

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CAJAMARCA

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

**ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE INGENIERÍA EN
INDUSTRIAS ALIMENTARIAS**



**DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS PARA LA OBTENCIÓN Y
CONSERVACIÓN DE CUAJO BOVINO EN EL DISTRITO DE CAJAMARCA**

T E S I S

**PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE
INGENIERO EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS**

PRESENTADO POR LA BACHILLER:

MARÍA GRETTEL CELIS RAMOS

ASESOR:

Ing. M.Sc. JOSE GERARDO SALHUANA GRANADOS

CAJAMARCA- PERÚ

2019



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CAJAMARCA

Norte de la Universidad Peruana

Fundada por Ley 14015 del 13 de febrero de 1962

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

Secretaría Académica



ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

En Cajamarca a los **veintiséis** días del mes de **junio** del Año dos mil diecinueve, se reunieron en el ambiente 2H-204 de la Facultad de Ciencias Agrarias, los integrantes del Jurado designados por Consejo de Facultad de Ciencias Agrarias, según Resolución de Consejo de Facultad N° 214-2019-FCA-UNC, Fecha 12 de junio del 2019, con el objetivo de Evaluar la sustentación de la Tesis titulada: **“DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS PARA LA OBTENCIÓN Y CONSERVACIÓN DE CUAJO BOVINO EN EL DISTRITO DE CAJAMARCA”** para optar el Título Profesional de **INGENIERO EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS**, de la Bachiller: **CELIS RAMOS MARÍA GRETEL**.

A las once horas y cero minutos y de acuerdo a lo estipulado en el Reglamento respectivo, el Presidente del Jurado dio por iniciado el acto. Después de la exposición del trabajo de Tesis, la formulación de preguntas y de la deliberación del Jurado, el Presidente del Jurado anunció la aprobación por unanimidad con el calificativo de diecisiete (17). Por lo tanto, el graduando queda expedita para que se le expida el **Título Profesional** correspondiente.

A las **doce** horas y **veinte** minutos, el Presidente del Jurado dio por concluido el acto.

Cajamarca, 26 de junio del 2019.



Ing. M.Sc. Jorge Ricardo De la Torre Araujo
PRESIDENTE



M.Sc. Rodolfo Raúl Orejuela Chirinos
SECRETARIO



Ing. Fanny Rimarachín Chávez
VOCAL



M.Sc. José Gerardo Salhuana Granados
ASESOR

DEDICATORIA

Esta tesis la dedico en primer lugar a Dios por guiarme cada día por el buen camino, por darme la suficiente fuerza para seguir adelante y así no dejarme vencer ante las adversidades que se presentaban, enseñándome a enfrentar los problemas sin desfallecer en el intento.

A mi familia en especial a mis padres y hermanos por su apoyo, consejos, comprensión, su amor y por su ayuda en los momentos difíciles, por apoyarme con los recursos necesarios para estudiar y para tal investigación; me brindaron todo lo que soy, mis valores, mis principios, mi empeño, mi perseverancia y a mi coraje y valentía para seguir con mis objetivos día a día.

A mis profesores por su apoyo profesional para la elaboración de esta tesis, por su tiempo compartido y por impulsar el desarrollo de nuestra formación profesional.

AGRADECIMIENTO

A la facultad de Ciencias Agrarias especialmente a la Escuela Académico profesional de Ingeniería en Industrias Alimentarias de la Universidad Nacional de Cajamarca que gracias a sus maestros hicieron posible mi formación profesional.

A mi asesor ING.M.Sc. Jose Gerardo Salhuana Granados quien con su experiencia profesional me apoyo decididamente para el logro del presente trabajo

A mis hermanos Sughey Celis Ramos y Ever Celis Ramos por ser ejemplo de profesionales a seguir, por contar con su apoyo estando siempre pendientes de mí persona y del avance de dicho proyecto hasta lograr ser ingeniero en Industrias Alimentarias .

INDICE GENERAL

ABSTRACT	x
CAPITULO I.....	1
I. GENERALIDADES	1
1.1. Introducción	1
1.2. Problema de investigación.....	2
1.3. Formulación de problema	3
1.4. Hipótesis de la investigación	3
1.5. Objetivos de la investigación.....	4
a. Objetivo General.....	4
b. Objetivos específicos.....	4
CAPITULO II	5
II. REVISIÓN DE LITERARIA	5
2.1. Antecedentes de la investigación	5
2.2. Bases teóricas.....	8
2.2.1. Cuajo	8
2.2.1.1. Diferencias de cuajo y coagulante lácteo	9
2.2.1.2. Funciones del cuajo.....	9
2.2.1.3. Características del Cuajo.....	10
2.2.1.4. Cuajos de origen animal	10
2.2.2. Abomaso.....	11
2.2.2.1. Abomaso adulto.....	12
2.2.2.2. Componentes Enzimáticos del abomaso.....	12
2.2.2.2.1. Quimosina.....	13
2.2.2.2.3. Características de los componentes enzimáticos del Abomaso.....	16
2.2.2.2.3.1. Características Bioquímicas de la Quimosina bovina.....	16
2.2.2.2.3.2. Características Bioquímicas de la Pepsina bovina.	17
2.2.3. Obtención del cuajo líquido	18
2.2.4. Fuerza de cuajado.....	21
2.2.4.1. Fórmula de la fuerza de cuajo.....	21
2.2.5. Proteínas de la leche	22
2.2.6. Coagulación de la leche.....	22
2.2.6.1. Coagulación por acción enzimática.....	23
2.2.6.2. Factores que afectan la coagulación de la leche	24

a.	Temperatura enzimática de la leche	24
a.	pH	24
b.	Calcio de la leche	25
III.	MATERIALES Y MÉTODOS	26
3.1.	Ubicación geográfica del método de investigación.....	26
3.2.	Materiales	26
3.2.1.	Material experimental.....	26
a.	Materia prima.....	26
b.	Insumos.....	26
c.	Reactivos.....	27
3.2.2.	Material y equipo de laboratorio.....	27
a.	Materiales en general	27
b.	Equipos	28
3.3.	Metodología	29
3.3.1.	Trabajo de campo	29
3.3.2.	Trabajo de laboratorio.....	29
3.3.2.1.	Proceso de obtención y conservación de cuajo líquido.....	29
3.3.2.1.1.	Análisis de la materia prima.....	29
3.3.2.1.2.	Evaluación de humedad del abomaso.....	30
a.	Humedad del abomaso seco.....	30
b.	Materia seca del abomaso.....	30
3.3.2.1.3.	Evaluación microbiológica al abomaso seco.....	30
3.3.2.2.	Análisis preliminar para determinar la concentración ideal de ácido clorhídrico (pH) en la extracción de enzimas coagulantes.	34
3.3.2.3.	Parámetros de obtención y conservación de cuajo líquido.....	35
3.3.2.3.1.	Analizar el porcentaje NaCl (sal) a concentraciones de 3% y 5% en la extracción de la solución enzimática y evaluar la fuerza de coagulación.....	35
3.3.2.3.2.	pH de Activación de la solución enzimática a pH de 5,6 ; 5,8 y evaluar la fuerza de coagulación	36
3.3.2.4.	Análisis fisicoquímico y microbiológico de la solución enzimática obtenida con mayor fuerza de coagulación (Cuajo líquido).....	37
3.4.	Diseño experimental y estadístico	38
3.4.1.	Factores de estudio.....	38
3.4.2.	Evaluación Estadística.	39
3.4.2.1.	Análisis de varianza	39

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	40
4.1. Obtención y conservación de cuajo líquido	40
4.1.1. Análisis de la materia prima	40
4.1.1.2. Análisis microbiológico del abomaso seco.	42
4.1.2. Análisis preliminar para determinar el pH ideal de solución de ácido clorhídrico en la extracción de enzimas coagulantes.	43
4.2. Parámetros de obtención y conservación de cuajo líquido	45
4.2.1. Porcentaje de cloruro de sodio (NaCl al 3% y 5 %) en la extracción de la solución enzimática y evaluar la fuerza de coagulación.....	45
4.2.2. PH de activación de la solución enzimática a pH 5,6 y 5,8 y evaluar la fuerza de coagulación.....	47
4.3. Análisis fisicoquímico y microbiológico de la solución enzimática (cuajo líquido) obtenida y conservada con mayor fuerza de coagulación..	54
Se realizó un análisis fisicoquímico y microbiológico a la solución enzimática obtenido la cual se describen a continuación:	54
4.3.1. Resultado de análisis fisicoquímico de la solución enzimática obtenida y conservada.....	54
4.3.2. Resultados de análisis microbiológicos del cuajo liquido de bovino Solución enzimática preparada (adicionando HCl, NaCl, conservante (Benzoato de Sodio)	55
4.4. Resultados del diseño experimental y estadístico	57
V. CONCLUSIONES.....	60
VI. RECOMENDACIONES	61
CAPITULO VI.....	62
VII. REFERENCIA BIBLIOGRAFICA	62
VIII. ANEXOS GENERALES	66
Fotos de materiales y procesos en la elaboracion de cuajo liquido.....	68
Rendimiento y costos de la solución enzimática:	77
Presupuesto	78

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
TABLA 1:COMPONENTES ENZIMÁTICOS DE ABOMASOS DE BOVINO, OVINO Y CAPRINO	13
TABLA 2: CARACTERÍSTICAS OPTIMAS DE LA QUIMOSINA Y PEPSINA	16
TABLA 3:REPRESENTACIÓN SIMBÓLICA DEL DISEÑO EXPERIMENTAL COMPLETAMENTE AL AZAR.....	38
TABLA 4: ANÁLISIS DE VARIANZA DEL DISEÑO COMPLETAMENTE AL AZAR	39
TABLA 5. HUMEDAD Y MATERIA SECA DEL ABOMASO SECO.....	40
TABLA 6. EVALUACIÓN MICROBIOLÓGICA DEL ABOMASO SECO.	42
TABLA 7. NORMA SANITARIA QUE ESTABLECE LOS CRITERIOS MICROBIOLÓGICOS DE CALIDAD SANITARIA E INOCUIDAD PARA VÍSCERAS DE BOVINO	42
TABLA 8: FUERZA DE COAGULACIÓN DE LA SOLUCIÓN ENZIMÁTICA PRELIMINAR	43
TABLA 9: FUERZA DE COAGULACIÓN DE LAS ENZIMÁTICAS EXTRAÍDAS A 3 Y 5 % DE SAL.....	45
TABLA 10: FUERZA DE COAGULACIÓN EN LA SOLUCIÓN ENZIMÁTICA ACTIVADA.....	47
TABLA 11: FUERZA DE COAGULACIÓN DE SOLUCIÓN ENZIMÁTICA DURANTE UN MES DE ALMACENAMIENTO	50
TABLA 12. ANÁLISIS FISCOQUÍMICO DE LA SOLUCIÓN ENZIMÁTICA OBTENIDA Y CONSERVADA	54
TABLA 13. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE CUAJO LÍQUIDO OBTENIDO Y CONSERVADO.....	55
TABLA 14: ANÁLISIS DE VARIANZA DEL FACTORIAL 2A X 2B X 2C	57
TABLA 15. FUERZA DE COAGULACIÓN DE LOS TRATAMIENTOS	58
TABLA 16: PROMEDIO DE LA FUERZA DE COAGULACIÓN EN TRATAMIENTOS	59
TABLA 17. DIFERENCIA SIGNIFICATIVA ENTRE LOS TRATAMIENTOS	59
TABLA 18. TABLAS DEL NÚMERO MÁS PROBABLE (NMP).....	66
TABLA 19: RENDIMIENTO Y COSTOS PARA LA OBTENCIÓN DE 400ML DE SOLUCIÓN ENZIMÁTICA.....	77

TABLA 20. PRESUPUESTO DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN.....	78
---	----

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
FIGURA 1: BENEFICIO DE BOVINO Y OVINO EN EL CAMAL MUNICIPAL DE CAJAMARCA ..	6
FIGURA 2: ABOMASO	11
FIGURA 3: PUNTO DE ACCIÓN DE LA QUIMOSINA KAPPA-CASEÍNA FOX Y MCSWEENEY (1998).....	15
FIGURA 4: PH DE ACTIVACIÓN DE LA SOLUCIÓN ENZIMÁTICA	49
FIGURA 5: EFECTO DE LA FUERZA DE COAGULACIÓN DE LA SOLUCIÓN ENZIMÁTICA DURANTE SU ALMACENAMIENTO	51
FIGURA 6. PROCESO DE OBTENCIÓN Y CONSERVACIÓN DE CUAJO LÍQUIDO O SOLUCIÓN ENZIMÁTICA	52
FIGURA 7: MATERIAL DE LABORATORIO (VASOS ERLLENMEYER, MATRAZ, PIPETA Y PROBETA)	68
FIGURA 8: MATERIAL MICROBIOLÓGICO.....	68
FIGURA 9: PAPEL FILTRO N° 42	68
FIGURA 10: PH METRO Y SOLUCIÓN DE HCL A PH 2.0	69
FIGURA 11: BALANZA DE PRECISIÓN	69
FIGURA 12: ÁCIDO CLORHÍDRICO CONCENTRADO 37%	69
FIGURA 13: INSUMOS (CLORURO DE SODIO, BENZOATO DE SODIO).....	70
FIGURA 14: ESTERILIZACIÓN DEL MATERIAL.....	70
FIGURA 15: ABOMASO.....	70

RESUMEN

El presente trabajo de investigación se realizó en el Distrito de Cajamarca en la Universidad Nacional de Cajamarca con el objetivo de determinar los parámetros de obtención y conservación de cuajo bovino en el Distrito de Cajamarca. Para la obtención del cuajo, se trabajó con abomaso seco de bovinos adultos de 2,0 años de edad de raza criolla. El abomaso seco se cortó en cuadrados de 1 cm², luego se procedió a la extracción de la enzima con solución ácido clorhídrico a pH 2,0 a través de una prueba previamente establecida; luego se adicionó cloruro de sodio al 3% y 5%(p/v), como conservante se adicionó benzoato de sodio al 0,1%; la extracción se hizo por 18 horas a temperatura de 14°C; seguidamente se filtró y se obtuvo la solución enzimática. Luego la solución obtenida se activó a pH 5,6 y 5,8 con fosfato di potásico. Posteriormente se filtró con papel (WHANTAN N° 42) la solución enzimática obteniéndose cuajo líquido con una fuerza de 371,00; seguidamente se envasó en frascos de vidrio ámbar y se almacenó por un mes a temperaturas de 7°C y -7°C. Y finalmente se realizó un análisis microbiológico presentando Ausencia en *Salmonella*, *Clostridium sp*, *Aerobios Mesofilos*, *E. Coli*, y con 10¹ UFC/g de *S. aureus*, cumpliendo con la Norma Sanitaria que establece los criterios microbiológicos de calidad sanitaria e inocuidad para vísceras de bovino y cuajos. Para evaluar los tratamientos se aplicó un diseño completamente al azar con arreglo factorial de 2x2x2, el cual constó de 8 tratamientos y tres repeticiones. Los tratamientos óptimos se eligieron en base a la fuerza de coagulación que tuvo el cuajo líquido, siendo el tratamiento N°1(S₁pH₁T₁) a concentración de sal al 3%, pH 5,6 y a T° de 7°C siendo el óptimo para la obtención y conservación del cuajo de bovino.

ABSTRACT

The present research work was carried out in the District of Cajamarca in the National University of Cajamarca with the objective of determining the parameters of obtaining and preserving bovine rennet in the District of Cajamarca. To obtain the rennet, we worked with dry abomasum of bovine adults of 2.0 years of Creole breed. The dried abomasum was cut into squares of 1 cm², then the enzyme was extracted with hydrochloric acid solution at pH 2.0 through a previously established test; then 3% and 5% (w / v) sodium chloride was added, 0.1% sodium benzoate was added as a preservative; the extraction was done for 18 hours at a temperature of 14 ° C; Then, the enzyme solution was filtered and obtained. Then the solution obtained was activated at pH 5.6 and 5.8 with potassium dihydrogen phosphate. Subsequently, the enzyme solution was filtered with paper (WHANTAN N ° 42) obtaining liquid rennet with a strength of 371.00; then it was packed in amber glass jars and stored for a month at temperatures of 7°C and -7°C. And finally a microbiological analysis was carried out, showing Absence in Salmonella, Clostridium sp, Mesophilic Aerobios, E. Coli, and with 10¹ CFU / g of S. aureus, complying with the Sanitary Standard that establishes the microbiological criteria of sanitary quality and safety for viscera of bovine and rennet. To evaluate the treatments, a completely randomized design with a 2x2x2 factorial arrangement was applied, which consisted of 8 treatments and three repetitions. The optimal treatments were chosen based on the coagulation force of the liquid rennet, with treatment No. 1 (S1pH1T1) at 3% salt concentration, pH 5.6, and T ° of 7 ° C being the optimum for the obtaining and conservation of bovine rennet.

CAPITULO I

I. GENERALIDADES

1.1. Introducción

En casi todas las comunidades campesinas de la sierra del Perú, la ganadería constituye la actividad principal después de la agricultura; los comuneros son especialmente criadores de ganado vacuno, ovino, caprino y en menor proporción de porcino. En consecuencia es muy común ver en ellas, la elaboración del queso a partir de la leche de vaca en mayor proporción a comparación de los otros animales mencionados, generalmente la elaboración del queso es utilizado para el autoconsumo y venta teniendo en cuenta que la industria quesera, así como un pequeño grupo de queseros artesanales utilizan el cuajo en polvo o pastilla, que proceden principalmente de Dinamarca, Estados Unidos, Alemania federal y Japón entre otros, en la actualidad; además no existen datos estadísticos acerca de la producción de cuajo líquido elaborado a nivel artesanal muy usado por la mayor parte de los comuneros. En las comunidades campesinas no se comercializa el cuajo líquido como tal, pero se observa que los comuneros propietarios de rebaño de ganado bovino de regular tamaño, acondicionan y desecan los abomasos y elaboran sus propios cuajos líquidos de acuerdo a las costumbres del lugar donde viven (Córdova 2009).

Según indica Pérez (2011) el máximo responsable de la fabricación de queso, es sin duda alguna el cuajo, sustancia que provoca que la leche “cuaje” y se produzca la separación de las proteínas de la leche fundamentalmente la caseína y resto de componentes sólidos del suero de la misma (lacto suero, agua y azúcares) y es elaborado en forma artesanal por el propio quesero; utilizando procedimientos empíricos, obteniéndose un producto con materiales extraños y sin parámetros establecidos con variable fuerza de coagulación; los cuales no tienen durabilidad y mucho menos calidad higiénica ; esto conlleva a que

muchos pequeños productores de quesos pierdan o desechen los cuajos que preparan por falta de información y esto se puede evitar brindando capacitaciones.

La importancia sería que la elaboración artesanal de cuajo, debe seguir las normas de calidad estandarizadas; por lo tanto el presente trabajo busca establecer parámetros de proceso en la obtención y conservación de cuajo bovino. Frente a esto se plantea el objetivo principal para la presente investigación es. Determinar los parámetros de obtención y conservación de cuajo bovino en el Distrito de Cajamarca.

1.2. Problema de investigación

Los cuajos son preparados artesanalmente por los mismos queseros y las recetas varían según su localidad. Estas pueden ser en forma de pasta, extractos líquidos o cuajar seco. Los procedimientos de obtención suelen ser laboriosos y largos. Estos cuajos por lo general presentan altos índices de contaminación microbiológica; su fuerza coagulante no es estandarizada de lote a lote, ya que de esta no se tiene una concentración exacta y se va dando un estimado a prueba y error los primeros días con cada lote, debido a los procedimientos de conservación pueden presentar una variación de la composición enzimática manifestando una pérdida de actividad enzimática (Call Martínez, G. M. 2015).

El cuajo líquido es preparado de forma artesanal por el propio quesero, este es elaborado utilizando procedimientos empíricos sin tener en cuenta sus parámetros óptimos de dicho cuajo obteniéndose un producto generalmente con diferentes fuerzas de coagulación y con algunas contaminaciones perjudiciales para la cuajada la cual no garantiza durabilidad y mucho menos calidad y salubridad; esto conlleva a que muchos pequeños productores de quesos pierdan o desechen los cuajos que preparan o en todo caso lo

reemplazan por cuajos comerciales ya que estos están estandarizados tanto en el tiempo de cuajado, cantidad de cuajo a utilizar y fuerza de coagulación (Córdova 2009).

Espinoza y Vial (2003), mencionan que no existe patrón alguno en las técnicas de elaboración aplicadas por los ganaderos. Así es como el proceso de coagulación tiene importantes variaciones de un productor a otro, partiendo de la obtención e incorporación del cuajo. Algunos agregan un raspado del interior del cuajar directamente a la leche; otros llenan los cuajares con leche y posteriormente agregan parte del coágulo producido a la leche que se desea coagular; y hay quienes trozan el cuajar luego lo maceran en agua, después agregan el líquido obtenido a la leche para ser coagulada. Es así como existen variaciones en las cantidades de cuajo que se agrega, lo que determina, en parte, que los tiempos y la fuerza de coagulación sean muy variables.

Lo expuesto en los párrafos anteriores nos conlleva a realizar la determinación de parámetros de obtención y conservación de cuajo de bovino en la provincia de Cajamarca con el fin de que la población mayormente los productores de queso obtengan esta información sobre los parámetros de obtención de cuajos líquidos y la fuerza de coagulación de los mismos.

1.3. Formulación de problema

¿Cuáles son los parámetros de obtención y conservación de cuajo de bovino en el Distrito de Cajamarca?

1.4. Hipótesis de la investigación

Los parámetros de obtención y conservación de cuajo bovino en el Distrito de Cajamarca tienen una buena fuerza de coagulación enzimática.

1.5. Objetivos de la investigación

a. Objetivo General

- Determinar los parámetros de obtención y conservación de cuajo bovino en el Distrito de Cajamarca.

b. Objetivos específicos

- Obtener la solución enzimática con solución de ácido clorhídrico y con parámetros de extracción, pH en activación y temperatura de conservación de cuajo bovino en el Distrito de Cajamarca.
- Evaluar la fuerza de cuajo que tiene la solución enzimática (cuajo bovino) en el Distrito de Cajamarca.
- Evaluar de manera fisicoquímica y microbiológica la solución con mayor fuerza de coagulación enzimática obtenida y conservada en el Distrito de Cajamarca.
- Evaluar la humedad y materia seca del abomaso seco para la obtención y conservación de solución enzimática en el Distrito de Cajamarca.

CAPITULO II

II. REVISIÓN DE LITERARIA

2.1. Antecedentes de la investigación

En el Distrito de Cajamarca se cuenta con un único camal o centro de beneficio activo que es el camal municipal, el mismo que cuenta con una infraestructura muy básica para dicho fin y no mantiene un frigorífico. Este camal tiene más de 82 años de antigüedad y hasta un año aproximadamente no cumplía con los requisitos exigidos por el SENASA, pero ahora ha remodelado y acondicionado sus áreas de trabajo habiendo implementado, rieles, carritos para transporte de animales, entre otros. Está ubicado en la misma ciudad de Cajamarca y se proyecta con alta peligrosidad de contaminación para la población en la medida que está dentro de la zona urbana, además sus afluentes van directamente al río, su capacidad para beneficio diario es de 30 reses, 300 carneros y 200 porcinos, sin embargo en la actualidad su capacidad de trabajo diario es de 30 reses y 40 carneros y 25 chanchos, la razón de esto radica en la aparición de centros de beneficio clandestinos (Technoserve, 2004).

Según las estadísticas registradas en el camal los días lunes y miércoles hay mayor beneficio de bovinos debido a que los días lunes son traídos desde la pecuaria Iscoconga y gran cantidad de bovino adulto el cual permite obtener con facilidad los abomasos, si bien se sabe de acuerdo a la cantidad de bovinos beneficiados por día genera la cantidad de abomasos que serán utilizados para la elaboración de cuajo líquido, en la tabla siguiente se describe la cantidad de bovinos beneficiados por mes de los últimos años hasta la actualidad, esta información brinda el administrador del camal Hugo Góngora Sánchez.

MUNICIPALIDAD PROVINCIAL DE CAJAMARCA
GERENCIA DE DESARROLLO ECONÓMICO

SUBGERENCIA DE FISCALIZACIÓN CONTROL Y POLICIA MUNICIPAL
CAMAL MUNICIPAL

"AÑO DEL DIALOGO Y LA RECONCILIACIÓN NACIONAL"

BENEFICIO DE ANIMALES

AÑO	ESPECIE	ENERO	FEBRERO	MARZO	ABRIL	MAYO	JUNIO	JULIO	AGOSTO	SETIEMBRE	OCTUBRE	NOVIEMBRE	DICIEMBRE
2016	VACUNO	923	915	896	912	985	894	984	956	924	920	895	965
	OVINO	1342	1275	1189	1386	1426	1384	1290	1478	1356	1458	1390	1386
2017	VACUNO	894	924	826	985	927	935	898	912	896	958	892	944
	OVINO	1428	1382	1396	1290	1386	1280	1349	1480	1386	1429	1329	1365
2018	VACUNO	924	835	954	945	898	929	950	936	928			
	OVINO	1322	1428	1328	1298	1378	1438	1430	1372	120			

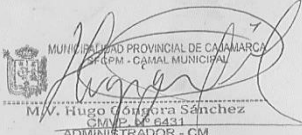

 MUNICIPIO PROVINCIAL DE CAJAMARCA
 GERENCIA DE DESARROLLO ECONÓMICO - CAMAL MUNICIPAL
 M.V. Hugo Córdova Sánchez
 CMMP. M. 6431
 ADMINISTRADOR - CM

Figura 1: Beneficio de bovino y ovino en el camal Municipal de Cajamarca

Según Córdova (2009) la investigación se realizó con el fin de determinar los parámetros de producción y conservación del cuajo. El abomaso seco se cortó y se procedió a la extracción de la enzima con ácido clorhídrico 3 mM, pH 2,5. Se activó la solución de enzima y se filtró para producir el cuajo líquido con 1: 607,59 fuerza ($\pm 1,58$) Unidades Soxhlet. El cuajo líquido se llenó en botellas de polietileno blanco lechoso de baja densidad y se almacenó durante un mes a 4 ° C, -7 ° C y -198 ° C, para su posterior evaluación. La resistencia del cuajo líquido en almacenamiento a 4 ° C no dio buenos resultados, debido a la pérdida del 38,47% de fuerza. El cuajo líquido almacenado a una temperatura de -7 ° C, generó una pérdida de potencia del 30,94%, siendo la resistencia basal de 1: 419,58 ($\pm 1,47$) en EE. UU. (Unidades Soxhlet)

Del mismo modo Rivera (2012) evaluó diferentes cuajos naturales y procesados de especies (bovinos, ovinos y cuy), para ser comparado con el tratamiento testigo (cuajo químico), en la elaboración de queso fresco, utilizándose 56 unidades experimentales de 20 litros de leche cada una, los resultados experimentales fueron sometidos a un análisis

de varianza y separación de medias mediante la prueba de Tukey. Determinándose mejores respuestas productivas con el cuajo macerado de bovino con una conversión de 5.44 litros/kg de queso. En lo bromatológico, con el cuajo químico y macerado de cuy se obtuvo mayor proteína (18.98 y 18.31%, respectivamente), pero con el macerado de bovino existe mayor materia orgánica (96.89%) y calcio (501.25 mg). Los quesos presentaron coliformes totales entre 81.75 y 100.5 UFC/g, que están por debajo de las recomendadas por las normas establecidas, además, existió ausencia de coliformes fecales, siendo aptos para el consumo humano.

Bonafede 2017 indica en su trabajo la temática enfocándose, principalmente, en los diversos sistemas de procesamiento de los cuajos caprinos empleados para tal fin. Para ello disponer de una adecuada información acerca de las principales características de las leches de las especies de mayor difusión en el país, su procesamiento e insumos. Muchas de las producciones queseras, cuentan con insumos elaborados in situ, como es el caso del coagulante artesanal. A diferencia del cuajo en pasta ampliamente utilizado por países del centro de Europa, en nuestro país se utiliza el coagulante líquido, producto de la combinación del cuajo deshidratado agregado en suero fresco de quesería. Para ello, se recabaron datos, aportados por los mismos productores, acerca de las diversas metodologías adoptadas, haciendo hincapié en las prácticas observadas para la preparación de sus agentes coagulantes, por cuanto éstos representan un insumo fundamental durante el proceso de elaboración. La mayoría de los establecimientos coinciden con el método de elaboración, uso y conservación del cuajo, por ello se elaboró un protocolo de elaboración de cuajo natural con recomendaciones a seguir, respetando las tradiciones de usar insumos naturales regionales en condiciones de inocuidad alimentaria.

2.2. Bases teóricas

2.2.1. Cuajo

Existen diversas denominaciones para la enzima coagulante. En Francia, el término empleado es Présure, en España es cuajo, el equivalente de este término es Rennet en inglés y Lab en alemán; se utiliza indiferentemente para todas las preparaciones enzimáticas que coagulan la leche (Linden, 2003).

Según Quijano (2010), indica que el cuajo es una sustancia presente en el abomaso denominada enzima proteolítica, secretada por la mucosa gástrica del cuarto estómago (cuajar) de los rumiantes ya sean terneros, cabritos y corderos; esta secreción se produce en forma de un precursor inactivo, la pro-quimosina, que en medio neutro no tiene actividad enzimática pero que en medio ácido se transforma rápidamente en quimosina activa. Generando las denominadas enzimas activas como quimosina (EC 3.4.23.4) y pepsina (EC 3.4.23.1). Estas enzimas son capaces de separar la caseína (el 80% aproximadamente del total de proteínas) de su fase líquida (agua, proteínas del lactosuero y carbohidratos), llamado suero.

Así mismo (Calvo 2011) menciona que el cuajo es una sustancia que provoca que la leche “cuaje” y se produzca la separación de las proteínas de la leche (fundamentalmente caseína) y resto de componentes sólidos, del suero de la misma (lacto suero, agua y azúcares). señalando así su importancia del cuajo el cual consiste en ser el máximo responsable de la coagulación láctea.

2.2.1.1. Diferencias de cuajo y coagulante lácteo

Para Ferrandini (2006) el cual define al cuajo como el producto obtenido exclusivamente de los cuajares de rumiantes y cuyo componente activo está constituido quimosina y pepsina. Mientras que coagulante lácteo se define, como aquellas preparaciones de proteinasas de origen animal, vegetal o microbiano capaces de provocar la desestabilización de la micela de caseína con formación de un gel lácteo, los coagulantes lácteos reemplazan el uso del cuajo debido principalmente a causas estacionales y a la escasez de abomasos de animales rumiantes. Si bien los coagulantes lácteos obtenidos de animales no rumiantes, de origen vegetal y microbiano, cuando se utilizan en la elaboración de quesos, producen en los mismos características texturales, aromas y sabores totalmente diferentes en relación con aquellos quesos elaborados en las mismas condiciones con cuajo de bovino.

2.2.1.2. Funciones del cuajo

Si bien es cierto que en el cuajo su componente activo y puro, es la quimosina, sólo se conoce desde hace unas cuantas décadas. La acción de la quimosina es bien conocida por la industria láctea. Actúa directamente en un punto delimitado de la caseína con calcio. Al alterar dicha molécula se inicia la formación de un gel que atrapa la mayoría de los componentes sólidos de la leche; este gel se contrae poco a poco ayudado por la acidificación previa de la leche por medio de bacterias ácido lácticas, y al contraerse va expulsando suero. Al cortar el gel en cubitos, se logra separar entre un 50 y un 90 % del contenido inicial del suero de la leche. Además, señala que la efectividad del cuajo está en función de la temperatura, la concentración del sustrato (la leche), concentración de calcio, y la acidez. Las temperaturas usuales de coagulación pueden variar entre los 28 °C y los 41 °C, aunque lo más usual es una de 35 °C, según el tipo de queso se pueden

tener mezclas de leche con una acidez que puede variar entre los 0,18 % de acidez titulable hasta los 0,46 % (Padrón 2008).

2.2.1.3. Características del Cuajo

El cuajo, es una solución formada principalmente por las enzimas: quimosina y pepsina, las cuales son segregados por la mucosa interna del abomaso (cuarta cavidad del estómago) de los rumiantes en estado de lactancia. Identificando así sus principales características que tiene el cuajo las que predominan son: Resiste a la acción de los ácidos, se altera en presencia de luz, Su temperatura óptima de actividad es de 35 a 40 °C y la destrucción es 60°C y el pH óptimo de su acción es de 5,5 – 6,0 (Calvin 2011).

Asimismo Sancor (2002) indica que las características fisicoquímicas de cuajo líquido deben ser a pH 5,2-5,8 con densidad de 1,12- 1,14 g/ml y salinidad de 15-20% además Vitoria (1990) indica que el cuajo líquido debe estar a pH de 5,3 -6,3

2.2.1.4. Cuajos de origen animal

Ahora bien, sabido es que los rumiantes tienen cuatro estómagos y que el primero que funciona con más actividad, es el que recibe la leche, que por esto se denomina cuajar (*abomaso*), de aquí el nombre de cuajo. Existen dos tipos de preparaciones de cuajos de origen animal. El cuajo natural hecho por el mismo fabricante de quesos, que se extrae del cuarto estómago (cuajar) del ternero, cordero o cabrito lactante, presentándose en líquido o en pasta y el cuajo comercial, preparado industrialmente, obtenido antes del destete, el cual es más puro, de mayor poder coagulante y se presenta en forma de polvo, tableta o líquido (Dubach 2000).

a. Cuajo bovino

Córdova (2009) señala que el cuajo animal se obtiene de la mucosa del cuarto estómago o cuajar de los mamíferos rumiantes, antes de sustituir el tiempo necesario para que una enzima sea necesaria para cumplir la función de cuajar. La importancia de la acción del cuajo se encuentra en la enzima quimosina, su función es la de separar la caseína del suero. A diferencia de otras enzimas, la quimosina permite que las partículas de caseína se unan para formar un gel sólido, lo que podemos denominar cuajada, ya que anula los segmentos de carga negativa (κ caseína) que hace que las partículas de caseína se repelan.

2.2.2. Abomaso

El Abomaso (Abomasum). Cuya imagen se muestra en la figura 2. La literatura lo cita como un tipo de cuajo animal que es capaz de provocar la coagulación enzimática de la leche.



Figura 2: Abomaso

El abomaso (Abomasum) o mejor conocido como cuajar es la última parte del estómago de los rumiantes es un saco alargado con un extremo ciego denominado fundus y un extremo pilórico que desemboca en el duodeno. Puede verse varias horas después del nacimiento. Está recubierto por una membrana mucosa con células glandulares encargadas de la secreción del jugo gástrico. Esta mucosa presenta también pliegues

elevados que aumenta su superficie, en número de 13 -14, y que prácticamente desaparecen en el límite de las regiones glandulares fúngica y pilórica, es el estómago verdadero donde se digiere el bolo por la acción del jugo gástrico (Rivera 2012).

Asimismo Call Martínez, G. M. (2015) indica que el abomaso secreta la renina o quimosina además de ácido clorhídrico y pepsina realizando una función similar al estómago monogástrico, en este órgano están los microorganismos y los residuos sin fermentar, pero digerible de los alimentos, se someten a la digestión enzimática y sus productos son absorbidos; la secreción de ácido clorhídrico y pepsina inicia la degradación de las proteínas alimenticias y microbianas; se produce la pro renina en rumiantes neonatos, el cual es un zimógeno que al entrar en contacto con el ácido clorhídrico se transforma en quimosina y ataca la proteína de la leche conocida como caseína en presencia de iones de calcio, formando un producto denominado paracaseína, al que posteriormente desdoblan enzimas duodenales.

2.2.2.1. Abomaso adulto

El tamaño de abomaso adulto en los bovinos se alcanza a partir de los 5 ó 6 meses. La forma y posición del abomaso son variable dependiendo de la edad y de la dieta alimentaria. En el abomaso adulto su posición es paramedial izquierda. En rumiantes adultos secreta la renina o quimosina la cual se denomina cuajo; esta es utilizada comúnmente en la elaboración de queso a nivel artesanal (Rivera 2012).

2.2.2.2. Componentes Enzimáticos del abomaso

El abomaso, antiguamente llamado renina, está compuesto por un conjunto de enzimas pertenecientes al grupo de las aspartato proteinasas. Pepsina A (EC. 3.4.23.1), Pepsina B (EC. 3.4.23.2), Gastricina (EC. 3.4.23.3) y quimosina (EC. 3.4.23.4). La quimosina incluye dos formas, A y B que difieren en la secuencia de sus pro enzimas solamente en un aminoácido (sustitución de un Asp por Gly en la posición 290). La quimosina y la

pepsina se hallan en mayor proporción que la gastricsina, cuya actividad frente a la caseína no ha sido muy estudiada (Ferradini et al. 2007).

Tabla 1: *Componentes enzimáticos de abomasos de bovino, ovino y caprino*

Grupo	Fuente	Nombre	Componente enzimático
	estomago de bovino	abomaso de bovino	quimosina a y b
			pepsina a y gastrina
Animal	estomago de ovino	abomaso de ovino	quimosina y pepsina
	estomago de caprino	abomaso de caprino	quimosina y pepsina

Nota: tomada de Ferradini et al (2007)

2.2.2.2.1. Quimosina

Se define a la Quimosina como una holoproteína que pertenece al grupo de las aspartato de las proteasas, es la enzima coagulante de la leche es el componente enzimático principal del cuajo, tiene una actividad coagulante alrededor de 10.000.000 unidades soxhlet por gramo de proteína. Tiene un peso molecular de 34400 Dalton. La quimosina se da en la naturaleza en dos formas alélicas, quimosina A y quimosina B. Estas formas se diferencian solamente en un aminoácido en la posición 286 de la cadena péptica. En esta posición la quimosina A contiene ácido aspártico y la quimosina B contiene glicina. La proporción puede variar entre preparaciones de cuajos genéticos llegando incluso en Chymax a contener sólo quimosina esta enzima se secreta en el abomaso bajo una forma inactiva, como proenzima denominada proquimosina. La cual en medio neutro no tiene actividad enzimática pero que en medio ácido se transforma rápidamente en quimosina activa. La proquimosina se transforma en enzima activa por un proceso autocatalítico acelerado por lo H^+ . El proceso es muy dependiente del pH, la fuerza iónica y la temperatura (Calvo 2011).

Del mismo modo Quijano (2010) indica que esta enzima es una aspartato proteínasa soluble que se secreta en el abomaso (cuajar) bajo una forma inactiva, la proquimosina la cual se activa por un proceso autocatalítico acelerado por iones H^+ . La activación es instantánea a pH 2,0 en el curso de la activación se separan péptidos básicos y a ello sigue un descenso del punto isoeléctrico. Diversos estudios se han llevado a cabo para determinar las variables óptimas para la activación de la proquimosinas así como indican que si la mezcla está libre de sales a pH 2,0 y a temperatura ambiente, la activación de la proquimosinas realiza entre 1 a 2 horas y con un mismo pH y temperatura, la activación es completada en 10 minutos si la solución contiene 0,1M NaCl a concentraciones mayores tiene efecto negativo. La activación de las enzimas del abomaso a distintos pH, obteniendo aproximadamente un 90 % de la actividad coagulante a pH 2, 0. A este pH, el 50% de las proteínas de las proteínas del extracto precipitan. La activación es instantánea a pH 2,0 en el curso de la activación se separan péptidos básicos iones es una excelente enzima coagulante de leche debido a su capacidad de actuar en el enlace fenilalanina 105 – metionina 106 de la κ -caseína (Figura 3) de forma rápida y efectiva. Esto se debe a que a pH 6,7 la zona del enlace que es hidrolizado tiene carga positiva, una fácil accesibilidad y la fuerte afinidad del sitio activo de la enzima cargada negativamente hacen la reacción más rápida. La quimosina como coagulante de leche es la hidrólisis del enlace fenilalanina (105) y metionina (106) en la micela de caseína específicamente en la κ -caseína. Esto resulta en la formación de la para- κ -caseína con un componente hidrofóbico (aminoácido residual 1 – 105) y un macropéptido hidrofílico (residual 106 – 169). La degradación de la κ -caseína genera la ruptura de la micela resultando así la coagulación debido a la influencia de iones Ca^{2+} en el medio. También participa en la maduración ya que en la cuajada persiste entre un 6 – 7% de quimosina activa la que se encarga de degradar a la

caseína α s-1 liberando péptidos los cuales, posteriormente serán hidrolizados por los cultivos lácticos (Linden 2003).

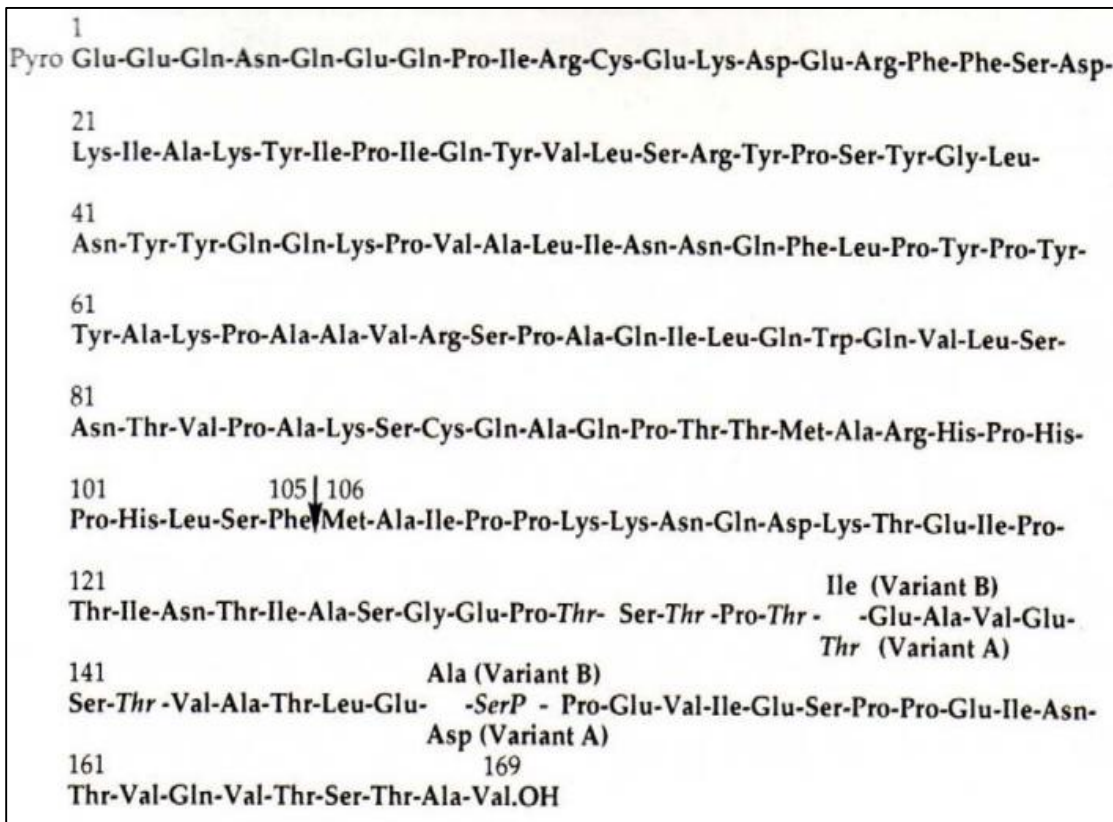


Figura 3: Punto de acción de la quimosina kappa-caseína Fox y McSweeney (1998)

2.2.2.2.2. Pepsina.

Se define a la pepsina (EC 3.4.23.1) como la enzima secundaria del abomaso de rumiantes. Su actividad coagulante se estima que es del orden del 20% de la actividad total, es la más parecida a la quimosina, es una proteasa muy ácida cuyo pH óptimo es 2,0 y se ve inhibida a pH sobre 6,6, de aquí su mala aptitud de coagulación de leches frescas. Hay dos tipos de pepsinas bovinas (I y II) y se diferencian entre ellas por su velocidad de inactivación en presencia de urea. Estas contienen en su estructura fósforo lo que las distingue de la quimosina que carece de él dándole un polimorfismo a las pepsinas. La pepsina también actúa en los mismos enlaces que actúa la quimosina o muy cerca de ellos, sin embargo la especificidad del sustrato de esta enzima es más amplio, el

cual puede resultar en efectos indeseados durante la maduración del queso, tales como formación de sabores amargos (Calvin 2011).

Según Quijano (2010) cuando se habla de pepsina bovina sin otra precisión se trata de la pepsina II con un peso molecular de 33400 Dalton la pepsina bovina I o B llamada también Gastriscina es minoritaria con 30000 Dalton. Las pepsinas I y II se distinguen por la velocidad de inactivación en presencia de urea.

2.2.2.3. Características de los componentes enzimáticos del Abomaso.

Tabla 2. *Características óptimas de la quimosina y pepsina*

Sustrato y condiciones	Quimosina	Pepsina
Sobre caseína	Específica	específica
T° óptima	35 –40 °C	35 – 40°C
T° inactivación	60 °C	50 °
pH óptimo	5,5 – 6, 0	1,5 – 2,0
pH inactivación	>7	>5,8

Nota: tomada de Rivera (2012).

2.2.2.3.1. Características Bioquímicas de la Quimosina bovina

Para Calvin (2011) las soluciones de pro quimosina son estables entre rangos de pH 5,5-9,0. A pH alrededor de 3,5 y sobre 7,0 la enzima pierde rápidamente su actividad y a pH 2,0 hay una zona de estabilidad limitada. Las soluciones de quimosina tienen su estabilidad óptima a pH entre 5,5 a 6,3 y decrece muy rápidamente por encima de pH 6,5 produciéndose una inactivación a pH mayor a 7. El mismo autor indica que el pH óptimo de la actividad proteolítica de la quimosina es aproximadamente 6,0. Su actividad coagulante cesa cuando la leche es alcalina, alrededor de pH 7,5 y superior a 8,0 se produce la desnaturalización irreversible de la enzima, mientras que la proenzima se mantiene aún estable a pH 9,0.

FAO (2000) indica que a pH 6,8 y sobre este valor la actividad de la quimosina se retarda. Además señala que la quimosina es altamente sensible a la agitación, calentamiento, luz, álcalis, diluciones y productos químicos.

2.2.2.3.2. Características Bioquímicas de la Pepsina bovina.

Esta enzima se caracteriza por poseer un punto isoeléctrico por debajo de 1,5 y presenta la máxima actividad catalítica en soluciones ligeramente ácidas y se desnaturaliza a valores de pH mayores de 5,8; las pepsinas contienen fósforo mientras que la quimosina carece de él. Esto es una fuente de polimorfismo. La pepsina desfosforilada aumenta su actividad coagulante sobre la caseína kappa (Moschopoulou, E.2011).

Asimismo Mahler y Cordes (1990), mencionan que la pepsina se sintetiza en forma de un precursor o zimógeno, llamado pepsinógeno, proteína cristalina, se encuentra en la mucosa gástrica y se caracteriza por tener un peso molecular de 42000. Los hidrogeniones catalizan la transformación del pepsinógeno en pepsina y por lo tanto, es de esperar que así ocurra al liberarse pepsinógeno en el jugo gástrico, fuertemente ácido y también por la acción de la propia enzima (pepsina). En consecuencia, la reacción activante es autocatalítica.

2.2.3. Obtención del cuajo líquido

El cuajo líquido puede ser obtenido a partir de las técnicas reportadas por los autores (Vitoria 1990 y De Soroa 1990); son más o menos parecidas aun cuando originalmente puedan tratarse de abomasos de terneros, bovinos adultos, cabritos o búfalos lactantes o adultos. La metodología se ajusta aproximadamente a lo siguiente:

a. Tratamiento de la materia prima

Vitoria (1990), afirma que los abomasos de terneros y bovinos adultos conservados en refrigeración con sales sólidas como sulfato del potasio, de sodio, produjeron un rendimiento de cuajo incrementado en un 50% mayor que cuando se utiliza el cloruro de sodio. Además tratándose de abomasos congelados se recomienda la conservación en salmuera de 75 g de cloruro de sodio por litro.

b. Acondicionamiento

El acondicionamiento consiste en un extendido y salado, es decir, se le da un corte y queda totalmente abierto, antes de ser enviado al procesador de cuajos (Vitoria 1990) , esta operación no concuerda con lo recomendado por De Soroa (1990) quién asegura que los abomasos no deben ser limpiados por dentro, ni volteados porque pierden mucha enzima.

c. Secado

Su función es insolubilizar las materias mucosas y viscosas que están impregnados en el abomaso, facilitando así la posterior filtración la temperatura de secado es de 25–30°C y el ambiente debe ser aireado. De Soroa (1990), menciona haber secado el abomaso por 20 días a las condiciones medio ambientales de Lima (sin indicar en que época del año) y Vitoria (1990) recomienda el secado de abomasos por un período de una semana.

d. Cortado

Esta operación se realiza para facilitar la extracción enzimática, los extremos cercanos a los píloros deben ser desechados por ser pobres en cuajo. El cortado se realiza en tamaños de aproximadamente $1 \times 1 \text{ cm}^2$ o lo más pequeño posible De Soroa (1990)

e. Macerado

La finalidad del macerado es extraer la mayor cantidad de enzima contenida en las paredes del abomaso; además de ella, se extrae la proenzima que es un precursor inactivo, la composición de la solución extraída debe ser la adecuada para evitar el desarrollo de microorganismos que puedan alterar el poder coagulante del cuajo. Básicamente consiste en una solución salina adicionada de uno o más antisépticos; el agua utilizada para la preparación de las soluciones debe estar libre de microorganismos alteradores no se recomienda el uso de agua hervida porque parece afectar a la extracción de la enzima así como su conservación. Los antisépticos utilizados pueden ser entre otros: ácido bórico, benzoato de sodio, glicerina, timol o alumbre, la extracción enzimática óptima, se realiza cuando el pH de la solución está alrededor de 5,2; para ajustar hasta dicho pH se utilizan soluciones al 10% de fosfato de sodio dibásico, borato de sodio o si es necesario, la temperatura de extracción no debe ser mayor de 25°C (Vitoria, 1990).

La duración de la extracción debe estar comprendida entre los 4–10 días; por el contrario, períodos prolongados provocan el paso a la solución de una mayor cantidad de proteínas y la enriquecen de gérmenes microbianos (Alais, 2003).

f. Filtrado

El filtrado consiste en separar de la solución de maceración todos los tejidos orgánicos e impurezas. Puede utilizarse un lienzo o una capa delgada de algodón y luego efectuar una clarificación como actividad complementaria. La clarificación elimina mucus y otras

impurezas que afectan el poder coagulante del cuajo y puede ser realizada por: adición de sustancias precipitantes (ácido acético o láctico diluido, alcohol, sal común, alumbre, etc.), por filtración (filtros esterilizantes, filtro prensa, papel, filtro común) ó centrifugación (Alais, 2003).

g. Maduración

Debido a que durante la maceración no sólo se extrae la enzima sino también la proenzima, es necesario el período de maduración para activar a esta última y así obtener un cuajo líquido con mayor poder de coagulación. La activación puede realizarse de dos maneras (Alais, 2003), que se mencionan a continuación.

Rápida; a pH 2,0 la activación es instantánea (Alais 2003), pero la estabilidad de la enzima en presencia del cloruro de calcio es menor.

Lenta; a pH 4,0–5,0 (Vitoria y De Soroa 1990), reportan que la activación de la proquimosina bovina a pH menores de 2,5 produjo una pseudoquimosina activa, que poseía 15 residuos de aminoácidos más largos que la quimosina. La pseudoquimosina se convirtió a quimosina a pH superiores de 5,5.

h. Envasado

El cuajo líquido debe ser envasado en recipientes de cierre hermético y en condiciones tales que no se altere el producto (De Soroa, 1990).

i. Almacenaje

Algunos autores como Vitoria (1990) y Sancor (2001) recomiendan una temperatura menor de 15°C ya que si son mayores pueden afectar a las enzimas; además deberán protegerse de la acción de la luz o rayos solares y del aire.

2.2.4. Fuerza de cuajado

Según Alais (2003), la fuerza del cuajo representa el número de volúmenes de leche fresca, coagulados por un volumen de cuajo en 40 minutos a 35 °C. Si se toma un volumen v de cuajo, un volumen V de leche y se mide el tiempo de coagulación T en segundos.

2.2.4.1. Fórmula de la fuerza de cuajo

La fuerza de cuajo se calcula mediante la siguiente fórmula expresada a continuación:

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

F = fuerza del cuajo Fuerza.

V = cantidad de leche en mililitros (ml)

C = cantidad de cuajo en mililitros (ml)

T = tiempo de coagulación en segundos (s)

Se expresa como $F = 1/F$

La fuerza de los “cuajos líquidos comerciales” es 2,000 y 5,000; fuerza de los “extractos de cuajo” comerciales 10,000 y 15,000; fuerza de los “cuajos en polvo” comerciales 100.000 y 150.000, fuerza del cuajo cristalizado, alrededor de 10.000.000. Las propiedades de los cuajos, se deben a la ruptura de la proteína de la leche kappa-caseína; las enzimas proteolíticas cortan a la caseína por el enlace Phe105-Met106, separando la región hidrofílica del extremo; de esta manera el primer fragmento (desde el aa 1 hasta el 105) se agrega en forma de micelas y el fragmento restante que es hidrosoluble queda en la solución. La forma activa del cuajo es a pH de entre 5 y 6. Comienza a desnaturalizarse por arriba de los 35 °C (Alais, 2003)

2.2.5. Proteínas de la leche

Las proteínas de la leche son: la caseína, albumina, globulina y enzimas, estas constituyen alrededor del 95% del nitrógeno presente y el nitrógeno restante es nitrógeno no proteico.

Las proteínas contienen alrededor de 20 aminoácidos y otras sustancias como azufre, fosforo y calcio (Robinson 1991)

2.2.5.1. Las caseínas.

De todos los componentes proteicos de la leche son probablemente las caseínas las que más se estudian dado su papel determinante en el estado del sistema del que forma parte.

Las caseínas son aquellas fosfoproteínas y estas se dividen en α , β , γ , así como la caseína κ , las caseínas α , β , γ , son sensibles al calcio, esto quiere decir que dichos componentes principales reaccionan en presencia de este elemento, con el que forman compuestos que precipitan provocando la coagulación de la leche (Fenema 2010).

2.2.6. Coagulación de la leche

Dergal, S. B., Rodriguez, H. B., & Morales, A. A. (1981) indican que la coagulación de la leche es, sin duda, una de las etapas tecnológicas más importantes. En efecto, independientemente de la escala con que se trabaje, es decir, ya sea artesanal ó industrialmente, la obtención de los sólidos de la leche, requiere, insoslayablemente, un cambio en su estado de agregación, pasando de la forma líquida natural a la de gel. Como ya se mencionó previamente, la coagulación de la leche puede realizarse por vía ácida ó por vía enzimática. Para lograr una mejor interpretación de este fenómeno, conviene revisar brevemente la forma en que se encuentran naturalmente las caseínas en la leche. Dado que las tres primeras son sensibles a los iones Ca^{+2} , naturalmente presente en la fase acuosa de la leche, y la κ -caseína es insensible, en su estado nativo, estas proteínas se encuentran organizadas en micelas (partículas coloidales, esféricas y voluminosas), cuyos diámetros pueden ir desde 20 a 300 nm, que aseguran su estabilidad

2.2.6.1. Coagulación por acción enzimática

Según (Dergal, S. B., Rodriguez, H. B., & Morales, A. A. 1981) indican que la coagulación enzimática de la leche involucra una modificación de las micelas de caseína a través de una proteólisis limitada llevada a cabo por proteasas seleccionadas, comúnmente llamadas cuajo, dando como resultado Para-caseína y Macro-péptidos, lo cual se conoce como Fase primaria. A continuación se produce una agregación de las micelas alteradas, inducida por la presencia de calcio, denominada Fase secundaria de la coagulación enzimática. Cabe destacar que, aunque los glóbulos de grasa quedan ocluidos en la matriz del gel, no participan en su formación. Durante la Fase primaria, se produce una profunda modificación en la organización micelar, debido la acción específica ejercida por el cuajo sobre la κ caseína. En efecto, como ya se mencionó, dada su insensibilidad a los iones Ca^{+2} (a diferencia de las caseínas α_1 , α_2 y β), esta proteína se localiza preferentemente en la superficie de las micelas (orientando su región hidrofílica al medio), ejerciendo un rol de coloide protector sobre las mismas. En forma muy sintética se puede decir que cuando el cuajo hidroliza el enlace peptídico Fen105-Met106, de la κ -caseína, se libera ese segmento hidrofílico κ -CN (f106-169), conocido como Glico-macropéptido (GMP) ó Caseíno-macropéptido (CMP), mientras que resto de la molécula, denominado para- κ caseína permanece unida a la micela. Bajo estas condiciones, se pierde el efecto protector que la κ caseína ejerce sobre las micelas, quedando expuestas las zonas sensibles al calcio Ca^{+2} por lo que en presencia de éste, comienzan a agregarse espontáneamente, dando como resultado en un gel que abarca la totalidad del volumen reaccionante. Es importante destacar que, a estas uniones intermicelares a través de iones Ca^{+2} , se suman interacciones hidrofóbicas propiciadas por la reducción, tanto en la carga superficial como en la estabilización estérica, que produce la hidrólisis de la κ -caseína. La fase primaria: durante la cual el cuajo ataca al

componente estabilizante de la micela, que es la caseína k cortándola en dos segmentos desiguales 1-105 corresponde a la paracaseína k y el segmento 106-169 al péptido llamado macro péptido. Todas las formas de caseínas k, contengan o no glúcidos, están sujetas a esta hidrólisis, la cual se efectúan a una gran velocidad. La fase secundaria. Fase de coagulación que corresponde a la formación del gel por asociación de las micelas modificadas bajo la acción del enzima a una temperatura conveniente esta agregación no empieza hasta que el 85-90% de caseína κ ha sido hidrolizado. Existe una fase terciaria que es el cuajado se inicia una vez que se ha producido el coagulo de la leche y consiste en una acción proteolítica de la α y β que constituye también parte del proceso de maduración.

2.2.6.2. Factores que afectan la coagulación de la leche

Entre los principales factores que afectan la coagulación de la leche están los siguientes:

a. Temperatura enzimática de la leche

La acción del enzima es máxima a temperaturas de 40-42°C, a temperaturas mayores vuelve a hacerse cada vez más lenta a consecuencia de la gradual desnaturalización de la enzima y se detiene a los 65°C como consecuencia de su desnaturalización. Por debajo de los 20°C se hace lenta pero ocurre aún a 0°C. Lo anterior no se cumple para la segunda fase de la coagulación, ya que por debajo de los 10°C no ocurre. La temperatura también afecta las características de la cuajada obtenida, así se coagula a 21-25°C se obtiene una cuajada blanda, a 30°C cuajada firme y a 32-35°C una cuajada consistente y elástica las temperaturas más usuales de coagulación puede variar entre los 28°C y los 41°C, aunque los más usual es una de 35°C (Córdova 2009).

a. pH de la leche.

La enzima se inactiva a pH superior de 7.5; la coagulación no se produce por inactivación de la enzima. La disminución del pH de la leche produce el aumento de la

velocidad de coagulación debido a una transferencia de calcio coloidal a calcio iónico, esto ocurre a pH de 5,6 - 6,6 (Córdova 2009).

b. Calcio de la leche

La aportación de iones de calcio y la disminución de pH debido a la reacción de calcio con los fosfatos y proteínas, reducen la estabilidad del fosfocaseinato micelar; de este modo se acelera la reacción primaria y en consecuencia disminuye el tiempo de coagulación, las dosis exageradas de calcio actúan negativamente (Alais 2003).

2.3. Definición de términos

Abomaso Último compartimiento del estómago de los rumiantes. (Rivera 2012).

Enzima Conjunto de moléculas de naturaleza proteica y estructural que catalizan reacciones químicas (Alais, 2003)

Hidrolisis Es una reacción química entre una molécula de agua y otra diferente, en la cual la molécula de agua divide sus átomos, es la reacción de los iones de una sal con el agua (Linden 2003).

pH Es una medida de acidez o alcalinidad de una disolución, indica la concentración de iones de hidrógeno presentes en determinadas disoluciones. (Linden 2003).

Caseína Fosfoproteína presente en la leche y sus derivados. (Calvin 2011).

Solución Es la mezcla homogénea de una o más sustancias disueltas en otra sustancia en mayor proporción. (Linden 2003).

Zimógeno Conocido como pro enzima, es un precursor enzimático. (Alais, 2003)

CAPITULO III

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Ubicación geográfica del método de investigación.

El presente trabajo de investigación se llevó a cabo en los Laboratorios de Tecnología de Lácteos (1H-201) de la Escuela de Ingeniería en Industrias Alimentarias, así como los análisis microbiológicos se realizó en el Laboratorio de Microbiología de Alimentos del Departamento de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de Cajamarca; ubicado en el distrito, provincia y departamento de Cajamarca. Estos laboratorios se encuentra situados a 3 km de la ciudad de Cajamarca, cuyas características geográficas son las siguientes: altitud 2750 msnm, 7° 10' latitud sur, 78° 30' longitud este, temperatura promedio 14 °C, humedad relativa 65 % y precipitación promedio anual 795 mm. (SENAMHI 2018).

3.2. Materiales

3.2.1. Material experimental

a. Materia prima

Los Abomasos de bovino fueron adquiridos en el Camal Municipal de Cajamarca de raza criolla raza que predomina en el Distrito de Cajamarca, estos animales al momento del sacrificio eran adultos de 2 años de edad.

b. Insumos

Leche. Fue adquirido en el Fundo La Victoria de la Universidad Nacional de Cajamarca la cual garantiza una leche de buena calidad.

Sal (cloruro de sodio, grado comercial).

c. Reactivos

- Solución de ácido clorhídrico a pH de 1,5 (0,032M); 2,0 (0,010M); 2,5 (0,003M) y 3,0 (0,001M).
- Benzoato de sodio
- Fosfato di potásico al 98%
- Agar rojo violeta.
- Agar de recuento.
- Agar Plate Count
- Agua pectonada estéril 0,1%
- Caldo lactosado
- Caldo verde brillante bilis 2%

3.2.2. Material y equipo de laboratorio

a. Materiales en general

- Vasos de precipitación
- Termómetros de 0 a 250°C/± 0,5 °C.
- Embudos de vidrio.
- Probeta de 1000 mL.
- Pipetas de 1 y 10 mL.
- Tinta indeleble.
- Matraz Erlenmeyer de 25, 50, 125, 250, 500 y 1000 mL.
- Placas Petri.
- Papel filtro whatman 42.
- Cuchillos.
- Frascos de vidrio ámbar de 50 ml (envasado)

b. Equipos

- PH metro (PH-009(III))High Accuracy Pen Type PH Meter (with temperature display)
- Balanza analítica
- Baño maría.
- Refrigeradora
- Congeladora
- Estufa
- Cronómetro.
- Termómetro digital

3.3. Metodología

3.3.1. Trabajo de campo

Para el presente estudio, se adquirió abomasos de bovino adulto de 2,0 años de edad en buen estado del Camal Municipal de Cajamarca, para luego ser trasladados en cooler hacia los laboratorios de lácteos de la escuela académico profesional de Industrias Alimentarias y al Laboratorio de Microbiología Alimentaria, respectivamente de la Universidad Nacional de Cajamarca.

3.3.2. Trabajo de laboratorio

Este trabajo se realizó tanto en el laboratorio de Ingeniería en Industrias Alimentarias el proceso de elaboración, y en el laboratorio de Microbiología de Alimentos lo que respecta al análisis microbiológico.

3.3.2.1. Proceso de obtención y conservación de cuajo líquido

Para realizar la obtención y conservación de cuajo bovino se realiza un análisis preliminar para establecer la solución de ácido clorhídrico descrita en el ítem 3.3.2.2 esta será utilizada durante el proceso, se hace también un análisis de: materia prima, de extracción y de activación de las soluciones enzimáticas obtenidas, estos procesos están descritos a continuación:

3.3.2.1.1. Análisis de la materia prima

Obtenido el abomaso de un peso aproximado de 1 Kg, es lavado ligeramente con agua destilada estéril, para luego realizar el proceso de secado en la estufa a 30°C por un lapso de 7 días, luego se realiza la evaluación de humedad, materia seca y análisis microbiológico descrito a continuación:

3.3.2.1.2. Evaluación de humedad del abomaso

a. Humedad del abomaso seco.

Pesar 5 g de abomaso seco y colocar en una placa Petri estéril, luego se procedió a la desecación en una estufa a T° de 102°C hasta alcanzar un peso constante y el resultado se expresó en porcentaje citado por (Córdova 2009).

b. Materia seca del abomaso.

Se determina según la siguiente fórmula $\%MS = 100 - \% H$. (Córdova 2009).

3.3.2.1.3. Evaluación microbiológica al abomaso seco.

Se realizó por el método ICMSF (2001) determinando: *Mesofilos viables*, *E. Coli*, *salmonella*, *S áureos*, *Mesofilos Viables* y *Clostridium sp.*

a. Recuento Mesofilos viables.

Pesar 25 g de la muestra de abomaso seco y diluir por separado en 225 ml de agua peptonada estéril 0,1% (APE). Se realizó diluciones decimales hasta 10^{-3} (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}) en APE 0,1% de cada muestra y a partir de cada una se inocularon, por vaciado agotamiento en placa por duplicado, agar Plate Count (PCA) que se incubaron a 35°C por 48 h. A partir del número de colonias obtenidas en las placas Petri, se calculó el número de microorganismos por gramo de muestra.

Para el recuento de las colonias se siguió la metodología establecida por la Comisión Internacional de Especificaciones Microbiológicas para Alimentos (ICMSF 2001).

b. Recuento Escherichia Coli Técnica del NMP.

La determinación del NMP de bacterias *coliformes* en una muestra se hizo a partir de la técnica de los tubos múltiples, en la cual volúmenes decrecientes de la muestra (diluciones decimales consecutivas) fueron inoculados en medio de cultivo adecuado. La combinación de los resultados positivos y negativos fue usada en la determinación del

NMP. El método constó en tres etapas: prueba presuntiva, prueba confirmativa y prueba complementaria.

Prueba presuntiva: Realizada las diluciones correspondientes de 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} y para cada dilución consistió en colocar volúmenes determinados de muestra (1 ml) en una serie de 3 tubos conteniendo caldo lactosado y fueron incubados a $36^{\circ} \text{C} \pm 1^{\circ} \text{C}$ durante 24-48 horas en baño maría, en las muestras. En esta prueba presuntiva la actividad metabólica de las bacterias es estimulada vigorosamente y ocurre una selección inicial de organismos que fermentan la lactosa con producción de gas. La formación de gas a $36^{\circ} \text{C} \pm 1^{\circ} \text{C}$ dentro las 24-48 horas, constituye una prueba presuntiva positiva para la presencia de bacterias del grupo *coliformes totales*.

Prueba confirmativa de *Coliformes fecales totales*: Consistió en transferir todos los tubos positivos de la prueba presuntiva a tubos conteniendo caldo verde brillante bilis 2% y fueron incubados durante 24-48 horas a $36^{\circ} \text{C} \pm 1^{\circ} \text{C}$. Esta prueba reduce la posibilidad de resultados falsos gas-positivos que pueden ocurrir por la actividad metabólica de los organismos formadores de esporas o por la producción sinérgica de gas debido a que algunas cepas de bacterias no pueden, individualmente, producirlo a partir de la fermentación de la lactosa.

El caldo verde brillante bilis contiene agentes inhibidores que suprimen el desarrollo de todos los microorganismos no *coliformes*. La producción de gas a 44°C después de las 24-48 horas constituye una prueba confirmativa positiva de *coliformes totales*, después del periodo de incubación se consultó la tabla del NMP para conocer el número más probable de *coliformes fecales totales* /g de muestra.

En determinados casos de confirmación de *coli fecal* positivo del caldo verde brillante, se puede realizar utilizando caldo *E. coli*.

Prueba confirmativa de *Coliformes Fecales*: Consistió en transferir por inoculación en estrías, las bacterias a partir de tubos positivos de la prueba presuntiva, a tubos con caldo *E. Coli*, se agitó suavemente para su homogenización, luego se incubó a 35°C por 24-48 horas, registró como positivos todos los tubos donde se observó producción de gas después del periodo de incubación, posteriormente se consultó en la tabla 16 del NMP para conocer el número más probable de *coliformes fecales/g* muestra.

Prueba complementaria para confirmar *E. coli*: se realizó la prueba del indol que consistió en transferir 2 o 3 asadas de los tubos positivos del caldo verde brillante o del caldo *E. coli* a tubos con caldo triptonado, luego se incubó a 35 °C ±0.5°C durante 24 ± 2 horas, posteriormente se confirmó con 0.5ml de reactivo de kovacs. Se consideró positivo si la coloración fue rojo y negativo si fue amarillo. Otra prueba consistió en tomar 2 o 3 asadas de los tubos positivos de caldo verde brillante o caldo *E. coli* y sembrados por estría en Agar Endo o Agar Eosina Azul de Metileno (E.M.B.), luego fueron incubadas a 35 °C ±0.5°C durante 24 ± 2 horas. Se consideraron positivas las colonias negras típicas nucleadas con brillo metálico.

c. Recuento de *Salmonella*.

Pesar 25 gramos de cada muestra de abomaso seco y homogenizar en 225 mL de caldo BHI, el cual se incubó por 24 h a 37°C. Luego se realizó el enriquecimiento selectivo en caldo selenito cistina y en caldo tetracionato e incubó ambas a 37°C/24hrs; después se procedió a sembrar en placa (Agar *Salmonella* - *Shigella* o (Agar Bismuto sulfito)) e incubar a 37°C/24-48horas.

Agar *Salmonella*-*Shigella* (S.S): Colonias transparentes con centro negro.

Agar Bismuto Sulfito (B.S): Colonias negras brillantes.

Para el recuento de las colonias se siguió la metodología establecida por la Comisión Internacional de Especificaciones Microbiológicas para Alimentos (ICMSF, 2001).

d. Recuento de *Staphylococcus aureus*.

Pesar 25 gramos de abomaso seco y diluir en 225 mL de agua peptonada estéril 0,1% (APE). Se realizaron diluciones decimales hasta 10^{-3} en APE 0,1% y a partir de cada una se inocularon, por vaciado o agotamiento en placa por duplicado, Baird Parker que se incubaron a 35°C por 48 h en atmósfera aerobia. Se consideraron sospechosas las colonias que presentaron una coloración negra o gris con zonas parcialmente opacas.

Para la prueba confirmativa se seleccionaron, dos colonias típicas; con este fin, se investigó la capacidad de la cepa en estudio para producir la enzima Coagulasa. La coagulasa es un enzima capaz de desnaturalizar la fibrina del plasma. La mayoría de las cepas de *Staphylococcus aureus* patógenas (enterotoxigénicas) producen esta enzima. Las colonias típicas seleccionadas se sembraron en caldo infusión cerebro-corazón, BHI (Brain Heart Infusión) contenido en tubos. Luego se Incubaron a 37 °C durante 18-24 horas.

e. Recuento de *clostridium sp*

Se midieron volumétricamente 25gr de la de cuajo líquido y se diluyeron en 225mLde agua peptonada estéril 0,1%(ATP) o un medio selectivo como diluyente Caldo Sulfito. Se realizaron diluciones decimales hasta 10^{-3} y a partir de cada uno se inocularon, por vaciado o por agotamiento en placa con Agar Selectivo para *Clostridium perfringes*, Agar Triptosa Sulfito (ATS), las que se incubaron a 35°por 48 h en atmosfera anaerobia y se observa las colonias de color negro.

3.3.2.2. Análisis preliminar para determinar la concentración ideal de ácido clorhídrico (pH) en la extracción de enzimas coagulantes.

Para determinar la medición del pH; calibrar el pH-metro y realizar la medida del pH por un método potenciométrico, este método se basa en el hecho de que entre dos disoluciones con distinta $[H^+]$ se establece una diferencia de potencial y luego utilizar en las concentraciones de la solución ácido clorhídrico a utilizar: a) pH 1,5 (0,032M); b) pH 2,0 (0,010M); c) pH 2,5 (0,003M) y d) pH 3,0 (0,001M).

Preparación de las concentraciones de HCl (pH), para la solución a un pH de 1.5 (0,032M): colocar 500 ml de agua destilada más 1,337 ml de HCl puro, homogenizar posteriormente y conservar en refrigeración. Para la solución a un pH de 2.0 (0,032.); colocar 500 ml de agua destilada más 4,1800 ml de HCl puro, homogenizar posteriormente y conservar en refrigeración. Para la solución a un pH de 2.5 (0,003M): colocar 500 ml de agua destilada más 0,1254 ml de HCl puro, homogenizar posteriormente y conservar en refrigeración. Para la solución a un pH de 3.0. (0,001 M): colocar 500 ml de agua destilada más 0,0418 ml de HCl puro, homogenizar posteriormente y conservar en refrigeración.

Obtener la mayor concentración de enzimas coagulantes a un determinado pH. (Extracción de las enzimas con la adición de HCl a diferentes concentraciones de pH). Para cada solución ya preparada pesar 100gr de abomaso seco cortado en cuadrados de 1cm^2 . Sumergir en cada porción de abomaso cortada en cuadrados de 1cm^2 en 250 ml solución de HCl a concentraciones de pH 1,5; 2,0; 2,5; y 3,0, según corresponda, durante un lapso de tiempo de 18 horas a una temperatura de 14°C .

Evaluar la fuerza de coagulación a diferentes concentraciones de pH. En un matraz de 250 ml, medir 100 ml de leche bovina y calentar a baño maría hasta una temperatura de graduación de 35°C . Cuando la leche alcanza esta temperatura se adiciona 1 ml de cada

solución enzimática extraída a diferentes concentraciones de pH y luego homogenizar, para seguidamente determinar su fuerza de coagulación de acuerdo a la fórmula siguiente: $2400 \times V/C \times T$. Evaluar y obtener la solución enzimática con la concentración de pH adecuado, que obtuvo la mayor fuerza de coagulación.

3.3.2.3. Parámetros de obtención y conservación de cuajo líquido

Para determinar los parámetros tanto de extracción, activación y conservación de la solución enzimática se procede a lo siguiente:

3.3.2.3.1. Analizar el porcentaje NaCl (sal) a concentraciones de 3% y 5% en la extracción de la solución enzimática y evaluar la fuerza de coagulación.

Utilizar las siguientes concentraciones de cloruro de sodio descritas a continuación:

Concentración de cloruro de sodio al 3%

Pesar 7.5 g de NaCl y agregar a un matraz de 250 ml que contiene una solución de HCl a pH 2,00 más 50 g de abomaso seco para su respectiva extracción de la solución enzimática.

Concentración de cloruro de sodio al 5%

Pesar 12.5 g de NaCl y agregar a un matraz de 250 ml que contiene una solución de HCl a pH 2,00 más 50 g abomaso seco para su respectiva extracción de la solución enzimática.

Para determinar la fuerza de coagulación; en un matraz de 250 ml colocar 100 ml de leche fresca de vaca añadir 1 ml de cuajo líquido y remover hasta obtener una buena homogenización y dejar reposar hasta lograr una precipitación enzimática y luego se calcula con la fórmula $2400 \times V/C \times T$.

3.3.2.3.2. pH de Activación de la solución enzimática a pH de 5,6 y 5,8 y evaluar la fuerza de coagulación

Preparación de fosfato di potásico a 98%, pesar 0.98 g de fosfato di potásico y diluir en 1 ml de agua destilada esterilizada

Activación de la solución enzimática a pH 5.6, agregar a la solución enzimática con 3% de concentración de cloruro de sodio 0.24ml de solución de fosfato di potásico al 98%.

Activación de la solución enzimática a pH 5.8, agregar a la solución enzimática 0.25ml de solución de fosfato di potásico al 98%.

Fuerza de coagulación: en un matraz de 250 ml Medir 100 ml de leche fresca de vaca añadir 1 ml de solución enzimática activada y mover hasta obtener una buena homogenización y dejar reposar hasta logra su precipitación enzimática y luego se calcula con la fórmula $2400 \times V/C \times T$.

3.3.2.3.3. Temperatura de conservación de la solución enzimática y evaluación de la fuerza de coagulación (7 °C y -7°C)

Graduar una refrigeradora a 7 °C y luego colocar las muestras a refrigerar por un lapso de tiempo de 1 mes evaluando constantemente la fuerza de coagulación.

Graduar una congeladora a -7 °C y luego colocar las muestras a congelar por espacio de 1 mes evaluando constantemente la fuerza de coagulación.

Fuerza de coagulación: en un matraz de 250 ml colocar 100 ml de leche fresca de vaca añadir 1 ml de solución enzimática activada y mover hasta obtener una buena homogenización y dejar reposar hasta logra su precipitación enzimática y luego se calcula con la fórmula $2400 \times V/C \times T$.

3.3.2.4. Análisis fisicoquímico y microbiológico de la solución enzimática obtenida con mayor fuerza de coagulación (Cuajo líquido).

Una vez obtenido la mejor solución enzimática se realiza análisis fisicoquímico y microbiológico según está indicado a continuación:

3.3.2.4.1. Análisis fisicoquímico de la solución enzimática con mayor fuerza de coagulación

a. Fuerza de Coagulación.

En un matraz de 250 ml medir 100 ml de leche fresca de vaca añadir 1 ml de solución enzimática activada y mover hasta obtener una buena homogenización y dejar reposar hasta logra su precipitación enzimática y aplicar la fórmula de fuerza de coagulación que es la siguiente $F=2400 \times v/c \times t$ (Alais 2003)

b. Densidad.

Medir 50 ml de cuajo liquido en una fiola de 50 ml y pesar luego aplicar la fórmula de densidad $d=m/v$ este proceso repetir 3 veces.

c. Solidos totales

Medir 3 ml de solución enzimática, luego se colocan en una placa esterilizada y se lleva a la estufa por 4 horas a 104°C, posteriormente se pesa y se obtiene los sólidos totales mediante la fórmula: $S T. = \frac{W_f}{W_o} \times 100\%$, donde: ST.= sólidos totales W_f = peso final en gramos, W_o = peso inicial en gramos (Campos 2010)

d. pH

Utilizar un pH metro, instrumento que detecta la señal eléctrica generada en un electrodo sumergido en la disolución problema y la expresa numéricamente en unidades de pH y su temperatura de dicha solución evaluada. Se calibran con disoluciones de pH conocido.

3.3.2.4.2. Evaluación microbiológica.

Este proceso está indicado páginas arriba en el ítem 3.3.2.1.3

3.4. Diseño experimental y estadístico

Utilizar el diseño experimental completamente al azar con arreglo factorial de $2 \times 2 \times 2$ con tres repeticiones obteniéndose 24 tratamientos (Vásquez 2014).

Arreglo factorial: factorial 2 A X 2B X 2C

A: Sal: $a_1 = 3\%$, $a_2 = 5\%$.; B: pH: $b_1 = 5.6$ $b_2 = 5.8$. ; C: T°: $c_1 = -7^\circ\text{C}$, $c_2 = 7^\circ\text{C}$

Tabla 3: Representación simbólica del diseño experimental completamente al azar

Tratamientos		
1	2	3
Y ₁	Y ₉	Y ₁₇
Y ₂	Y ₁₀	Y ₁₈
...
Y ₈	Y ₁₆	Y ₂₄

3.4.1. Factores de estudio

a. Factores constantes:

Abomaso seco: Solución ácido clorhídrico en relación de 1:5

pH de solución ácido clorhídrico: 2,0(0,001M)

b. Factores variables

A: Sal: $a_1 = 3\%$, $a_2 = 5\%$.

B: pH: $b_1 = 5.6$ $b_2 = 5.8$.

C: T°: $c_1 = -7^\circ\text{C}$, $c_2 = 7^\circ\text{C}$

c. Factores dependientes

Fuerza de cuajo de la solución enzimática (cuajo líquido).

3.4.2. Evaluación Estadística.

Para (Vásquez ,2014) el cuajo líquido obtenido y conservado durante un mes de almacenamiento en prueba, se evaluara la fuerza de coagulación, aplicando un diseño completamente al azar con arreglo factorial de $2 \times 2 \times 2$ con 3 repeticiones llevándolo esto a un cuadro de varianza para determinar las diferencias significativas de 5%, para el análisis estadístico y prueba de comparación de medias se hizo uso del SAS (System Analysis Statistics).

Arreglo factorial: factorial 2 A x 2B x 2C

A: Sal: $a_1 = 3\%$, $a_2 = 5\%$.

B: pH: $b_1 = 5.6$ $b_2 = 5.8$.

C: T°: $c_1 = -7^\circ\text{C}$, $c_2 = 7$

3.4.2.1. Análisis de varianza

Tabla 4: *Análisis de Varianza Del Diseño Completamente Al Azar*

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Fcal
Tratamiento	t-1	SC(Trat)	SC(Trat)(t-1)	CM(Trat)
Error	n-t	SC(Error)	SC(Error)(n-t)	CM(Error)
Total	n-1	SC(total)		

\bar{Y} : media de los promedio de los tratamientos.

CAPITULO IV

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Obtención y conservación de cuajo líquido

Este proceso de obtención y conservación de la solución enzimática se muestra esquemáticamente en la figura 6 a través de un flujograma de producción previo a eso se realizó el análisis de la materia prima y la determinación de la concentración ideal de ácido clorhídrico especificados a continuación.

4.1.1. Análisis de la materia prima

A la materia prima se realiza la evaluación de humedad y análisis microbiológico tal como se detalla a continuación:

4.1.1.1. Humedad y materia seca del abomaso seco

En esta evaluación se consideró la determinación de humedad y materia seca del abomaso seco según se describe en la siguiente tabla 5.

Tabla 5. Humedad y materia seca del abomaso seco

Determinación	Base	
	Húmeda (%)	Seca (%)
Humedad	15.29	-----
Materia Seca	84.71	100

Nº de repeticiones 3

La tabla 5 indica que la humedad es 15,29% y la materia seca es 84,71% de humedad, coincidiendo con lo que recomienda Parducho (2001) quien establece que la humedad del abomaso seco debe estar en un rango de 13,3 a 18,5%, la cual indica que está dentro del rango aceptable para una buena obtención de cuajo líquido; de la misma manera Coronel et al (1999) menciona que la humedad debe ser menor al 20% para los abomasos secos,

siendo estos resultados los más apropiados para la elaboración del cuajo natural porque estos porcentajes de humedad es un factor importante en la minimización e inactivación de carga bacteriana. Asimismo Córdova (2009) indica que el rango ideal de materia seca debe estar entre 81,5% a 86,7% de humedad con la finalidad de inactivar las bacterias causantes del deterioro.

Se concluye que tanto la humedad como la materia seca de la materia prima están dentro de los rangos aceptables para obtener solución enzimática.

4.1.1.2. Análisis microbiológico del abomaso seco.

Este análisis se realizó teniendo en cuenta la norma sanitaria establecida en la tabla 7 siendo como base de comparación con los resultados obtenidos en la tabla 6

Tabla 6. Evaluación microbiológica del abomaso seco.

Materia prima	(UFC/g)	(UFC/g)	(UFC/g)	(UFC/g)	(UFC/g)
Abomaso seco	<i>Aerobios Mesófilas</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>Salmonella</i>	<i>Cl. perfringens</i>
	10 ⁷	4 x 10 ²	10 x 10 ²	Ausencia	9x 10 ²

Los resultados obtenidos en la tabla 6 nos indican que el abomaso seco contiene bacterias las cuales están dentro del rango que establece la norma sanitaria detallada en la tabla 7, la cual si no es tratada puede generar alteraciones en el producto. Para evitar estas alteraciones se opta por utilizar cloruro de sodio (sal), benzoato de sodio y un proceso de filtración las cuales inhiben la carga microbiana

Tabla 7. Norma Sanitaria que Establece los criterios microbiológicos de calidad sanitaria e inocuidad para vísceras de bovino

Vísceras de aves, bovinos, ovinos , caprinos refrigerados y congelados							
Agente microbiano	Categoría	Clase	n	c	Limite por gr.		
					m	M	
<i>Aerobios Mesofilos</i>	2	3	5	2	10 ⁵	10 ⁷	
<i>Escherichia coli</i>	5	3	5	2	50	5x10 ²	
<i>Salmonella sp</i>	10	2	5	0	Ausencia	Ausencia	
<i>S. aureus</i>	8	3	5	1	10 ²	10 ³	
<i>Cl. perfirnges</i>	8	3	5	1	10 ²	10 ³	

Fuente: R.M.591-2008-MINSA

Nota

“n” (minúscula): Número de unidades de muestra seleccionadas al azar de un lote, que se analizan para satisfacer los requisitos de un determinado plan de muestreo.

“c” Número máximo permitido de unidades de muestra rechazables en un plan de muestreo.

Cuando se detecta un número de unidades de muestra mayor a c se rechaza el lote.

4.1.2. Análisis preliminar para determinar el pH ideal de solución de ácido clorhídrico en la extracción de enzimas coagulantes.

Se analizó la determinación de iones hidrogeniones (pH) y su fuerza de coagulación en cada una de las soluciones enzimáticas obteniéndose los siguientes resultados:

Tabla 8: *Fuerza de Coagulación de la solución enzimática preliminar*

Solución de ácido clorhídrico	Tiempo de coagulación	Fuerza de coagulación
1. pH 1.5(0,032M)	No presente	No presente
2. pH 2.0(0,032M)	10'05''= 605 seg	297.00
3. pH 2.5(0,032M)	14'12''= 840 seg	285.71
4. pH 3.0(0,032M)	20'45''= 1245seg	192.77

De los resultados obtenidos en la tabla 8, las soluciones enzimáticas con diferentes soluciones de ácido a tomando diferentes valores de pH se encontró que: la solución enzimática a un pH de 1.5 en solución de ácido clorhídrico no presento fuerza de coagulación, debido a que se presentó una desnaturalización Según Badui (2006) explica que una desnaturalización ácida implica la protonación de cargas de Aspartato y Glutamato, impidiendo la formación de una interacción electrostática provocando la desnaturalización de las enzimas pro quimosina y pepsina generando ausencia en la fuerza de coagulación. En la segunda solución enzimática con solución de HCl a un pH de 2.0, si se encontró una fuerza de coagulación de 297.00 lo que indica que 1 cantidad de solución enzimática coagula 297.00 partes de leche. Siendo esta la mejor fuerza de coagulación esto se debe a que la enzima quimosina y pepsina se adaptan mejor a un pH de 2.0, según (Linden 2003) indica la razón porque la pro quimosina se transforma en enzima activa por un proceso auto catalítico acelerado por los H⁺.

En la tercera y cuarta solución enzimática con solución de ácido clorhídrico a un pH de 2,5 y de 3,0 encontramos que la fuerza de coagulación de las enzimas quimosina y pepsina va disminuyendo debido a que esta tiene un valor de pH menor que el valor de su punto isoeléctrico enzimas están bajo su punto isoeléctrico lo cual se ve irreversiblemente inactivado, debido a que el pH de las enzimas tiene carga cero a este valor de pH, la solubilidad de la sustancia es casi nula. Mickelsen y Ernstrom (1992), comentan que la tasa de activación va aumentando al disminuir el pH, sin embargo cerca del pH 2,5 y 4,0 la enzima no permanece estable, observándose una subsecuente pérdida de actividad, por tal motivo se podría explicar del porque la disminución de la fuerza de la solución enzimática de cuando se extrae la enzima a pH 2,5 y 3,00

En conclusión las soluciones enzimáticas diferente a un pH de 2.00 la fuerza de coagulación disminuye.

4.2. Parámetros de obtención y conservación de cuajo líquido

Una vez establecido el pH ideal de la solución de ácido clorhídrico que debe tener para extraer las enzimas correspondientes; se determinó los parámetros óptimos tanto en la extracción, activación y conservación de las enzimas; para ello el medio ácido de la solución, se equilibró con una solución saturada de fosfato di potásico, hasta elevar el pH de la solución donde sea favorable para la activación del zimógeno.

4.2.1. Porcentaje de cloruro de sodio (NaCl al 3% y 5 %) en la extracción de la solución enzimática y evaluar la fuerza de coagulación

Se trabajó con 3% y 5% de cloruro de sodio para la extracción de las enzimas presentes en el abomaso, luego de la extracción se filtró la solución enzimática y se determinó la fuerza de coagulación.

Tabla 9: *Fuerza de Coagulación de las enzimáticas extraídas a 3 y 5 % de sal*

Repeticiones	Solución enzimática	
	Enzima extraída con cloruro de sodio al 3%	Enzima extraída con cloruro de sodio al 5%
r ₁	301.96	239.52
r ₂	307.37	227.27
r ₃	289.16	237.15
Ȳ	300.00	234.65

En la tabla 9, La concentración de cloruro de sodio al 3% tiene como promedio 300 de fuerza de coagulación siendo esta mayor con respecto a la concentración de cloruro de sodio al 5% teniendo como promedio 234,65 de fuerza de coagulación, esto nos da a conocer que a que a menor porcentaje de cloruro de sodio la solubilidad de las enzimas aumenta, disociándose en iones que se ligan a moléculas proteicas aumentando así la

fuerza de coagulación de la solución enzimática, del mismo modo a mayor concentración de cloruro de sodio logra reducir la solubilidad de las enzimas provocando la precipitación de las proteínas y por ende una disminución de la fuerza de la solución enzimática.

El presente trabajo de investigación presento que a menor porcentaje de cloruro de sodio para extraer la enzima da una mayor fuerza de coagulación, esto concuerda con Córdova (2009), Vitoria y Campos (1990), quienes mencionan, que la mejor extracción se logra con mínimos contenidos de sal debido a que hay una mejor solubilidad. Asimismo Córdova (2009) indica que la fuerza obtenida es baja, cuando se extrajo la enzima con 5% de cloruro de sodio. Asimismo Foltmann (2001) observo que al aumentar la cantidad de sales 6% para extraer la enzima, la fuerza y la estabilidad de la enzima disminuía debido a una menor solubilidad esto podría explicar, del porque la disminución de la fuerza de coagulación de cuando se incrementa la sal para extraer la enzima. Por tal motivo es el resultado de la fuerza baja obtenida cuando se extrae con 5% de sal.

Para extraer pepsina y quimosina se utilizó benzoato de Sodio al 0.1% como conservante químico cuyo efecto es inhibir carga microbiana deteriorante y patógena. Se tuvo en consideración la cantidad y concentración establecida de benzoato de sodio utilizado debido a que este conservante aparte de tener una acción antiséptica, anti fúngica; puede generar un aumento mucho mayor de la solubilidad de las enzimas generando la dilución de estas con efectos de mínima fuerza de coagulación hasta llegar a una ausencia; debido muy posible a una mayor solubilidad y concentración de las enzimas en la solución enzimática.

Del análisis de varianza tabla 14, se puede indicar que tiene diferencia altamente significativa el factor sal al utilizar concentraciones de 3% y 5 % de cloruro de sodio lo cual indica que el efecto del rango investigado es menos amplio al 3% hay mayor fuerza de coagulación lo cual también se indica mediante la mayor fuerza de coagulación.

4.2.2. PH de activación de la solución enzimática a pH 5,6 y 5,8 y evaluar la fuerza de coagulación

Las soluciones obtenidas filtradas después de extraer la enzima con 3% y 5% de cloruro de sodio, se activó cada solución enzimática, a dos pH ($pH_1= 5,6$ y $pH_2=5,8$) con fosfato di potásico al 98% permitiendo activar las enzimas con la finalidad de activar el zimógeno contenido en dicha solución enzimática, los resultados se muestra en la tabla 10 generando una mayor acción en la fuerza de coagulación y una mejor estabilidad enzimática.

Tabla 10: Fuerza de coagulación en la solución enzimática activada

pH de activación a 16°C	Solución enzimática	
	Enzima extraída con cloruro de sodio al 3%	Enzima extraída con cloruro de sodio al 5%
	Fuerza de coagulación	Fuerza de coagulación
r ₁ pH 5.6	349.85	290.56
pH 5.8	308.80	285.71
r ₂ pH 5.6	400.00	280.14
pH 5.8	383.38	279.28
r ₃ pH 5.6	363.59	288.14
pH 5.8	338.50	273.26
Ȳ pH 5.6	371.15	286.28
Ȳ pH 5.8	343.56	279.41

En la tabla 10 la solución enzimática extraídas al 3% de cloruro de sodio con pH_1 5,6 tiene un promedio de 371, 15 a pH_2 5,8 tiene promedio de 343.56; siendo mayor la fuerza de coagulación a este porcentaje de concentración y a un menor pH de activación; asimismo la solución enzimática extraída con 5% de cloruro de sodio a pH_1 de activación

de 5,6 tiene un promedio de 286,28 y a pH₂ de 5,8 presenta un promedio de 279.41 siendo mayor la fuerza de coagulación a pH menor específicamente a pH de 5,6

Mickelsen y Ernstrom (1992), que explican que la tasa de activación va aumentando y por ende se incrementa la fuerza al disminuir el pH. Del mismo modo Linden (2003), menciona que el zimógeno se transforma en enzima activa por un proceso autocatalítico acelerado por los iones H⁺, siendo el proceso muy dependiente del pH.

Los Resultados obtenidos en la tabla 10 muestran variaciones de fuerza de coagulación a diferentes activaciones las cuales indican que a pH de 5,6 con 3% de cloruro de sodio es más favorable para la fuerza de coagulación la cual presenta mayor fuerza de coagulación. Se podría concluir que la fuerza disminuye a medida que el pH descienda (figura 4), resultado por el cual probablemente, a estos valores de pH 5,8 y pH 5,6 la enzima esté acercándose a su punto isoeléctrico, referido a esto Badui (2006) menciona que la solubilidad de las proteínas es afectada por el pH de la solución, indicando que en el punto isoeléctrico, las proteínas presentan una solubilidad mínima.

Al cuajo líquido, se elevó el pH dentro del rango de estabilidad tal como recomienda Escobar (1992), quien señala que el pH del cuajo líquido debe estar dentro del rango de 5,4 a 5,8, favorable para la estabilización de la enzima, debido a que se tuvo en cuenta lo que mencionan Mahler y Cordes (1990), quienes señalan que la pepsina se desnaturaliza a valores de pH mayores de 6,0 y debido a esto, se perdería parte de la actividad enzimática y por ende una disminución de la fuerza.

Según estudios realizados Cordova 2009 indica que a pH de 4,8 de activación también hay fuerza de coagulación

En la figura 4 se indica las variaciones en la fuerza de coagulación frente a pH de activación de 5,6 y 5,8 extraídos con 3% y 5% de NaCl

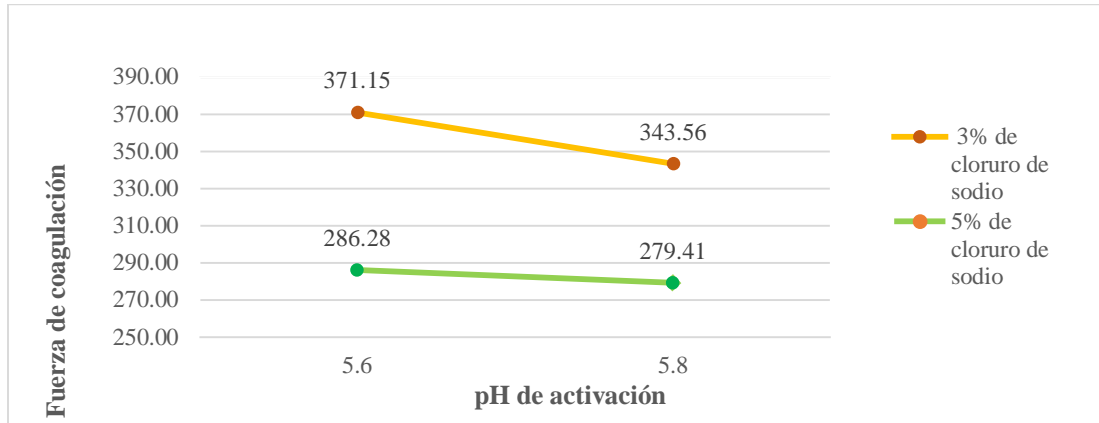


Figura 4: pH de activación de la solución enzimática

De la Figura 4 se deduce que a menor pH de activación hay mayor fuerza de coagulación. No hubo diferencia significativa en la fuerza de coagulación, con respecto a las soluciones activadas a pH₁ y a pH₂ debido a que tiene un efecto amplio en el rango de activación.

4.2.3. Temperatura de conservación de la solución enzimática y su fuerza de coagulación durante un mes de almacenamiento.

La solución enzimática se envasó en envases de vidrio ámbar y se almacenó a dos temperaturas de 7°C y -7°C durante un mes, asimismo en la tabla 11 se presentan los datos de la fuerza de coagulación durante el periodo de almacenamiento.

Tabla 11: Fuerza de coagulación de solución enzimática durante un mes de almacenamiento

Almacenamiento	Fuerza de coagulación		
	Días	Temperatura a 7°C	Temperatura a -7°C
	1	371.15	371.15
	4	371.15	371.12
	7	371.13	371.08
	10	371.12	370.07
	13	371.12	370.05
	16	371.10	370.03
	19	371.08	369.97
	22	371.05	369.93
	25	371.00	368.88
	28	370.99	368.82
	31	370.99	368.78

Según Alais (2003), las soluciones de quimosina y pepsina tienen su estabilidad óptima a pH entre 5,3 a 6,3 y decrece su estabilidad por debajo de 5,3 y muy rápidamente por encima de pH 6,5 esto hace referencia a la disminución con mayor estabilidad de la fuerza de coagulación de cuajo líquido durante el transcurso del tiempo de almacenamiento.

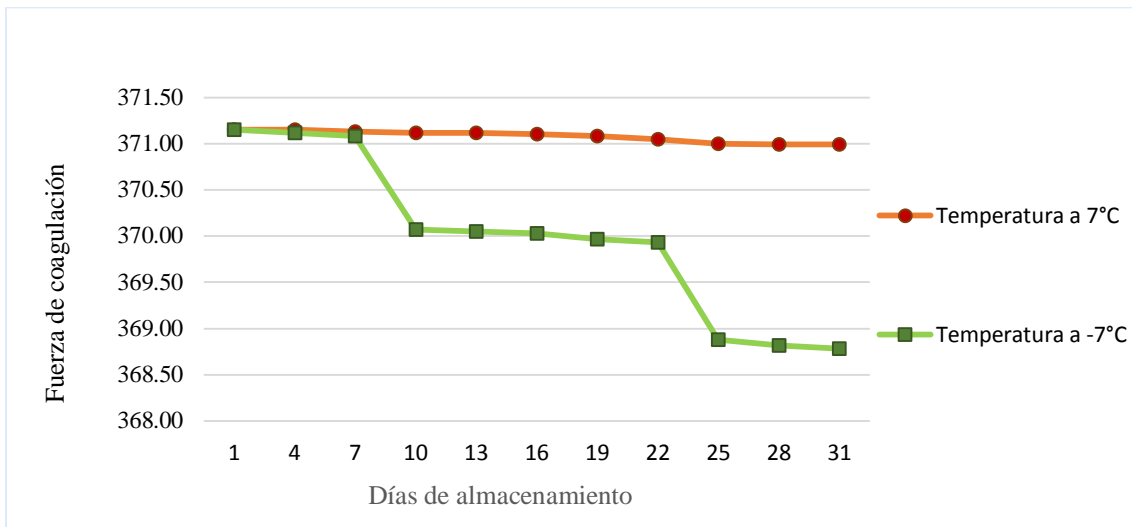


Figura 5: Efecto de la fuerza de coagulación de la solución enzimática durante su almacenamiento

Kosikowski (2004), menciona que la fuerza exclusivamente proveniente de la actividad de la quimosina se deteriora un 1% mensual, cuando se almacena a una temperatura baja, en oscuridad y en envase oscuro, lo que también probablemente ocurrió en la presente investigación.

Como se muestra en la figura 5, el cuajo líquido almacenado a temperatura de 7 y -7°C, a T° de 7°C ocasionó una pérdida menor de fuerza de coagulación de solución enzimática a diferencia de T° de -7 °C ocasiono una perdida mayor de fuerza de coagulación de solución enzimática a causa de la ruptura de la pared celular y por la generación de peróxidos de hidrogeno. Covacevich (1993), menciona que la actividad enzimática del cuajo líquido es afectada por las temperaturas de congelación y por ende ocasiona una disminución de la fuerza.

Según estudios realizados no se concuerda con Córdova 2009 el cual indica que a temperatura de congelación durante su conservación hay mayor fuerza de coagulación durante su almacenamiento.

En el siguiente flujograma expresado en la figura 6 se indica la definición del proceso a seguir para obtener y conservar la solución enzimática.

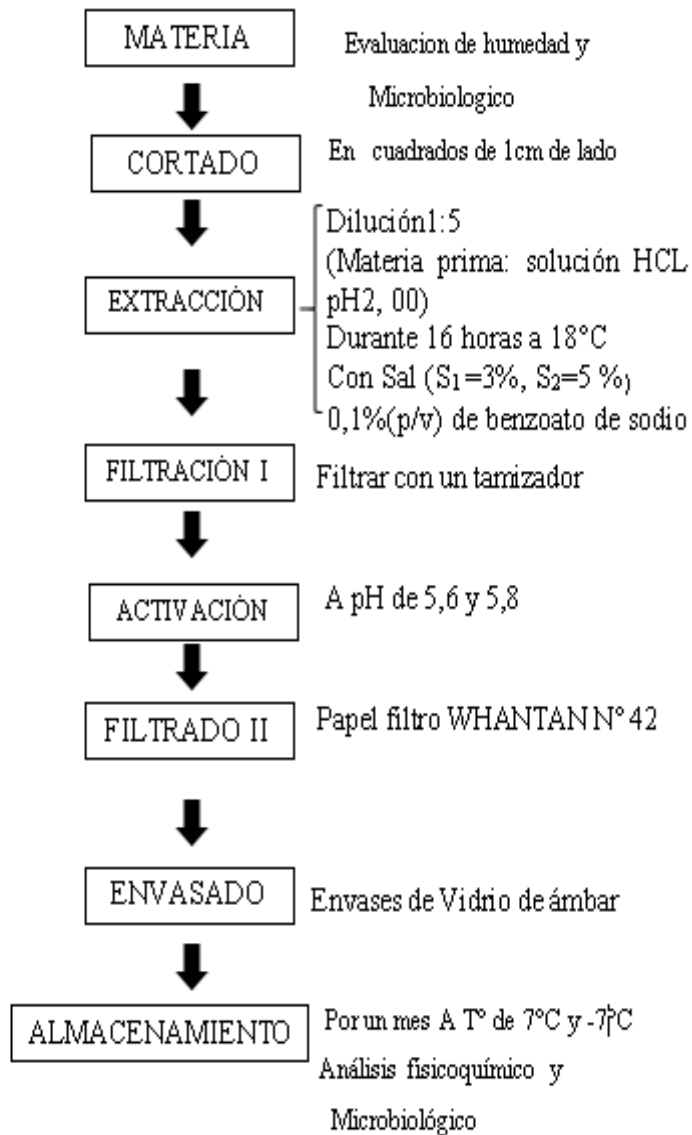


Figura 6. Proceso de obtención y conservación de cuajo líquido o solución enzimática

El proceso de obtención de la solución enzimática consta de los siguientes procesos:

- a. Materia prima. La materia prima fue abomaso seco de bovino de edad adulta.
- b. Cortado. Se realizó con cuchillo de acero inoxidable, se cortó el abomaso seco en cuadrados de 1 cm de lado como recomienda Córdova (2009). Esta operación se realizó con la finalidad de facilitar la extracción de la enzima.

- c. Extracción. *Sal*; se efectuó con 3% y 5% (p/v) la dilución se hizo en la relación de 1:5 (Materia prima trozada: solución ácido clorhídrico pH 2,0 0,003M previamente establecida), además benzoato de sodio, se utilizó como conservante para la solución enzimática en una proporción de 0,1% (p/v) tal como recomienda Campos (2010).
- d. Filtrado I. Se realizó en forma manual con un paño de trama fina (organza) para eliminar los tejidos (partes de abomasos húmedos) y el mucílago, procedentes de la etapa de extracción.
- e. Activación. pH; se efectuó a dos niveles de 5,6 y 5,8; pH que están en el rango para activar la solución enzimática.
- f. Filtrado II. Esta etapa se realizó con un papel filtro WHATMAN N°42 con la finalidad de eliminar remanentes impurezas de mucílago procedentes de las etapas anteriores y que la solución enzimática (cuajo líquido) esté libre de partículas extrañas.
- g. Envasado. Fue envasado en envases de frascos de vidrio ámbar con la finalidad de evitar pérdidas de enzimas.
- h. Almacenamiento. Se tomó en consideración dos temperaturas de 7°C, -7°C, por el período de un mes.

4.3. Análisis fisicoquímico y microbiológico de la solución enzimática (cuajo líquido) obtenida y conservada con mayor fuerza de coagulación

Se realizó un análisis fisicoquímico y microbiológico a la solución enzimática obtenida la cual se describen a continuación:

4.3.1. Resultado de análisis fisicoquímico de la solución enzimática obtenida y conservada

Tabla 12. Análisis fisicoquímico de la solución enzimática obtenida y conservada

Análisis	Cuajo liquido obtenido
Fuerza de coagulación (US)	1:371.00
Solidos totales	14.4741
Densidad(g/ml)	1.008
pH(5.600
Salinidad	3.000
Temperatura de conservación	7°C

La tabla 12 indica que la solución enzimática obtuvo una fuerza de coagulación de 371,00 lo que indica que 1 mL de cuajo es capaz de coagular aproximadamente 371,00 ml de leche. El valor obtenido es bastante inferior a lo señalado por Alais (2003), que le otorga una fuerza a los cuajos líquidos comerciales entre 2000 y 5000, la diferencia se explicaría por el tipo de abomaso que se utilizó para la extracción de la enzima, el abomaso utilizado fue a partir de animales adultos, en cambio el enunciado hace referencia a cuajos líquidos obtenidos a partir de animales recién nacidos, la fuerza obtenida es muy similar a la lograda por Jarpa y Retamal (1985), además mencionan que los cuajos extraídos de animales adultos tienen fuerzas bajas a comparación de las fuerzas estándar para los cuajos líquidos señalados por Alais (2003). Por otra parte, se considera la edad de los bovinos sacrificados de donde se obtuvieron los abomasos secos, puesto que a la adultez

del animal disminuye la proporción de quimosina y pepsina con respecto a un abomaso de bovino recién nacido.

La densidad del cuajo líquido fue de 1,008 g/ml, valor que no alcanza los límites recomendados por Córdova (2009) el cual varía entre 1,12- 1,14g/ml para corregir tal defecto se debe incrementar la cantidad de abomaso en la extracción, además teniendo en cuenta los parámetros con que se trabajaron para extraer la enzima, esto podría ser la explicación del porque se obtuvo una densidad baja.

El pH de 5.6 es el óptimo para el cuajo líquido obtenido, donde la actividad enzimática no se verá afectada concordando con Sancor (2002), quien establece un rango de 5,2- 5,8 para los cuajos líquidos. También señala que la pepsina se desnaturaliza a valores de pH mayores de 6 y parte de la fuerza de coagulación se perdería y motivo por el cual se dio la estabilidad a ese.

4.3.2. Resultados de análisis microbiológicos del cuajo líquido de bovino Solución enzimática preparada (adicionando HCl, NaCl, conservante (Benzoato de Sodio))

Los resultados expresados como promedios de cinco repeticiones se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 13. Análisis Microbiológico De Cuajo Líquido Obtenido Y Conservado

Muestra	<i>Salmonella</i> (UFC/g)	<i>Clostridium</i> <i>m sp</i>	<i>E. Coli</i>	<i>Aerobias Mesofilos</i> (UFC/g)	<i>S. aureus</i> (UFC/g)
Cuajo líquido	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	10 ²

En la tabla 13 se muestra los resultados obtenidos indicándonos que estos cuajos preparados contienen una carga microbiana muy baja y en la mayoría Ausencia cumpliendo con los parámetros y rangos microbiológicos establecidos en la norma sanitaria, siendo este producto apto para ser usado en la elaboración del queso.

Esta caracterización nos determina que la adición del conservante benzoato de sodio contribuyo para la no presencia de *Salmonella spp* y una minimización de la carga microbiana restante.

Este resultado microbiológico que comparado con el resultado del cuajo seco sin adicionar el conservante, HCl y ClNa, demuestra que hay una perdida microbiana importante, lo que garantizara la conservación del cuajo, así como su inocuidad en la elaboración del queso.

En cuanto a la Temperatura de almacenamiento del cuajo líquido preparado (-7 °C) es importante recalcar que se observó efectos bactericidas durante la descongelación a temperaturas 14 °C a 17 °C, por efectos de ruptura de la pared celular y por la generación de peróxidos de hidrogeno el cual tiene efectos bactericida.

Con referencia al pH, hubo un efecto negativo de desarrollo de la *Salmonella spp*, ya que esta bacteria se desarrolla en pH Alcalinos mayores a pH 7. Con respecto al Benzoato de Sodio, este ejerce una actividad negativa para el desarrollo de bacterias, debido a la acción antiséptica de la sal, provocando perdida de la actividad de agua (Aw) llegando a valores menores a AW 0,80, que no permite el desarrollo de bacterias.

4.4. Resultados del diseño experimental y estadístico

El estudio tiene como Factorial 2 A X 2B X 2C en un diseño completamente al azar.

A: Sal: $a_1 = 3\%$, $a_2 = 5\%$.

B: pH: $b_1 = 5.6$ $b_2 = 5.8$.

C: T°: $C_1 = -7^\circ\text{C}$, $C_2 = 7^\circ\text{C}$

Tabla 14: Análisis de varianza del factorial 2A x 2B x 2C

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	de Cuadrado medio	$F_{\text{calculado}}$	F_{tabular}	Pr>F	
A	1	36420.58	36420.58	81.13**	4.49 8.68	<.0001	
B	1	464.72	464.72	1.04 ns	4.49 8.68	0.3442	
C	1	34.48	34.48	0.08 ns	4.49 8.68	0.7852	
AB	1	1058.81	1058.81	2.36 ns	4.49 8.68	0.1441	
AC	1	5.53	5.53	0.01 ns	4.49 8.68	0.9129	
BC	1	96.44	96.44	0.21 ns	4.49 8.68	0.6493	
ABC	1	13.36	13.36	0.03 ns	4.49 8.68	0.8652	
Error	16	7182.75	448.92				
Total	23	45276.71					
$R^2 = 0.8414$		$CV = 6.62\%$		$\bar{y}_{...} = 323.00$			

Zona de rechazo: Rechazar la H_0 si: $F.C > f$ (G.L; Error), al nivel de significancia alfa ($\alpha=5\%$)

La tabla 14 muestra el análisis de varianza para la factorial 2A x 2B x 2C, se observa que hay diferencias altamente significativas para el factor A, lo cual indica que hay diferencias reales entre los promedios de los dos niveles a_1 y a_2 .

No se ha encontrado diferencias significativas para los factores B y C, así como para ninguna de las interacciones.

El coeficiente de variabilidad es de 6.62%, lo que nos indica que es un valor bajo y que se ha conducido eficiente mente el experimento.

Prueba múltiple de Diferencia Mínima Significativa o LSD Limite Significación para el factor A, nos indica que con el nivel $a_1= 352.00$, 3% de sal se ha obtenido mayor respuesta que con el nivel $a_2= 286.12$, que es con 5% de sal. Asimismo para el factor B nos indica que con el nivel $b_1=315.52$, los promedios no difieren significativamente; pero con el nivel b_1 , se tiene mayor promedio. De igual manera con el factor C, el nivel c_1 ocupa el primer lugar con un promedio de 321.12. En segundo lugar se halla con el nivel c_2 con 318.72. Esto significa que tanto los parámetros comparados tanto de pH y temperatura no tienen influencia en la respuesta del presente experimento.

En la tabla 15 se muestra los tratamientos respectivas repeticiones y su fuerza de coagulación

Tabla 15. Fuerza de coagulación de los tratamientos

TRATAMIENTOS	Repetición 1	Repetición 2	Repetición 3
Y ₁	349.69	399.84	363.44
Y ₂	347.65	397.40	361.29
Y ₃	308.64	383.23	338.34
Y ₄	307.65	382.18	337.10
Y ₅	285.56	279.12	273.11
Y ₆	284.61	277.78	272.16
Y ₇	290.40	280.18	288.14
Y ₈	289.58	279.23	286.74

En la tabla 16 se muestra el promedio de los tratamientos según la fuerza de coagulación que presento cada tratamiento.

Tabla 16: Promedio de la fuerza de coagulación en tratamientos

Tratamientos	Comparaciones de la obtención y conservación de cuajo	repeticiones	Promedio
Y ₁	a ₁ b ₁ c ₁	3	371.00
Y ₂	a ₁ b ₁ c ₂	3	368.78
Y ₃	a ₁ b ₂ c ₁	3	343.40
Y ₄	a ₁ b ₂ c ₂	3	342.46
Y ₅	a ₂ b ₁ c ₁	3	286.12
Y ₆	a ₂ b ₁ c ₂	3	285.18
Y ₇	a ₂ b ₂ c ₁	3	279.26
Y ₈	a ₂ b ₂ c ₂	3	278.43

Tabla 17. Diferencia significativa entre los tratamientos

Grados de libertad	Valor de promedio	Tabla Duncan	A.L.S
16	3	2,87	2.76
16	2	3,02	3.74

Existe diferencia significativa entre los tratamientos, por el cual el mejor tratamiento corresponde al tratamiento numero1 con una fuerza de coagulación de 371.00 (Y₁ =S₁ pH₁T₁).

CAPITULO V

V. CONCLUSIONES

Al finalizar el presente trabajo de estudio se llegó a las siguientes conclusiones:

- La obtención de solución enzimática en la Provincia de Cajamarca es con solución de ácido clorhídrico a un pH de 2,00; con parámetros de 3% de cloruro de sodio en la extracción; 5,6 de pH en la activación y 7°C en temperatura conservación.
- La solución enzimática obtuvo una fuerza de coagulación de 371,00 lo que indica que 1 ml de cuajo obtenido es capaz de coagular 371.00 ml de leche.
- La solución enzimática presenta fisicoquímicamente una densidad de 1.008 g/ml con sólidos totales de 14,474(%); salinidad de 3,000%; pH 5,6 a T° de 7°C y microbiológicamente presenta Ausencia en *Salmonella*, *Clostridium sp*, *Aerobios Mesofilos*, *E. Coli*, y con 10^1 UFC/g de *S. aureus*.
- La materia prima es tiene 15.29 %de humedad y 84.71% de materia seca.

VI. RECOMENDACIONES

Al finalizar la presente investigación se hacen las siguientes recomendaciones:

- Realizar otra investigación teniendo como base esta investigación evaluando con soluciones de ácido cítrico reemplazando al ácido clorhídrico.
- Realizar tratamientos para obtener cuajo en polvo a partir del abomaso de bovino criollo, prologando la durabilidad del cuajo sin afectar la fuerza de coagulación.
- Para minimizar la carga bacteriana indeseable presente en el cuajo líquido se debe realizar una micro filtración, reemplazando al proceso de filtración II el cual fue realizado con papel filtro WANTHAN N° 42 no siendo suficiente para eliminar toda la carga bacteriana a diferencia de una micro filtración la cual ayudara a eliminar todas las bacterias patógenas que afectan en el almacenamiento y por ende en la fuerza de coagulación
- Evaluar la concentración de enzima (quimosina) en la solución enzimática (cuajo líquido)

CAPITULO VI

VII. REFERENCIA BIBLIOGRAFICA

Alais, c. 2003. *Ciencia de la Leche: Principios de Técnica Lechera*. 4 ed. Editorial Reverté S.A. Barcelona, España. 873 p-191p

Aran, s. (2006). *Industrias lácteas*. Yagues. Quinta edición. España.

Alais Ch. (2003) *Ciencia de la leche*. 5a ed. Continental. México DF, 150.

Dergal, S. B., Rodriguez, H. B., & Morales, A. A. (1981). *Química de los alimentos*. 4ª Ed. Pearson Educación México DF. (p. 123). Alhambra. Recuperado el 29 de mayo de 2018 <http://madejaseinsumos.com/descargables/Quimica%20de%20los%20alimentos>

Badui, D.S. (2008) *Química de los Alimentos*. Cuarta edición. Ed. Pearson Addison-Wesley. México DF.

Calvo. M. 2011. *Bioquímica de los alimentos*. Tomo I. Editorial, Contreras, Colombia. pp 23 - 45.

Caal Martínez, G. M. (2015). *Extracción de la quimosina producida de forma natural a través del cuarto estómago de ternero a partir de diferentes tiempos de extracción y edades del bovino a escala laboratorio* (Doctoral, Universidad de San Carlos de Guatemala).

Campos C. (2010) *Obtención de cuajo en polvo a partir de abomasos de cabrito* (Capra sp.). Tesis para optar el título profesional de Ingeniero en Industrias Alimentarias. UNALM. Lima.

Córdova Ramos, J. S. (2009). *Determinación de parámetros para obtención y conservación de cuajo de bovino adulto*. Tesis, Universidad Nacional del Centro del Perú de Huancayo.94

Córdova, J. S., y Paitan, E. (2014). *Determination of parameters for obtaining and conservation of adult bovine rennet*. Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

- Córdova, J. S., & Paitan, E. (2013). *Determinación de parámetros para obtención y conservación de cuajo de bovino adulto*. *Ciencia e Investigación*, 16(1), 9-11.
- Correa, H. J. (2006). *Estudio del desarrollo de los Estómagos de los Rumiantes* *Livestock Research for Rural Development*, 18(6), 326-335.
- Dubach, J. (2000). *El ABC para la quesería rural del Ecuador*. Ecuador. FAO. 90.
- Eck, A., y Mestres Lagarriga, J. (1990). El queso.
- FAO OMS 2003 *Organización de las naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación Organización Mundial de la Salud. Garantía de los Alimentos: Directrices para el Fortalecimiento de los Sistemas Nacionales de Control de los Alimentos*. Roma. FAO, Estudios Alimentación y Nutrición, 76. Disponible en <http://www.fao.org/docrep/006/y8705s/y8705s00s.htm>
- FDA.2008.*Codex Alimentarius*. Codex Stan 221,2008.
- Ferrandini, E. 2006. *Elaboracion de queso de murcia al vino con cuajo natural en pasta*. Tesis de grado Doctoral. Facultad de Veterinaria, Universidad de Murcia. Murcia, España. Pp 17-50.
- Ferrandini E., Castillo M., López M.B., Laencina J. (2006) *Estructura de la micela de caseína*. *Anales de Veterinaria (Murcia)* 22: 5-18
- Ferrandini E. López, M. Laencina, J. Castillo, M. Roca, J. López, C. Rodriguez, M. (2007) *Cuajos en pasta naturales en la industria quesera*. Informe Técnico Departamento de Tecnología de Alimentos, Nutrición y Bromatología. Universidad de Murcia, España. Murcia 27-32 9.
- Ferrandini E., Castillo M., López M.B., Laencina J. (2006) *Estructura de la micela de caseína*. *Anales de Veterinaria (Murcia)* 22: 5-18
- Fox P.F. and McSweeney P.L.H. (1998). *Milk Proteins en Dairy Chemistry and Biochemistry*. Published by Blackie Academic y Professional, Thomson Science, London SE1 SHN, UK. pp 146-237.
- González, M. 2002. *Tecnología para la elaboración de queso blanco, amarillo y yogurt*. Veraguas, Panamá. Páginas PDF.

- Jarpa, J. y Retamal, E. (1985). *Efecto de la pasteurización, adición de fermento láctico y de cuajo en la calidad microbiológica y organoléptica del queso de cabra*. Tesis Ing. Agr., Santiago. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales. Escuela de Agronomía. 186.
- Linden, G. (2003). *Principales usos de las enzimas en la industria lechera*. In: Actualización de resúmenes de las conferencias. Laboratorio de Bioquímica Aplicada. Universidad de Nancy.
- Linden G, Lorient D. 1996. *Revalorización alimentaria de la producción agrícola*. 1ª ed. Bioquímica agroindustrial acribia. Zaragoza.
- Mosell, F., y Quevedo. (2010). *Métodos microbiológicos*. Facultad de Farmacia y Bioquímica de la U.N.M.S.M. Lima.
- Moschopoulou E, (2011). *Characteristics of rennet and other enzymes from small ruminants used in cheese production*. *Small Ruminant Research*, 101, 188-195
- Minsa, (2008). *Norma Sanitaria que establece los criterios microbiológicos de calidad sanitaria e inocuidad para alimentos y bebidas de consumo humano vísceras de bovino y cuajos*.
<https://www.saludarequipa.gob.pe/desa/.../Normas.../RM591MINSANORMA.pdf>
- Pouch, F. *compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. APHA.4th edition 2001.
- Quijano Velasco J. (2010) *Quimosinas*. Ed. *Recite IA*. Cali, Valle, Colombia. Recuperado el 29 de febrero de 2018 de <https://books.google.com.pe/books?id=K-souR1jtE8C>
- Rivera Guerra, V. (2012). *Evaluación de distintos cuajos naturales y procesados (Bovinos, ovinos y cuy) para la realización de queso fresco*. Tesis Ing.Riobamba- Ecuador,Escuela Superior Pontifica de Chimborazo.140
- Ruiz, J. (2005). *Extracción y caracterización de proteasas de especies vegetales nativas y su potencial utilización en quesería*, Tesis. Universidad Austral de Chile. Valdivia, Chile.

- SENAMHI (*Servicios nacionales de Meteorología e Hidrología del Perú*).2018
dirección Regional Senamhi-Cajamarca. Disponible
en:<https://www.senamhi.gob.pe/main.php?p=pronosticodetalle&dp=cajamarca&localidad=0011>
- Technoserve Business Solutions to Rural poverty.(2004).*Estudio Subsectorial Carnes de Vacuno y Ovino en la provincia de Cajamarca*.40(10)
- Vitoria, J. C., Sojo, A., & Rodriguez-Soriano, J. (1990). Changing pattern of cow's milk protein intolerance. *Acta Pædiatrica*, 79(5), 566-567.
- Visser, S. (1993). *Proteolytic enzymes and their relation to cheese ripening and flavor: an overview*. *Journal of Dairy Science*, 76(1), 329-35.
- Walstra, P., Claudi-Magnussen, C., Chevillon, P., Von Seth, G., Diestre, A., Matthews, K. R. & Bonneau, M. (1999). An international study on the importance of androstenone and skatole for boar taint: levels of androstenone and skatole by country and season. *Livestock production science*, 62(1), 15-28.
- Walstra, P. (1999). Casein sub-micelles: do they exist? *International Dairy Journal*, 9(3-6), 189-192.
- Wolfgang Aehle (2007). *Enzymes in Industry. Production and Applications*. 3^o Edition. Ed. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.

VIII. ANEXOS GENERALES

Tabla 18. Tablas *del Número Más Probable (NMP)*

Las tablas *del Número Más Probable (NMP) e intervalo de confianza a nivel de 95% de probabilidades* para diversas combinaciones de tubos positivos en series de tres o

Combinaciones de tubos +	Serie de 3 tubos Intervalo de confianza (95%)			Serie de 5 tubos Intervalo de confianza (95%)		
	NMP/C	Mínimo	Máximo	NMP/C	Mínimo	Máximo
0-0-0	<0,03	<0,005	<0,09	<0,02	<0,005	<0,07
0-0-1	0,03	<0,005	0,09	0,02	<0,005	0,07
0-1-0	0,03	<0,005	0,13	0,02	<0,005	0,07
0-2-0	-	-	-	0,04	<0,005	0,11
1-0-0	0,04	<0,005	0,20	0,02	<0,005	0,17
1-0-1	0,07	0,01	0,21	0,04	<0,005	0,11
1-1-0	0,07	0,01	0,23	0,04	<0,005	0,11
1-1-1	0,11	0,03	0,36	0,06	<0,005	0,15
1-2-0	0,11	0,03	0,36	0,06	<0,005	0,15
2-0-0	0,09	0,01	0,36	0,05	<0,005	0,13
2-0-1	0,14	0,03	0,37	0,07	0,01	0,17
2-1-0	0,15	0,03	0,44	0,07	0,01	0,17
2-1-1	0,2	0,07	0,89	0,09	0,02	0,21
2-2-0	0,21	0,04	0,47	0,09	0,02	0,21
2-2-1	0,28	0,10	1,50	-	-	-
2-3-0	-	-	-	0,12	0,03	0,28
3-0-0	0,23	0,04	1,20	0,08	0,01	0,19
3-0-1	0,39	0,07	1,30	0,11	0,02	0,25
3-0-2	0,64	0,15	3,80	-	-	-
3-1-0	0,43	0,07	2,10	0,11	0,02	0,25
3-1-1	0,75	0,14	2,30	0,14	0,04	0,34
3-1-2	1,20	0,30	3,80	-	-	-
3-2-0	0,93	0,15	3,80	0,14	0,04	0,34
3-2-1	1,5	0,30	4,40	0,17	0,05	0,46
3-2-2	2,1	0,35	4,70	-	-	-
3-3-0	2,4	0,36	13,0	-	-	-
3-3-1	4,6	0,71	24,0	-	-	-
3-3-2	11,0	1,50	48,0	-	-	-
3-3-3	≥24	>1,50	>48,0	-	-	-
4-0-0	-	-	-	0,13	0,03	0,31

4 -0-1	-	0,17	0,05	0,46
4 -1-0	-	1,17	0,05	0,46
4 -1-1	-	0,21	0,07	0,46
4-1-2	-	0,26	0,09	0,63
4-2-0	-	0,22	0,07	0,76
4-2-1	-	0,26	0,09	0,78
4-3-0	-	0,27	0,09	0,80
4-3-1	-	0,33	0,09	0,93
4-4-0	-	0,34	0,07	0,93
5-0-0	-	0,23	0,11	0,70
5-0-1	-	0,31	0,12	0,89
5-0-2	-	0,43	0,07	1,14
5-1-0	-	0,33	0,11	0,93
5-1-1	-	0,46	0,16	1,2
5-1-2	-	0,63	0,21	1,5
5-3-0		0,49	0,17	1,3
5-3-1		0,700,94	0,23	1,7
5-3-2		0,79	0,28	2,2
5-3-3		1,10	0,25	1,9
5-4-0		1,40	0,31	2,5
5-4-1		1,80	0,37	3,4
5-4-2		1,30	0,44	5,00
5-4-3		1,70	0,35	3,0
5-4-4		2,20	0,43	4,9
5-5-0		2,80	0,57	7,0
5-5-1		2,80	0,90	8,5
5-5-1		3,50	1,20	10,0
5-5-2		2,40	0,68	7,5
5-5-3		3,50	1,20	10,0
5-5-3		5,40	1,80	14,0
5-5-4		9,20	3,00	32,0
5-5-5		16,09	6,40	58,0

cinco tubos. La cantidad inoculada de la muestra: 10.0- 1,0 g o ml (Manual Bacteriológica Analítica. Estados Unidos. 1984).

Fotos de materiales y procesos en la elaboración de cuajo líquido



Figura 7: material de laboratorio (vasos Erlenmeyer, matraz, pipeta y probeta)



Figura 8: Material Microbiológico



Figura 9: Papel filtro N° 42



Figura 10: pH metro y solución de HCl a pH 2.0

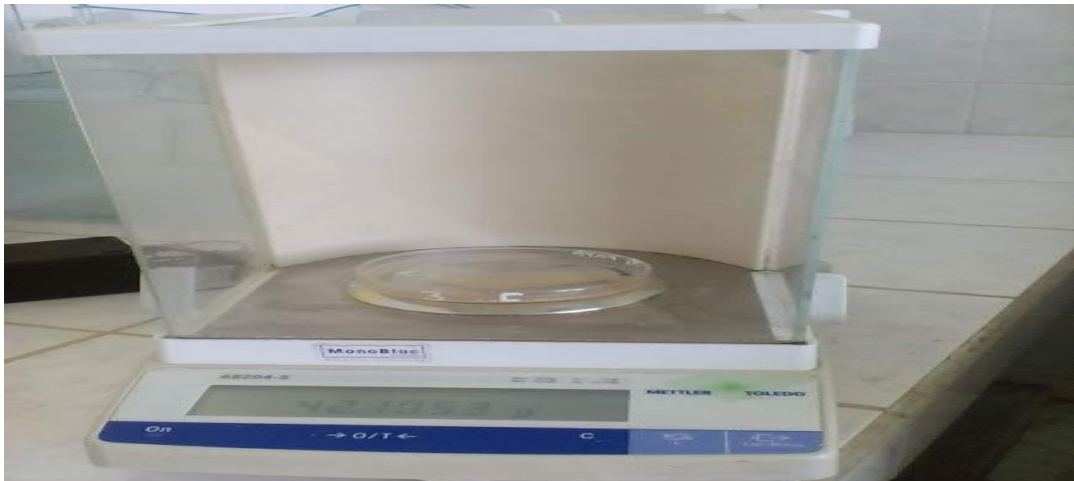


Figura 11: Balanza de precisión



Figura 12: ácido clorhídrico concentrado 37%



Figura 13: Insumos (cloruro de Sodio, benzoato de sodio)



Figura 14: Esterilización del Material



Figura 15: Abomaso



Figura 16: Abomaso Seco



Figura 17: Abomaso cortado



Figura 18: Extracción de solución enzimática



Figura 19: Filtración I



Figura 20: Activación de la enzima



Figura 21: Filtración II



Figura 22: filtración II con papel Whatman N° 42



Figura 23: Esterilización de envases de vidrio ámbar



Figura 24. Envasado



Figura 25: Almacenado



Figura 26: Fuerza de coagulación después de filtración I



Figura 27. Fuerza de coagulación después de filtración II



Figura 28: Fuerza de coagulación después de activación



Figura 29: Material microbiológico



Figura 30: Siembra microbiológica

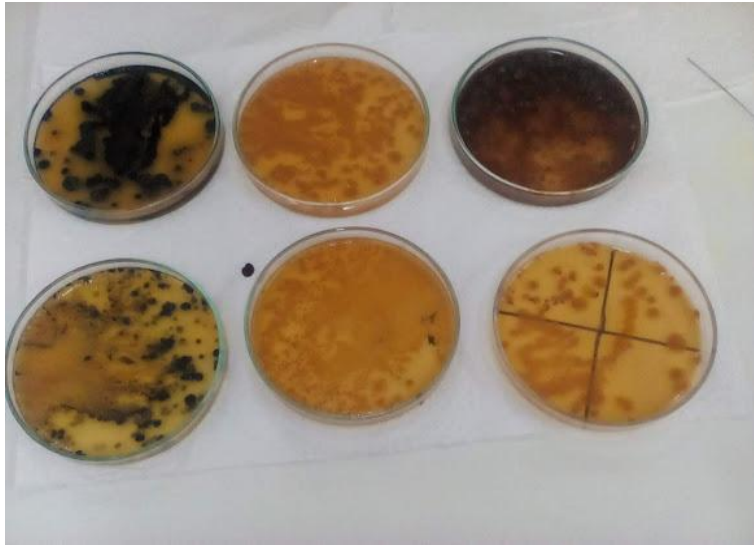


Figura 31: Recuento De Microorganismos

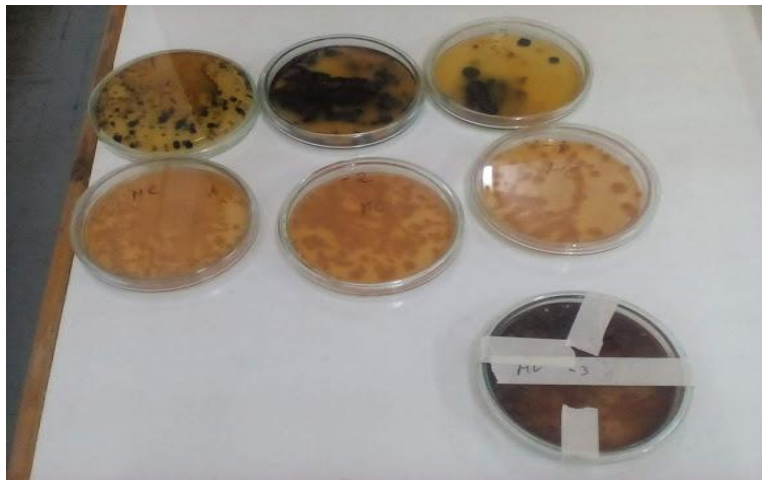


Figura 32: Muestras con Baterías desarrolladas

Rendimiento y costos de la solución enzimática:*Tabla 19: Rendimiento y costos para la obtención de 400ml de solución enzimática.*

REQUERIMIENTO DESCRIPCIÓN		UNIDAD MEDIDA	PRECIO UNITARIO (S/.)	CANTIDAD	TOTAL (S/.)
Materia prima	Abomaso seco	kilogramo	15,000	0,100	1,50
Insumos	HCl	ml	0,077	35,000	2,70
	Sal	kilogramo	0,500	0,015	0,01
Conservante	Benzoato de sodio	gramo	0,048	0,500	0,02
Envase	Envase de vidrio x 50 mL	Unidad	2.50	8	20,00
Costo total					24,23
Costo por unidad (S/.)					3,03

Presupuesto

En la tabla 19 se describe el presupuesto invertido en el trabajo de investigación

Tabla 20. Presupuesto del trabajo de investigación

DESCRIPCIÓN BIENES	DETALLE	COSTO TOTAL
Materiales de escritorio	Papel, marcadores, lapiceros	30.00
Materiales de elaboración	Abomaso de bovino , leche, ácido clorhídrico, cloruro de sodio(sal), placas Petri, agar nutritivo y agar de recuento envases,	1100.00
Material para procesar datos	USB, tinta para impresora	200.00
SERVICIOS		
Movilidad, alimentación, estadía	Traslado a Universidad Nacional de Cajamarca	700.00
Fotocopias	Copias de proyecto y tesis	150.00
TOTAL (S/.)		2180