, USA) con peso molecular de 44,1 kDa.	32
Figura 6. Perfil electroforético SDS-PAGE de los compartimentos del estómago de fetos de <i>Vicugna pacos</i> “alpaca”. (CI): EPT del feto uno (1), EPT del feto dos (2); (CII): EPT del feto uno (1), EPT del feto dos (2); (CIII) EPT del feto uno (1), EPT del feto dos (2). Se observa que la banda que correspondería a pepsina disminuye su concentración relativa conforme avanza del CI al CIII.	33
Figura 7. Perfil electroforético SDS-PAGE de los compartimentos del estómago de crías lactantes de <i>Vicugna pacos</i> “alpaca”. (CI) EPT de Cría uno (1), EPT de Cría dos (2); (CII) EPT de Cría uno (1), EPT de Cría dos (2); (CIII) EPT del Cría uno (1), EPT de Cría dos (2). Se observa que la banda que correspondería a quimosina aumenta su concentración relativa conforme avanza del CI al CIII, y la banda que correspondería a pepsina disminuye su concentración relativa conforme avanza del CI al CIII.	34
Figura 8. Frecuencia de bandas en los tres compartimentos del estómago de fetos de <i>Vicugna pacos</i> “alpaca”. CI, diez bandas presentes donde las bandas de interés tienen pesos moleculares de 36,80 kDa y 30,86 kDa y están presentes en el 100% de los individuos; CII, siete bandas presentes con pesos moleculares de 37,63 kDa y 31,17 kDa, donde las bandas de interés están presentes en un 100% y 86,36%; CIII, siete bandas con pesos moleculares de 36,63 kDa y 30,64 Da, presentes en un 100% y 86,36% en los sujetos estudiados. Nota: Para este análisis, se consideraron únicamente las bandas presentes entre 63 KDa y 17 KDa del marcador molecular, seleccionadas por criterio, debido a una	

mayor definición y relevancia para la identificación de proteínas de interés.

38

Figura 9. Frecuencia de bandas en los tres compartimentos del estómago de crías lactantes de *Vicugna pacos* "alpaca". CI, diez bandas presentes, donde las bandas de interés tienen pesos moleculares de 36,13 y 30,85 kDa y están presentes en el 100% y 87.10 % de los individuos; CII, diez bandas presentes donde las bandas de interés poseen pesos moleculares de 36,67 kDa y 30,72 kDa y están presentes en un 100% y 90,32% en los individuos estudiados; CIII, diez bandas presentes, donde las bandas de interés tienen pesos moleculares de 37,25 kDa y 30,84 kDa y se encuentran en un 100% y 93,55%. Nota: Para este análisis, se consideraron únicamente las bandas presentes entre 63 kDa y 17 kDa del marcador molecular, seleccionadas por criterio, debido a una mayor definición y relevancia para la identificación de proteínas de interés.

39

ÍNDICE DE ANEXOS

	Pág.
Anexo 1. Vista panorámica del Camal Municipal de Huancavelica, donde se recolectaron las muestras de fetos.	56
Anexo 2. Alpacas que fueron faenadas en el Camal Municipal de Huancavelica, de las cuales se obtuvieron las muestras de fetos.	56
Anexo 3. Centro Poblado de Choccoro (Chuschi, Ayacucho), donde se recolectaron las muestras de crías lactantes.	57
Anexo 4. Alpacas criadas en el Centro Poblado de Choccoro - Ayacucho.	57
Anexo 5. Recolección de muestras del Camal Municipal de Huancavelica <i>post mortem</i> . Feto del último tercio de gestación de <i>Vicugna pacos</i> "alpaca".	58
Anexo 6. Recolección de muestras del Centro Poblado de Choccoro (Chuschi, Ayacucho) <i>post mortem</i> . Cría lactante de <i>Vicugna pacos</i> "alpaca"	58
Anexo 7. Vista completa del estómago de fetos de <i>Vicugna pacos</i> "alpaca", con longitud total de 21 cm (A) y crías lactantes de <i>Vicugna pacos</i> "alpaca", con longitud total de 36,9 cm (B), se muestran los tres compartimentos CI, CII y CIII.	59
Anexo 8. Flujograma de la obtención del Extracto Proteico Total (EPT) de tejido gástrico de fetos y crías lactantes de <i>Vicugna pacos</i> "alpaca".	60
Anexo 9. Flujograma del método Bradford para la cuantificación de proteínas en los compartimentos estomacales de fetos y crías de <i>Vicugna pacos</i> "alpaca".	61
Anexo 10. Cálculo del volumen de muestra necesario para cargar 30 µg de proteína para electroforesis SDS-PAGE	62
Anexo 11. Flujograma de la Electroforesis SDS-PAGE para obtener perfiles electroforéticos de fetos y crías lactantes de <i>Vicugna pacos</i> "alpaca"	63
Anexo 12. Flujograma de la fotodocumentación de los geles obtenidos por electroforesis SDS-PAGE.	64
Anexo 13. Flujograma del análisis de imágenes tomadas con el fotodocumentador GelDoc Go (Bio-Rad) y procesadas con el programa Image Lab (Bio-Rad).	65
Anexo 14. Matriz de consistencia	66

RESUMEN

El uso de cuajo de alpaca, proveniente de fetos y crías, para elaborar quesos tradicionales con leche de vaca, es una práctica extendida en las comunidades altoandinas; sin embargo, no se ha reportado la presencia de enzimas responsables de la coagulación de la leche en los tres compartimentos ni su concentración relativa. El objetivo fue caracterizar parcialmente el proteoma del cuajo de alpaca. Se recolectaron 22 estómagos de fetos y 31 estómagos de crías lactantes, a partir de los cuales se obtuvo un Extracto Proteico Total (EPT). Se determinó proteínas por Bradford y se procedió con la electroforesis SDS-PAGE, cargando 30 µg de proteína en los carriles. En fetos, se identificaron entre 7 y 10 bandas de proteínas, con pesos moleculares entre 18,84 y 65,87 kDa; y en crías lactantes, 10 bandas de proteínas, entre 16,75 y 63,95 kDa. Se calculó la concentración relativa de cada proteína y se identificaron las bandas correspondientes a quimosina y pepsina, con 36,87 kDa y 30,82 kDa, respectivamente. La proporción quimosina/pepsina en cada uno de los tres compartimentos estomacales CI, CII y CIII fue ascendente, tanto en fetos como en crías. Si bien los perfiles electroforéticos de los EPT mostraron algunas diferencias entre fetos y crías lactantes, se demostró que existe actividad coagulante en los tres compartimentos estomacales de la alpaca, lo cual valida el conocimiento empírico de las comunidades altoandinas de utilizar estómagos completos como cuajo.

Palabras clave: Quimosina, pepsina, perfil electroforético.

I. INTRODUCCIÓN

El cuajo animal es un coagulante enzimático extraído del cuarto estómago de los rumiantes lactantes conocido como abomaso, donde se encuentran la quimosina y pepsina que actúan sobre la caseína, teniendo una alta especificidad sobre la *k*-caseína. Los cuajos son de importancia en la industria alimentaria para la elaboración de quesos, el cuajo proveniente de terneros ha sido tradicionalmente considerado el más adecuado para la producción de quesos, debido a su elevada concentración de quimosina, cuya proporción depende de la edad del animal. En las comunidades altoandinas, el cuajo obtenido de alpacas se emplea de manera frecuente en la preparación de quesos tradicionales elaborados con leche de vaca.. En este caso, el término “cuajo” se refiere al estómago completo de fetos y crías lactantes de alpaca y no únicamente a la cuarta cavidad llamada abomaso o cuajar. La coagulación de la leche ocurre a través de un proceso en el cual la desestabilización de la solución coloidal de caseína provoca la unión de las micelas y da lugar a la formación de un gel que retiene los demás componentes de la leche. Sin embargo, según conocimientos empíricos tradicionalmente en las alturas los alpaqueros tienen como actividad económica la crianza de alpacas, aprovechando su lana, carne, piel y el cuajo, especialmente este último de los fetos abortados o las crías que fallecieron por friaje u otras causas; el cuajo es utilizado en la producción de quesos, siendo el queso producido a partir de cuajo de alpaca uno con buena textura y sabor. La alpaca posee tres compartimentos estomacales, así para el estudio de la presencia de proteínas que intervienen en la coagulación de la leche se utilizaron los tres compartimentos para observar la presencia de las proteínas responsables de la coagulación y estimar el peso molecular en el perfil electroforético y la concentración relativa, en este estudio se evaluaron los tejidos gástricos de fetos y crías lactantes de *Vicugna pacos* “alpaca”. A la fecha no existe reportes específicos sobre la caracterización

molecular de las proteínas quimosina y pepsina en este animal, por lo que el presente estudio tuvo como objetivos:

Objetivo general

Caracterizar molecularmente el Extracto Proteico Total (EPT) obtenido de tejido gástrico de los compartimentos CI, CII y CIII del estómago de fetos y crías de *Vicugna pacos* “alpaca”.

Objetivos específicos

1. Obtener el Extracto Proteico Total (EPT), a partir de tejido gástrico.
2. Determinar el perfil electroforético SDS-PAGE del EPT.
3. Establecer y comparar el patrón de bandas de proteínas del EPT en los compartimentos.
4. Estimar la variación y proporción de quimosina/pepsina en el EPT de los tres compartimentos.

II. MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes

2.1.1 Antecedentes internacionales

Isselnane et al. (2016) realizaron la caracterización molecular del abomaso de camello de Argelia, puesto que, al momento de usar cuajo bovino, este no tenía mucha eficiencia para poder coagular la leche de camella y el cuajo de camello sí. En este estudio se realizó la comparación del extracto crudo de dromedarios lactantes, dromedarios de dieta mixta y destetados, se realizó la electroforesis SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis, electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico) y se observó una diferencia significativa entre estas tres muestras, pero en el extracto crudo gástrico de dromedarios destetados observaron una banda muy notoria de un peso molecular aproximadamente de 38 kDa, que sería la quimosina; en dromedarios adultos al realizar la cromatografía DEAE-celulosa se encontró un pico perteneciente a pepsina con gran actividad coagulante.

Por otro lado, Elagamy (2000) realizó la caracterización fisicoquímica, molecular e inmunológica del cuajo de ternera de camello y cuajo de ternera de búfalo; encontrando que el cuajo de ternera de camello fue más termoestable que el de ternera de búfalo, además de que la actividad de coagulación de ambos aumentó mientras el pH disminuía; la temperatura de acción para el ternero fue de 50°C y para el cuajo de ternero de búfalo fue de 45°C; la actividad proteolítica del cuajo de ternera de camello fue más efectiva en la degradación de caseína. Al momento de realizar la electroforesis de SDS-PAGE de las proteínas de las dos muestras se observaron dos bandas principales, para el cuajo de ternera de camello fueron

estimadas en 52 KDa y 39 KDa y para el cuajo de ternera de búfalo fueron de 50 KDa y 35 KDa.

Mohanty et al. (2003) aislaron, purificaron y caracterizaron la quimosina de búfalo de río (*Bubalus bubalis*). Para la purificación utilizaron la técnica de cromatografía de filtración en gel, posteriormente se realizó la electroforesis en SDS-PAGE determinando el peso molecular que fue un peso de 35,6 KDa; así también se reportó el umbral de temperatura, dando como resultado una actividad máxima a los 55°C, además de que la coagulación disminuyó a medida que el pH aumentaba, finalmente se comparó con quimosina bovina, observándose diferencias pequeñas en la estabilidad y actividad proteolítica.

Moschopoulou et al., (2006) al investigar la purificación y caracterización de quimosina y pepsina de cabrito, reportaron que las proteínas quimosina y pepsina se extrajeron de una raza autóctona y estas fueron separadas mediante cromatografía en DEAE-celulosa para posteriormente ser purificadas mediante filtración en gel y cromatografía de intercambio aniónico. Dieron como pesos moleculares de 36 KDa para quimosina y 40 KDa para pepsina; por último, reportaron la actividad de la pepsina de cabrito que fue más dependiente del pH y la temperatura que la actividad de la quimosina de cabrito.

2.1.2 Antecedentes nacionales

Mujica & Hernández (2023) investigaron la actividad coagulante de cuajo de alpaca que se aplica directamente a la leche, después del macerado; caracterizaron y evaluaron su actividad coagulante, proteínas por el método Bradford, electroforesis SDS-PAGE, tiempo de coagulación y actividad proteolítica. Los resultados mostraron que el extracto enzimático presentó concentraciones protéicas entre 29,80 y 52,91 mg/ml de proteína. El análisis electroforético reveló la existencia de al menos siete proteínas distintas, con pesos moleculares comprendidos entre 91,6 y 15,3 KDa, destacando dos bandas principales de 18,4 y 15,3 KDa que corresponderían probablemente a quimosina y pepsina, respectivamente.

Contreras (2025) realizó una investigación en cuajo bovino (de 13 a 17 meses), porcino (de 8 a 12 meses) y de alpaca (hembras de 2 a 3 años), utilizando macerados de 15, 30 y 45 días, realizando una caracterización enzimática y electroforética, reportando mayor fuerza de coagulación en bovinos y porcinos, mayor actividad lipolítica en bovinos y bandas de 42,7 KDa y 31,7 KDa que

corresponderían a quimosina y pepsina respectivamente; además de reportar 13 bandas con pesos entre 245 KDa y 26,6 KDa. .

Tenorio (2025) en su tesis reportó la caracterización bioquímica de estómagos de fetos y crías de alpaca, utilizando Extracto Enzimático Crudo (EEC) de los compartimentos CI, CII y CIII, concluyendo que los estómagos de fetos del último tercio de gestación tienen mayor fuerza de cuajo, mostrando incremento progresivo del CI hasta el CIII; además de que los Compartimentos CI, CII y CIII de fetos y crías lactantes contienen enzimas coagulantes donde el CIII presentó la mayor actividad coagulante.

2.2 Marco conceptual

2.2.1 Anatomía y fisiología digestiva de la alpaca

La alpaca es un animal herbívoro con tendencia selectiva y oportunista, posee preferencia por las herbáceas y se alimenta de las puntas de las ramas de árboles jóvenes cuando hay extrema necesidad, además, debe beber agua todos los días. Entre su dieta se encuentran especies como *Oxychloe andina* (Cyperaceae) y *Festuca nardifolia* (Poaceae), gramíneas (*F. nardifolia*, *Deschampsia caespitosa* y *Agrostis tolucensis*) (Castellaro et al., 2004).

La anatomía gástrica de la alpaca está adaptada en gran medida al proceso fisiológico de rumia y a la degradación del contenido de las paredes celulares de las plantas. El estómago consta de tres compartimentos y muestra dos áreas saculadas en CI y otro sistema similar a un peine en CII. Los compartimentos están revestidos por una mucosa lisa, solo las células profundas de CII están revestidas por una mucosa papilada; se sugiere que el diseño específico del estómago, junto con sus funciones y procesos fisiológicos relacionados, confirma que la evolución de los tilópodos y los rumiantes se produjo en paralelo y no en homología (Vater et al., 2021).

La anatomía y fisiología de los Camélidos Sudamericanos (CSA) difiere notablemente de la observada en los rumiantes. Estos animales presentan tres compartimentos denominados CI, CII y CIII, que no guardan similitud estructural ni funcional con el rumen, retículo, omaso y abomaso característicos de los rumiantes. El compartimento I constituye el de mayor tamaño y se encuentra dividido en una proporción craneal y otra caudal, separadas por un pliegue muscular transversal. El compartimento II, por su parte, es el más reducido en volumen. En cambio, el compartimento III posee una forma alargada y tubular, y

en su segmento terminal se lleva a cabo la secreción de ácido clorhídrico. Así mismo, los compartimentos I y II desempeñan un papel fundamental en los procesos de fermentación, albergando la microbiota responsable de la degradación y aprovechamiento del forraje (Pinto et al., 2010).

Vallenas y Furet (1971), realizaron un estudio detallado de la anatomía macroscópica del estómago de la llama y el guanaco, aplicando técnicas tanto *in vivo* como *in vitro*. Estos autores describieron que el estómago de dicho camélidos (aplicable también a la alpaca y la vicuña) está conformado por tres compartimentos denominados CI, CII y CIII, o bien designados como compartimentos proximal, intermedio y distal (PC, IC y DC, respectivamente) (Alzola et al., 2004).

2.2.1.1 Etapa fetal

La evaluación morfométrica indica que el tamaño aumenta según avanzan los tercios gestacionales, así el largo del compartimento III es mayor al compartimento CI y CII, el ancho del compartimento CI es mayor a la del compartimento CII y CIII. El largo y ancho en ambos sexos son similares; al finalizar el primer tercio de gestación es evidente la formación de los tres compartimentos del estómago fetal de la alpaca, visibilizándose a los 103 días, esto sugiere que el desarrollo del estómago fetal de la alpaca en compartimentos separados ocurre durante la gestación temprana. Por otro lado, también se describen las celdillas y surcos perpendiculares que aumentan a medida que avanza la gestación de la alpaca. La superficie interna del saco ventral es lisa con presencia de mucosa en los tres tercios de gestación. El CII presenta crestas glandulares no tan evidentes, mientras que el CIII no presenta surcos ni celdillas. En el saco dorsal del compartimento CI se observan numerosos surcos perpendiculares que persisten hasta el segundo tercio de gestación y se incrementa en el último, manteniéndose posteriormente en la edad adulta (Flores et al., 2022).

Durante el primer tercio gestacional, el esbozo del estómago se origina como una dilatación del intestino primitivo, localizada cranealmente respecto al hígado. En el segundo tercio, el compartimento craneal se sitúa hacia la derecha y ventralmente al hígado, mientras que hacia la izquierda caudalmente se relaciona con el bazo y el riñón izquierdo. Estas transformaciones anatómicas del estómago fetal de la alpaca evidencian una organización progresiva que diferencia claramente el primer y segundo tercios gestacionales (Carrica et al., 2022).

2.2.1.2 Etapa de cría lactante

La cría de alpaca se alimenta de leche al nacer, exclusivamente durante ocho días y va disminuyendo según pasan los días; las crías lactantes tienen una alimentación intermedia o gradual hacia el consumo de pastos que van hasta los 18 días de edad; entre los ocho a diez meses existe una alimentación mixta, pasado este tiempo inicia el destete. El desarrollo posterior al nacimiento ocurre con notable rapidez. A partir de las ocho semanas de edad, la estructura tisular de los compartimentos estomacales de alpaca se asemeja a la de los adultos. La actividad microbiana se incrementa de manera significativa hacia las 12 semanas, lo que se asocia con una disminución en los niveles de glucosa sanguínea, un aumento de la producción de ácidos grasos volátiles y la reducción del pH en los CI y CII. Estos cambios continúan hasta las 16 semanas, momento en el que los valores de la glucosa alcanzan niveles comparables a los observados en animales adultos (García et al., 2005; Yaranga, 2009)

Mientras la cría va desarrollándose el pH del estómago aumenta, es así que se reporta que el pH en los compartimentos I, II y III es menor en los recién nacidos que en las crías entre el día 1 y 45 de edad, mientras que el pH en los intestinos es constante (Vásquez et al., 2012).

2.2.2 Cuajos animales

El uso de cuajo derivado del abomaso de terneros lactantes constituye una práctica ancestral que se consolidó durante el siglo XIX con su industrialización en Europa alrededor de 1874 (Cano, 2015).

Dentro de los coagulantes de origen animal, el cuajo de ternero es considerado el más apropiado para la elaboración de quesos debido a su elevado contenido de quimosina, enzima responsable de la coagulación proteolítica y desnaturalización de la caseína. En el abomaso de animales jóvenes, la proporción de quimosina y pepsina varía de acuerdo con la edad y el tipo de alimentación del animal (Cano, 2015).

2.2.3 Proteínas de la leche

La leche está constituida aproximadamente por 87,7% de agua, 3,3 a 3,5% de proteína, 4,9% de lactosa, 3,4% de grasa y 0,70% de minerales, además de un 3,36% de componentes menores. La leche bovina representa una fuente esencial de nutrientes que aporta proteínas, carbohidratos y micronutrientes indispensables para el crecimiento de los terneros lactantes, y se considera uno

de los alimentos más completos dentro de la nutrición humana. (Ahmed & Abdelrahman, 2020; Padilla et al., 2021).

La leche contiene más de cien proteínas diferentes, clasificadas en tres fracciones nitrogenadas: caseínas (α_{s1} -, α_{s2} -, β - y κ -caseína), que representan alrededor del 78%; proteínas del suero o lactosuero (17%), entre las que destacan la α -lactoalbúmina, β -lactoglobulina, albúmina sérica bovina (BSA) y las inmunoglobulinas (Ig); y finalmente, una fracción de nitrógeno no proteico (NPN) correspondiente al 5%. Asimismo, las proteínas lácteas incluyen componentes asociados a la membrana de los glóbulos de grasa y una amplia variedad de enzimas (cerca de 60) y hormonas (Dupont et al., 2011).

2.2.3.1 Caseínas

Las caseínas son fosfoproteínas que constituyen la principal fracción proteica de la leche. En leche bovina, un litro aporta entre 25 y 32 g de proteína, sintetizadas exclusivamente en la glándula mamaria. Estas proteínas se organizan formando agregados multimoleculares denominados *micelas de caseína*, responsables de la estructura coloidal de la leche líquida (Padilla et al., 2021)

Las caseínas son una fuente relevantes de calcio, fósforo y aminoácidos, y representan uno de los sistemas protéicos más valorados nutricionalmente. Por ello, la leche y sus derivados constituyen productos de alto consumo en la dieta humana (Padilla et al., 2021).

En conjunto, las caseínas comprenden cerca del 78 % de las proteínas lácteas y se precipitan al acidificarse la leche hasta un pH de 4,6. Se encuentran unidad principalmente a fosfato de calcio ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$), formando una estructura esponjosa denominada micela. Su clasificación se basa en la movilidad electroforética de sus fracciones (García et al., 2014).

a) Caseína- α_1 ($\alpha\text{S1-CN}$)

Es la de fracción proteica más abundante en la leche bovina. Su estructura está compuesta por 199 aminoácidos con ocho o nueve grupos fosfato para interactuar con calcio, tres regiones no polares o hidrofóbicas, y una zona polar o hidrofílica de carga neta negativa, en la que se encuentran la mayoría de los grupos fosfato proporcionando a la leche un pH de 6.6 (García et al., 2014). Es una fosfoproteína con un peso molecular aproximado de 23 KDa, presente en concentraciones de 12 a 15 g/dm de leche (Miciński et al., 2013).

b) Caseína- α_2 (α S2-CN)

La α S2 está compuesta por 207 aminoácidos y posee 13 grupos fosfaos que le permiten interactuar con el calcio. Presenta un bajo número de residuos de prolina y un único enlace disulfuro entre dos cisteínas. Es más hidrofílica que la α S1-CN, ya que contiene tres zonas polares y una región no polar con aminoácidos hidrofóbicos, lo que le confiere una carga neta positiva. Su concentración en la leche es relativamente baja y su peso molecular aproximado es de 25 KDa (Miciński et al., 2013).

c) β -Caseína (β -CN)

La β -CN está formada por 209 aminoácidos y contiene cinco grupos fosfato con afinidad por el calcio. Aunque carece de cisteína, es la fracción con mayor número de residuos de prolina, lo que la hace más flexible estructuralmente. Su molécula presenta una división clara entre una región polar y otra hidrofóbica, predominando esta última, conformada por abundantes aminoácidos no polares (Miciński et al., 2013).

Esta proteína exhibe actividad de tipo chaperona durante la formación de micelas, propiedad atribuida al elevado contenido de prolina y a sus extensas superficies hidrofóbicas. Además, puede surir hidrólisis enzimática por acción de proteinasas de origen sanguíneo, originando fragmentos conocidos como γ -CN y fracción proteosa-peptona (PP). La β -CN es una fosfoproteína con un peso molecular aproximado de 24 KDa (Miciński et al., 2013).

d) κ -Caseína (κ -CN)

La κ -CN está formada por 169 aminoácidos y se caracteriza por poseer residuos de serina glucosilados distribuidos a lo largo de su estructura. Contiene un grupo fosfato y mantiene una interacción débil con el calcio, en comparación con las demás fracciones de caseína. Esta proteína cumple la función esencial al estabilizar la superficie de las micelas, evitando la precipitación de las caseínas α S1-CN, α S2-CN y β -CN inducida por el calcio (García et al., 2014).

Además, participa en la formación de un “cepillo micelar”, estructura que protege la micela frente a la agregación. La κ -caseína presenta grupos carboxílicos que se hidrolizan en condiciones fisiológicas cercanas a un pH de 6,0, y el tamaño de las micelas depende de la cantidad de κ -caseína disponible. Una mayor proporción de esta proteína genera micelas más pequeñas y estables, facilitando la dispersión de los sólidos durante la coagulación, así la firmeza del coágulo y, por lo tanto, la

calidad del queso (Ahmed & Abdelrahman, 2020; Padilla et al., 2021). La κ -caseína es la fracción menos fosforilada y la única glicosilada con un peso molecular de 19,03 KDa (Sánchez & Sepúlveda, 2020).

2.2.3.2 Proteínas del suero

a) Alfa – lactoalbúmina (α -LA)

La α -lactoalbúmina es una proteína exclusiva del suero de la leche, presente en todas las especies de mamíferos, incluido eutéricos, marsupiales y monotremas. En la mayoría de mamíferos, esta proteína está formada por 123 aminoácidos; sin embargo, en especies como cerdos y conejos presenta un residuo menos. En la α -lactoalbúmina bovina (y probablemente en las α -lactoalbúminas de otros rumiantes), aproximadamente el 10% de las moléculas se encuentran glicosiladas (Sánchez & Sepúlveda, 2020).

Su estructura globular presenta una conformación terciaria estabilizada por cuatro enlaces disulfuro, y contiene tres α -hélices regulares, dos hélices 310 y una pequeña lámina de 3 hebras anti-paralelas plegadas, separadas por giros β irregulares (Sánchez & Sepúlveda, 2020).

La α -LA posee un sitio específico de unión al calcio y desempeña un papel importante tanto nutricional como funcional, ya que forma parte de las proteínas esenciales del lactosuero. En la industria alimentaria, su uso es relevante en la elaboración de fórmulas lácteas infantiles debido a su alto contenido de aminoácidos esenciales, especialmente triptófano. Además, se considera una proteína de baja alergenicidad y representa cerca del 22% de las proteínas totales del suero, con un peso molecular aproximado de 14 KDa (García et al., 2014; Sánchez Vega & Sepúlveda Ahumada, 2020).

b) Beta-lactoalbúmina (β -LA)

La β -LA constituye la principal proteína del suero en la leche de rumiantes (vaca y oveja), aunque está ausente en la leche humana. En condiciones fisiológicas, esta proteína se encuentra como dímero, aunque puede presentarse como monómero en determinadas especies. Posee una alta hidrofobicidad, propiedad que depende del pH y de la fuerza iónica del medio. Durante la acidificación o la desnaturalización térmica de la leche, la β -LA experimenta cambios estructurales que afectan su solubilidad y funcionalidad. En la leche de rumiantes, constituye una de las proteínas más abundantes del suero (Sánchez & Sepúlveda, 2020).

Su estructura está formada por 162 aminoácidos con dos enlaces disulfuro, y posee un grupo tiol libre en Cys-121 que le otorga a la β -LA su capacidad antioxidante, compuesta por un átomo de azufre y uno de hidrógeno. Su estructura incluye nueve hebras de lámina β -antiparalelas, de las cuales ocho se disponen formando un barril de configuración plana, ligeramente cónica, cerrado en un extremo por el residuo Trp-19. La hebra A se pliega cerca de 90° en el residuo 22, permitiendo la formación de una interacción antiparalela con la hebra H, mientras que la novena hebra (I) se sitúa en la parte externa, participando en la interfaz del dímero. La composición aminoacídica de esta proteína le confiere alto valor nutricional y resistencia frente a ácidos y pepsina, además de ser una fuente importante de péptidos con actividad biológica (García et al., 2014; Sánchez & Sepúlveda, 2020). Representa una proteína alergénica que constituye aproximadamente el 51% de las proteínas totales del suero, con un peso molecular de 18 KDa (Miciński et al., 2013).

2.2.4 Enzimas coagulantes

2.2.4.1 Quimosina

La quimosina es una proteína con un peso molecular de 31 KDa, es una endopeptidasa aspártica similar a pepsina, esta se sintetiza en las células de la mucosa gástrica pero como preproquimosina que tiene un péptido señal de 16 residuos necesario para el transporte dentro de la célula. El siguiente zimógeno denominado proquimosina, se secreta en el lumen del estómago, la activación de este se da en un entorno ácido que implica la escisión del propéptido N-terminal de 42 residuos que bloquea el sitio activo de la enzima. Como resultado de estas modificaciones la proquimosina se transforma en quimosina, una proteína activa. La quimosina presenta una estrecha especificidad de sustrato; por ello su principal sustrato natural es la K-caseína (Belenkaya et al., 2020). La quimosina actúa sobre la k-caseína en el enlace Phe105-Met106, generando una porción hidrofóbica y otra hidrofílica. Este proceso provoca una disminución de la carga neta negativa y de la resulsión esférica, lo que favorece la agregación de las micelas modificadas (Sbodio & Revelli, 2012). Kappeler et al., (2006) reportaron un peso molecular de 40 KDa de quimosina aparente de camello. Houen et al., (1996) menciona que la quimosina bovina tiene un peso molecular de 35,6 KDa y la quimosina porcina tiene un peso moléculas de 35,4 KDa. Moschopoulou et al., (2006) reportaron la quimosina de cabrito con un peso molecular de 36 KDa.

Baudys et al., (1988) reportaron la quimosina de cordero con un peso molecular de 36 KDa.

2.2.4.2 Pepsina

La pepsina representa a las enzimas que no contienen grupos prostéticos, su actividad proteolítica se atribuye a la disposición de sus aminoácidos en la cadena peptídica y/o al plegamiento de la cadena en una estructura específica. Este plegamiento específico interviene en la desnaturalización de la proteína, implica un desdoblamiento mas no un cambio en la disposición de los aminoácidos que va acompañada de la destrucción completa de la actividad peptídica (Herriott, 1956). Su acción sobre las micelas de caseína implica 3 fases distintas: la primera, hidrólisis específica del enlace Phe 105 –Met 106 de κ -CN por pepsina a pH >5, produciendo el caseinomacropéptido glicosilado C-terminal y para- κ -CN; la segunda fase que consiste en la agregación de micelas de caseína por asociación hidrofóbica junto con efectos electrostáticos iónicos, que ocurre cuando se ha eliminado una cantidad mínima del caseinomacropéptido y la última fase que es la proteólisis progresiva donde tanto las caseínas como las proteínas del suero se hidrolizan en péptidos a un pH <4 (Yang et al., 2022). La pepsina porcina posee un peso molecular de 34,5 KDa, la pepsina bovina en específico la pepsina II o A tiene un peso molecular de 33,4 KDa; la pepsina bovina I o B llamada también gastriscina es minoritaria con 30 KDa (Córdova Ramos, 2009), Abuharfeel & Abuereish, (1984) reportaron los pesos moleculares de pepsina I y II de camello, estas fueron 35.5 KDa y 34.7 KDa respectivamente, Moschopoulou et al., (2006) reportaron la pepsina de cabrito con un peso molecular de 40 KDa, Baudys et al., (1988) reportaron la pepsina de cordero con un peso molecular de 37 KDa.

2.2.5 Variación de la proporción quimosina/pepsina

Para la preparación de queso generalmente se utilizan cuajos de origen animal, vegetal y microbiano. El cuajo animal generalmente se obtiene de rumiantes; sin embargo, también se puede obtener de otros animales como los camélidos, entre ellos la alpaca. Los cuajos se obtienen de los cuajares donde el componente está constituido por quimosina y pepsina. La quimosina, es el componente en mayor cantidad que se encuentra en un 88 al 94% mientras que la pepsina está presente con un 6 al 12%. Esta proporción varía a medida que aumenta la edad del animal del cual se extrae el cuajo; es el caso de un animal maduro cuya proporción es de un 90 a 94% de pepsina y sólo de un 6 al 10% de quimosina (Sivipaucar, 2022).

La razón de esta proporción se debe a que la quimosina no puede hidrolizar las inmunoglobulinas del calostro a comparación de la pepsina, por ello es que la quimosina se encuentra en mayores cantidades en los primeros meses de vida de los animales lactantes (Dobler López, 2015).

2.2.6 Coagulación de la leche

La coagulación de la leche es un proceso que se produce por la desestabilización de la solución coloidal de caseína, lo que provoca la aglomeración de las micelas y la formación de un gel en el cual quedan retenidos los demás componentes de la leche. Este fenómeno puede llevarse a cabo por distintos métodos, principalmente por coagulación enzimática o ácida (Benavides, 2003).

El proceso de coagulación se desarrolla en dos etapas. En la primera, la quimosina del cuajo hidroliza el enlace peptídico 105-106 (Phe-Met) de la K-caseína, una proteína constituida por 169 aminoácidos (Padilla et al., 2021). Esta relación da lugar a la separación de la p-k-caseína y el macropéptido. En la segunda etapa, la p-k-caseína se precipita por acción del calcio (Ca^{2+}) a temperaturas superiores a los 20 °C. La mayor parte de la quimosina permanece en el suero, mientras que una fracción se integra en la red proteica, desempeñando un papel relevante durante la maduración del queso (Dobler López, 2015).

A medida que avanza el proceso, se forma una red tridimensional de poros que permite el acomodo de los glóbulos grasos, haciendo que el coágulo adquiera mayor firmeza mediante la formación progresiva de enlaces entre las micelas (García Flores et al., 2014).

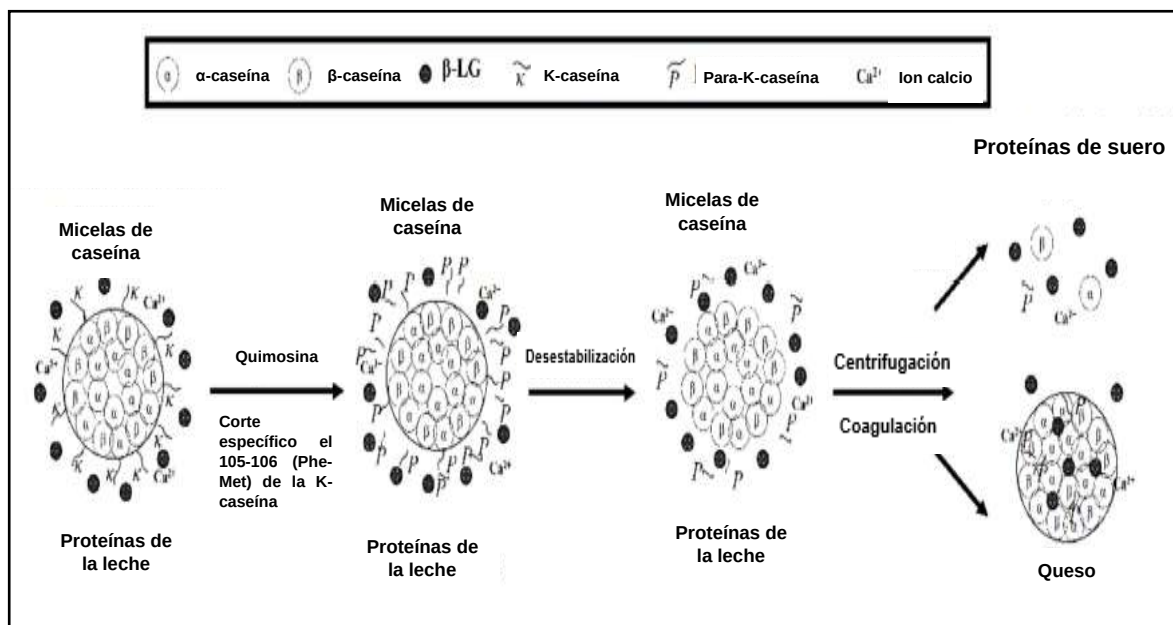


Figura 1. Proceso de coagulación de la leche por la enzima quimosina. La enzima quimosina actúa sobre las micelas de caseína (k-caseína) causando la desestabilización de las micelas produciendo la coagulación (Chen et al., 2021).

2.2.7 Extracción y purificación de proteínas

La purificación de proteínas requiere una extracción cuidadosa, empleando procedimientos que garanticen su estabilidad térmica y la preservación de su estructura mediante soluciones tampón que controlen el pH y eviten su degradación. En la mayoría de protocolos se incorporan inhibidores de proteasas para prevenir la hidrólisis enzimática por proteasas. Una vez obtenidas, las proteínas se someten a métodos de separación que buscan conservar su integridad, aunque estos procesos suelen ser complejos, ya que el material de partida suele ser un extracto crudo con múltiples componentes. Entre las estrategias más empleadas destacan las técnicas cromatográficas, las cuales permiten la separación física de los componentes al pasar una fase móvil sobre una fase estacionaria (Riaño, 2019).

Estas técnicas se basan en distintos principios: la exclusión molecular, que separa las proteínas según su tamaño; afinidad, que aprovecha la unión específica entre grupos funcionales; y el intercambio iónico, que depende de la interacción entre cargas eléctricas opuestas. Posteriormente, se realiza un monitoreo analítico para confirmar la pureza y presencia de la proteína de interés. El método más común para esta verificación es la electroforesis, una técnica que utiliza la carga eléctrica neta de las proteínas para separarlas. Al aplicar un campo eléctrico, las

proteínas migran hacia el electrodo opuesto según su peso molecular y carga. Dependiendo del tipo de sistema, la electroforesis puede efectuarse bajo condiciones nativas o desnaturalizantes, e incluso de forma bidimensional (Riaño, 2019).

2.2.8 Electroforesis SDS-PAGE

La electroforesis SDS-PAGE es una técnica fundamental para la separación, identificación y purificación de proteínas. Su principio se basa en la atracción de las proteínas cargadas eléctricamente dentro de un campo eléctrico. Al unirse al dodecil sulfato de sodio (SDS), las proteínas adquieren una carga negativa uniforme, lo que provoca su migración hacia el ánodo del sistema.

En este método, la velocidad de migración es directamente proporcional a la carga eléctrica y al peso molecular: las proteínas más pequeñas o con mayor carga migran más rápidamente a través del gel (Pérez et al., 2015).

La Electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) es una técnica empleada para la separación de moléculas según su movilidad en un campo eléctrico. Los geles están constituidos por redes químicamente entrelazadas obtenidas mediante la polimerización de acrilamida en presencia de un agente de entrecruzamiento bifuncional, como la bisacrilamida. Estos geles se caracterizan por su alta claridad óptica, neutralidad eléctrica y amplia porosidad, lo que permite una separación eficiente de biomoléculas bajo diversas condiciones experimentales (Navarro & Flores, 2019).

El SDS-PAGE es una variante de la PAGE que utiliza dodecil sulfato de sodio (SDS), un detergente aniónico que desnaturaliza las estructuras secundarias y terciarias de las proteínas no unidas por puentes disulfuro. Este agente confiere a las proteínas una carga negativa uniforme, proporcional a su longitud, lo que permite estimar su peso molecular durante la migración en el gel. Sin embargo, la movilidad electroforética puede verse influenciada por el estado estructural de la proteína, como su grado de fosforilación o la presencia de complejos multiméricos (Navarro & Flores, 2019).

El sistema Laemmli de SDS-PAGE se considera discontinuo, pues está conformado por dos fases: un gel de concentración o apilamiento (stacking gel) y un gel de separación o resolución (resolving gel). Ambos presentan diferentes valores de pH y concentraciones de poliacrilamida.

El gel de concentración, con menor porcentaje de poliacrilamida, permite que las proteínas se apilen en una banda compacta antes de ingresar al gel de separación, en el cual contiene una mayor concentración de poliacrilamida y posibilita una resolución precisa de las proteínas según su tamaño molecular. Los porcentajes de poliacrilamida pueden ajustarse en función del rango de pesos moleculares presentes en la muestra (Brunelle & Green, 2014; Navarro & Flores, 2019).

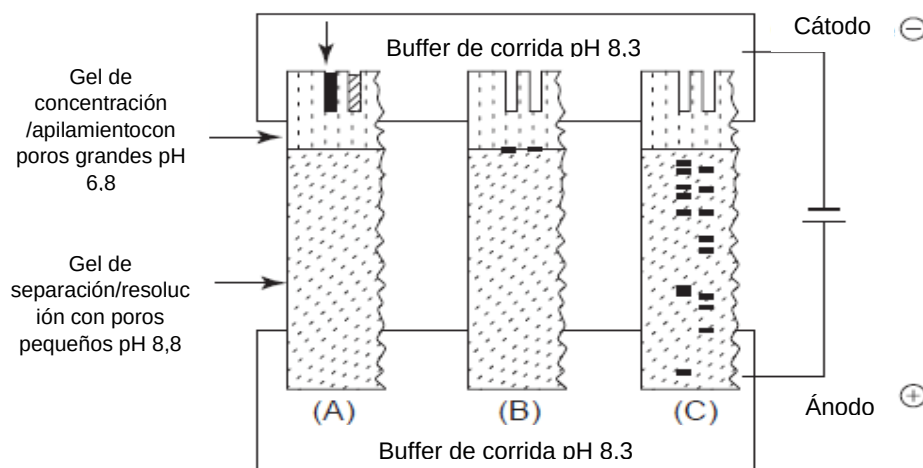


Figura 2. Electroforesis discontinua en gel de poliacrilamida: (A) se dispensa la muestra. (B) se aplica corriente y la muestra se concentra en el gel. (C) separación de proteínas por su peso molecular (Stringer, 2005).

2.2.8.1 Componentes

Dodecilsulfato de Sodio (SDS). El SDS es un detergente con una fuerte carga negativa y se une fuertemente a todas las proteínas, independientemente de su carga natural. Como resultado, todas las proteínas adquieren una carga negativa uniforme. El SDS se une a los polipéptidos en una proporción constante en peso, por lo que la carga por unidad de masa es prácticamente uniforme. Esto hace que la movilidad electroforética dependa únicamente de la masa molecular (con algunas excepciones, como glicoproteínas o proteínas muy básicas) (Stringer, 2005).

Poliacrilamida. Los geles de poliacrilamida se forman por la polimerización de acrilamida en presencia de un reactivo de entrecruzamiento, que comúnmente es N,N'- metilenbisacrilamida (denominada bisacrilamida). Esto resulta en una red en forma de malla donde fibras largas de acrilamida están entrecruzadas mediante

puentes de bisacrilamida. La porosidad del gel es determinada por las proporciones relativas de la acrilamida y bis-acrilamida (C%) así, el poro es menor cuando hay más bis-acrilamida en relación a la concentración de acrilamida y cuando la cantidad de acrilamida aumenta, el tamaño de poros aumenta. El porcentaje total de acrilamida/bisacrilamida (T%) determina el rango de separación del gel, la mayoría de las proteínas se separan bien en el rango de 5 a 10% de concentración de acrilamida/bisacrilamida, donde T% es la concentración de monómeros (acrilamida más bisacrilamida) y C% el porcentaje de reticulante (cantidad de bisacrilamida con respecto al total de monómeros). El tamaño aparente de los poros está principalmente afectado por dos parámetros: la concentración total de acrilamida y la proporción de acrilamida a bisacrilamida, esta proporción afecta la frecuencia de entrecruzamiento de la malla de poliacrilamida. El efecto de tamizado por tamaño es el principal factor que determina las propiedades de separación de un gel de poliacrilamida, donde la relación entre el tamaño de los poros y el tamaño de la molécula determina la movilidad relativa de las proteínas a través del gel (Pérez et al., 2015; Petrov et al., 2013).

Tampón de concentración. El tampón Tris HCl proporciona un entorno ligeramente ácido (pH 6,7), en el que solo se disocia una pequeña cantidad de glicina (presente en el tampón de corrida), lo que conlleva a una baja eficiencia de movilidad electroforética. Las muestras se diluyen en la solución amortiguadora del gel (Tris HCl), de tal forma que las proteínas quedarán entre las soluciones amortiguadoras del gel y el de los electrodos (Tampón glicina), conocida también como “solución amortiguadora de la cola”. Las proteínas quedan entre los iones de estos tampones, estos disminuyen la movilidad de las proteínas. Cuando se aplica el campo eléctrico, los iones del gel se mueven por delante de las proteínas a separar, mientras que los iones del Tampón glicina migran por detrás de las proteínas. Entre ambos se forma una banda de baja conductividad, donde las moléculas de proteína se concentran en una banda estrecha antes de entrar al gel de separación, este proceso mejora la resolución de las proteínas. Las diferencias de pH y tamaño de poro entre el gel de concentración y el de separación crean un gradiente responsable del efecto de nitidez en las proteínas del gel de concentración y del efecto de resolución en el gel de separación. El primer tampón de corrida o ejecución descrito para SDS-PAGE consistió en Tris 28 mM, glicina 192 mM y SDS al 0,1 % (pH = 8,3), conocido como tampón Laemmli. Cuando se

utiliza con los geles de concentración y separación de diferente pH, los iones glicinato del tampón Laemmli están menos ionizados en el gel de concentración y tienen menor movilidad electroforética que los iones cloruro, que son más pequeños e ionizados en ambos geles. Dado que la mayoría de las proteínas siguen siendo aniónicas a pH = 6,8, se concentran en una banda delgada entre los iones cloruro y glicinato. Además, debido a la baja concentración de acrilamida en el gel de concentración, su movilidad se ve limitada. Una vez aplicado el campo eléctrico, el cloruro migra mucho más rápido que el glicinato, por lo que se le denomina ion líder. El glicinato se convierte entonces en el ion de cola, y las proteínas migran entre ambos (es decir, las movilidades electroforéticas son $\text{Cl}^- > \text{aniones proteicos} > \text{glicinato}$) (Dumut et al., 2022; New Desheng CO., s. f.; Pérez Chabela et al., 2015).

Tampón de separación. Cuando la muestra entra al gel de separación, debido al aumento del pH (pH 8,8), el ambiente se alcaliniza, la glicina se disocia significativamente y la velocidad de movilidad electroforética aumenta, siguiendo de cerca al ion cloruro, el glicinato domina a los aniones proteicos (es decir, las movilidades electroforéticas se convierten en $\text{Cl}^- > \text{glicinato} > \text{aniones proteicos}$). El tamaño de poro del gel de separación se reduce y las moléculas de proteína se separan según su carga inherente y tamaño molecular a medida que avanza hacia el ánodo. Durante este proceso, el tampón Tris HCl proporciona un ambiente alcalino estable, lo que garantiza la separación de las moléculas de proteína (Dumut et al., 2022; New Desheng CO., s. f.).

Persulfato de Amonio (APS) y TEMED. El Persulfato de amonio (APS) se emplea como catalizador en la polimerización de acrilamida y bisacrilamida, compuestos esenciales en la preparación de geles de poliacrilamida utilizados para el análisis de proteínas y ácidos nucleicos. Este agente oxidante suele combinarse con TEMED (N, N, N', N'-tetrametiletildiamina), que actúa como acelerador de la reacción mediante un mecanismo catalizado por bases. Durante este proceso, el APS genera radicales libres de oxígeno en solución acuosa, los cuales inducen la polimerización de acrilamida y bisacrilamida, formando una matriz de gel capaz de separar macromoléculas según su tamaño. En ocasiones, también se utilizan otras aminas terciarias como el DMAPN (3-dimetilaminopropionitrilo) que cumplen una función similar en la catálisis (Bio-Rad, s. f.-b; Sigma-Aldrich, s. f.-a).

β -Mercaptoetanol. Actúa como agente reductor que rompe los puentes disulfuro presentes en las proteínas, provocando la desnaturalización de su estructura tridimensional compacta y transformándolas en proteínas lineales semejantes a las varillas. El grupo tiol del β -mercaptoetanol cede electrones, reduciendo los enlaces disulfuro y liberando grupos sulfhidrilo, lo que modifica la estructura y función de las proteínas. De esta manera, se garantiza que la separación electroforética no se vea afectada por la estructura terciaria de las proteínas (Foroumadi & Saeedi, 2014; Stringer, 2005).

Tampón de corrida (Tampón glicina). Este sistema proporciona un entorno de pH estable durante el proceso, lo que garantiza la migración fluida de las moléculas de proteína. Este tampón, generalmente de Tris-Glicina-SDS, proporciona un entorno adecuado para que las proteínas desnaturalizadas por el SDS se muevan de forma eficiente bajo la influencia de un campo eléctrico (Dumut et al., 2022; New Desheng CO., s. f.).

Tampón de carga. El tampón de carga es una solución donde se combinan los siguientes reactivos: el sistema tampón tris y el pH desempeñan un papel esencial para evitar la ruptura de los enlaces peptídicos. El SDS a linealizar las proteínas (desnaturalizándolas) y a otorgarles una carga neta negativa, independientemente de su carga inicial. Esto minimiza las variaciones en el movimiento de las proteínas en el gel. El glicerol proporciona alta densidad (espesamiento de la solución), garantiza que la muestra se desplace hacia el pocillo. El Beta-mercaptoetanol se utiliza para romper los enlaces disulfuro. El beta-mercaptoetanol, junto con el SDS, garantiza que las bandas se deban a polipéptidos individuales en lugar de a complejos moleculares, por último el azul de bromofenol indica visualmente la ubicación (colorante de seguimiento) de la muestra en el gel (Bio-Rad, s. f.-a; Sigma-Aldrich, s. f.-b).

Cámara de electroforesis. Una cámara de electroforesis vertical es un dispositivo diseñado para llevar a cabo la técnica de electroforesis en gel. Consta de una cubeta de plástico con compartimentos de tampón para el ánodo y cátodo que contienen electrodos (generalmente de alambre de platino), en esta cubeta se coloca el gel de poliacrilamida. Los electrodos se conectan a un enchufe que está unido a una fuente de alimentación que generan un campo eléctrico. Los geles se mantienen en posición vertical entre las cámaras de electrodos durante la electroforesis (Bio-Rad, s. f.-d; National Human Genome Research Institute, s. f.).



Figura 3. Componentes de la cámara de electroforesis vertical (Bio-Rad, s. f.-d)

Colorante y decolorante. El colorante orgánico Azul Brillante de Coomassie es el método más frecuentemente empleado para la detección de proteínas en geles SDS-PAGE. Este colorante aniónico de trifenilmetano se utiliza en dos variantes, como el Coomassie R-250 (tono rojizo) y Coomassie G-250 (tono verdoso), que posee dos grupos metilo adicionales. En medio ácido, estos colorantes se unen a los grupos amino de las proteínas mediante interacciones electrostáticas e hidrofóbicas. Las ventajas de los métodos de tinción con Coomassie incluyen una unión cuantitativa del colorante a las proteínas (Shen, 2019).

Tras la electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS, las proteínas quedan fijadas en el gel para evitar su dispersión. Posteriormente, se visualizan mediante tinción utilizando colorantes cromogénicos como el Azul de Coomassie R-250, el Negro Amido y el Rojo Directo 81, los cuales se disuelven en una mezcla de ácido acético, metanol y agua. Durante el proceso de tinción, la mezcla del colorante y disolvente impregna el gel, permitiendo que el colorante interactúe con las proteínas. Tanto el ácido acético como el metanol contribuyen a desnaturalizar las proteínas y generan un medio ácido que favorece la fijación y estabilidad del colorante. Tras la tinción, el colorante presente en el gel y no unido a la proteína se elimina utilizando el mismo medio disolvente en el que se disolvieron el colorante, al que se denomina decolorante. Después de 2-3 horas de estar

sumergido el gel en la solución decolorante, la solución se colorea, el gel se aclara, las bandas de proteína permanecen oscuras y el contraste con el gel circundante mejora. En la solución decolorante el metanol, ácido acético y agua contribuyen inicialmente a eliminar el SDS del gel. El SDS puede ser removido únicamente con una solución de metanol. Si el SDS permanece alrededor de la proteína, esta queda rodeada de cargas negativas, lo que podría competir con la interacción entre los colorantes cargados positivamente y los aminoácidos cargados negativamente en la proteína (Goldring, 2018).

2.2.9 Fotodocumentación, densitometría y análisis de imágenes

La densitometría es la medición cuantitativa de la densidad óptica; es el proceso de cuantificar la cantidad de muestra en función de su absorbancia de luz, mide la "oscuridad" de un material fotosensible sobre un área definida. La densidad óptica de una muestra está relacionada con el porcentaje de luz incidente que se transmite a través de ella. La densitometría se utiliza a menudo para cuantificar manchas o bandas en geles de proteínas teñidos colorimétricamente o en radiografías utilizadas para obtener imágenes de Western blots quimioluminiscentes. Se mide la densidad óptica de las bandas en el gel o la película, y los valores de gris de las bandas se asocian con la cantidad de material en cada banda. El GelDoc Go es un dispositivo diseñado para la adquisición de imágenes con alta sensibilidad y resolución, empleado en la documentación y análisis de geles y blots. Los generadores de imágenes utilizan el Image Lab Touch de Bio-Rad para controlar la captura y optimizar imágenes. (Azure Biosystems, s. f.; Bio-Rad, s. f.-c; Fundación Instituto Roche, s. f.).

La semicuantificación de la carga proteica en el gel se realiza a través de una metodología no estandarizada, utilizando densitometría en ensayos SDS-PAGE. El análisis de imágenes por densitometría se realiza utilizando los perfiles de los carriles y calibrados a un estándar conocido. El área del pico es la señal utilizada en la mayoría de los análisis de densitometría, en la cuantificación de proteínas en las bandas de geles SDS-PAGE. Las proteínas desconocidas se cuantifican con estándares proteicos disponibles comercialmente como la albúmina sérica bovina (BSA), anhidrasa carbónica (AC) y ovoalbúmina (OV), y marcadores de peso molecular de concentración conocida. El marcador de peso molecular se utiliza posteriormente como único estándar proteico para la cuantificación y estimación del peso molecular (Alonso et al., 2020).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Ubicación de la zona de estudio

La investigación fue realizada en el Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UNSCH. Las muestras fueron recolectadas en dos lugares, los estómagos de fetos del último tercio de gestación de alpaca se recolectaron en el Matadero Municipal de Huancavelica, a una altitud de 3780 msnm, con coordenadas [12°47'25.8"S|75°02'14.9"O](#). Por otro lado, los estómagos de crías lactantes de uno a treinta días de edad se obtuvieron en el Centro Poblado de Choccoro, ubicado en el distrito de Chuschi, provincia de Cangallo en la región de Ayacucho, a una altitud de 4337 msnm, con coordenadas [13°24'26.7"S|74°30'17.3"O](#).

3.2 Población y muestra

3.2.1 Población

La población estuvo conformada por todos los estómagos de fetos del último tercio de gestación y crías lactantes de alpaca de uno a treinta días de edad *post mortem* de Huancavelica y Ayacucho, respectivamente.

3.2.2 Muestra

Se muestrearon 52 estómagos de alpaca, donde 22 estómagos fueron de fetos del último tercio de gestación *post mortem* y 31 estómagos de crías lactantes de uno a treinta días de edad fallecidas en época de friaje, enero-febrero. Por esta razón, no fue necesario tramitar la aprobación del comité de ética.

3.2.3 Tipo de muestreo

Para la ejecución de este estudio se utilizó el método de muestreo no probabilístico por conveniencia.

3.3 Metodología experimental

3.3.1 Colecta de estómagos de fetos de alpaca

- Se obtuvieron los estómagos de fetos de alpaca en el Matadero Municipal de Huancavelica-Chuñuranra, donde se realizó la medición del diámetro biparietal para la estimación de la edad gestacional, los estómagos fueron etiquetados y transportados en un *cooler* con hielo en gel.
- Los estómagos fueron trasladados al Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UNSCH, para el procesamiento de las muestras.
- Los estómagos fueron congelados, en el laboratorio a -20 °C hasta su uso.
- Antes del procesamiento los estómagos se descongelaron en recipientes con agua, se procedió a limpiar retirando grasa perivisceral y eliminando el contenido estomacal.
- Las muestras después de ser descongeladas se invirtieron exponiendo la mucosa gástrica para proceder a limpiar el saco glandular con abundante agua destilada, este procedimiento se realizó con el fin de preparar las muestras para la extracción de EPT.

3.3.2 Colecta de estómagos de crías lactantes de alpaca

- Los estómagos de crías de alpaca se recolectaron en el Centro Poblado de Choccoro, en la región de Ayacucho. El contenido estomacal fue retirado y cada estómago se colocó en un tubo Falcon de 50 ml y fue transportado en un tanque de nitrógeno líquido a -196°C al Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UNSCH, para su procesamiento.
- En el laboratorio, los estómagos fueron conservados a -20 °C hasta su uso. Antes de procesar los estómagos, se descongelaron en recipientes con agua y se limpiaron, retirando grasa perivisceral.
- Los estómagos después de ser descongelados se invirtieron exponiendo la mucosa gástrica para proceder a limpiar el saco glandular con abundante agua destilada, este procedimiento se realizó con el fin de preparar las muestras para la extracción de EPT.

3.3.3 Obtención del Extracto Proteico Total (EPT)

Se utilizó el método de extracción de enzimas gástricas crudas de tejido abomasal bovino descrito por Valles y Furet (1977), con algunas modificaciones (Ver Anexo 8).

- a. Trituración de los compartimentos.** Se extrajeron los compartimentos correspondientes, se midieron y pesaron, posteriormente se cortaron con tijeras en pequeños pedazos y se trituraron en el mortero.
- b. Extracción de proteínas.** Se pesaron 2.5 g de tejido gástrico triturado (cortes pequeños, triturados en mortero) y se maceraron en 1.25 volúmenes de HCl 0.2 M a una temperatura de 42°C durante 60 min en agitación lenta (agitador Boheco Bio-RS-24, Germany), seguidos por centrifugación a 4,000 rpm x 10 min (centrifuga Eppendorf 5702, Germany).
- c. Clarificación.** El extracto crudo se clarificó adicionando 1% (v/v) de solución de Al_2SO_4 por volumen y 5% de solución 1 M de Na_2SO_4 por volumen que fue calentado a 42°C. Después de la centrifugación a 4000 rpm por 10 min, se obtuvo una solución clarificada amarillenta.
- d. Concentración y resuspensión.** Para concentrar el filtrado clarificado, se adicionaron dos volúmenes de solución saturada de NaCl (Dobler et al., 2016) conteniendo 1% (p/p) de HCl concentrado. Se mezcló y se dejó reposar durante 1 h. Luego se centrifugó a 4000 rpm durante 20 min. Para la resuspensión se adicionaron el 20% del peso húmedo de solución salina y 100 μl de NaHPO_4 , se midió el pH y se aumentó 100 μl más de ser necesario. Luego se añadió PMFS a una concentración de 1 mM, es decir 1 μl por 100 μl de EPT, esto para inactivar las proteasas que pudieran estar presentes.

3.3.4 Cuantificación de proteínas por Bradford

Se preparó una curva de calibración según Bradford M. (1976) y Ernst Z. (2010), para ello se prepararon las siguientes soluciones:

Solución madre. Se preparó inicialmente una solución madre con BSA (Sigma, USA) a una concentración de 10 mg/ml. Se pesó 100 mg de BSA, se diluyó con agua desionizada y se enrazó en una fiola de 10 ml. Finalmente, utilizando la fórmula $C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$, se tomaron 100 μl de esta solución y se diluyó nuevamente con agua desionizada enrazándose en una fiola de 10 ml, para obtener finalmente la solución madre de BSA a 0.1 mg/ml de concentración.

Dilución del reactivo Bradford. El reactivo comercial Bradford (Bio-Rad, USA), para ser usado, fue diluido previamente 1:3.5 en agua desionizada.

Soluciones estándar. Las soluciones estándar, se prepararon a concentraciones de 0, 2, 4, 8, 12, 16 y 20 $\mu\text{g/ml}$ de BSA. Se añadieron 100 μl soluciones estándar

y 100 μ l de reactivo Bradford diluido, posteriormente se dejó reaccionar. Las lecturas de absorbancia a 595 nm se hicieron después de los 10 min y antes de los 60 min, tiempo en el cual se desarrolló el color. Se realizó un gráfico con los valores de concentración de los estándares y las lecturas de 595 nm. Finalmente, se obtuvo la ecuación lineal de la curva de calibración.

Luego se hicieron las lecturas de las muestras, para ello se realizó una dilución de 1:800 del extracto proteico total (EPT) a fin de lograr lectura dentro del rango adecuado. En un tubo Eppendorf, se depositaron 100 μ l de EPT, luego se añadió 100 μ l de reactivo de Bradford diluido y se dejó reaccionar. Las lecturas de 595 nm se realizaron después de los 10 min y antes de los 60 min. Finalmente, se calculó la concentración de las muestras de EPT en base a la ecuación lineal de la curva de calibración, los resultados se expresaron en μ g proteína ml^{-1} de EPT (Ver anexo 9).

3.3.5 Electroforesis SDS-PAGE

Se utilizó el método según Andrews (1986) y Laemmli (1970) (Ver anexo 11).

3.3.5.1 Cálculo y preparación de muestras

- Después de cuantificar proteína presente en cada muestra por Bradford se realizaron cálculos para cargar 30mg de proteína en cada pocillo (Ver anexo 10).
- Los EPT se separaron a tubos Eppendorf debidamente rotulados en una cantidad de 30 μ l de cada muestra.
- A las muestras separadas se le agregaron tampón de carga en proporciones de 1:2, en un volumen final de 90 μ l.
- Las muestras fueron hervidas a 100 °C por 5 min, para inactivar proteasas que pudieran estar presentes y desnaturalizar las proteínas presentes en las muestras.

3.3.5.2 Preparación de reactivos

a) Solución de acrilamida/bisacrilamida al 40% (100 ml)

Para la preparación de acrilamida/bisacrilamida en una proporción 37,5:1 se pesó 40 g acrilamida y 1,067 g bis acrilamida, posteriormente estos se disolvieron en 100 ml de agua destilada. Por último, se filtró y guardó a 4°C en la oscuridad.

b) Solución de Dodecilsulfato de Sodio (SDS) al 10% (10 ml)

Para preparar SDS al 10 % se pesaron 1 g del reactivo y se disolvió con 10 ml de agua destilada, se guardó en un tubo Falcon debidamente rotulado y se almacenó a 4 °C.

c) Solución de persulfato de amonio al 10% (10 ml)

El persulfato de amonio se preparó al instante de realizar la Electroforesis, para ello se pesó 10 mg APS y se disolvió en 100 µl de agua destilada.

d) Reactivo TEMED

Se utilizó el producto comercial TEMED (BioRad, USA).

e) Solución de azul de bromofenol al 1% (10 ml)

Se pesaron 100 mg azul de bromofenol y se disolvió en 10 ml agua destilada, se guardó en un tubo Falcon rotulado y fue almacenado a 4°C.

3.3.5.3 Preparación de soluciones tampón

a) Tampón de separación Tris-HCl 1.5 M pH 8,8 (50 ml)

Para la preparación del tampón de separación se pesaron 9.075 g de Tris-base, se disolvió el reactivo en 30 ml agua destilada y se aforó en una fiola de 50 ml, seguidamente se ajustó el pH a 8,8 con HCl concentrado o HCl 1 N, tras el ajuste de pH el tampón se depositó en un frasco de vidrio rotulado y se almacenó a 4°C.

b) Tampón de concentración Tris-HCl 0.5 M pH 6,8 (50 ml)

Se pesaron 3 g del reactivo Tris-base y se disolvieron en 30 ml agua destilada, se ajustó el pH a 6,8 con HCl 1 N o HCl concentrado a continuación se aforó en una fiola de 50 ml y se almacenó a 4°C en un frasco de vidrio rotulado.

c) Tampón de corrida 10X (500 ml)

Para preparar el tampón de corrida se pesaron 15 g de Tris-Base (25 mM), 72 g de Glicina (192 mM), 5 g de SDS (10%), estos reactivos se disolvieron en 400 ml de agua destilada, posteriormente se ajustó el pH a 8,3 con HCl concentrado y se aforó en una fiola de 500 ml.

d) Tampón fosfato sódico Na_3PO_4 0.0625 M (20 ml)

Para la obtención del tampón fosfato sódico 0.0625 M (pH 7,0), inicialmente se prepararon por separado dos soluciones, para la solución 1 se pesó 0,120 g de fosfato monosódico (NaH_2PO_4) y para la solución 2 se pesó 0,142 g de fosfato disódico (Na_2HPO_4), cada solución se aforó en una fiola de 10 ml, posteriormente se mezclaron ambas soluciones y se ajustó el pH a 7.0, finalmente se almacenó en un tubo Falcon de 50 ml a 4 °C.

e) Tampón de carga (7.2 ml)

El tampón de carga se elaboró con 1,6 ml SDS 10%; 0,8 ml mercaptoetanol 99,9 %; 0,4 ml de azul de bromofenol 1%; 1 ml de tampón fosfato sódico 0,0625 M pH 7.0 y 0.8 ml de glicerol, cada elemento se mezcló en un tubo Falcon de 15 ml, rotulado debidamente y se almacenó a 4 °C. Cabe resaltar que el mercaptoetanol solo se agregó al momento de la preparación de las muestras.

3.3.5.4 Preparación de geles de poliacrilamida

a) Preparación del gel separador al 14% (10 ml)

En un beaker de 100 ml, se mezclaron todos los componentes: 3,84 ml de agua destilada, 2,5 ml de tampón de separación Tris-HCl 1.5 M (pH 8,8), 3,501 ml de la mezcla acrilamida/bisacrilamida al 40%, 100 µl de SDS al 10%, 50 µl de APS al 10% (preparado al momento de realizar la electroforesis) y 14 µl de TEMED. La mezcla se agitó suavemente, evitando la formación de burbujas y se dispensó a las placas para la polimerización del gel, para evitar el contacto con el aire y una rápida polimerización se colocó alcohol, se dejó polimerizar por 40 min.

b) Preparación del gel concentrador al 4% (6 ml)

En un beaker de 100 ml, se mezclaron los siguientes componentes: 3,78 ml de agua destilada, 1,5 ml de tampón de concentración Tris-HCl 0.5 M (pH 6,8), 0,6 ml de la mezcla acrilamida/bisacrilamida al 40%, 60 µl de SDS al 10%, 60 µl de APS al 10% y 6 µl de TEMED. La mezcla se agitó suavemente, evitando la formación de burbujas y se dispensó a las placas para la polimerización del gel, una vez dispensado la mezcla se colocó el peine para la formación de pocillos y se dejó polimerizar por 30 min.

3.3.5.5 Electroforesis en gel de acrilamida

Para realizar el proceso de electroforesis se preparó el gel de separación y se cargó en el portagel, se dejó polimerizar por un espacio de 40 min a temperatura ambiente. Luego se añadió el gel concentrador y se dejó polimerizar por 30 min. Por último, se cargó en los pocillos el marcador de peso molecular y las muestras cuidando de cargar 30 µg en cada caso (EPT de los compartimentos de fetos y crías lactantes). La corrida se realizó a 80 voltios por un espacio de tres horas y media.

3.3.5.6 Preparación del colorante y decolorante

a) Colorante (1000 ml)

Se pesó 0,5 g azul de Coomassie G-250; 1 g sulfato de cobre, además se midió 300 ml metanol al 95%; 100 ml ácido acético glacial; 600 ml agua destilada en una probeta. La mezcla se agitó por lo menos durante 2 h y se guardó en un frasco ámbar. Una vez finalizada la electroforesis se retiró el gel de acrilamida y se sumergió en el colorante, el gel se dejará en agitación suave over night.

b) Decolorante (1000 ml)

Se midió 100 ml ácido acético glacial; 300 ml metanol al 95%; 600 ml agua destilada, cada una en probetas. Se mezclaron todos los reactivos para luego ser guardado en un frasco ámbar. Terminada la coloración, el gel de acrilamida se sumergió en la solución decolorante y se dejó en agitación suave por 12 horas.

3.3.6 Fotodocumentación y procesamiento de imágenes.

3.3.6.1 Fotodocumentación de geles con el equipo GelDoc Go (Bio-Rad, USA).

Una vez finalizada la decoloración del gel se procedió a tomar una foto con el equipo fotodocumentador GelDoc Go Gel Imagen System (Bio-Rad, USA), para ello se lavó el gel con abundante agua destilada y se colocó al centro de la bandeja del equipo y se realizó una fotografía del gel con la opción azul de Coomassie que viene integrado en el equipo, este realizó un ajuste automático a la imagen del gel (Ver Anexo 12).

3.3.6.2 Procesamiento de imágenes con el programa Image Lab (Bio-Rad, USA)

Una vez tomadas las imágenes, estas se exportaron a un USB para ser procesados en la aplicación Image Lab de Bio-Rad, USA.

- Una vez descarga la aplicación de la página oficial de Bio-Rad, USA se abrió el archivo compatible con esta aplicación.
- La primera herramienta utilizada fue Image Tools para cortar la imagen y acomodarla de manera derecha para un mejor análisis.
- La segunda herramienta que se utilizó fue Lane and Bands que permitió analizar carriles y bandas de los geles, siempre tomando en cuenta en Background e intensidad de las bandas.

- La siguiente herramienta denominada MW Analysis Tools, permitió calcular los pesos moleculares de las bandas escogidas en los carriles determinados.
- La herramienta Quantity Tools que se utilizó como última herramienta, permitió calcular la concentración relativa de cada banda analizada.
- Por último, los datos proporcionados por el programa se descargaron en el formato Excel, para realizar análisis estadísticos (Ver anexo 13).

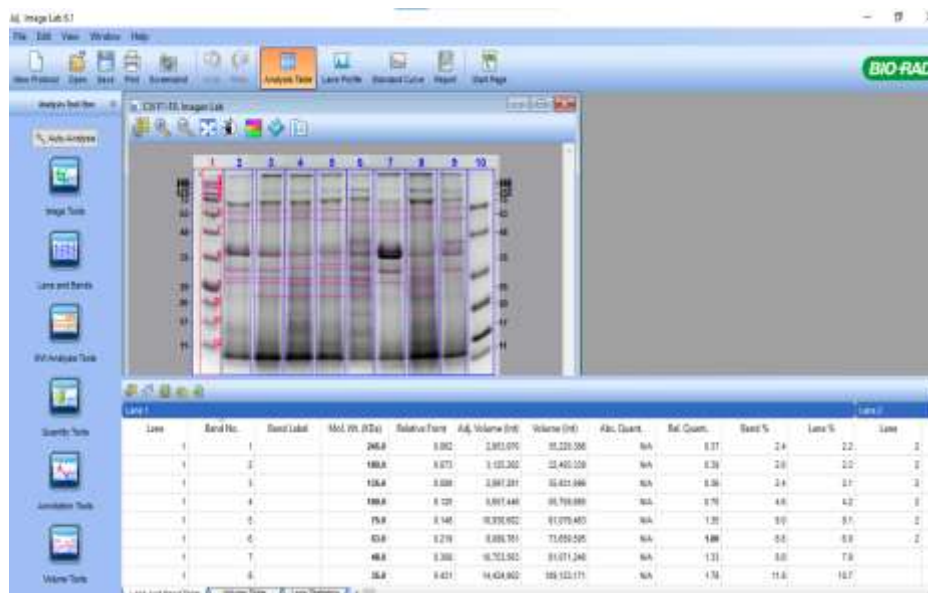


Figura 4. Procesamiento y análisis de un gel con ocho muestras de EPT del Compartimento III, en la aplicación Image Lab.

3.4 Técnicas de procesamiento y análisis de datos

Para ver la diferencia entre el perfil electroforético de fetos y crías lactantes de alpaca y de sus cavidades se realizó una estadística descriptiva y la comparación de medianas de la concentración total de proteínas y la concentración relativa de quimosina y pepsina se realizó con la prueba de Kruskal-Wallis, puesto que los datos no tenían distribución normal, esto al pasarlos por la prueba de Shapiro Wilk. Se considero como diferentes estadísticamente cuando $p < 0.05$.

IV. RESULTADOS

Tabla 1. Contenido de proteína (medianas) del Extrado Proteico Total (EPT) de los tres compartimentos CI, CII y CIII de los estómagos de fetos y crías de *Vicugna pacos* “alpaca”, Ayacucho 2024.

Extracto Proteico Total (EPT)	n	Contenido de proteína (µg/ml)		
		CI	CII	CIII
EPT fetos	22	26,79 ^{a A}	20,76 ^{b A}	25,98 ^{a B}
EPT crías	31	23,62 ^{b A}	24,36 ^{b A}	38,14 ^{a A}

Las medianas del contenido de proteína por cavidades comparadas con Kruskal-Wallis seguidas de letras minúsculas en las filas indican diferencia significativa ($p < 0.05$) entre cavidades en fetos y crías, por otro lado, las letras mayúsculas indican diferencia significativa ($p < 0.05$ solo entre el compartimento tres (CIII) de fetos y crías. En los fetos se observa una diferencia significativa entre CII y los compartimentos CI y CIII, con un valor más bajo en CII. En crías, el CIII muestra una concentración de proteínas significativamente mayor en comparación con CI y CII. Al comparar entre grupos, el CIII de crías lactantes presenta una concentración de proteínas significativamente más alta que el CII de fetos.

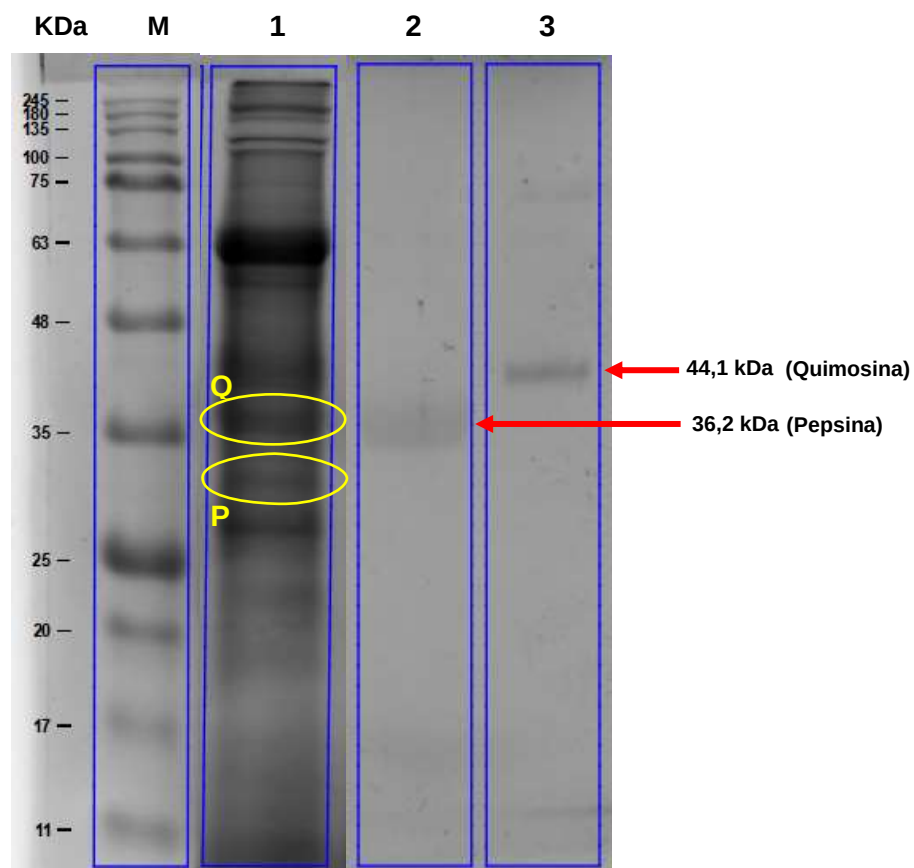


Figura 5. Electroforesis SDS-PAGE del Extracto Proteico Total (EPT) de tejido gástrico de feto de alpaca. M, marcador de peso molecular; 1, EPT de tejido gástrico de feto de *Vicugna pacos* “alpaca” que resalta las bandas que podrían corresponder a la quimosina (Q) y pepsina (P) con pesos moleculares de 36,87 kDa y 30,82 kDa, respectivamente; 2, estándar de pepsina porcina (Sigma-Aldrich, USA) con peso molecular de 36,2 kDa; 3, estándar de quimosina bovina expresada en *Mucor miehei* Tipo II (Sigma-Aldrich, USA) con peso molecular de 44,1 kDa.

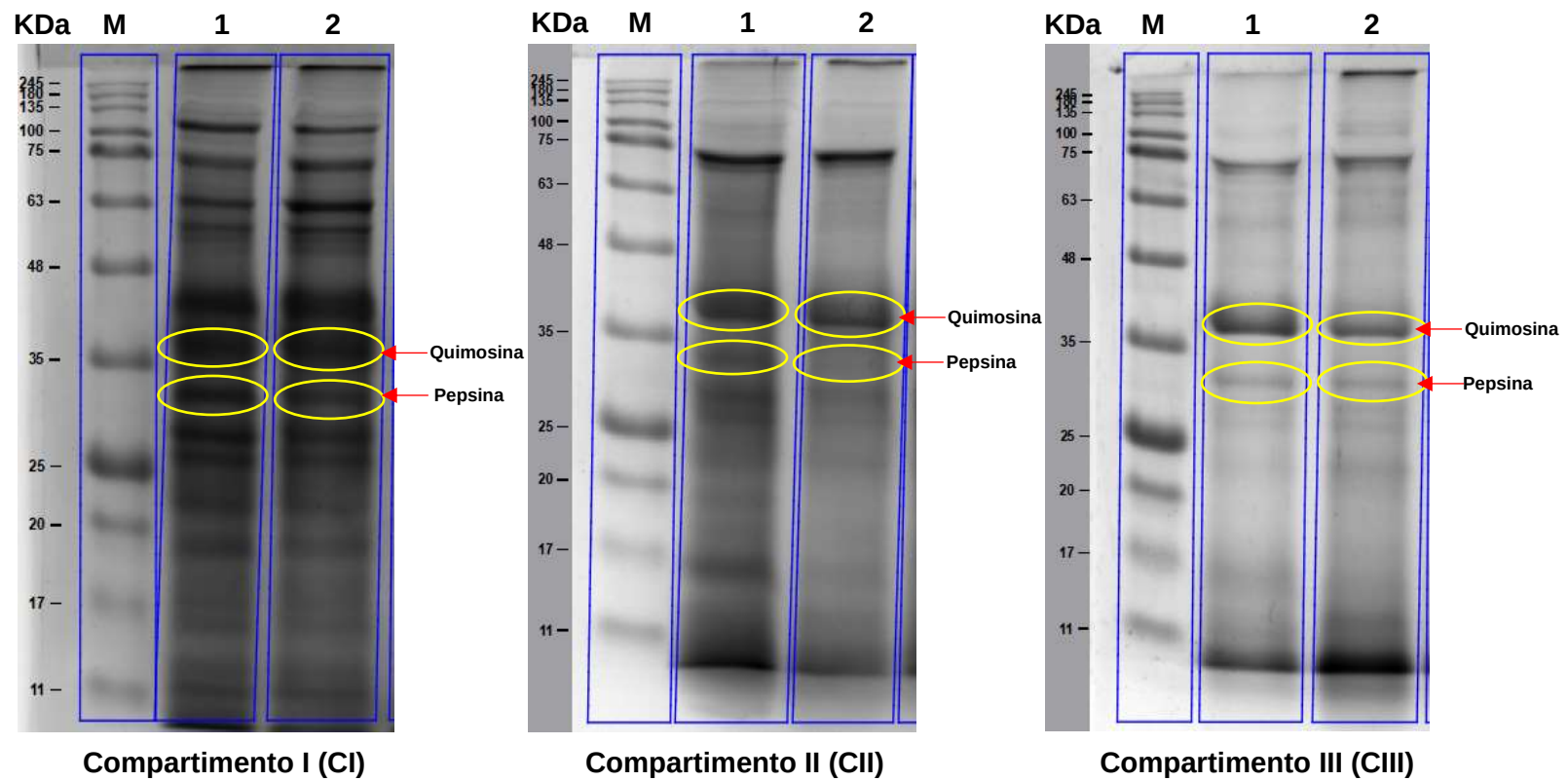


Figura 6. Perfil electroforético SDS-PAGE de los compartimentos del estómago de fetos de *Vicugna pacos* “alpaca”. (CI): EPT del feto uno (1), EPT del feto dos (2); (CII): EPT del feto uno (1), EPT del feto dos (2); (CIII) EPT del feto uno (1), EPT del feto dos (2). Se observa que la banda que correspondería a pepsina disminuye su concentración relativa conforme avanza del CI al CIII.

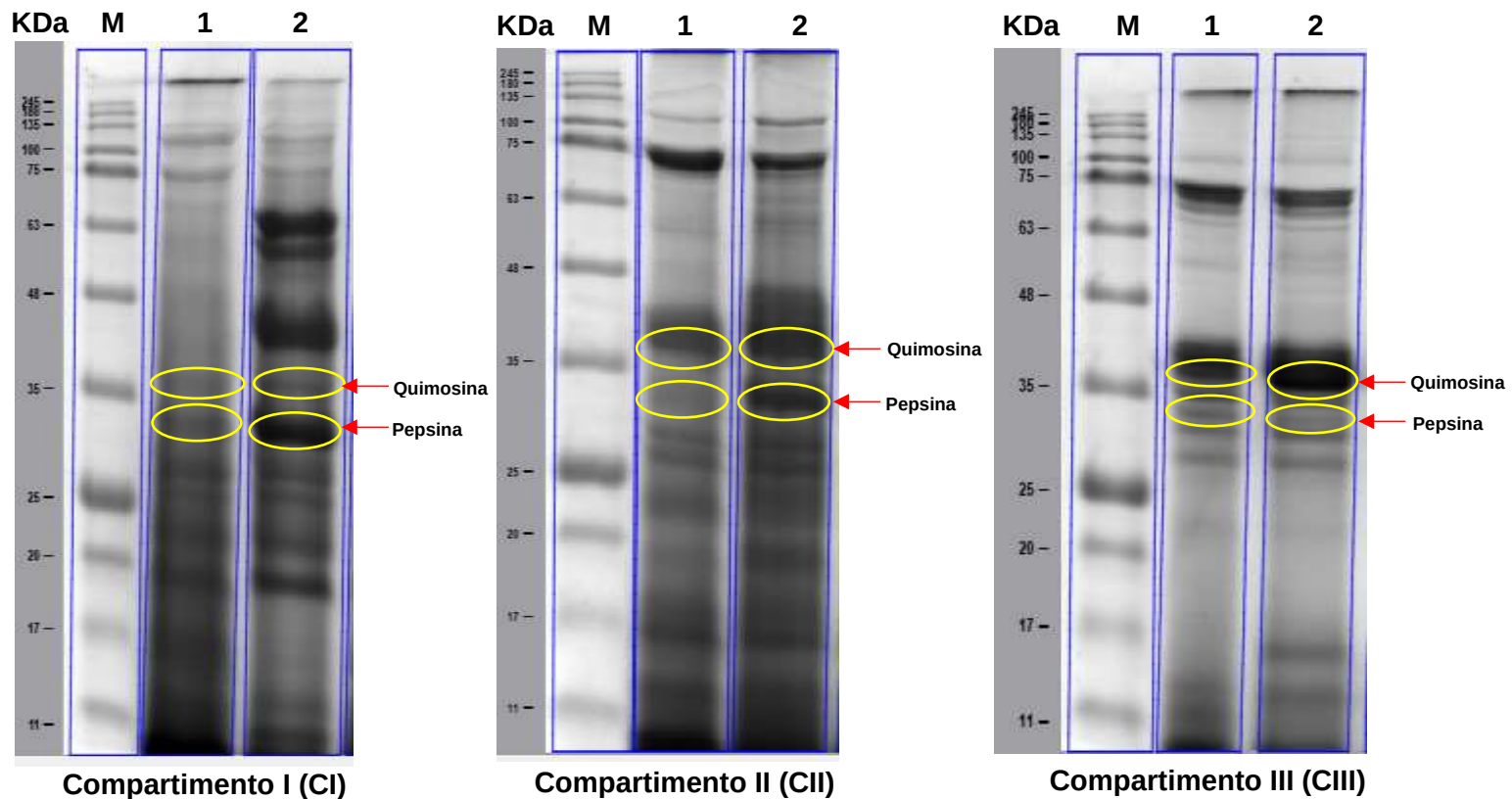


Figura 7. Perfil electroforético SDS-PAGE de los compartimentos del estómago de crías lactantes de *Vicugna pacos* “alpaca”. (CI) EPT de Cría uno (1), EPT de Cría dos (2); (CII) EPT de Cría uno (1), EPT de Cría dos (2); (CIII) EPT del Cría uno (1), EPT de Cría dos (2). Se observa que la banda que correspondería a quimosina aumenta su concentración relativa conforme avanza del CI al CIII, y la banda que correspondería a pepsina disminuye su concentración relativa conforme avanza del CI al CIII.

Tabla 2. Concentración relativa (medianas) de la banda correspondiente a quimosina del Compartimento I (CI), Compartimento II (CII) y Compartimento III (CIII) de los estómagos de fetos y crías de *Vicugna pacos* “alpaca” en aproximadamente 30 µg de proteína, Ayacucho 2024

Extracto Proteico Total (EPT)	n	Concentración relativa de quimosina		
		CI	CII	CIII
EPT fetos	22	1,68 ^{b A}	4,38 ^{a A}	7,37 ^{a A}
EPT crías	31	1,35 ^{c A}	2,85 ^{b B}	4,70 ^{a A}

Las medianas comparadas con la prueba Kruskal-Wallis seguidas de letras (letras minúsculas para filas y mayúsculas para columnas) en las filas indican diferencia significativa ($p < 0.05$) entre compartimentos en fetos y crías donde se puede observar que no hay diferencia entre los CII y CIII en fetos, pero en crías se observa una diferencia en los CI, CII y CIII, viéndose que el CIII tiene mayor concentración. Por otro lado, las letras mayúsculas indican diferencia significativa ($p < 0.05$) entre el CII de fetos y crías.

Tabla 3. Concentración relativa (medianas) de la banda correspondiente a pepsina del Compartimento I (CI), Compartimento II (CII) y Compartimento III (CIII) de los estómagos de fetos y crías de *Vicugna pacos* “alpaca” en aproximadamente 30 µg de proteína, Ayacucho 2024.

Extracto Proteico Total (EPT)	n	Concentración relativa de pepsina		
		CI	CII	CIII
EPT fetos	22	1,02 ^{a A}	0,61 ^{a A}	0,53 ^{a A}
EPT crías	31	0,59 ^{a A}	0,28 ^{a A}	0,70 ^{a A}

Las medianas comparadas con la prueba de Kruskal-Wallis no indican diferencia estadística significativa ($p > 0.05$), lo que indica que la presencia de pepsina en CI, CII, CIII de estómagos de fetos y CI, CII, CIII de estómagos de crías lactantes no difieran estadísticamente, por otro lado, la presencia de pepsina entre CI, CII y CIII de fetos y crías tampoco tienen diferencia significativa.

Tabla 4. Relación Quimosina/Pepsina del Compartimento I (CI), Compartimento II (CII) y Compartimento III (CIII) de los estómagos de fetos y crías de *Vicugna pacos* “alpaca”, Ayacucho 2024.

Extracto Proteico Total (EPT)	n	Relación quimosina/pepsina					
		CI		CII		CIII	
		Relación	%	Relación	%	Relación	%
Fetos	22	1,65:1	62%	7,18:1	88%	13,9:1	93%
Crías	31	2,29:1	70%	10,18:1	91%	6,71:1	87%

En los fetos, la relación quimosina/pepsina muestra un patrón creciente desde el CI hacia el CIII, lo que indica un incremento progresivo de proporción de quimosina en relación con la pepsina. En el caso de crías lactantes, aunque también se observa una alta proporción de quimosina, destaca una relación particularmente elevada en el CII, atribuida a una muy baja concentración relativa de la pepsina en este compartimento, lo que aumenta artificialmente la relación calculada. Este hallazgo sugiere, que la relación quimosina/pepsina en crías puede estar más influenciada por la dieta, generalmente en animales en desarrollo como las crías lactantes.

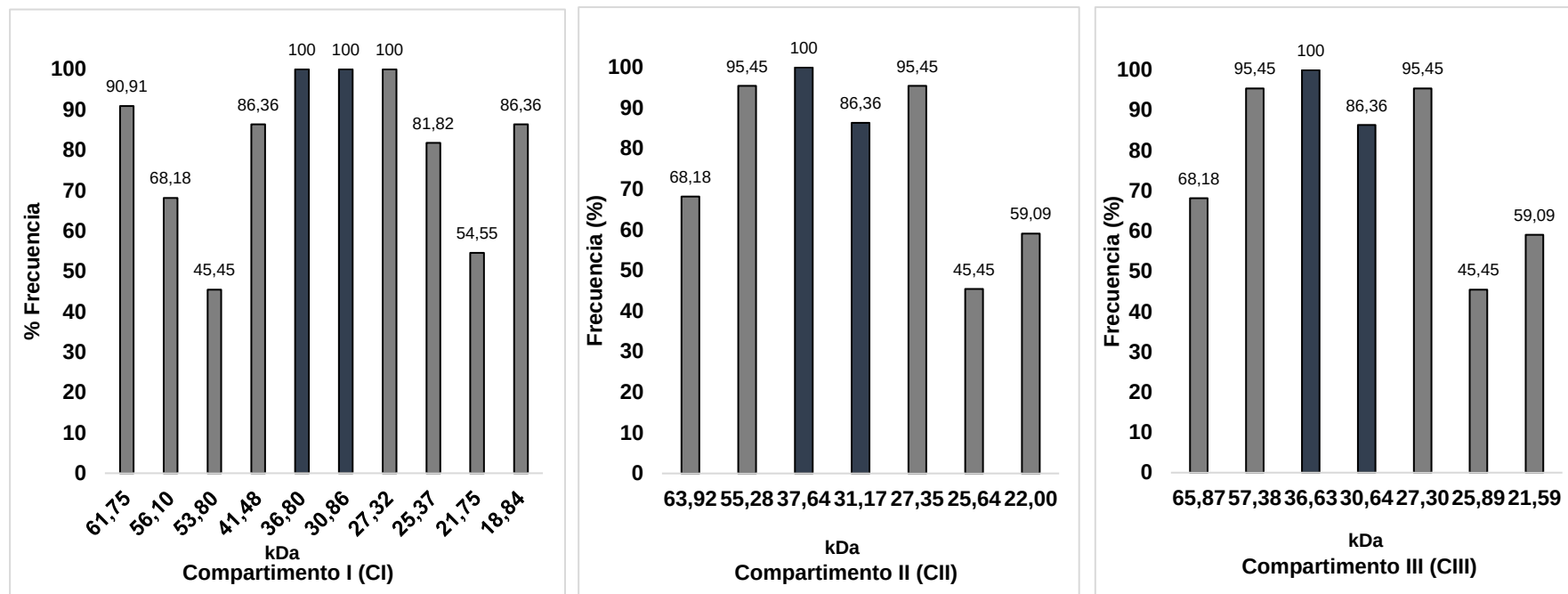


Figura 8. Frecuencia de bandas en los tres compartimentos del estómago de fetos de *Vicugna pacos* “alpaca”. CI, diez bandas presentes donde las bandas de interés tienen pesos moleculares de 36,80 kDa y 30,86 kDa y están presentes en el 100% de los individuos; CII, siete bandas presentes con pesos moleculares de 37,63 kDa y 31,17 kDa, donde las bandas de interés están presentes en un 100% y 86,36%; CIII, siete bandas con pesos moleculares de 36,63 kDa y 30,64 Da, presentes en un 100% y 86,36% en los sujetos estudiados. Nota: Para este análisis, se consideraron únicamente las bandas presentes entre 63 KDa y 17 KDa del marcador molecular, seleccionadas por criterio, debido a una mayor definición y relevancia para la identificación de proteínas de interés.

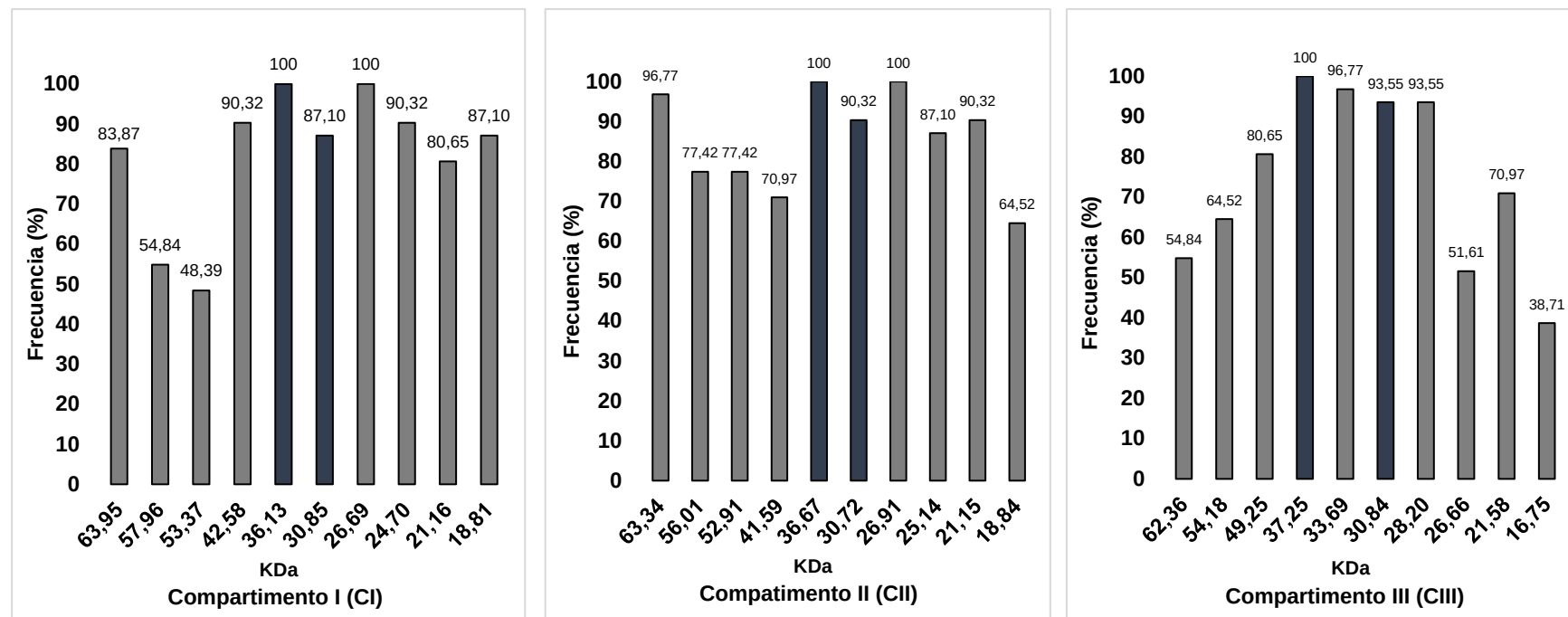


Figura 9. Frecuencia de bandas en los tres compartimentos del estómago de crías lactantes de *Vicugna pacos* “alpaca”. CI, diez bandas presentes, donde las bandas de interés tienen pesos moleculares de 36,13 y 30,85 kDa y están presentes en el 100% y 87,10 % de los individuos; CII, diez bandas presentes donde las bandas de interés poseen pesos moleculares de 36,67 kDa y 30,72 kDa y están presentes en un 100% y 90,32% en los individuos estudiados; CIII, diez bandas presentes, donde las bandas de interés tienen pesos moleculares de 37,25 kDa y 30,84 kDa y se encuentran en un 100% y 93,55%. Nota: Para este análisis, se consideraron únicamente las bandas presentes entre 63 kDa y 17 kDa del marcador molecular, seleccionadas por criterio, debido a una mayor definición y relevancia para la identificación de proteínas de interés.

V. DISCUSIÓN

El presente estudio es el primer reporte respecto al proteoma del cuajo de alpaca, utilizado en las comunidades altoandinas para elaborar quesos tradicionales con leche de vaca.

En la Tabla 1, se muestra la concentración de proteínas en el EPT de fetos de alpaca. Las medianas de las concentraciones de proteínas fueron: 26,79 $\mu\text{g/ml}$ para el CI, 20,76 $\mu\text{g/ml}$ para el CII y 25,98 $\mu\text{g/ml}$ para el CIII. Se evidenció una diferencia estadísticamente significativa entre los compartimentos CI y CIII con CII, con una concentración menor en el CII ($p < 0.05$), mientras que en el CI y CIII no se detectó diferencia estadística significativa ($p > 0.05$). Por otra parte, la concentración de proteína en el EPT de los CI, CII y CIII de crías lactantes de *Vicugna pacos* “alpaca” fue de 23,62 $\mu\text{g/ml}$, 24,36 $\mu\text{g/ml}$ y 38,14 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente, con diferencia significativa ($p < 0.05$) donde el CIII presentó mayor concentración de proteínas, mientras que CI y CII no muestran diferencia significativa ($p > 0.05$). A comparación de otras investigaciones realizadas la concentración de proteínas en cuajo de alpaca variaron entre 29,80 y 52,91 mg/ml (Mujica & Hernández, 2023), quienes trabajaron con muestras de macerados de cuajo de alpaca listo para ser usados, más no usaron tejido gástrico como se realizó en la presente investigación. Recientemente, Tenorio (2025) reportó la concentración de proteínas en las tres cavidades del estómago de fetos y crías lactantes de alpaca, encontrándose diferencia entre los compartimentos estomacales de crías en el cual el CIII obtuvo un valor superior en la concentración de proteínas, de igual manera entre el CIII de fetos y crías se reportó diferencia estadística mencionando que CIII de crías lactantes poseen mayor concentración de proteínas. Por otra parte, se ha reportado la concentración de proteínas en Extracto de Enzimas Gástricas (GEC) de abomaso de *Camelus dromedarius*,

encontrándose mayor concentración en dromedarios adultos, en comparación a lactantes (Saliha et al., 2012); sin embargo, ellos realizaron una investigación anterior en dromedarios de edades diferentes que incluyeron un año, tres y nueve años, observándose un aumento en la concentración de proteínas conforme aumenta la edad (Saliha et al., 2011), lo que resulta concordante con Kouadri & Nessil (2023).

En la Figura 5, se presenta el perfil electroforético SDS - PAGE del EPT de cuajo de alpaca, donde se observan el marcador, las bandas del estándar de quimosina recombinante *Mucor miehei* Tipo II (Sigma-Aldrich, USA) y el estándar de pepsina porcina (Sigma-Aldrich, USA) con pesos moleculares de 44,1 kDa y 36,2 kDa, respectivamente, que se tomaron como referencia para considerar las bandas de quimosina y pepsina presentes en los tres compartimentos de los EPT de tejido gástrico de alpaca. En investigaciones realizadas anteriormente se reportaron pesos moleculares de quimosina y pepsina; en bovinos la quimosina presenta un peso molecular de 35,5 a 36 kDa (Amjad et al., 2024; Kumar et al., 2010) y pepsina un peso molecular de 34 kDa a 35 kDa (Chow & Kassel, 1968; Imelio et al., 2008), los pesos moleculares reportados fueron 52 kDa y 40 kDa para la quimosina en dromedarios (Elagamy, 2000; Kappeler et al., 2006) y pepsina 39 kDa (Elagamy, 2000), aunque no se encontraron artículos donde se reportan los pesos moleculares de la quimosina y pepsina en alpaca, el Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI) reporta la quimosina con un peso molecular de 43,016 kDa (National Center for Biotechnology Information, s. f.-b) y 41,79 kDa para pepsina (National Center for Biotechnology Information, s. f.-a), notándose que los pesos moleculares reportados por NCBI son mayores a los observados, es necesario resaltar que son pesos calculados de acuerdo a un gen y que el resultado de la traducción del gen son enzimas inactivas como pueden ser la preproquimosina, proquimosina y la propepsina o pepsinógeno que poseen pesos moleculares mayores, como la proquimosina que posee un peso molecular de 40,77 kDa y la preproquimosina que tiene 16 aminoácidos más (Kumar et al., 2010); el pepsinógeno en bovinos tiene un peso molecular aproximado de 39 kDa, ovinos 43 kDa y caprinos 42 kDa (Mostofa et al., 1990), tanto la quimosina como la pepsina para que se activen, necesitan procesarse por proteólisis limitada. Sin embargo, no se tomaron las bandas más cercanas o con pesos moleculares cercanos a la quimosina recombinante y pepsina porcina, puesto que se tomó como criterio la proporción de quimosina/pepsina en el abomaso de animales

utilizados para la producción de quesos, que varían según la edad y alimentación, donde la quimosina es la principal proteína o enzima altamente específica en la coagulación, por el contrario la pepsina tiene una actividad proteolítica general (Ruesson, 2018). En el abomaso (cuajo) la cantidad de quimosina es predominante en recién nacidos y crías lactantes, presente en un 88% a 94% contra un 6% a 12% de pepsina (Sivipaucar, 2022). Estos valores coinciden con los resultados obtenidos en esta investigación (Tabla 4), donde la quimosina representa entre el 62% y 93 %, mientras que la pepsina varía entre el 7% y 38 % reafirmando el patrón esperado. Tomando en cuenta estas referencias se tomaron dos bandas que podrían ser quimosina y pepsina, la primera banda con mayor presencia y en mayor concentración sobre todo en el CIII de fetos y crías lactantes de *Vicugna pacos* “alpaca” con peso molecular de 36,87 kDa, la segunda banda de y 30,82 kDa para pepsina.

En las Figuras 6 y Figura 7, se muestra el perfil electroforético SDS-PAGE de los compartimentos de estómagos de fetos y crías lactantes de alpaca observándose en los compartimentos CI, CII y CIII dos bandas principales de interés que son la quimosina y pepsina. En los compartimentos de fetos se observa que la banda correspondiente a la pepsina disminuye su concentración relativa conforme avanza del CI al CIII y la banda correspondiente a la quimosina aumenta su concentración relativa conforme avanza de cavidad. En crías lactantes, se observa un aumento en la concentración relativa de la banda quimosina y un descenso en la concentración relativa de la banda de pepsina.

En la Tabla 2, se muestran las medianas de la concentración relativa de la banda correspondiente a quimosina de fetos y crías lactantes. Al realizarse el análisis de Kruskal Wallis, se percibe una diferencia significativa ($p < 0.05$) entre los compartimentos de fetos y crías; sin embargo, las concentraciones relativas del CII y CIII de fetos, no tienen diferencia significativa ($p > 0.05$), mientras que la concentración relativa en los compartimentos de crías lactantes indica diferencia entre las tres cavidades, con una concentración mayor en la CIII. Cabe añadir que al aplicarse la prueba estadística para la comparación de concentración relativa de quimosina entre las cavidades de fetos y crías solo existió una diferencia significativa entre la CII, contando con una mayor concentración el CII de fetos.

En la Tabla 3, se tiene la concentración relativa de pepsina en las cavidades de fetos y crías lactantes de alpaca. Al aplicarse la prueba estadística estas no

mostraron diferencia significativa ($p > 0.05$) en los tres compartimentos de fetos y crías, ni entre fetos y crías. Aunque no se reportaron concentraciones relativas analizadas en el perfil electroforético SDS-PAGE de las bandas de quimosina y pepsina, Contreras (2025) comparó los perfiles electroforéticos de macerados de abomaso en tres tipos de animales (porcino, bovino y camélido) encontrado proteínas con mayor fuerza de cuajo en el EPT de cuajo de alpaca con pesos moleculares de 42,5 kDa, 36,2 kDa y 32,5 kDa y concentraciones relativas de 5,28; 6,19 y 2,92 respectivamente; es necesario resaltar que los EPT fueron extraídos de alpacas de 2-3 años, y según la literatura hay mayor presencia de quimosina en crías lactantes y esta va disminuyendo conforme avanza el desarrollo fisiológico por el cambio de dieta.

En la Tabla 4, se reporta la relación quimosina/pepsina de las concentraciones relativas en los compartimentos CI, CII y CIII. Se determinó que la quimosina se encuentra en mayor porcentaje con respecto a pepsina, observándose en fetos un aumento conforme avanzan los compartimentos; mientras que en crías se notó un porcentaje mayor en el CII puesto que hay una baja concentración de la pepsina; sin embargo en la Tabla 2 las concentraciones relativas de quimosina aumentan según avanzan los compartimentos y en la Tabla 3 se observa que el CII en crías lactantes presenta una concentración relativa baja de pepsina, pero entre los tres compartimentos no existe diferencia estadísticamente significativa. Estos resultados resultan concordantes con lo reportado por Sivipaucar (2022), quien refiere que la quimosina es el componente mayor con relación a la pepsina, se encuentra en un 88% a 94% en crías lactantes bovinas, mientras que la pepsina se encuentra en un 6% a 12%. Esta proporción varía y se invierte conforme la edad del animal avanza, puesto que la dieta también cambia.

En la Figura 8, se reporta el patrón de bandeo en los compartimentos I, II y III de fetos de alpaca. Se determinaron diez bandas en el compartimento I de estómagos de fetos, donde las dos bandas de interés con pesos moleculares de 36,80 kDa y 30,86 kDa mostraron una frecuencia de un 100% para ambas bandas, la presencia de siete bandas en el CII de estómagos de fetos, donde las bandas de interés tuvieron una frecuencia del 100% y 86,36 % con pesos moleculares de 37,64 kDa y 31,17 kDa respectivamente, por último la presencia de siete bandas en el CIII de estómagos de fetos, con dos bandas de interés de pesos moleculares de 36,63 kDa y 30,64 kDa con frecuencias del 100% y 30,64%, respectivamente.

En la Figura 9, se reporta el patrón de bandeo en los compartimentos I, II y III de crías lactantes de alpaca. Se determinaron un total de diez bandas con pesos moleculares desde 63,95 kDa a 18,81 kDa, sin embargo, la frecuencia de las dos bandas de interés fue del 100% y 87,10% con pesos moleculares de 36,13 kDa y 30,85 kDa, respectivamente. Se muestran las frecuencia y presencia de 10 bandas en el CII en crías lactantes, con pesos moleculares desde 63,34 kDa hasta 18,84 kDa, mientras que la frecuencia de las dos bandas de interés fue del 100% y 90,32% con pesos moleculares de 36,37 kDa y 30,72 kDa, de igual manera se reportan la presencia y frecuencia de diez bandas en el CIII de estómagos de crías lactantes con pesos moleculares desde 63,36 kDa hasta 16,75 kDa y las dos bandas de interés con pesos moleculares de 37,25 kDa y 30,84 kDa tuvieron una frecuencia del 100% y 93,55% respectivamente.

VI. CONCLUSIONES

1. Se logró estandarizar el protocolo para obtener el Extracto Proteico Total (EPT) a partir de tejido gástrico de alpaca.
2. Mediante electroforesis SDS-PAGE se estableció el perfil proteico de los compartimentos estomacales de fetos y crías de alpaca, determinándose entre 7 y 10 bandas de proteínas.
3. Se encontraron diez bandas en el CI, siete en el CII y CIII de fetos que van desde 65,87 kDa a 18,84 kDa y 10 bandas en los tres compartimentos de crías lactantes que van desde los 63,95 kDa a 16,75 kDa. La banda correspondiente a quimosina está presente en la totalidad de las muestras.
4. Existe una variación en la relación de quimosina/pepsina en los tres compartimentos de estómagos de fetos y crías lactantes de alpaca, observándose una mayor proporción de quimosina en comparación con pepsina.

VII. RECOMENDACIONES

1. Verificar previamente mediante zimogramas la actividad proteolítica de la quimosina presente en el EPT del cuajo de alpaca.
2. Continuar con los estudios que permitan purificar la quimosina de alpaca a través de cromatografía líquida en columna y demostrar su actividad coagulante.
3. Utilizar técnicas más avanzadas para identificar la quimosina de alpaca, tales como 2D, HPLC y MS.
4. Completar los estudios de eficiencia tecnológica con miras a formular una patente de elaboración de cuajo de alpaca.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abuharfeel, N. M., & Abuereish, G. M. (1984). Isolation and characterization of camel pepsins. *Comparative Biochemistry and Physiology. A, Comparative Physiology*, 77(1), 175-182. [https://doi.org/10.1016/0300-9629\(84\)90031-8](https://doi.org/10.1016/0300-9629(84)90031-8)
- Ahmed Alshamiry, F., & Abdelrahman, M. (2020). Review: Milk protein, types and structure, synthesis of casein. *Global Advanced Research*, 22.
- Alonso Villela, S. M., Kraïem, H., Bouhaouala-Zahar, B., Bideaux, C., Aceves Lara, C. A., & Fillaudeau, L. (2020). A protocol for recombinant protein quantification by densitometry. *MicrobiologyOpen*, 9(6), e1027. <https://doi.org/10.1002/mbo3.1027>
- Alzola, R. H., Ghezzi, M. D., Gimeno, E. J., Lupidio, M. C., Castro, A. N., & Rodríguez, J. A. (2004). Topografía y morfología del estómago de llama (*Lama glama*). *International Journal of Morphology*, 22(2), 155-164. <https://doi.org/10.4067/S0717-95022004000200010>
- Amjad, H., Saleem, F., Ahmad, M., Nisar, U., & Arshad Dar, H. (2024). Comprehensive bioinformatics-based annotation and functional characterization of bovine chymosin protein revealed novel biological insights. *Food Chemistry: Molecular Sciences*, 8, 100191. <https://doi.org/10.1016/j.fochms.2023.100191>
- Andrews, A. T. (1986). *Electrophoresis: Theory, techniques, and biochemical and clinical applications*, Anthony T. Andrews. (2nd ed.). Clarendon Press.
- Azure Biosystems. (s. f.). Densitometry. *Azure Biosystems*. Recuperado 29 de mayo de 2025, de <https://azurebiosystems.com/western-blotting-applications/densitometry/>
- Baudys, M., Erdene, T. G., Kostka, V., Pavlík, M., & Foltmann, B. (1988). Comparison between prochymosin and pepsinogen from lamb and calf. *Comparative Biochemistry and Physiology. B, Comparative Biochemistry*, 89(2), 385-391. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(88\)90241-6](https://doi.org/10.1016/0305-0491(88)90241-6)
- Belenkaya, S. V., Bondar, A. A., Kurgina, T. A., Elchaninov, V. V., Bakulina, A. Y., Rukhlova, E. A., Lavrik, O. I., Ilyichev, A. A., & Shcherbakov, D. N. (2020). Characterization of the Altai Maral Chymosin Gene, Production of a Chymosin Recombinant Analog in the Prokaryotic Expression System, and Analysis of Its Several Biochemical Properties. *Biochemistry. Biokhimiia*, 85(7), 781-791. <https://doi.org/10.1134/S0006297920070068>

- Benavides Castro, T. A. (2003). *Efecto de las Variantes Genéticas A y B de κ -Caseína y β -lactoglobulina sobre las Propiedades de Coagulación de la Leche*. Universidad Austral de Chile.
- Bio-Rad. (s. f.-a). *2x Laemmli Sample Buffer #1610737*. Recuperado 28 de mayo de 2025, de <https://www.bio-rad.com/es-pe/sku/1610737-2x-laemmli-sample-buffer?ID=1610737>
- Bio-Rad. (s. f.-b). *Ammonium Persulfate (APS) #1610700 | Bio-Rad*. Recuperado 29 de mayo de 2025, de <https://www.bio-rad.com/es-pe/sku/1610700-ammonium-persulfate-aps?ID=1610700>
- Bio-Rad. (s. f.-c). *GelDoc Go Gel Imaging System*. Recuperado 29 de mayo de 2025, de <https://www.bio-rad.com/es-pe/category/geldoc-go-gel-imaging-system?ID=O494SO15>
- Bio-Rad. (s. f.-d). *Mini-PROTEAN Tetra Cell for Classroom Labs – Bio-Rad*. Recuperado 28 de mayo de 2025, de <https://www.bio-rad.com/es-pe/product/mini-protean-tetra-cell?ID=d5d6580e-b8f6-4f1c-bbc4-f63d360ea788>
- Brunelle, J. L., & Green, R. (2014). Chapter Twelve—One-dimensional SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (1D SDS-PAGE). En J. Lorsch (Ed.), *Methods in Enzymology* (Vol. 541, pp. 151-159). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-420119-4.00012-4>
- Cano Salazar, V. M. (2015). *Extracción y caracterización fisicoquímica de quimosina bovina para producción de cuajo, sometida a variación térmica y de pH, a escala laboratorio*. Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Carrica Illia, M., Díaz, M. del C., Lendez, P. A., Carrica Illia, M. P., Zimmermann, B., Ghezzi, M. D., Mendoza Torres, G. J., Castro, A. N. C., & Barbeito, C. G. (2022). Relaciones anatómicas del estómago de la alpaca (*Vicugna pacos*) durante su desarrollo ontogénico. En *Libro de Resúmenes de las Jornadas de Investigación y Posgrado: El desafío de visibilizar la Ciencia*. Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Veterinarias. <https://ri.conicet.gov.ar/handle/11336/224350>
- Castellaro G., G., Ullrich R., T., Wackwitz, B., & Raggi S., A. (2004). Composición botánica de la dieta de alpacas (*Lama pacos* L.) y llamas (*Lama glama* L.) en dos estaciones del año, en praderas altiplánicas de un sector de la Provincia de Parinacota, Chile. *Agricultura Técnica*, 64(4), 353-363. <https://doi.org/10.4067/S0365-280720040004000004>

- Chen, C.-C., Chen, L.-Y., Li, W.-T., Chang, K.-L., Kuo, M.-I., Chen, C.-J., & Hsieh, J.-F. (2021). Influence of Chymosin on Physicochemical and Hydrolysis Characteristics of Casein Micelles and Individual Caseins. *Nanomaterials (Basel, Switzerland)*, 11(10), 2594. <https://doi.org/10.3390/nano11102594>
- Chow, R. B., & Kassel, B. (1968). Bovine pepsinogen and pepsin. I. Isolation, purification, and some properties of the pepsinogen. *The Journal of Biological Chemistry*, 243(8), 1718-1724.
- Contreras Mancilla, N. J. (2025). *Caracterización enzimática de cuajo porcino, bovino y de camélido utilizados en la elaboración de quesos artesanales de Pariahuanca* (Cangallo). <https://repositorio.unsch.edu.pe/handle/20.500.14612/7616>
- Córdova Ramos, J. S. (2009). Determinación de parámetros para obtención y conservación de cuajo de bovino adulto [Universidad Nacional del Centro del Perú]. PDF. <https://repositorio.uncp.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12894/2638/C%c3%b3rdova%20Ramos.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Dobler López, J. (2015). Evaluación de uso de proteasas de estómagos de conejo en las características fisicoquímicas, microbiológicas y sensoriales de queso frescos y madurados [Doctorado Tesis, Universidad Autónoma del Estado de México]. <https://core.ac.uk/reader/76002228>
- Dumut, D. C., Garić, D., Centorame, A., & Radzioch, D. (2022). The gradient-like separation and reduced running time with Tris-Tricine-HEPES buffer for SDS-PAGE. *Analytical Biochemistry*, 653, 114789. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2022.114789>
- Dupont, D., Grappin, R., Pochet, S., & Lefier, D. (2011). MILK PROTEINS | Analytical Methods. En J. W. Fuquay (Ed.), *Encyclopedia of Dairy Sciences (Second Edition)* (pp. 741-750). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374407-4.00428-3>
- Elagamy, E. I. (2000). Physicochemical, molecular and immunological characterization of camel calf rennet: A comparison with buffalo rennet. *The Journal of Dairy Research*, 67(1), 73-81. <https://doi.org/10.1017/s0022029999003957>
- Flores Tintaya, W., Quispe Gutiérrez, U. S., Alva Villavicencio, G., & Navarrete Zamora, M. V. (2022, marzo 30). *Evaluación morfométrica del estómago*

- fetal en alpaca (Vicugna pacos)*. 32.
<https://produccioncientificaluz.org/index.php/cientifica/article/view/37914>
- Foroumadi, A., & Saeedi, M. (2014). Mercaptoethanol, 2-. En P. Wexler (Ed.), *Encyclopedia of Toxicology (Third Edition)* (pp. 201-202). Academic Press.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386454-3.00408-5>
- Fundación Instituto Roche. (s. f.). *Glosario de genética—Densitometría*. Recuperado 29 de mayo de 2025, de <https://www.institutoroche.es/recursos/glosario/Densitometr%C3%ADa>
- García, C., Montiel, R. L. A., & Borderas, T. F. (2014). Grasa y proteína de la leche de vaca: Componentes, síntesis y modificación. *Archivos de zootecnia*, 63(0), 85-105.
- García Flores, V., Chambillo, J., Incacutipa Rivas, D., & Marquez Alvis, N. (2014). *Elaboracion de Queso saborizado con oreg—UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN FACULTAD DE - Studocu* [Tesis de grado, UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN].
<https://www.studocu.com/pe/document/universidad-nacional-de-ucayali/ingenieria-agroindustrial-1/elaboracion-de-queso-saborizado-con-oreg/45096338>
- García Vera, W., Pezo Carreón, D., San Martín H, F., Olazábal Loaiza, J., & Franco Febres, F. (2005). *Manual del Técnico Alpaquero* (Biblioteca Nacional del Perú). Soluciones Practicas.
- Goldring, J. P. D. (2018). The Roles of Acetic Acid and Methanol During Fixing and Staining Proteins in an SDS-Polyacrylamide Electrophoresis Gel. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1853, 15-18.
https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8745-0_2
- Herriott, R. M. (1956). The active groups of pepsin. *Journal of Cellular Physiology. Supplement*, 47(Suppl 1), 239-243.
<https://doi.org/10.1002/jcp.1030470417>
- Houen, G., Madsen, M. T., Harlow, K. W., Lønblad, P., & Foltmann, B. (1996). The primary structure and enzymic properties of porcine prochymosin and chymosin. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 28(6), 667-675. [https://doi.org/10.1016/1357-2725\(96\)00002-7](https://doi.org/10.1016/1357-2725(96)00002-7)
- Imelio, N., Marini, A., Spelzini, D., Picó, G., & Farruggia, B. (2008). Pepsin extraction from bovine stomach using aqueous two-phase systems: Molecular mechanism and influence of homogenate mass and phase

- volume ratio. *Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 873(2), 133-138.
<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2008.07.006>
- Isselnane, S., Boudjenah-Haroun, S., Nouani, A., Ahmed-Zennia, S. S., Bouazza, B., Yabrir, B., & Mati, A. (2016). Molecular characterization of crude enzymatic extract from algerian camel abomasum (*Camelus dromedarius*). *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 217-223.
<https://doi.org/10.9755/ejfa.2015-07-490>
- 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>
- Kouadri, N. E. H., & Nessil, F. (2023). *Valorisation des extraits enzymatiques coagulants d'origine cameline* [Thesis, UNIVERSITE KASDI MERBAH OUARGLA]. <http://dspace.univ-ouargla.dz/jspui/handle/123456789/36002>
- Kumar, A., Grover, S., Sharma, J., & Batish, V. K. (2010). Chymosin and other milk coagulants: Sources and biotechnological interventions. *Critical Reviews in Biotechnology*, 30(4), 243-258.
<https://doi.org/10.3109/07388551.2010.483459>
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), Article 5259.
<https://doi.org/10.1038/227680a0>
- Miciński, J., Kowalski, I. M., Zwierzchowski, G., Szarek, J., Pierożyński, B., & Zabłocka, E. (2013). Characteristics of cow's milk proteins including allergenic properties and methods for its reduction. *Polish Annals of Medicine*, 20(1), 69-76. <https://doi.org/10.1016/j.poamed.2013.07.006>
- Mohanty, A. K., Mukhopadhyay, U. K., Kaushik, J. K., Grover, S., & Batish, V. K. (2003). Isolation, purification and characterization of chymosin from riverine buffalo (*Bubalus bubalis*). *The Journal of Dairy Research*, 70(1), 37-43.
<https://doi.org/10.1017/s0022029902005927>
- Moschopoulou, E. E., Kandarakis, I. G., Alichanidis, E., & Anifantakis, E. M. (2006a). Purification and characterization of chymosin and pepsin from kid. *The Journal of Dairy Research*, 73(1), 49-57.
<https://doi.org/10.1017/S0022029905001470>

- Moschopoulou, E. E., Kandarakis, I. G., Alichanidis, E., & Anifantakis, E. M. (2006b). Purification and characterization of chymosin and pepsin from kid. *Journal of Dairy Research*, 73(1), 49-57. <https://doi.org/10.1017/S0022029905001470>
- Mostofa, M., McKellar, Q. A., & Eckersall, P. D. (1990). Comparison of pepsinogen forms in cattle, sheep and goats. *Research in Veterinary Science*, 48(1), 33-37.
- 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*, 25(1), 32-40. <https://doi.org/10.18271/ria.2023.493>
- National Center for Biotechnology Information. (s. f.-a). *pepsin A-like [Vicugna pacos]—Protein*. Recuperado 21 de abril de 2025, de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/560985489>
- National Center for Biotechnology Information. (s. f.-b). *Quimosina [Vicugna pacos]—Proteínas—NCBI*. Recuperado 21 de abril de 2025, de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/2953142113>
- National Human Genome Research Institute. (s. f.). *Electroforesis*. Recuperado 28 de mayo de 2025, de <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Electroforesis>
- Navarro, C. A. M., & Flores, M. A. L. (2019). Electroforésis: fundamentos, avances y aplicaciones. *epistemus*, 13(26), Article 26. <https://doi.org/10.36790/epistemus.v13i26.96>
- New Desheng CO. (s. f.). *The role of Tris hcl buffer in sds electrophoresis*. Hubei new desheng materials technology co., LTD. Recuperado 27 de mayo de 2025, de <https://www.hbdsbio.com/the-role-of-tris-hcl-buffer-in-sds-electrophoresis.html>
- Padilla Doval, J., Zambrano Arteaga, J. C., Padilla Doval, J., & Zambrano Arteaga, J. C. (2021). Estructura, propiedades y genética de las caseínas de la leche: Una revisión. *CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*, 16(3), 62-95. <https://doi.org/10.21615/cesmvz.5231>
- Pérez Chabela, M. de L., Soriano Santos, J., Ponce Alquicira, E., & Díaz Tenorio, L. M. (2015). Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS como herramienta en el estudio de las proteínas miofibrilares. Una revisión. *Nacameh*, 9(2), 77-96.

- Petrov, A., Tsa, A., & Puglisi, J. D. (2013). Chapter Sixteen—Analysis of RNA by Analytical Polyacrylamide Gel Electrophoresis. En J. Lorsch (Ed.), *Methods in Enzymology* (Vol. 530, pp. 301-313). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-420037-1.00016-6>
- Pinto Jiménez, C. E. P., Martín Espada, C. M., & Cid Vázquez, M. D. C. (2010). Camélidos sudamericanos: Clasificación, origen y características. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias*, 4(1), Article 1.
- Riaño, D. A. O. (2019). Difusión del conocimiento aplicativo y tecnológico para el desarrollo de métodos analíticos bioquímicos, como la extracción y purificación de proteínas. *Revista de la Escuela Colombiana de Ingeniería*, 49-52.
- Ruesson, E. (2018). *Milk coagulation –impact on cheese*. 27. PDF.
- Saliha, B.-H., Laleye, S., Senoussi Chahra, L., Farida, M.-M., Saliha, S. A., & Abderrahma, M. (2012). Coagulation of Camel Milk using Dromedary Gastric Enzymes as a Substitute of the Commercial Rennet. *American Journal of Food Technology*, 7(7), 409-419. <https://doi.org/10.3923/ajft.2012.409.419>
- Saliha, B.-H., Louis, L. C., Farida, M.-M., Saliha, S. A., Nasma, M., & Abderrahmane, S. (2011). Comparative study of milk clotting activity of crude gastricenzymes extracted from camels. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 301-310.
- Sánchez Vega, R., & Sepúlveda Ahumada, D. (2020). Capítulo 4: Proteína y péptidos lácteos. En *Lácteos: Nutrición y Salud* (Valenzuela Báez, Rodrigo, pp. 28-29). Consorcio Lechero; PDF. <https://repositorio.uchile.cl/handle/2250/181877>
- Sbodio, O. A., & Revelli, G. R. (2012). Coagulación de la leche: Desarrollo de un dispositivo para el “monitoreo”online del proceso. Avances en la Argentina. *RIA. Revista de investigaciones agropecuarias*, 38(3), 236-246.
- Shen, C.-H. (2019). Chapter 8—Quantification and Analysis of Proteins. En C.-H. Shen (Ed.), *Diagnostic Molecular Biology* (pp. 187-214). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802823-0.00008-0>
- Sigma-Aldrich. (s. f.-a). *Ammonium persulfate for molecular biology, for electrophoresis*, = 98 7727-54-0. Recuperado 29 de mayo de 2025, de <https://www.sigmaaldrich.com/PE/en/product/sigma/a3678>

- Sigma-Aldrich. (s. f.-b). *Sample Buffer, Laemmli 2× Concentrate SDS Sample Buffer*. Recuperado 28 de mayo de 2025, de <https://www.sigmaaldrich.com/PE/en/product/sigma/s3401>
- Sivipaucar Silvera, Y. R. (2022). *Influencia de los cuajos naturales de ovino (Ovis orientalis aries), porcino (Sus scrofa domesticus) y caprino (Capra aegagrus hircus) sobre las características químicas y sensoriales en el queso fresco*. <http://repositorio.unajma.edu.pe/handle/20.500.14168/721>
- Stringer, R. (2005). ELECTROPHORESIS | Overview. En P. Worsfold, A. Townshend, & C. Poole (Eds.), *Encyclopedia of Analytical Science (Second Edition)* (pp. 356-363). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B0-12-369397-7/00120-5>
- Tenorio Bautista, Y. R. (2025). *Morfometría y caracterización bioquímica del estómago de Vicugna pacos "alpaca" en fetos del último tercio de gestación y crías lactantes*. <https://repositorio.unsch.edu.pe/handle/20.500.14612/7564>
- Vásquez C., M., Rodríguez G, J., Lira M., B., Cueva M, S., Ayón S, M., & Mallma D, Y. (2012). Ph de la superficie luminal de la mucosa gastrointestinal de crías de alpacas durante las primeras semanas de edad. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 23(1), 20-26.
- Vater, A. L., Zandt, E., & Maierl, J. (2021). The topographic and systematic anatomy of the alpaca stomach. *Anatomical Record (Hoboken, N.J.: 2007)*, 304(9), 1999-2013. <https://doi.org/10.1002/ar.24588>
- 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). *Alimentacion de camelidos sudamericanos y Manejo de pastizales* [Nota de Curso: Modulo de Camélidos Sudamericanos I]. PDF. https://www.academia.edu/7308893/Alimentacion_de_camelidos_sudamericanos

ANEXOS

Anexo 1. Vista panorámica del Camal Municipal de Huancavelica, donde se recolectaron las muestras de fetos.



Anexo 2. Alpacas que fueron faenadas en el Camal Municipal de Huancavelica, de las cuales se obtuvieron las muestras de fetos.



Anexo 3. Centro Poblado de Choccoro (Chuschi,Ayacucho), donde se recolectaron las muestras de crías lactantes.



Anexo 4. Alpacas criadas en el Centro Poblado de Choccoro - Ayacucho.



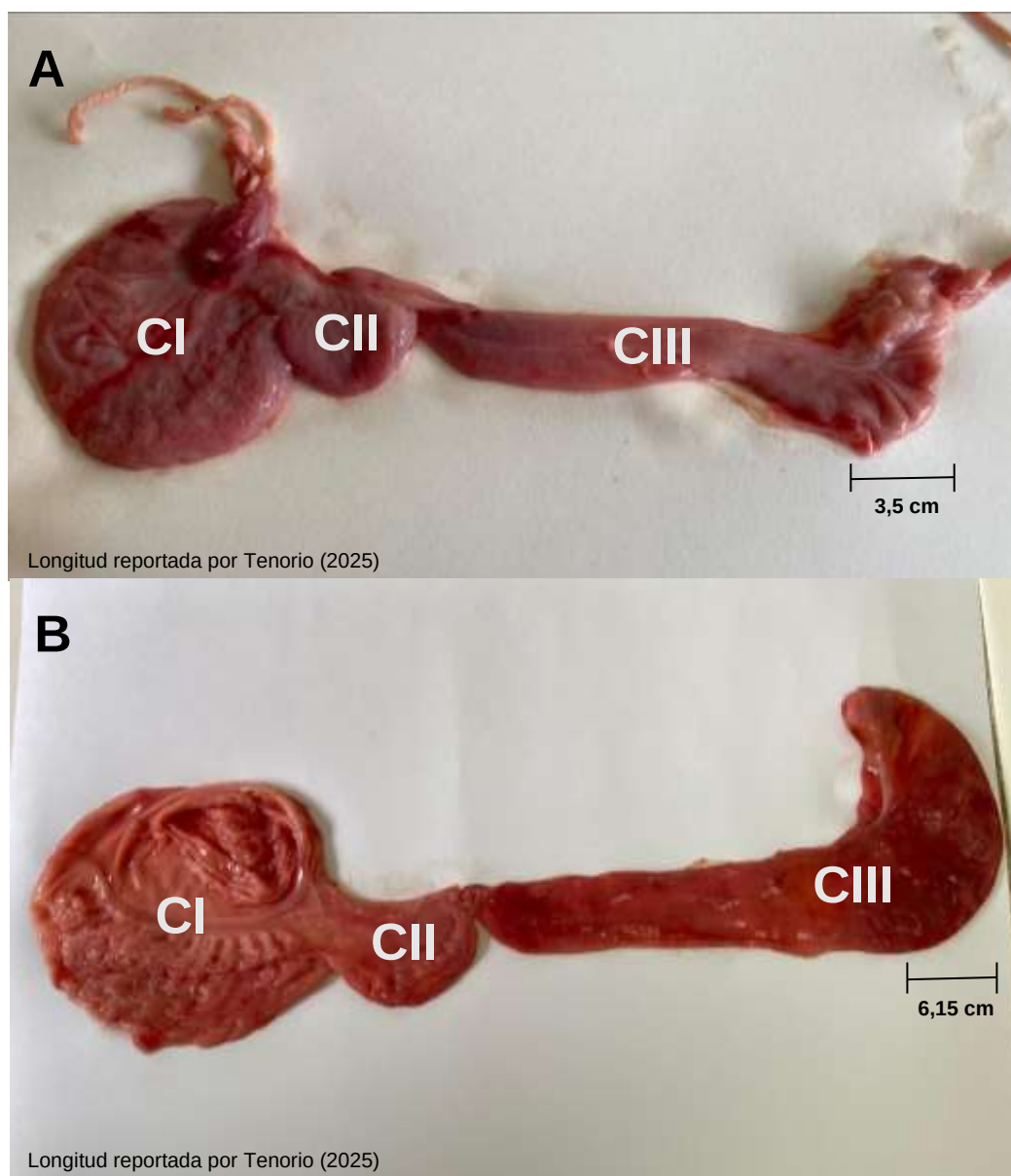
Anexo 5. Recolección de muestras del Camal Municipal de Huancavelica *post mortem*. Feto del último tercio de gestación de *Vicugna pacos* “alpaca”.



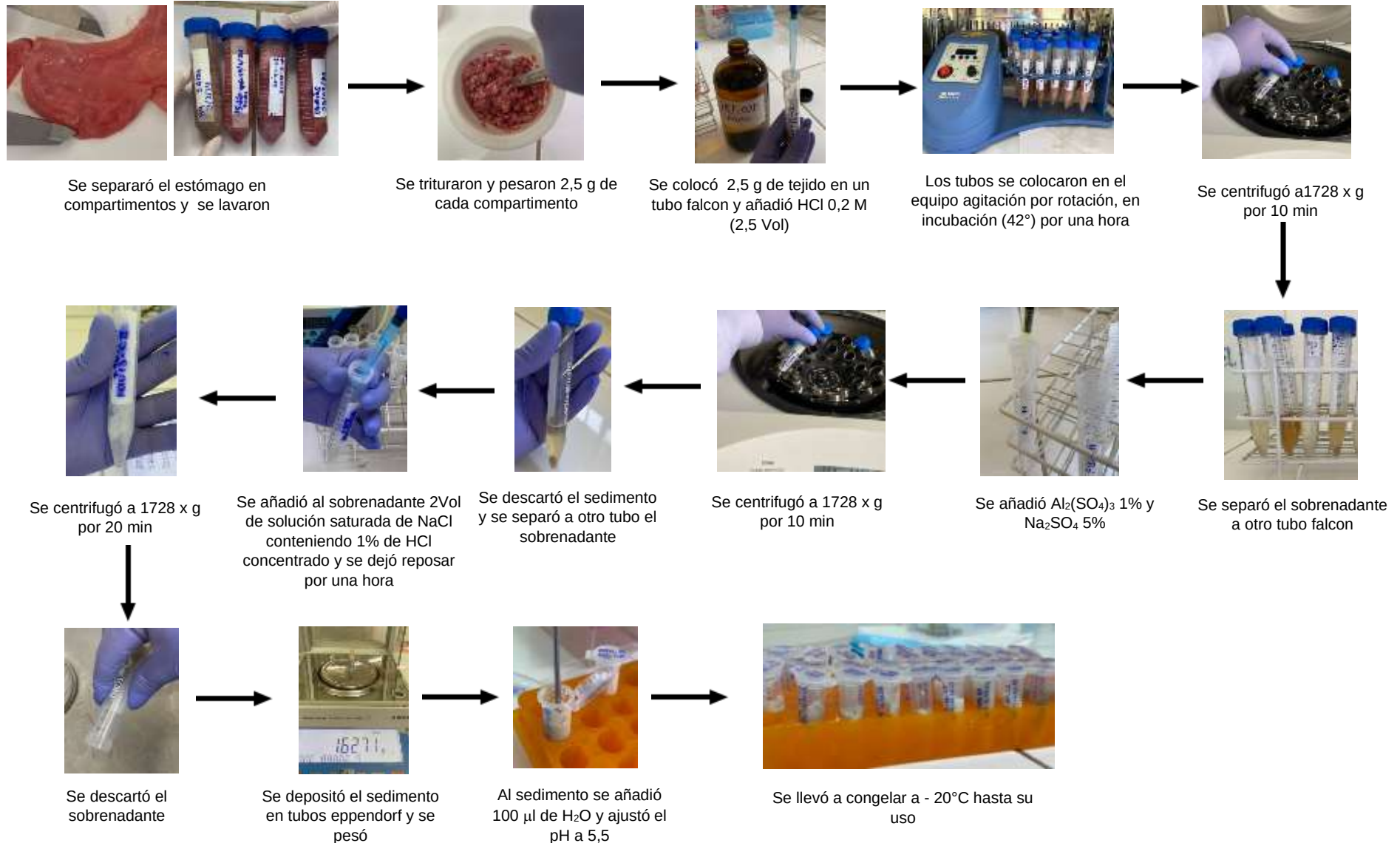
Anexo 6. Recolección de muestras del Centro Poblado de Choccoro (Chuschi, Ayacucho) *post mortem*. Cría lactante de *Vicugna pacos* “alpaca”



Anexo 7. Vista completa del estómago de fetos de *Vicugna pacos* “alpaca”, con longitud total de 21 cm (A) y crías lactantes de *Vicugna pacos* “alpaca”, con longitud total de 36,9 cm (B), se muestran los tres compartimentos CI, CII y CIII.



Anexo 8. Flujograma de la obtención del Extracto Proteico Total (EPT) de tejido gástrico de fetos y crías lactantes de *Vicugna pacos* “alpaca”.



Anexo 9. Flujoograma del método Bradford para la cuantificación de proteínas en los compartimentos estomacales de fetos y crías de *Vicugna pacos* “alpaca”.



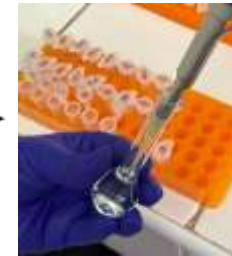
Se realizó una dilución 1:800 de la muestra



Se preparó BSA para realizar la curva de calibración



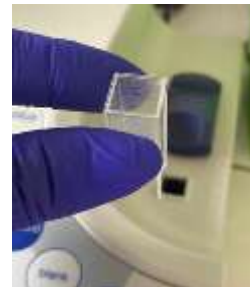
Se preparó el reactivo Bradford con una dilución 1:3,5



En tubos Eppendorf rotulados se añadió 100 μ l de cada concentración de BSA (2,4,8, 10, 12, 16, 18 y 20 μ g de BSA/ml) mas el reactivo Bradford diluido y se dejó reaccionar



Para las muestras, en tubos Eppendorf rotulados se añadió 100 μ l de muestra diluida y 100 μ l del reactivo Bradford y se dejó reaccionar por 10 min



Se llevó a leer al Espectrofotómetro a 595 nm y anotar las absorbancias, tanto de la curva y las muestras para realizar una ecuación lineal y calcular la concentración de proteínas totales



Tras dejar reaccionar se forma una coloración azul

Anexo 10. Cálculo del volumen de muestra necesario para cargar 30 µg de proteína para electroforesis SDS-PAGE

CRÍA	MUESTRA	CONCENTRACIÓN INICIAL (µg/ml) (Xi)	CONCENTRACIÓN INICIAL (µg/µl) (Yi)	Vol. Muestra (µl) (a)	Vol. Buffer de carga 1x (µl) (b)	Volumen final (µl) (c)	CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA (µg/µl) Ci	Cantidad de proteína final (µg) (d)	Volumen a cargar (µl) Vi
Cría 01	C1C1	6,587	5,270	30	60	90	1,7565	30	17,1
	C1C2	9,344	7,475	30	60	90	2,4917	30	12,0
	C1C3	21,711	17,369	30	60	90	5,7896	30	5,2
Cría 02	C2C1	7,234	5,787	30	60	90	1,9291	30	15,6
	C2C2	6,915	5,532	30	60	90	1,8440	30	16,3
	C2C3	11,560	9,248	30	60	90	3,0827	30	9,7
Cría 03	C3C1	4,246	3,397	30	60	90	1,1324	30	26,5
	C3C2	9,628	7,702	30	60	90	2,5674	30	11,7
	C3C3	13,670	10,936	30	60	90	3,6454	30	8,2

Las fórmulas utilizadas fueron:

Concentración inicial de proteína en mg/ml

$$Yi = \frac{(Xi \times 800)}{1000}$$

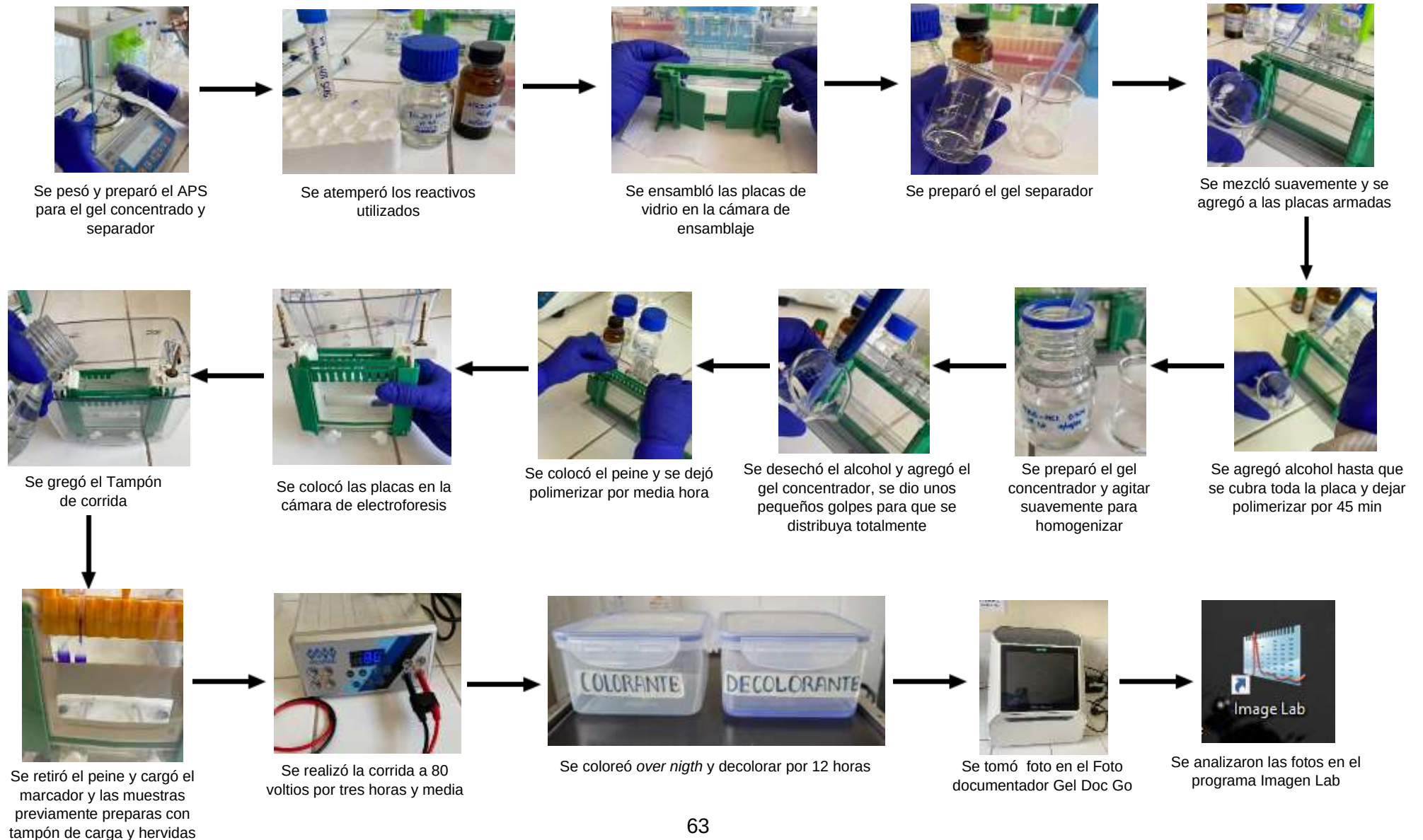
Concentración de proteína con buffer de cargar 1x en mg/ml

$$Ci = \frac{(Yi \times a)}{c}$$

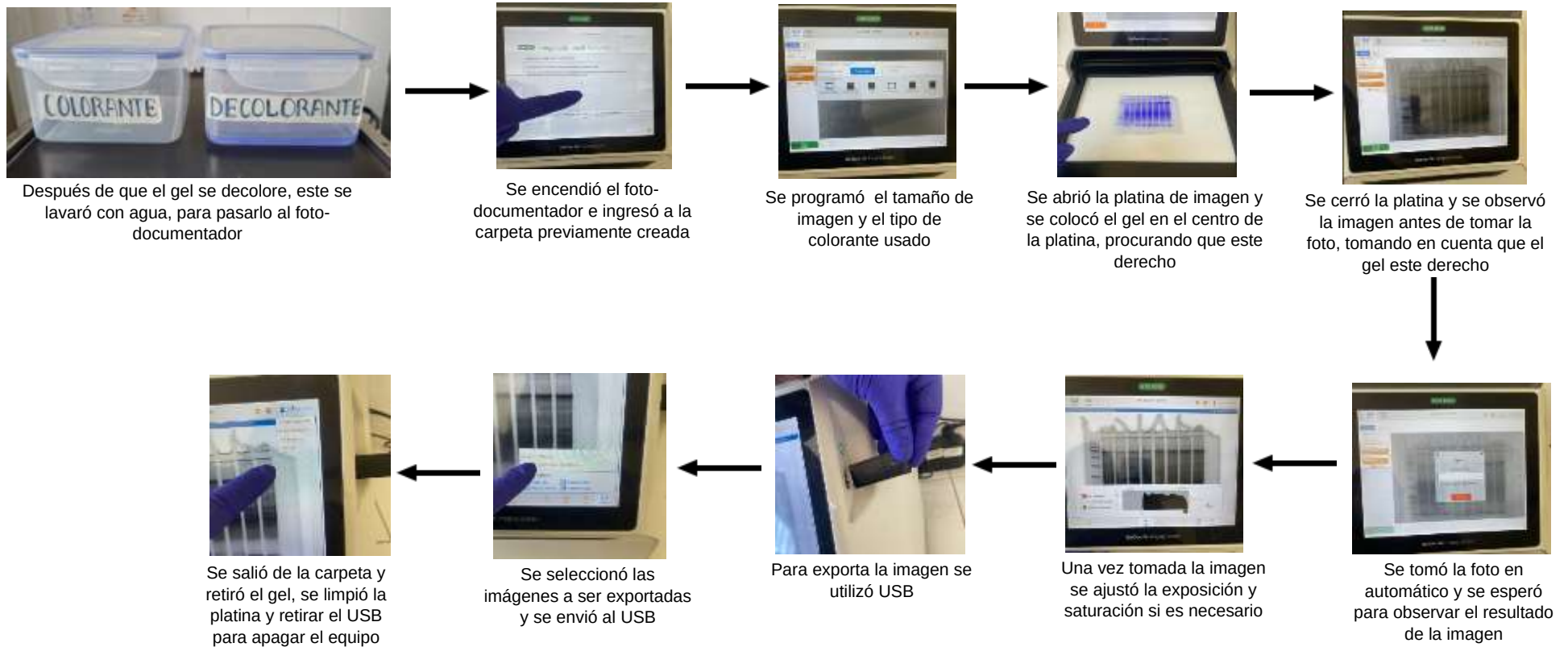
Volumen a cargar para 30 mg de proteína

$$Vi = \frac{d}{Ci}$$

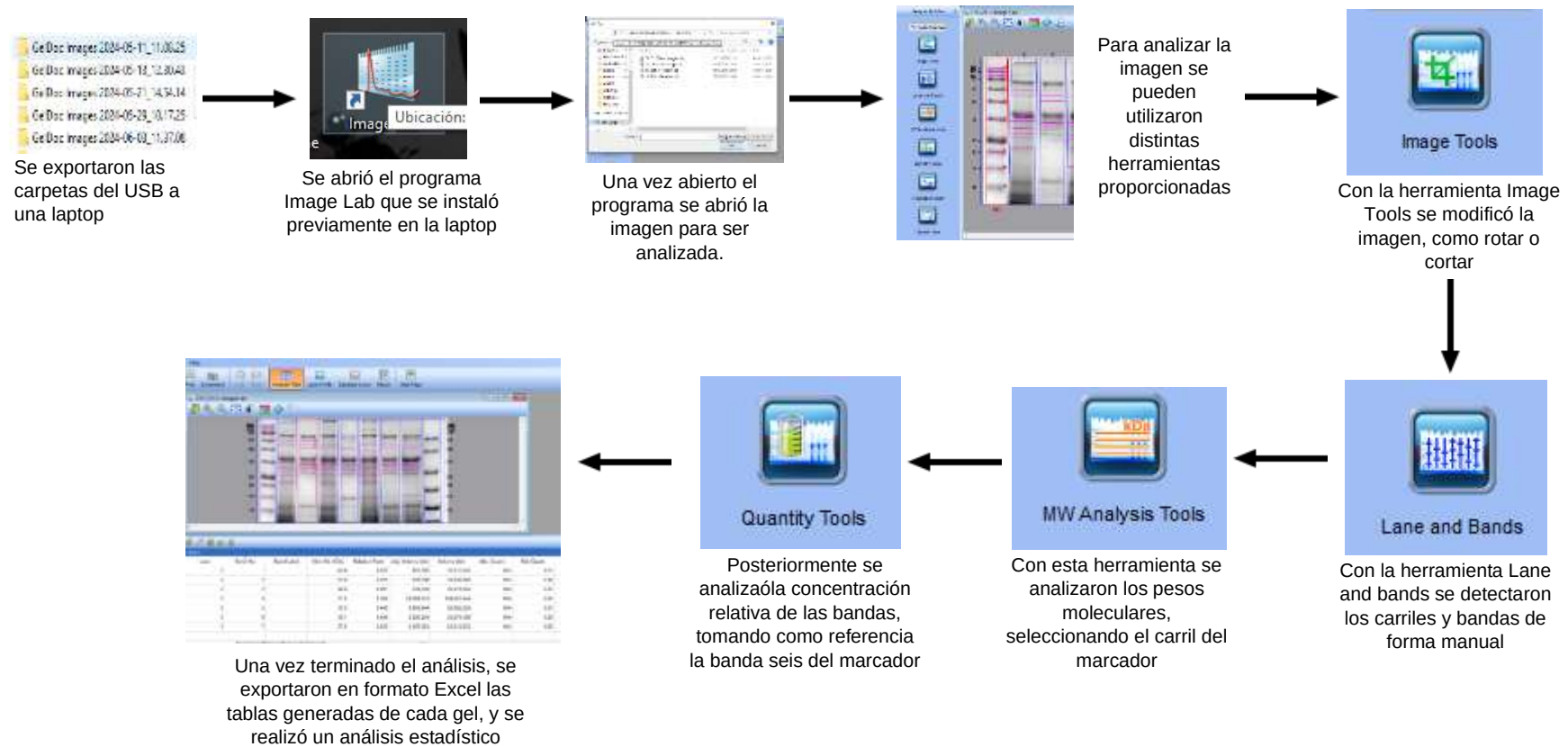
Anexo 11. Flujograma de la Electroforesis SDS-PAGE para obtener perfiles electroforéticos de fetos y crías lactantes de *Vicugna pacos* “alpaca”



Anexo 12. Flujograma de la fotodocumentación de los geles obtenidos por electroforesis SDS-PAGE.



Anexo 13. Flujograma del análisis de imágenes tomadas con el fotodocumentador GelDoc Go (Bio-Rad) y procesadas con el programa Image Lab (Bio-Rad).



Anexo 14. Matriz de consistencia

TÍTULO: Perfil electroforético del extracto proteico total obtenido de tejido gástrico de fetos y crías de *Vicugna pacos* “alpaca”.

Autor: Jaqueline Susan Huaman Perez

PROBLEMA	OBJETIVOS	MARCO TEORICO	HIPOTESIS	VARIABLES E INDICADORES	METODOLOGIA
¿Cómo varían las características moleculares del Extracto Proteico Total del tejido gástrico de fetos y crías lactantes de “alpaca” <i>Vicugna pacos</i> ?	Objetivo general Caracterizar molecularmente el Extracto Proteico Total (EPT) obtenido de tejido gástrico de los compartimentos CI, CII y CIII del estómago de fetos y crías de <i>Vicugna pacos</i> “alpaca”. Objetivos específicos - Obtener el Extracto Proteico Total (EPT), a partir de tejido gástrico. - Determinar el perfil electroforético SDS-PAGE del EPT. - Establecer y comparar el patrón de bandas de proteínas del EPT en los compartimentos. - Estimar la variación y proporción de quimosina/pepsina en el EPT de los tres compartimentos.	2.2.1 Anatomía y fisiología digestiva de la alpaca 2.2.2 Cuajos animales 2.2.3 Proteínas de la leche 2.2.4 Enzimas coagulantes 2.2.5 Variación de la proporción quimosina/pepsina 2.2.6 Coagulación de la leche 2.2.7 Extracción y purificación de proteínas 2.2.8 Electroforesis SDS-PAGE 2.2.9 Foto documentación, densitometría y análisis de imágenes.	Las características moleculares de la quimosina y pepsina del extracto enzimático crudo de tejido gástrico de fetos y crías lactantes son variables.	Variable Fetos Indicadores - Edad gestacional - Morfometría del estómago - Extracto Proteico Total (EPT) Variable Crías Lactantes Indicadores - Morfología craneal. - Cantidad de dientes Variable Perfil electroforético SDS-PAGE Indicadores - Número de bandas - Concentración relativa - Peso molecular - Proporción quimosina/pepsina	1.Tipo de investigación Básica 2.Nivel de investigación Explicativo 3.Método Descriptivo 4.Diseño Correlacional 5.Tipo de muestreo Aleatorio 6.Muestreo Por conveniencia 6.1Población Alpacas gestantes faenadas en el matadero municipal de Huancavelica, crías lactantes muertas por el friaje 6.2Muestra 53 muestras de estómagos de alpaca - (22 fetales, 31 crías lactantes) 7.Técnicas - Colecta de estómagos. - Obtención de EPT. - Determinación de proteínas - Electroforesis SDS-PAGE

**UNSCH**FACULTAD DE
CIENCIAS BIOLÓGICAS**ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS****Bach. Jaqueline Susan HUAMAN PEREZ****RESOLUCIÓN DECANAL N° 340-2025-UNSCH-FCB-D**

En la ciudad de Ayacucho, siendo las cuatro de la tarde del día martes dieciséis de setiembre del año dos mil veinticinco; 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 el Dr. Saturnino Martín Tenorio Bautista, el Dr. Pedro Ayala Gómez (miembro – jurado), el Dr. Raúl Antonio Mamani Aycachi (miembro – jurado), el Mg. Reynán Condor Alarcón (miembro – jurado), el Dr. Fidel Rodolfo Mujica Lengua (miembro – asesor) y el Mg. Luis Uriel Moscoso García actuando como secretario docente, para presenciar la sustentación de tesis titulada: perfil electroforético del extracto proteico total obtenido de tejido gástrico de fetos y crías de *Vicugna pacos* “alpaca” presentado por la **Bach. Jaqueline Susan HUAMAN PEREZ**; 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 en 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 correspondientes; cuyos resultados son los que se consignan a continuación:

Miembros del Jurado Evaluador	Exposición	Respuesta/preguntas	Promedio
Dr. Pedro Ayala Gómez	18	17	18
Dr. Raúl Antonio Mamani Aycachi	18	17	18
Mg. Reynán Condor Alarcón	18	18	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 seis con treinta minutos; firmando al pie del presente en señal de conformidad.

Dr. Saturnino Martín Tenorio Bautista
Presidente

Dr. Pedro Ayala Gómez
Miembro - jurado

Dr. Raúl Antonio Mamani Aycachi
Miembro – jurado

Dr. Fidel Rodolfo Mujica Lengua
Miembro – asesor

Mg. Reynán Condor Alarcón
Miembro – jurado

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 062-2025-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: **Perfil electroforético del extracto proteico total obtenido de tejido gástrico de fetos y crías de *Vicugna pacos* "alpaca"**, por JAQUELINE SUSAN HUAMAN PEREZ; he constatado por medio del uso de la herramienta TURNITIN, procesado CON DEPÓSITO, una similitud de 11%, 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, 11 de noviembre del 2025.



UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL DE HUAMANGA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA

Dr. Fidel R. Mujica Lengua
DIRECTOR

Perfil electroforético del extracto proteico total obtenido de tejido gástrico de fetos y crías de Vicugna pacos “alpaca”

por Jaqueline Susan HUAMAN PEREZ

Fecha de entrega: 07-nov-2025 09:01p. m. (UTC-0500)

Identificador de la entrega: 2807256629

Nombre del archivo: 4A_HUAMAN_PEREZ-Jaqueline_Susan-pregrado-2025_TURNITIN.pdf (906.36K)

Total de palabras: 13211

Total de caracteres: 68199

Perfil electroforético del extracto proteico total obtenido de tejido gástrico de fetos y crías de Vicugna pacos "alpaca"

INFORME DE ORIGINALIDAD

11%	6%	1%	6%
INDICE DE SIMILITUD	FUENTES DE INTERNET	PUBLICACIONES	TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	Submitted to Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga Trabajo del estudiante	5%
2	dspace.unach.edu.ec Fuente de Internet	1%
3	revistas.ces.edu.co Fuente de Internet	1%
4	cybertesis.uach.cl Fuente de Internet	1%
5	doku.pub Fuente de Internet	<1%
6	www.scilit.net Fuente de Internet	<1%
7	ww.visionveterinaria.com Fuente de Internet	<1%
8	eprints.ucm.es Fuente de Internet	<1%
9	bibdigital.epn.edu.ec Fuente de Internet	<1%
10	docplayer.es Fuente de Internet	<1%
11	hdl.handle.net Fuente de Internet	<1%
12	Jorge Zambrano N, Miguel Landines P. "Ingestión de lípidos oxidados: efecto sobre actividad enzimática antioxidativa en trucha arcoiris Oncorhynchus mykiss (Walbaum)", Revista MVZ Córdoba, 2011 Publicación	<1%

13	Submitted to Universidad Andrés Bello	<1 %
Trabajo del estudiante		

14	dgsa.uaeh.edu.mx:8080	<1 %
Fuente de Internet		

15	ebuah.uah.es	<1 %
Fuente de Internet		

16	livrosdeamor.com.br	<1 %
Fuente de Internet		

Excluir citas	Activo	Excluir coincidencias	< 30 words
Excluir bibliografía	Activo		