



Universidad de San Carlos de Guatemala
Facultad de Ingeniería
Escuela de Ingeniería Química

**EXTRACCIÓN Y CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE QUIMOSINA
BOVINA PARA PRODUCCIÓN DE CUAJO, SOMETIDA A VARIACIÓN
TÉRMICA Y DE pH, A ESCALA LABORATORIO**

Vivian María Cano Salazar

Asesorado por la Inga. Telma Maricela Cano Morales
y el Ing. Mario José Mérida Meré

Guatemala, mayo de 2015

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA



FACULTAD DE INGENIERÍA

**EXTRACCIÓN Y CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE QUIMOSINA
BOVINA PARA PRODUCCIÓN DE CUAJO, SOMETIDA A VARIACIÓN
TÉRMICA Y DE pH, A ESCALA LABORATORIO**

TRABAJO DE GRADUACIÓN

PRESENTADO A LA JUNTA DIRECTIVA DE LA
FACULTAD DE INGENIERÍA
POR

VIVIAN MARÍA CANO SALAZAR

ASESORADO POR LA INGA. TELMA MARICELA CANO MORALES Y
EL ING. MARIO JOSÉ MÉRIDA MERÉ

AL CONFERÍRSELE EL TÍTULO DE

INGENIERA QUÍMICA

GUATEMALA, MAYO DE 2015

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE INGENIERÍA



NÓMINA DE JUNTA DIRECTIVA

| | |
|------------|--|
| DECANO | Ing. Angel Roberto Sic García |
| VOCAL I | |
| VOCAL II | Ing. Pablo Christian de León Rodríguez |
| VOCAL III | Inga. Elvia Miriam Ruballos Samayoa |
| VOCAL IV | Br. Narda Lucía Pacay Barrientos |
| VOCAL V | Br. Walter Rafael Véliz Muñoz |
| SECRETARIO | Ing. Hugo Humberto Rivera Pérez |

TRIBUNAL QUE PRACTICÓ EL EXAMEN GENERAL PRIVADO

| | |
|------------|----------------------------------|
| DECANO | Ing. Murphy Olympto Paiz Recinos |
| EXAMINADOR | Ing. Otto Raúl de León de Paz |
| EXAMINADOR | Ing. Erwin Manuel Ortiz Castillo |
| EXAMINADOR | Ing. Carlos Salvador Wong Davi |
| SECRETARIO | Ing. Hugo Humberto Rivera Pérez |

HONORABLE TRIBUNAL EXAMINADOR

En cumplimiento con los preceptos que establece la ley de la Universidad de San Carlos de Guatemala, presento a su consideración mi trabajo de graduación titulado:

EXTRACCIÓN Y CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE QUIMOSINA BOVINA PARA PRODUCCIÓN DE CUAJO, SOMETIDA A VARIACIÓN TÉRMICA Y DE pH, A ESCALA LABORATORIO

Tema que me fuera asignado por la Dirección de la Escuela de Ingeniería Química, con fecha 11 de septiembre de 2013.

Vivian María Cano Salazar



Guatemala, 14 de Enero de 2015

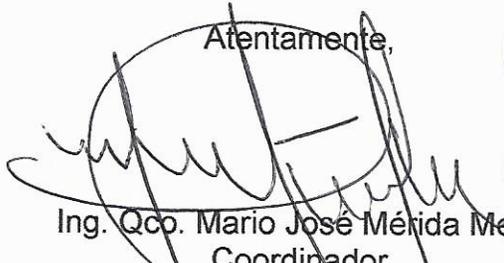
Ingeniero
Victor Manuel Monzón Valdez
Director Escuela de Ingeniería Química
Facultad de Ingeniería
Universidad de San Carlos de Guatemala
Presente.

Ingeniero Monzón:

Por medio de la presente HACEMOS CONSTAR que hemos revisado y dado nuestra aprobación al Informe Final del trabajo de graduación titulado **“EXTRACCIÓN Y CARACTERIZACIÓN FISICOQUÍMICA DE QUIMOSINA BOVINA PARA PRODUCCIÓN DE CUAJO, SOMETIDA A VARIACIÓN TÉRMICA Y DE pH, A ESCALA LABORATORIO”**, de la estudiante de Ingeniería Química Vivian María Cano Salazar quien se identifica con el carné número 2005-12129.

Sin otro particular me suscribo de usted.

Atentamente,


Ing. Qco. Mario José Mérida Méndez
Coordinador
Laboratorio de Investigación
de Extractos Vegetales –LIEXVE–
Asesor




Inga. Qca. Telma Maricela Cano Morales
Directora
Centro de Investigaciones de Ingeniería / CII
Asesora



Guatemala, 06 de abril de 2015.
Ref. EIQ.TG-IF.017.2015.

Ingeniero
Víctor Manuel Monzón Valdez
DIRECTOR
Escuela de Ingeniería Química
Facultad de Ingeniería

Estimado Ingeniero Monzón:

Como consta en el registro de evaluación del informe final EIQ-PRO-REG-007 correlativo **093-2013** le informo que reunidos los Miembros de la Terna nombrada por la Escuela de Ingeniería Química, se practicó la revisión del:

INFORME FINAL DE TRABAJO DE GRADUACIÓN

Solicitado por la estudiante universitaria: **Vivian María Cano Salazar**.
Identificada con número de carné: **2005-12129**.
Previo a optar al título de **INGENIERA QUÍMICA**.

Siguiendo los procedimientos de revisión interna de la Escuela de Ingeniería Química, los Miembros de la Terna han procedido a **APROBARLO** con el siguiente título:

EXTRACCIÓN Y CARACTERIZACIÓN FISCOQUÍMICA DE QUIMOSINA BOVINA PARA PRODUCCIÓN DE CUAJO, SOMETIDA A VARIACIÓN TÉRMICA Y DE pH, A ESCALA LABORATORIO

El Trabajo de Graduación ha sido asesorado por los Ingenieros Químicos: **Telma Maricela Cano Morales** y **Mario José Mérida Meré**.

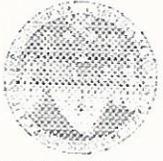
Habiendo encontrado el referido informe final del trabajo de graduación **SATISFACTORIO**, se autoriza al estudiante, proceder con los trámites requeridos de acuerdo a las normas y procedimientos establecidos por la Facultad para su autorización e impresión.

"ID Y ENSEÑADA A TODOS"


Ing. César Alfonso García Guerra
COORDINADOR DE TERMA
Tribunal de Revisión
Trabajo de Graduación



C.c.: archivo



Ref.EIQ.TG.053.2015

El Director de la Escuela de Ingeniería Química de la Universidad de San Carlos de Guatemala, luego de conocer el dictamen del Asesor y de los Miembros del Tribunal nombrado por la Escuela de Ingeniería Química para revisar el Informe del Trabajo de Graduación de la estudiante, **VIVIAN MARÍA CANO SALAZAR** titulado: **"EXTRACCIÓN Y CARACTERIZACIÓN FISCOQUÍMICA DE QUIMOSINA BOVINA PARA PRODUCCIÓN DE CUAJO, SOMETIDA A VARIACIÓN TÉRMICA Y DE pH, A ESCALA LABORATORIO"**.
Procede a la autorización del mismo, ya que reúne el rigor, la secuencia, la pertinencia y la coherencia metodológica requerida.

"Id y Enseñad a Todos"



Ing. Víctor Manuel Monzón Valdez
DIRECTOR
Escuela de Ingeniería Química



Guatemala, mayo 2015

Cc: Archivo
VMMV/ale





DTG. 206.2015

El Decano de la Facultad de Ingeniería de la Universidad de San Carlos de Guatemala, luego de conocer la aprobación por parte del Director de la Escuela de Ingeniería Química, al Trabajo de Graduación titulado: **EXTRACCIÓN Y CARACTERIZACIÓN FISCOQUÍMICA DE QUIMOSINA BOVINA PARA PRODUCCIÓN DE CUAJO, SOMETIDA A VARIACIÓN TÉRMICA Y DE pH, A ESCALA LABORATORIO**, presentado por la estudiante universitaria: **Vivian María Cano Salazar**, y después de haber culminado las revisiones previas bajo la responsabilidad de las instancias correspondientes, autoriza la impresión del mismo.

IMPRÍMASE:

Ing. Angel Roberto Sic García
Decano

Guatemala, 15 de mayo de 2015

/gdech



ACTO QUE DEDICO A:

- Dios** Por las bendiciones recibidas y por iluminarme en todos los aspectos de mi vida, incluyendo mi carrera profesional.
- Mis padres** Antonio Cano y María Estela Salazar de Cano, por ser un pilar importantísimo durante mi carrera. Por su amor y su apoyo incondicional, por creer en mí y ser siempre mi ejemplo a seguir.
- Mis hermanos** Eder Iván y Claudia Mariela Cano Salazar, por todo su apoyo, por compartir conmigo mis momentos de alegría y tristeza.
- Mis tíos** Por sus sabios consejos y creer en mí, a lo largo de mi vida y durante mis estudios.
- Mis abuelos** Refugio de Cano, Antonio Cano y Andrés Salazar, quienes en vida me brindaron todo su apoyo y ahora, desde el cielo, me cuidan y me guían en todo momento. A mi abuelita Isabel Cano quien me ha animado todos los días de mi vida.

Mis amigos

Por el apoyo incondicional, los momentos compartidos, todos los recuerdos y por nuestras victorias y derrotas.

Mis asesores

Ingeniera Telma Cano e ingeniero Mario Mérida, por brindarme su ayuda, su confianza y compartir sus conocimientos.

AGRADECIMIENTOS A:

- Dios** Por todas sus bendiciones y por permitirme culminar mi carrera profesional.
- Universidad de San Carlos de Guatemala** Por la oportunidad para alcanzar mi meta profesional y egresar orgullosamente de esta gloriosa institución.
- Mi madre** María Estela Salazar de Cano, por todos tus cuidados y atenciones, por seguir paso a paso mi vida, porque mis desvelos fueron tus desvelos y también mis victorias serán tus victorias. Por todo tu amor.
- Mi padre** Antonio Cano, por tu apoyo incondicional, por creer siempre en mí, incluso cuando ni yo misma creía, por todos tus consejos, y todo tu amor.
- Mis hermanos** Eder Iván y Claudia Mariela Cano Salazar, por todo su apoyo y amor.
- Mis tíos y primos** Por su apoyo y consejos.
- Mis abuelos** Por toda su sabiduría.

Mis amigos

Especialmente Claudia Quiroa, Gabriela Caal, Grissel Navichoque, Allan Sanchez Diana Rodas, Manuel Aroche, Sergio Palencia, Gladis Argueta, Rosa Marroquín, por su amistad, por las alegrías compartidas y por todo el apoyo.

Familia Sánchez Mejía

Por todo su apoyo, sus consejos y por alegrarse por mis triunfos.

**Catedráticos de la
Facultad de Ingeniería**

Por compartir sin egoísmo sus conocimientos especialmente Ing. Mario Mérida, Telma Cano, Víctor Monzón, Otto Raúl de León, Erwin Ortiz, Jorge Godínez, Manuel Tay.

ÍNDICE GENERAL

| | |
|---|------|
| ÍNDICE GENERAL..... | I |
| ÍNDICE DE ILUSTRACIONES..... | V |
| LISTA DE SÍMBOLOS..... | XI |
| GLOSARIO..... | XIII |
| RESUMEN..... | XVII |
| OBJETIVOS..... | XIX |
| Hipótesis..... | XX |
| INTRODUCCIÓN..... | XXI |
| | |
| 1. ANTECEDENTES..... | 1 |
| | |
| 2. MARCO TEÓRICO..... | 5 |
| 2.1. Quimosina..... | 5 |
| 2.1.1. Código de la quimosina..... | 5 |
| 2.1.2. Síntesis de la quimosina..... | 6 |
| 2.1.3. Activación de la quimosina..... | 6 |
| 2.2. Coagulantes animales (cuajos)..... | 7 |
| 2.3. Enzima extraída..... | 9 |
| 2.4. Precipitación..... | 9 |
| 2.4.1. Efectos de la precipitación y disolución salina..... | 10 |
| 2.5. Extracción..... | 12 |
| 2.5.1. Tipos de extracción..... | 12 |
| 2.5.1.1. Extracción sólido-líquido..... | 12 |
| 2.5.1.2. Factores a controlar en una lixiviación..... | 13 |

| | | | |
|------|----------|---|----|
| | 2.5.1.3. | Selección del solvente a utilizar | 14 |
| | 2.5.1.4. | La temperatura del proceso..... | 14 |
| | | 2.5.1.4.1. Termolabilidad de la quimosina bovina | 14 |
| | 2.5.2. | Tamaño de partícula del sólido | 15 |
| | 2.5.3. | Agitación..... | 15 |
| | 2.5.4. | pH..... | 16 |
| | 2.5.5. | Tiempos de extracción | 16 |
| | 2.5.6. | Velocidad de lixiviación | 17 |
| | 2.5.7. | Lixiviación por maceración | 17 |
| | 2.5.8. | Tipos de maceración | 18 |
| | | 2.5.8.1. Maceración en frío..... | 18 |
| | | 2.5.8.2. Maceración con calor | 19 |
| | | 2.5.8.3. Maceración estática | 19 |
| | | 2.5.8.4. Maceración dinámica | 19 |
| | 2.5.9. | Extracción líquido-líquido | 20 |
| | 2.5.10. | Extracción enzimática líquido-líquido | 21 |
| | 2.5.11. | Solventes..... | 21 |
| | | 2.5.11.1. Polietilenglicol..... | 21 |
| | | 2.5.11.2. Polietilenglicol como disolvente..... | 23 |
| 2.6. | | Sales inorgánicas..... | 23 |
| 2.7. | | Intercambio iónico | 24 |
| | 2.7.1. | Resina de intercambio iónico | 24 |
| | | 2.7.1.1. Selectividad de resinas..... | 27 |
| | | 2.7.1.2. Cinética de resinas..... | 28 |
| | 2.7.2. | Cromatografía | 28 |
| | | 2.7.2.1. Cromatografía de intercambio iónico.... | 29 |
| | | 2.7.2.2. Cromatografía en columna..... | 30 |
| | | 2.7.2.3. Separación de proteínas, enzimas | 31 |

| | | |
|----------|--|-----|
| 3. | DISEÑO METODOLÓGICO | 33 |
| 3.1. | Localización | 33 |
| 3.2. | Variables..... | 33 |
| 3.2.1. | Variable de respuesta..... | 35 |
| 3.3. | Delimitación del campo de estudio | 35 |
| 3.4. | Obtención de la materia prima..... | 35 |
| 3.5. | Recurso humano disponible | 35 |
| 3.6. | Recursos materiales | 36 |
| 3.6.1. | Equipo | 36 |
| 3.6.1.1. | Instrumentos de medición..... | 36 |
| 3.6.1.2. | Equipo auxiliar | 37 |
| 3.6.1.3. | Otros materiales | 37 |
| 3.6.2. | Equipo de protección personal | 37 |
| 3.6.3. | Reactivos | 37 |
| 3.6.4. | Técnica cuantitativa o cualitativa | 38 |
| 3.6.5. | Metodología experimental | 38 |
| 3.7. | Recolección y ordenamiento de la información para la obtención de la fuerza de cuaje..... | 40 |
| 3.8. | Análisis estadístico | 42 |
| 4. | RESULTADOS | 65 |
| 5. | DISCUSIÓN DE RESULTADOS | 79 |
| | CONCLUSIONES | 85 |
| | RECOMENDACIONES..... | 87 |
| | BIBLIOGRAFÍA..... | 89 |
| | APÉNDICE..... | 93 |
| | ANEXOS | 135 |

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

FIGURAS

| | | |
|-----|--|----|
| 1. | Estructura de la quimosina en 3D | 6 |
| 2. | <i>Salting out – salting in</i> | 11 |
| 3. | Lixiviación..... | 13 |
| 4. | Estructura química polietilenglicol | 22 |
| 5. | Reacción producción polietilenglicol..... | 22 |
| 6. | Representación esquemática de resinas intercambiadoras de cationes y de aniones..... | 25 |
| 7. | Cromatografía de intercambio iónico..... | 32 |
| 8. | Relación de rendimiento de quimosina respecto a la variación de pH (2, 3, 4) a 25 °C | 43 |
| 9. | Prueba de chi-cuadrado, comparación de diferencias del rendimiento de quimosina (fuerza de cuaje), con variación de pH (2, 3, 4) a 25 °C | 44 |
| 10. | Relación del rendimiento de quimosina (fuerza de cuaje) respecto de la variación de pH a 35 °C..... | 46 |
| 11. | Prueba de chi-cuadrado, comparación de diferencias del rendimiento de quimosina (fuerza de cuaje), con variación de pH (2, 3, 4) a 35 °C | 47 |
| 12. | Relación del rendimiento de quimosina (fuerza de cuaje) respecto de la variación de pH a 45 °C..... | 49 |
| 13. | Prueba de chi-cuadrado, comparación de diferencias del rendimiento de quimosina (fuerza de cuaje), con variación de pH (2, 3, 4) a 45 °C | 50 |

| | | |
|-----|--|----|
| 14. | Relación del rendimiento de pepsina (fuerza de cuajo) respecto de la variación de pH (2, 3, 4) a 25 °C | 52 |
| 15. | Prueba de chi-cuadrado, comparación de diferencias del rendimiento de pepsina (fuerza de cuaje), con variación de pH (2, 3, 4) a 25 °C | 53 |
| 16. | Relación de la variación de pH (2, 3, 4) a 35 °C respecto del rendimiento de pepsina (fuerza de cuaje) | 55 |
| 17. | Prueba de chi-cuadrado, comparación de diferencias del rendimiento de pepsina (fuerza de cuaje), con variación de pH (2, 3, 4) a 35 °C | 56 |
| 18. | Relación de la variación de pH (2, 3, 4) a 45 °C respecto al rendimiento de pepsina (fuerza de cuaje) | 58 |
| 19. | Prueba de chi-cuadrado, comparación de diferencias del rendimiento de pepsina con variación de pH (2, 3, 4) a 45 °C | 59 |
| 20. | Relación del rendimiento de quimosina (fuerza de cuaje) a los distintos pH (2, 3, 4) y temperaturas (25 °C, 35 °C, 45 °C) | 61 |
| 21. | Relación del rendimiento de pepsina (fuerza de cuaje) respecto a los distintos pH (2, 3, 4) y temperaturas (25 °C, 35 °C, 45 °C) | 63 |
| 22. | Fuerza de cuajo de la quimosina en función del tiempo de coagulación a pH 2 y temperaturas (25 °C, 35 °C y 45 °C) | 69 |
| 23. | Fuerza de cuajo de la pepsina en función del tiempo de coagulación a pH 2 y temperatura (25 °C, 35 °C y 45 °C) | 70 |
| 24. | Fuerza de cuajo de la quimosina en función del tiempo de coagulación a pH 3 y temperaturas (25 °C, 35 °C, 45 °C) | 71 |
| 25. | Fuerza de cuajo de la pepsina en función del tiempo de coagulación a pH 3 y diferentes temperaturas (25 °C, 35 °C, 45 °C) | 72 |
| 26. | Fuerza de cuajo de la quimosina a pH 4 en función del tiempo de coagulación diferentes temperaturas (25 °C, 35 °C, 45 °C) | 73 |
| 27. | Fuerza de cuajo de la pepsina a pH 4 en función del tiempo de coagulación de diferentes temperaturas (25 °C, 35 °C, 45 °C) | 74 |

| | | |
|-----|---|----|
| 28. | Fuerza de cuajo de la quimosina en función del tiempo de coagulación con variación de NaCl (<i>salting out</i>) a pH 2..... | 75 |
| 29. | Fuerza de cuajo de las distintas variedades de quimosina (natural, <i>salting out</i> , comercial) en función del tiempo de coagulación | 76 |
| 30. | Fuerza de cuajo de las distintas variedades de pepsina (natural, <i>salting out</i> , comercial) en función del tiempo de coagulación | 77 |

TABLAS

| | | |
|-------|---|----|
| I. | Variables independientes | 33 |
| II. | Variables dependientes..... | 34 |
| III. | Análisis cuantitativo del rendimiento de quimosina (fuerza de cuaje), con variación pH (2, 3, 4) a 25 °C | 42 |
| IV. | Análisis de varianza del rendimiento de quimosina (fuerza de cuajo), con variación de pH (2, 3, 4) a 25°C | 43 |
| V. | Valores típicos, figura 8..... | 44 |
| VI. | Análisis cuantitativo del rendimiento de quimosina (fuerza de cuaje), con variación de pH (2, 3, 4) a 35 °C | 45 |
| VII. | Análisis de varianza del rendimiento de quimosina (fuerza de cuaje), con variación de pH a 35 °C..... | 45 |
| VIII. | Valores típicos, figura 10..... | 46 |
| IX. | Análisis cuantitativo del rendimiento de quimosina (fuerza de cuaje), con variación pH (2, 3, 4) y 45 °C | 48 |
| X. | Análisis de varianza del rendimiento de quimosina (fuerza de cuaje), con variación de pH a 45 °C..... | 48 |
| XI. | Valores típicos, figura 12..... | 49 |
| XII. | Análisis cuantitativo del rendimiento de pepsina (fuerza de cuaje), con variación pH (2, 3, 4) a 25 °C | 51 |

| | | |
|--------|--|----|
| XIII. | Análisis de varianza del rendimiento de pepsina (fuerza de cuaje), con variación de pH (2, 3, 4) a 25 °C | 51 |
| XIV. | Valores típicos, figura 14 | 52 |
| XV. | Análisis cuantitativo del rendimiento de pepsina (fuerza de cuaje) con variación pH (2, 3, 4) a 35 °C | 54 |
| XVI. | Análisis de varianza del rendimiento de pepsina (fuerza de cuaje), con variación de pH (2, 3, 4) a 35 °C | 54 |
| XVII. | Valores típicos, figura 16 | 55 |
| XVIII. | Análisis cuantitativo del rendimiento de pepsina (fuerza de cuaje), con variación pH (2, 3, 4) a T 45 °C..... | 57 |
| XIX. | Análisis de varianza del rendimiento de pepsina (fuerza de cuaje), con variación de pH (2, 3, 4) a 45 °C | 57 |
| XX. | Valores típicos, figura 18 | 58 |
| XXI. | Análisis cuantitativo del rendimiento de quimosina (fuerza de cuaje), a los distintos pH (2, 3, 4) y temperaturas (25 °C, 35 °C, 45 °C) | 60 |
| XXII. | Análisis de varianza del rendimiento de quimosina (fuerza de cuaje), a los distintos pH (2, 3, 4) y temperaturas (25 °C, 35 °C, 45 °C) | 60 |
| XXIII. | Valores típicos, figura 20 | 61 |
| XXIV. | Análisis de comparación cuantitativa del rendimiento de pepsina (fuerza de cuaje) a los distintos pH (2, 3, 4) y temperaturas (25 °C, 35 °C, 45 °C)..... | 62 |
| XXV. | Análisis de varianza del rendimiento de pepsina (fuerza de cuaje), a los distintos pH (2, 3, 4) y temperaturas (25 °C, 35 °C, 45 °C) | 62 |
| XXVI. | Valores típicos, figura 21 | 63 |
| XXVII. | Densidades, tiempo de cuajo, fuerza de cuajo e índice de refracción de la quimosina extraída utilizando maceración dinámica de 2 horas a pH 2 | 65 |

| | | |
|----------|--|----|
| XXVIII. | Densidades, tiempo de cuajo, fuerza de cuajo e índice de refracción de la quimosina extraída utilizando maceración dinámica de 2 horas a pH 3..... | 65 |
| XXIX. | Densidades, tiempo de cuajo, fuerza de cuajo e índice de refracción de la quimosina extraída utilizando maceración dinámica de 2 horas a pH 4..... | 66 |
| XXX. | Densidades, tiempo de cuajo, fuerza de cuajo e índice de refracción de la pepsina acuosa extraída utilizando maceración dinámica de 2 horas a pH 2..... | 66 |
| XXXI. | Densidades, tiempo de cuajo, fuerza de cuajo e índice de refracción de la pepsina acuosa extraída utilizando maceración dinámica de 2 horas a pH 3..... | 67 |
| XXXII. | Densidades, tiempo de cuajo, fuerza de cuajo e índice de refracción de la pepsina extraída utilizando maceración dinámica de 2 horas a pH 4..... | 67 |
| XXXIII. | Densidades, tiempo de cuajo, fuerza de cuajo e índice de refracción de la quimosina con variación de NaCl (<i>salting out</i>) utilizando maceración dinámica de 2 horas a pH 2 a 25 °C..... | 68 |
| XXXIV. | Densidades, tiempo de cuajo, fuerza de cuajo e índice de refracción de la pepsina con variación de NaCl (<i>salting out</i>) utilizando maceración dinámica de 2 horas a pH 2 a 25 °C..... | 68 |
| XXXV. | Densidades, tiempo de cuajo, fuerza de cuajo del cuajo comercial..... | 69 |
| XXXVI. | Correlación y coeficientes, figura 22..... | 69 |
| XXXVII. | Correlación y coeficientes, figura 23..... | 70 |
| XXXVIII. | Temperatura, correlación y coeficiente, figura 24..... | 71 |
| XXXIX. | Temperatura, correlación y coeficiente, figura 25..... | 72 |
| XL. | Temperatura, correlación y coeficiente, figura 26 diferentes..... | 73 |
| XLI. | Temperatura, correlación y coeficiente, figura 27..... | 74 |
| XLII. | Fuerza de cuajo, correlación y coeficiente, figura 28..... | 75 |

| | | |
|--------|--|----|
| XLIII. | Fuerza de cuajo, correlación y coeficiente, figura 29..... | 76 |
| XLIV. | Fuerza de cuajo, correlación y coeficiente, figura 30..... | 77 |

LISTA DE SÍMBOLOS

| Símbolo | Significado |
|-----------------------|----------------------------|
| cm³ | Centímetro cúbico |
| R² | Coeficiente de correlación |
| Q1 | Cuartil primero |
| Q3 | Cuartil tercero |
| s⁻¹ | Frecuencia |
| °C | Grado centígrado |
| g | Gramos |
| L | Litros |
| mL | Mililitros |
| min | Minutos |
| s | Segundos |
| T | Temperatura |
| t | Tiempo |

GLOSARIO

| | |
|-----------------------------|--|
| Abomaso | Cuarto y último compartimento del estómago de los rumiantes. |
| Cuajo | Sustancia presente en el abomaso de los mamíferos rumiantes, que hace cuajar la leche. |
| Divinilbenceno (DVB) | Divinilbenceno tiene dos etileno, la polimerización puede generar una estructura tridimensional de polímero infusible. Por lo tanto, el agente de reticulación es una herramienta muy útil, ampliamente utilizado en resinas de intercambio de iones, membranas de intercambio iónico, resina de poliestireno, resina de poliéster insaturado. |
| Enzima | Molécula de naturaleza proteica que cataliza las reacciones bioquímicas del metabolismo. Las enzimas actúan sobre las moléculas conocidas como sustratos y permiten el desarrollo de los diversos procesos celulares. |
| Enzima digestiva | Enzimas que hidrolizan los polímeros presentes en los alimentos, en moléculas más pequeñas que pueden ser absorbidas con facilidad. Las enzimas digestivas se encuentran en el tubo |

digestivo de los animales donde colaboran con la digestión del alimento, así como en el interior de las células.

Frecuencia

Magnitud que mide el número de repeticiones por unidad de tiempo de cualquier fenómeno o suceso.

Fuerza de cuaje

Cantidad de leche, en mililitros, que cuaja a 35 °C, cuando se le adiciona un gramo o mililitro de cuajo.

Índice de refracción

Cociente entre la velocidad de la luz en el vacío y la velocidad de la luz en el medio. Este determina la reducción de la velocidad de la luz al propagarse por un medio.

Maceración

Proceso de extracción sólido-líquido. El producto sólido (materia prima) posee una serie de compuestos solubles en el líquido extractante que son los que se pretende extraer.

Pepsina

Enzima digestiva segregada en el estómago y que hidroliza las proteínas en el mismo, produciendo cuajado de la leche.

**Poli(etilenglicol)
(PEG)**

Poliéter ampliamente empleado en la industria, posee bajo peso molecular; puede ser usado como disolvente no volátil.

| | |
|--|--|
| Quimosina | Enzima proteasa aspártica encontrada en el cuajo. Es producida por las células principales en el cuarto estómago de las vacas con el fin de cuajar la leche. Al inicio de la lactancia se encuentra en un 100 % disminuyendo conforme la edad, siendo sustituida por la pepsina. |
| Resina de intercambio iónico | Perlas de plástico cuya estructura es un polímero en el cual un ion fijo ha sido inmovilizado de manera permanente. |
| Retención y factor de capacidad | Medida del tiempo transcurrido en la fase estacionaria, en relación con el tiempo transcurrido en fase móvil. |
| <i>Salting in - out</i> | Es un método de separación de proteínas basado en el principio de que las proteínas son menos solubles a altas concentraciones de sal. Es la manera más común de precipitar proteínas. |
| Soluto | Sustancia que se disuelve, por lo que se puede encontrar en un estado de agregación diferente al comienzo del proceso de disolución y experimentar una transición de fase. |
| Termolabilidad | Sensibilidad a las temperaturas pudiendo llegar a inactivar las sustancias. |

RESUMEN

En el presente estudio de investigación, a nivel de trabajo de graduación, se realizó la extracción y caracterización fisicoquímica de quimosina bovina, para producción de cuajo, sometida a variación térmica y de pH a escala laboratorio.

Se utilizó como materia prima el abomaso bovino, se limpió y separó la membrana interna la cual contiene la enzima, para luego romperla por medio de molienda. La solución acuosa resultante contenía la enzima quimosina, a la cual se le agregó polietilenglicol y sal inorgánica para formar un sistema de dos fases, se ajustó al pH deseado para posteriormente macerar por dos horas. El polietilenglicol conteniendo la quimosina se recuperó mediante centrifugado y se puso en contacto con una resina de intercambio iónico, ajustando el pH de tal forma que la quimosina se uniera a la resina, la quimosina se eluyó de la columna empleando una solución salina.

En la variación de pH 2, 3 y 4 y temperaturas 25 °C, 35 °C y 45 °C, las soluciones con menor pH y mayor temperatura obtuvieron los resultados más satisfactorios en la fuerza de cuajo, un promedio 149 mL de leche cuajada por cada mililitro de extracto de quimosina. Asimismo, al realizar una variación de NaCl del 18 % contra el 20 % del procedimiento original para la elución de la enzima, se obtuvieron resultados satisfactorios, con una fuerza de cuajo promedio de 700 mL de leche cuajada por cada mililitro de extracto de quimosina.

Como subproducto de la extracción de quimosina se obtiene pepsina, la cual está presente en mayor cantidad en abomasos de vacas adultas. Así, en las mismas condiciones, pH bajos y temperaturas altas, se obtuvieron resultados de mayor cantidad que la quimosina, un promedio de 800 mL de leche cuajada por cada mililitro de extracto de pepsina.

Por último, se realizó una comparación con la pastilla comercial de cuajo, para la cual se obtuvo una fuerza de cuajo de 2 028 mL de leche cuajada por cada mililitro de cuajo comercial.

A los extractos se les determinó densidad, fuerza de cuajo (cantidad de centímetros cúbicos cuajados por un centímetro cúbico de quimosina o pepsina), índice de refracción y se realizaron estudios microbiológicos. Asimismo, se calculó el porcentaje de rendimiento, tomando el peso de la leche y posteriormente del queso, obteniendo un porcentaje del 89 %, siendo un factor importante el tiempo que tomaba en cuajar.

OBJETIVOS

General

Extracción y caracterización fisicoquímica de quimosina bovina para producción de cuajo con base en variaciones térmicas y de pH en la solución extractora, a escala laboratorio.

Específicos

1. Extracción de la quimosina de forma natural a partir del abomaso, mediante maceración dinámica a tres temperaturas diferentes de lo recomendado en la patente europea *Procedimiento para la recuperación de quimosina producida de forma natural*, Es 2 078 345 (párrafo 50, página 8).
2. Extracción de la quimosina de forma natural a partir del abomaso, mediante maceración dinámica a tres pH diferentes de lo recomendado en la patente europea *Procedimiento para la recuperación de quimosina producida de forma natural*, Es 2 078 345 (párrafo 60, página 5).
3. Extracción de la quimosina de forma natural a partir del abomaso, mediante maceración a una concentración de NaCl diferente de lo recomendado en la patente europea *Procedimiento para la recuperación de quimosina producida de forma natural*, Es 2 078 345 (párrafo 15, página 5).

4. Determinar la relación entre la cantidad recuperada de quimosina y la variación térmica, de pH y de concentración de NaCl.
5. Comparación de la actividad enzimática de la quimosina recuperada, respecto a pastillas de cuajo comerciales.

Hipótesis

Basado en los métodos utilizados en la patente europea *Procedimiento para la recuperación de quimosina producida de forma natural Es 2 078 345*, es posible establecer la relación existente entre la obtención de cuajo a partir de quimosina extraída del abomaso, en función de variaciones de temperaturas y pH.

Los resultados analíticos obtenidos en los ensayos, permitirán validar cuantitativamente el rendimiento de quimosina bovina pudiendo definir las condiciones óptimas para obtener la mayor fuerza de cuajo.

Hipótesis nula:

Existe diferencia significativa en el rendimiento (fuerza de cuaje) de quimosina extraída para la producción de cuajo, en función de la variación térmica y de pH de la solución extractora.

Hipótesis alternativa:

No existe diferencia significativa en el rendimiento (fuerza de cuaje) de quimosina extraída para la producción de cuajo, en función de la variación térmica y de pH de la solución extractora.

INTRODUCCIÓN

En el grupo de coagulantes proteicos de origen animal, el cuajo se considera como el ideal para la elaboración de quesos por su alto contenido de quimosina, cuyo código enzimático es E.C.3.4.23., siendo esta la propia enzima natural para coagular leche bovina. En el abomaso y los extractos de otros tejidos, la proporción de dos enzimas, quimosina y pepsina, varía según la edad del animal y el tipo de alimentación (Andrén, 1982).

Extractos provenientes de estómagos de terneros jóvenes tienen un alto contenido de quimosina, siendo su composición normalmente 80-90 % quimosina y 10-20 % pepsina (IDF Standard 110B). Los cuajos de bovinos adultos presentan un mayor contenido de pepsina, normalmente 80-90 %.

El cuajo de ternero es el producto tradicionalmente utilizado para la elaboración de quesos, siendo el producto de referencia en cuanto a composición y rendimiento. El cuajo de bovino adulto es el de mayor uso alternativo, debido a que contiene la misma composición enzimática activa. El mayor contenido de pepsina de los cuajos de bovino adulto lo hace más sensible al pH a determinadas temperaturas y posee, en general, una mayor actividad proteolítica.

El presente trabajo de tesis investiga cómo el pH y la temperatura tienen influencia en la actividad proteolítica de la enzima. Dicha enzima se extrajo por maceración dinámica, utilizando reactivos como polietilenglicol y sales inorgánicas en solución acuosa, para después separarlo por medio de una columna de intercambio iónico, empleando resinas para su separación.

1. ANTECEDENTES

El marco del proceso de investigación que se realizó en el Laboratorio de Investigaciones de Extractos Vegetales (LIEXVE), del Centro de Investigación de Ingeniería (CII) de la Universidad de San Carlos de Guatemala, se tomó como base un aspecto de la invención de la patente europea-española *Procedimiento para la recuperación de quimosina producida de forma natural ES 2 078 345*, la cual proporciona un procedimiento para la recuperación y purificación de la quimosina a partir de una solución acuosa que contiene quimosina obtenida a partir del abomaso bovino, pepsina y otros contaminantes.

El procedimiento conlleva los siguientes pasos:

- Preparación de cuajares sumergiendo el abomaso bovino en agua, cortándolo y estirándolo, eliminando cualquier desecho que contenga el saco.
- Molienda de los fragmentos de estómago bovino.
- Extracción del material proteico por maceración en solución salina (agua desionizada).
- Cribado del líquido de maceración.
- Ajustar el pH de la solución acuosa variando el mismo. Añadir a la solución acuosa una cantidad efectiva de polietilenglicol (PEG) y una sal

inorgánica para formar un sistema de dos fases. Posteriormente, calentar a 37 °C para la solubilidad de la sal en la solución.

- Permitir que la solución acuosa de la mezcla polietilenglicol-sal inorgánica se separe en una fase de polietilenglicol rica en quimosina y pepsina, y una fase salina agotada de quimosina y pepsina.
- Separación por intercambio iónico para recuperar la fase de polietilenglicol rica en quimosina y pepsina.
- Poner en contacto la fase de polietilenglicol rica en quimosina y pepsina con una resina de intercambio iónico, bajo condiciones en las que la quimosina se une a la resina, y el polietilenglicol y la pepsina pasen a través de ella.
- Elución de resina con NaCl a 18 % en peso de la solución mezclada para eliminación de residuos de PEG y pepsina.
- Re-elución de la resina con fosfato disódico 0,05 M a pH 5,8 con NaCl 2 M para recuperar la quimosina de la resina.

En el paso de extracción, la mayor parte de la quimosina y de la pepsina están contenidas en la fase de polietilenglicol mientras que los contaminantes diferentes a la pepsina se mantienen en la fase salina. Además, cuando se pone en contacto la fase de polietilenglicol con una resina de intercambio iónico adecuada, la quimosina se une a la resina mientras que la pepsina pasa a través de ella. A continuación, la quimosina, básicamente libre de pepsina u otros contaminantes (es decir, la contaminación es menor del 10 % del peso con base en el peso de la quimosina), se recupera de la resina.

En general, el pH de una solución acuosa puede ser cualquiera en el que la quimosina sea estable. Sin embargo, en una realización preferida, se ha determinado que el uso de pH menores, es decir, pH 3 o menor y preferiblemente pH de 2 a 2,5, da como resultado un coeficiente de reparto más elevado (mayor selectividad) para la separación de la quimosina en la fase de polietilenglicol, comparado con el uso de pH de 3 a 6.5.

- Efectos de calentamiento sobre enzimas, temperatura óptima

Es preciso tener en cuenta algunas nociones:

- La velocidad inicial de la reacción enzimática aumenta con la elevación relativa de la temperatura, como en la mayor parte de las reacciones bioquímicas.
- La elevación de la temperatura provoca la desnaturalización de la proteína correspondiente de las enzimas y es completa a partir de los 55 °C para muchas enzimas.
- La temperatura óptima de actividad de una enzima es aquella en que los dos efectos se equilibran, la actividad propia de la enzima no disminuye más allá de esta temperatura, lo que disminuye es la cantidad.
- La temperatura óptima varía con el pH y la composición del medio. Para un gran número de enzimas, la temperatura óptima se sitúa hacia 30 a 40 °C, siendo una característica menos significativa y menos notable que el pH óptimo.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Quimosina

Es una enzima proteasa aspártica encontrada en el cuajo. Es producida por las vacas en el abomaso. La quimosina es producida por las células principales en el estómago de bebés y niños con el fin de cuajar la leche que toman, garantizando así una mayor y mejor absorción.

2.1.1. Código de la quimosina

La quimosina es una enzima proteasa aspártica cuyo código es: (EC 3.4.23.4). Desglosado de la siguiente manera:

- EC 3 – hidrolasa.
- EC 3.4 - actúa sobre los enlaces peptídicos (hidrolasas peptídicas).
- EC 3.4.23 - endopeptidasas aspártico (hidrólisis en donde haya ácido aspártico).
- EC 3.4.23.4 quimosina.

La quimosina es particularmente útil en la preparación del queso, mientras que las fuentes de quimosina natural incluyen estómagos de ternero, estómagos de bovino, estómagos de cabra, estómagos de porcinos, entre otros. La quimosina comercial se obtiene básicamente a partir del cuarto estómago de los terneros alimentados con leche. Esto es debido a que dichas vacas producen mayores cantidades de quimosina a comparación de las de pepsina, mientras que otras fuentes de quimosina contienen generalmente mayores

cantidades de pepsina a comparación de las de quimosina y, consecuentemente, la recuperación de la quimosina de estas fuentes es más dificultosa y económicamente menos rentable, es decir, hay menos quimosina para recuperar.

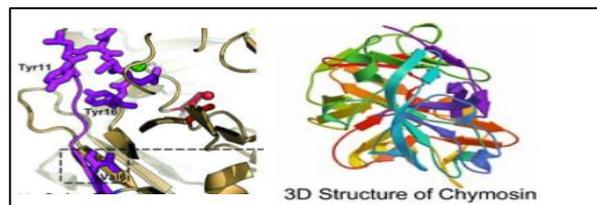
2.1.2. Síntesis de la quimosina

La quimosina se sintetiza como pre-pro-quimosina, proteína que tiene en su cadena 58 aminoácidos más que la quimosina activa, y que no tienen actividad proteolítica. Se secreta al estómago como pro-quimosina, también inactiva, tras el corte de 16 aminoácidos. Se transforma en la enzima activa por la eliminación proteolítica de otro fragmento de 42 aminoácidos, quedando con un peso molecular de aproximadamente 30 700.

2.1.3. Activación de la quimosina

La quimosina, como todas las proteínas, puede autodigerirse si se conserva en las condiciones en las que es activa. Puesto que la quimosina se inactiva reversiblemente con concentraciones elevadas de cloruro de sodio, se conserva en esta forma y al disminuir la concentración salina se reactiva.

Figura 1. Estructura de la quimosina en 3D



Fuente: *Protein data bank*. Estructura+de+la+quimosina+en+3D&biw=1366&bih=667&source=
=Inms&tbm=isch&sa=X&ei=scs_VbL5KcqoNrn9gNgC&ved=0CAYQ_AUoAQ.
[Consulta: 20 de septiembre de 2013].

2.2. Coagulantes animales (cuajos)

En el grupo de coagulantes de origen animal, el cuajo de ternero se considera como el ideal para la elaboración de quesos por su alto contenido de quimosina, siendo esta la enzima natural para coagular (proteólisis y desnaturalización) leche bovina. En el abomaso y los extractos de otros tejidos, la proporción de dos enzimas, quimosina y pepsina, varía según la edad del animal y el tipo de alimentación (Andrén, 1982).

Extractos provenientes de estómagos de terneros jóvenes tienen un alto contenido de quimosina, siendo su composición normalmente 80-90 % quimosina y 10-20 % pepsina (IDF Standard 110B). Los cuajos de bovinos adultos presentan un mayor contenido de pepsina, normalmente 80-90 %, aunque se pudieron observar contenidos de pepsina mayores, cercanos al 97 %, en cuajares de bovinos en Brasil. En todo el mundo, los animales son enviados a los frigoríficos a diferentes edades, observándose todo tipo de mezcla de extractos, así, los cuajos comerciales poseen un amplio rango de composición enzimática. Sin embargo, debido a la búsqueda de eficiencia económica, los animales son enviados a los frigoríficos con mayor peso corporal, dando como resultado la falta de cuajares de terneros y la predominancia de cuajares de bovinos adultos, con el consecuente encarecimiento del cuajo de ternero.

El cuajo de ternero es el producto tradicionalmente utilizado para la elaboración de quesos, siendo el producto de referencia en cuanto a composición y rendimiento. Sin embargo, el cuajo de bovino adulto es el de mayor uso alternativo del cuajo de ternero, debido a que contiene la misma composición enzimática activa. El mayor contenido de pepsina de los cuajos de bovino adulto los hace más sensible al pH y poseen, en general, una mayor

actividad proteolítica. Cuajos de cordero/oveja y cabrito/cabra son bastantes similares a ternero/bovino adulto, aunque probablemente más aptos para coagular leche de su misma especie (Foltmann, 1992).

El cuajo animal algunas veces es utilizado en mezclas con lipasas (Harboe, 1994), especialmente en los quesos italianos del sur, en los cuales el producto posee un sabor característico. Tales cuajos se denominan cuajo en pasta, y los mismos están elaborados por maceración y secado de estómagos provenientes de ternero, cordero o cabrito que han sido recientemente destetados, con el objeto de tener estómagos llenos con leche. Consecuentemente, el cuajo en pasta contiene una mezcla de enzimas de cuajo y lipasa (pregástrica y posiblemente gástrica) en una proporción no estandarizada (Birschbach, 1994).

De todos los cuajos sustitutos de origen animal que han sido utilizados por años, solamente se ha empleado en muy baja proporción el cuajo porcino. Este es característico por presentar alta actividad proteolítica y alta inestabilidad, especialmente frente al pH.

La renina actúa sobre la fracción kappa-caseína de la leche con liberación de varios péptidos. Al realizar su acción proteolítica, se destruye el efecto de coloide protector de la micela de caseína, causando su floculación. En este proceso, acidez, tiempo y temperatura influyen significativamente en las características posteriores del queso resultante a un pH óptimo de entre 6 y 7.

Se ha preparado también renina a partir de estómagos de aves por su inmersión en solución de sal, a pH 4.

La quimosina bovina se puede producir de forma alternativa mediante ADN recombinante en *Escherichia coli*, *Aspergillus niger* var. *awamori* y *Kluyveromyces lactis*; estas variedades se agrupan bajo el nombre de quimosinas producidas por fermentación (FPC, por sus siglas en inglés).

2.3. Enzima extraída

Por maceración de trozos de estómagos de terneros (alimentados solo con leche) en agua salada, se obtiene el llamado cuajo cuyo principio activo es la enzima y que se expende en forma de un extracto líquido o polvo seco con sal. Si los terneros reciben además de la leche otro forraje, se va formando pepsina, la cual constituye en el animal adulto la proteasa más activa del estómago.

2.4. Precipitación

Una de las técnicas más utilizadas para la precipitación de enzimas es la llamada *salting out*, la cual se realiza agregando altas concentraciones de sales a la solución en la que se encuentra la proteína para su precipitación. La precipitación por disminución de la solubilidad de la proteína de interés se efectúa por medio de un agente precipitante y esta solubilidad está determinada por el grado de hidratación de las moléculas. El hecho de que las proteínas sean anfotéricas se debe a que en sus superficies presentan regiones hidrofóbicas y regiones hidrofílicas, cargadas ya sea positiva o negativamente. Cuando se agrega un agente precipitante a la solución, las proteínas que presentan mayor hidrofobicidad, por contar con mayor número de aminoácidos hidrofóbicos en su superficie, precipitan más fácilmente que las de menor hidrofobicidad (Whitaker, 1994; Alberts, 2004).

2.4.1. Efectos de la precipitación y disolución salina

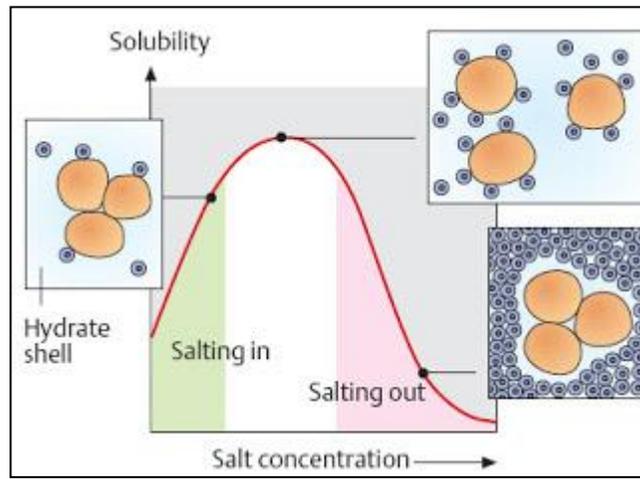
La solubilidad de las proteínas no es algo sencillo de estudiar. Es necesario tener en cuenta numerosos aspectos como la dependencia de la solubilidad con el pH, la temperatura, la naturaleza de la proteína y la concentración salina del medio.

En un medio poco salino, la solubilidad de las proteínas aumenta al incrementar la concentración de sales. Este efecto se conoce como disolución salina (*salting in*) y se explica mediante la teoría de Debye-Hückel. Según se añaden sales al medio (o lo que es lo mismo, según aumenta la fuerza iónica del medio), los iones en que estas se disocian rodean a las proteínas interactuando con sus grupos ionizables, evitando así que se establezcan interacciones atractivas entre las cadenas laterales o extremos cargados de las proteínas; es decir, se dificulta la aglomeración de las proteínas y por tanto su precipitación. En estas condiciones, la solubilidad aumenta al incrementarse la fuerza iónica del medio.

En un medio con altas concentraciones de sal, la repulsión entre cargas del mismo signo se reduce y las proteínas se solvatan mucho menos al ir aumentando la concentración de sal. Otra forma de explicarlo es que al solubilizar la sal, sus iones se rodean de moléculas de agua, limitando las moléculas de agua disponibles para solubilizar las proteínas. Así, al potenciarse las interacciones proteína-proteína frente a las interacciones proteína-disolvente, estas precipitarán según aumente la fuerza iónica del medio (disminuye su solubilidad). A este efecto se le denomina efecto salino de precipitación, también conocido como *salting out*.

La dependencia de la solubilidad con la concentración salina puede observarse en la siguiente imagen:

Figura 2. **Salting out – salting in**



Fuente: *Protein data bank*. Estructura+de+la+quimosina+en+3D&biw=1366&bih=667&source=Inms&tbm=isch&sa=X&ei=scs_VbL5KcqoNrn9gNgC&ved=0CAYQ_AUoAQ.
[Consulta: 20 de septiembre de 2013].

Una sal bastante empleada en estos estudios es el sulfato de amonio, que presenta una elevada solubilidad en medio acuoso. Sin embargo, en algunos casos, el sulfato de amonio puede desnaturizar a la proteína. Por ello en ocasiones, se sustituyen las sales por alcoholes que reducen la constante dieléctrica del medio, lo que disminuye la solubilidad de las proteínas al reducirse el número de interacciones proteínas-disolvente. También se pueden usar NaCl o KCl.

2.5. Extracción

En química, la extracción es un procedimiento de separación de una sustancia que puede disolverse en dos disolventes no miscibles entre sí, con distinto grado de solubilidad y que están en contacto a través de una interfase. La relación de las concentraciones de dicha sustancia en cada uno de los disolventes, a una temperatura determinada, es constante.

Si tenemos una sustancia soluble en un disolvente, pero más soluble en un segundo disolvente no miscible con el anterior, esta puede extraerse del primero, añadiéndole el segundo, agitando la mezcla y separando las dos fases. A nivel de laboratorio, el proceso se desarrolla en un embudo de decantación. Como es de esperar, la extracción nunca es total, pero se obtiene más eficacia cuando la cantidad del segundo disolvente se divide en varias fracciones y se hacen sucesivas extracciones, que cuando se añade todo de una vez y se hace una única extracción.

2.5.1. Tipos de extracción

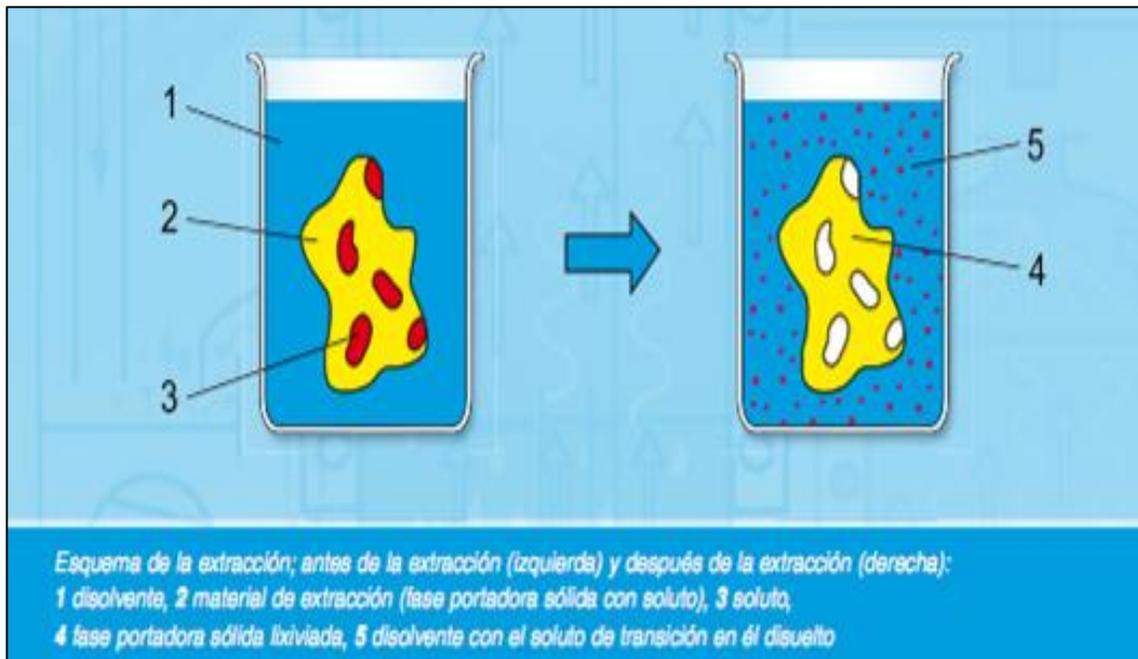
La extracción es un procedimiento por el cual se separa una sustancia en dos que no pueden mezclarse entre sí. Esto sucede con diferente grado de solubilidad, lo cual corresponde a la capacidad que tiene una determinada sustancia.

2.5.1.1. Extracción sólido-líquido

Consiste en la remoción o extracción de un componente soluble (solute) contenido en un sólido mediante un solvente apropiado. La lixiviación es una

operación de transferencia de masa, por lo que es indispensable que exista un contacto íntimo entre el solvente y el soluto contenido en el sólido.

Figura 3. **Lixiviación**



Fuente: *Extracción sólido líquido*. Estructura +de+la+ quimosina+ en+ 3D&biw=1366&bih=667&source =lnms&tbm=isch&sa=X&ei=scs_ VbL5KcqoN rn9gNgC&ved=0CAYQ_AUoAQ.
[Consulta: 20 de septiembre de 2013].

2.5.1.2. Factores a controlar en una lixiviación

- Tipo de solvente a utilizar
- Temperatura del proceso
- Tamaño de partícula del sólido

2.5.1.3. Selección del solvente a utilizar

- El solvente ideal empleado para solubilizar es el agua (bajo costo, no tóxica, no inflamable, no corrosiva), sin embargo no siempre tiene una capacidad de extracción adecuada.
- El solvente empleado debe tener el mayor coeficiente de transferencia de masa posible.
- El mejor solvente a utilizar es el de más bajo costo y menor toxicidad.

2.5.1.4. La temperatura del proceso

Al aumentar la temperatura del proceso, aumenta la solubilidad del soluto en el solvente, incrementando el coeficiente de difusión del solvente en las partículas de sólido, lo que provoca una mayor velocidad de extracción. Sin embargo, temperaturas muy elevadas pueden deteriorar el producto o provocar la evaporación del solvente. Se debe encontrar la temperatura más adecuada para cada caso en particular y facilitar su extracción.

2.5.1.4.1. Termolabilidad de la quimosina bovina

La literatura indica que la quimosina bovina rápidamente pierde actividad a temperaturas superiores a 60 °C y retiene sólo el 10-15 % de la actividad después del calentamiento a 75 °C.

2.5.2. Tamaño de partícula del sólido

Cualquiera que sea el método de extracción empleado, generalmente la materia prima (sólido) que contiene al soluto debe acondicionarse (corte, trituración, molienda) para propiciar el contacto con el solvente.

Las partículas pequeñas crean una mayor área interfacial entre el sólido y el líquido, además de una distancia más corta para que el soluto se difunda a través de la partícula y alcance la superficie.

Pero, si el tamaño de la partícula es demasiado pequeño, se forman conglomerados que impiden la circulación del solvente entre las partículas compactadas y dificultan su separación, provocando que estas puedan ser arrastradas con el solvente.

2.5.3. Agitación

La eficiencia del proceso extractivo es en función del equilibrio de saturación del solvente.

La agitación hace que nuevas cantidades de solvente, pobre en las sustancias extraíbles, entren en contacto con el sólido y un nuevo punto de equilibrio de saturación sea alcanzado.

El movimiento del líquido, con la ayuda de bombas o de agitadores mecánicos para la recirculación del solvente, desplaza el equilibrio en el sentido de la saturación del solvente, aumentando la eficiencia del proceso.

2.5.4. pH

El pH influye en la solubilidad de diversos compuestos ya que permite la posibilidad de formación de sales. La obtención de alcaloides constituye un ejemplo clásico de la influencia del pH en el proceso de extracción.

La extracción de alcaloides con solventes orgánicos de baja polaridad exige un pretratamiento con soluciones alcalinas, buscando con esto liberar los alcaloides de sus sales y así volverlos solubles.

En el caso de extracción de alcaloides con soluciones acuosas es necesario un pH ácido, buscando con esto la conversión de los alcaloides en sus respectivas sales.

2.5.5. Tiempos de extracción

El tiempo de extracción se determina experimentalmente en función del solvente y del equipo seleccionado. Además, esta variable es resultante de todos los factores mencionados previamente.

El tiempo de extracción debe ser suficiente para permitir la separación de los compuestos de interés, aunque se debe prestar cuidado para que no sea excesivo.

Prolongar el tiempo de extracción más allá del estrictamente necesario no influye en el proceso negativamente, pero sí influye en los costos del consumo de energía y de mano de obra no necesaria, lo que acarrea un encarecimiento del proceso industrial.

2.5.6. Velocidad de lixiviación

En la lixiviación de materiales solubles del interior de una partícula por acción de un disolvente, el proceso general consiste en los siguientes pasos:

- El disolvente se transfiere del volumen de solución a la superficie del sólido
- Después, dicho solvente penetra o se difunde en el sólido
- El soluto se disuelve en el disolvente

2.5.7. Lixiviación por maceración

La maceración es un proceso de extracción sólido-líquido. El producto sólido (materia prima) posee una serie de compuestos solubles en el líquido extractante, que son los que se pretende extraer.

En general, en la industria química se suele hablar de extracciones, pero, cuando se trata de alimentos, hierbas y otros productos para consumo humano se emplea el término maceración. En este caso, el agente extractante (la fase líquida) suele ser agua, pero también se emplean otros líquidos como vinagre, jugos, alcoholes o aceites aderezados con diversos ingredientes que modificarán las propiedades de extracción del medio líquido.

A veces el producto obtenido es el extracto propiamente dicho, en otras es el sólido sin los citados compuestos o incluso ambas partes.

La naturaleza de los compuestos extraídos depende de la materia prima empleada, así como del líquido de maceración. En los casos en que se utilice el

producto extraído se suele emplear una etapa de secado ya sea al sol, con calor o incluso una liofilización.

En forma simple, la maceración consiste en mantener en contacto, a temperatura ordinaria y durante un tiempo variable, una cantidad determinada de la sustancia macerada a la que se quiere extraer el componente, con el volumen de disolvente prescrito.

La maceración es recomendable para la extracción de aquellas sustancias que tienen principios activos muy solubles o que se alteran con el calor.

2.5.8. Tipos de maceración

La maceración es el método de extracción de los principios activos de una sustancia, la cual consiste en dejar reposar dicha sustancia durante un periodo considerable que puede oscilar entre 6 horas y varias semanas.

2.5.8.1. Maceración en frío

Consiste en sumergir el producto a macerar en un líquido y dejarlo un determinado tiempo, para transmitir al líquido las características del producto macerado. Los productos a macerar son varios; en la gastronomía se puede destacar la infusión de especias varias en aceite de oliva extra virgen, concediendo a estos últimos aromas y paladares propios de las especias maceradas. Son especialmente recomendados para ensaladas y platos fríos.

También se podrá añadir a un recipiente con la menor cantidad de agua posible, solo la suficiente como para cubrir totalmente el producto. Esto se hace por un lapso más o menos largo, dependiendo de lo que se vaya a macerar.

2.5.8.2. Maceración con calor

El proceso a ejecutar en este tipo de maceración es el mismo que en la maceración en frío, solo que en este caso puede variar el medio por el cual se logra. El tiempo varía mucho en comparación con la maceración en frío, ya que al utilizar calor se acelera el proceso. Como referencia se toma que 3 meses de maceración en frío es igual a 2 semanas en maceración con calor, esto en el caso de las plantas y hierbas medicinales.

La desventaja de la maceración en calor es que no logra extraer totalmente pura la esencia del producto a macerar, ya que siempre degrada o destruye alguna pequeña parte de esta (muchas veces se trata de compuestos termolábiles).

Muchas veces, para acortar más los tiempos de extracción y que las sustancias pasen el menor tiempo posible a elevadas temperaturas, se hacen extracciones con corriente de vapor.

2.5.8.3. Maceración estática

El proceso clásico de maceración consiste en dejar la materia prima en contacto con el solvente a temperatura ambiente durante varios días, con agitación ocasional, este es un proceso sumamente lento.

2.5.8.4. Maceración dinámica

Para abreviar el tiempo de operación, la materia prima y el solvente deben mantenerse en movimiento constante (fluido en dos fases).

2.5.9. Extracción líquido-líquido

La extracción líquido-líquido, también conocida como extracción con solventes o con disolventes, es un proceso fisicoquímico empleado para separar una mezcla utilizando la diferencia de solubilidad de sus componentes entre dos líquidos inmiscibles o parcialmente miscibles (por ejemplo, agua y cloroformo o éter etílico y agua).

En la extracción líquido-líquido, se extrae del seno de un líquido A una sustancia (solute) poniendo A en contacto con otro líquido B, inmiscible o parcialmente miscible con A y que tiene mayor afinidad por el soluto, pasando la sustancia del seno del líquido A al seno de B.

Con esta operación se busca concentrar un analito o bien separarlo de una matriz compleja o con interferentes.

La transferencia del componente disuelto (solute) se puede mejorar por la adición de agentes saladores a la mezcla de alimentación o de agentes formadores de complejos al disolvente de extracción. En algunos casos se puede utilizar una reacción química para mejorar la transferencia, por ejemplo, el empleo de una solución cáustica acuosa (como una solución de hidróxido de sodio) para extraer fenoles de una corriente de hidrocarburos.

Un concepto más complicado de la extracción líquido-líquido se utiliza en un proceso para separar completamente dos solutos. Un disolvente primario de extracción se utiliza para extraer uno de los solutos presentes en una mezcla (en forma similar al agotamiento en destilación) y un disolvente lavador se utiliza para depurar el extracto libre del segundo soluto (semejante a la rectificación en destilación).

2.5.10. Extracción enzimática líquido-líquido

La formación de dos fases líquidas puede ser inducida en función de la incompatibilidad de dos polímeros que termodinámicamente no son estables disueltos en la misma fase. Es, por lo tanto, posible que una enzima migre preferencialmente a una de las fases lográndose una concentración-purificación, Kula (27) ha descrito fisicoquímicamente estos sistemas y los ha aplicado a la purificación de varias enzimas. Los polímeros normalmente usados son el polietilenglicol por un lado y de extrañas o fosfatos por otro. Aunque el polietilenglicol se ha empleado también como agente precipitante y estabilizante de proteínas.

2.5.11. Solventes

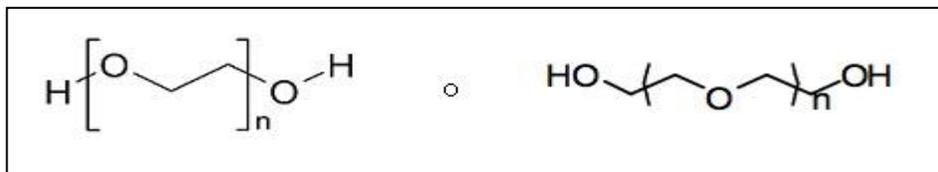
Es una sustancia en la que se diluye un soluto, resultando en una solución; normalmente es el componente de una solución presente en mayor cantidad.

2.5.11.1. Polietilenglicol

El polietilenglicol (PEG) es un poliéter ampliamente empleado en la industria. Su nombre generalmente aparece asociado a un número que hace referencia a la masa molecular del polímero u oligómero; por ejemplo, un PEG con $n = 9$ tendría un peso molecular medio de aproximadamente 400 daltons y sería etiquetado como PEG 400. La distribución del tamaño se puede caracterizar estadísticamente por su peso molecular promedio en peso (M_w) y su peso molecular promedio en número (M_n), la relación de los cuales se llama el índice de polidispersidad (M_w/M_n). El M_w y M_n se pueden medir por espectrometría de masas.

Su estructura química puede representarse como HO-(CH₂-CH₂-O)_n-H, cada vez está siendo más usado como biomaterial debido a sus propiedades físicoquímicas. Los acrónimos PEG, PEO o POE refieren a un oligómero o polímero de óxido de etileno, los tres nombres son químicamente sinónimos.

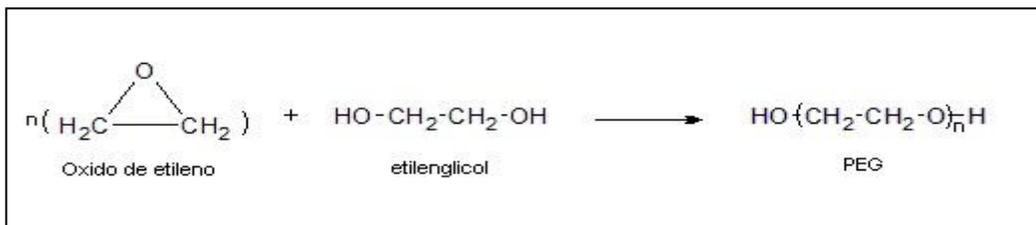
Figura 4. **Estructura química polietilenglicol**



Fuente: *Tecnología de los plásticos*. www.google.com.gt/search?q=tipos+de+extraccion&ei=tDRAVfnbGcqMNubcgJgJ#q=polietilenglicol. [Consulta: 10 de noviembre de 2013].

El polietilenglicol se produce por la interacción del óxido de etileno con agua, etilenglicol u oligómeros de etilenglicol. La reacción está catalizada por catalizadores ácidos o básicos, se prefiere partir de etilenglicol o sus oligómeros que del agua, ya que esto permite obtener polímeros de baja polidispersión. La longitud de la cadena de polímero depende de la proporción de reactantes.

Figura 5. **Reacción producción polietilenglicol**



Fuente: *Tecnología de los plásticos*. www.google.com.gt/search?q=tipos+de+extraccion&ei=tDRAVfnbGcqMNubcgJgJ#q=polietilenglicol. [Consulta: 10 de noviembre de 2013].

Dependiendo del tipo de catalizador, el mecanismo de polimerización puede ser catiónico o aniónico. Es preferible el mecanismo aniónico porque conduce a la obtención de PEG con menor polidispersidad. La polimerización de óxido de etileno es un proceso exotérmico. El polietilenglicol de alto peso molecular se sintetiza por polimerización en suspensión.

2.5.11.2. Polietilenglicol como disolvente

El PEG es soluble en agua, por lo que la mayoría de sus aplicaciones se dan en disoluciones acuosas, siendo mayor esta solubilidad a mayor peso molecular del PEG.

El PEG puede ser recuperado y reciclado de la disolución por extracción o destilación directa.

2.6. Sales inorgánicas

Las sales son compuestos iónicos heterodiatómicos y heteropoliatómicos (hasta 5 iones) que resultan de la reacción de neutralización y metátesis entre sustancias de propiedades ácido-básicas opuestas.

Las sales resultan de la neutralización entre un ácido y una base, un ácido y un metal, un óxido ácido y uno básico, un hidróxido y un metal, una base y un óxido o una sal y una sal; en todos los casos se produce sal y agua.

Las sales fundidas o en solución se disocian en iones; en estas, la base proporciona el catión y el ácido aporta el anión; un ejemplo es la sal de cocina NaCl.

Cuando una cantidad conocida de átomos de hidrógenos de un ácido es reemplazada por igual cantidad de átomos de un metal, se obtiene una sal.

2.7. Intercambio iónico

El intercambio iónico es una interacción de iones entre dos electrolitos o entre una disolución de electrolitos y un compuesto de coordinación o ion completo. En la mayoría de los casos se utiliza el término para referirse a procesos de purificación, separación y descontaminación de disoluciones que contienen dichos iones, empleando para ello sólidos poliméricos o minerales dentro de dispositivos llamados intercambiadores de iones.

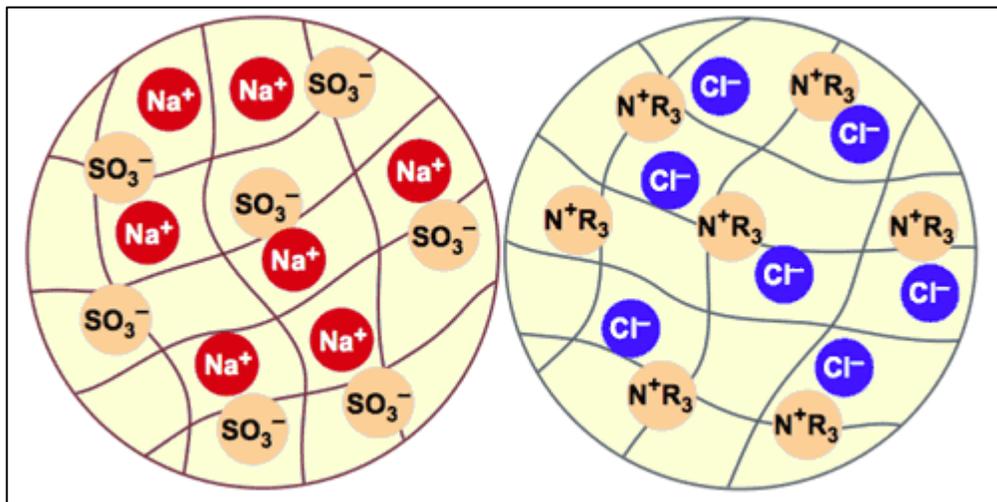
Los intercambiadores de iones suelen contener resinas de intercambio iónico (porosas o en forma de gel), zeolitas, arcilla y humus del suelo. Los intercambiadores de iones pueden ser intercambiadores de cationes, para iones cargados positivamente (cationes), o intercambiadores de aniones para iones con carga negativa (aniones).

2.7.1. Resina de intercambio iónico

Son perlas de plástico minúsculas, con un diámetro de aproximadamente 0,6 mm. Estas esferulitas son porosas y contienen agua, que es invisible y no se puede retirar, la cual se expresa como retención de humedad. La estructura de la resina es un polímero (como todos los plásticos) en el cual un ion fijo ha sido inmovilizado de manera permanente. Este ion no se puede quitar o reemplazar porque pertenece a la estructura de la resina. Para mantener la neutralidad eléctrica de la resina, cada uno de estos iones fijos está neutralizado por un ion de carga opuesta, el cual es móvil y puede entrar o salir de la resina.

La figura 6 representa esquemáticamente las perlas de resinas intercambiadoras de cationes y de aniones. En la figura, las líneas oscuras representan el esqueleto polimérico de la resina que es poroso y contiene agua. Los iones fijos de la resina intercambiadora de cationes son sulfonatos (SO_3^-) atados al esqueleto y los iones móviles son cationes sodio (Na^+). Las resinas intercambiadoras de cationes, por ejemplo la Amberlite 1 000, son muchas veces suministradas en la forma sódica.

Figura 6. **Representación esquemática de resinas intercambiadoras de cationes y de aniones**



Fuente: DARDEL, Francois. *Intercambio iónico*. p. 127.

Cada ion que entra en la resina produce la salida de otro ion de misma carga, para mantener la neutralidad eléctrica, eso es lo que se llama intercambio iónico. Solo iones de la misma carga se pueden cambiar, no es posible fabricar una resina que pueda intercambiar simultáneamente cationes y aniones, porque los cationes fijos dentro de la resina neutralizarían los aniones fijos y ningún intercambio sería posible.

Las resinas de intercambio iónico son particularmente adecuadas para la eliminación de impurezas por varias razones:

- Poseen una alta capacidad para los iones que se encuentran en bajas concentraciones.
- Son estables y se regeneran fácilmente, los efectos de la temperatura son en su mayoría insignificantes.

Las resinas catiónicas fuertes se forman tratando a las esferas con ácido sulfúrico concentrado (un proceso conocido como sulfonación), para formar grupos sulfónico- ácidos permanentes de carga negativa a través de las esferas. Los sitios de intercambio formados de esta manera se encuentran ubicados a través de la esfera. El proceso de intercambio iónico no es un fenómeno de superficie, más del 99 % de la capacidad de un material de intercambio iónico se encuentra en el interior de la esfera.

Los requisitos básicos de los materiales de las esferas de intercambio iónico son la insolubilidad, el tamaño de la esfera y su resistencia a las fracturas. La resina deberá ser insoluble bajo condiciones normales de funcionamiento, deberá tener dimensiones uniformes con un tamaño normal que varía entre 16 y 50 US Mesh (tamaño estadounidense de malla), además, el hinchamiento y contracción de la esfera de resina durante el agotamiento y la regeneración no deberán causar que revienten las esferas. Asimismo, una propiedad importante de las resinas de intercambio iónico es que el sitio activo se encuentra permanentemente ligado a la esfera.

Las resinas de intercambio iónico pueden ser fabricadas en una de dos estructuras físicas: gelatinosa o macroporosa.

Las resinas gelatinosas son polímeros homogéneos entrecruzados y son las resinas más comúnmente disponibles, estas tienen sitios de intercambio distribuidos de forma pareja a través de la esfera.

Las resinas macro porosas fueron introducidas comercialmente en 1959 y están hechas con grandes poros que permiten el acceso a sitios interiores de intercambio. También se conocen como resinas macroreticulares o de poros fijos. Son fabricadas a través de un proceso que deja una red de vías a través de la esfera, esta estructura con apariencia esponjosa permite que la porción activa de la esfera contenga un nivel elevado de entrecruzamiento de DVB (divinilbenzeno) sin afectar la cinética del intercambio. Desafortunadamente, también significa que la resina tiene una menor capacidad porque las esferas contienen menos sitios de intercambio ya que los poros pueden ocupar entre 10 % y 30 % del polímero.

2.7.1.1. Selectividad de resinas

La selectividad o afinidad de resinas de intercambio iónico es influida por las propiedades de la esfera, los iones intercambiados y la solución en la cual están presentes los iones.

El agua es un componente esencial en las resinas de intercambio iónico, por ejemplo, las resinas catiónicas de ácido fuerte contienen más o menos 50 % de humedad. La cantidad de entrecruzamiento de la esfera tiene un impacto sobre el contenido de humedad de la esfera y, por su parte, el contenido de humedad tiene un impacto sobre la selectividad. Una esfera con un alto contenido de humedad tiene alta porosidad y los grupos activos se encuentran más separados uno del otro.

2.7.1.2. Cinética de resinas

La tasa de intercambio, o cinética, de las reacciones de intercambio iónico es gobernada por varios factores. La solución que está siendo tratada, ya que al aumentar la concentración se puede acelerar la velocidad de la reacción. La cantidad de entrecruzamiento de DVB en la esfera determina la porosidad de la esfera y la movilidad iónica dentro de la esfera.

El tamaño de los iones que están siendo intercambiados también influye en la velocidad cinética y depende un poco del tamaño de los poros en la estructura de la resina. Las esferas más pequeñas presentan una vía de difusión más corta hacia los sitios activos en su parte interior.

La resina tiene una mayor afinidad hacia los iones de mayor valencia, por lo que la predominancia de estos puede causar una mayor tasa de reacción.

Otros elementos que influyen incluyen la temperatura, la forma iónica y la fortaleza de los sitios de intercambio. Una mayor temperatura puede acelerar las reacciones químicas. La reacción de intercambio es un proceso de difusión, por lo que la tasa de difusión en el sitio de intercambio iónico tiene algún efecto; además, la fortaleza del sitio de intercambio, ya sea fuerte o débilmente ácido o básico, afecta la tasa de reacción.

2.7.2. Cromatografía

La cromatografía es un método físico de separación para la caracterización de mezclas complejas, la cual tiene aplicación en todas las ramas de la ciencia.

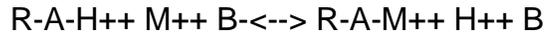
Es un conjunto de técnicas basadas en el principio de retención selectiva, cuyo objetivo es separar los distintos componentes de una mezcla, permitiendo identificar y determinar las cantidades de dichos componentes. Diferencias sutiles en el coeficiente de partición de los compuestos da como resultado una retención diferencial sobre la fase estacionaria y, por tanto, una separación efectiva en función de los tiempos de retención de cada componente de la mezcla.

2.7.2.1. Cromatografía de intercambio iónico

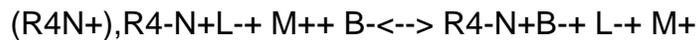
La cromatografía de intercambio iónico (cromatografía iónica) es un proceso que permite la separación de iones y moléculas polares, basada en las propiedades de carga de las moléculas. Puede ser usada en casi cualquier tipo de molécula cargada, incluyendo grandes proteínas, pequeños nucleótidos y aminoácidos. La solución que se inyecta es usualmente llamada muestra y los componentes separados individualmente son llamados analitos. Es usada a menudo en purificación de proteínas, análisis de agua o control de calidad.

La fase estacionaria (resina de intercambio) muestra en la superficie grupos funcionales iónicos que interactúan con iones de carga opuesta. Este tipo de cromatografía se subdivide a su vez en la cromatografía de intercambio catiónico y cromatografía de intercambio aniónico.

La cromatografía de intercambio catiónico retiene cationes debido a que la fase estacionaria muestra un grupo funcional cargado negativamente (SO_3^- , CO_2^-). Las resinas cuyo grupo funcional activo es un sulfonato (SO_3^-) se consideran resinas intercambiadoras ácidas fuertes, mientras que aquellas cuyo grupo funcional activo es un ion carboxilato (CO_2^-) se consideran resinas ácidas débiles:



La cromatografía de intercambio de aniones retiene aniones usando grupos funcionales cargados positivamente, como un catión de amonio cuaternario.



2.7.2.2. Cromatografía en columna

Es el método más utilizado para la separación de compuestos orgánicos a escala preparativa. La fase estacionaria se deposita en el interior de una columna de vidrio que termina con una placa porosa que impide su paso y en un estrechamiento con una llave. La mezcla se deposita sobre la parte superior de la fase estacionaria mientras que la fase móvil atraviesa el sistema. Los compuestos van saliendo por separado de la columna y se recogen en fracciones, los más polares quedan más retenidos y, para que salgan, generalmente hace falta aumentar la polaridad del disolvente. El tiempo necesario para eluir un compuesto de la columna se llama tiempo de retención.

Las variables que más influyen en la eficacia de la separación en cromatografía son las siguientes:

- Diámetro de la columna y cantidad de adsorbente: la altura del adsorbente está relacionada con la diferencia de R_f de los componentes de la mezcla, el diámetro de la columna con la cantidad de producto a separar.

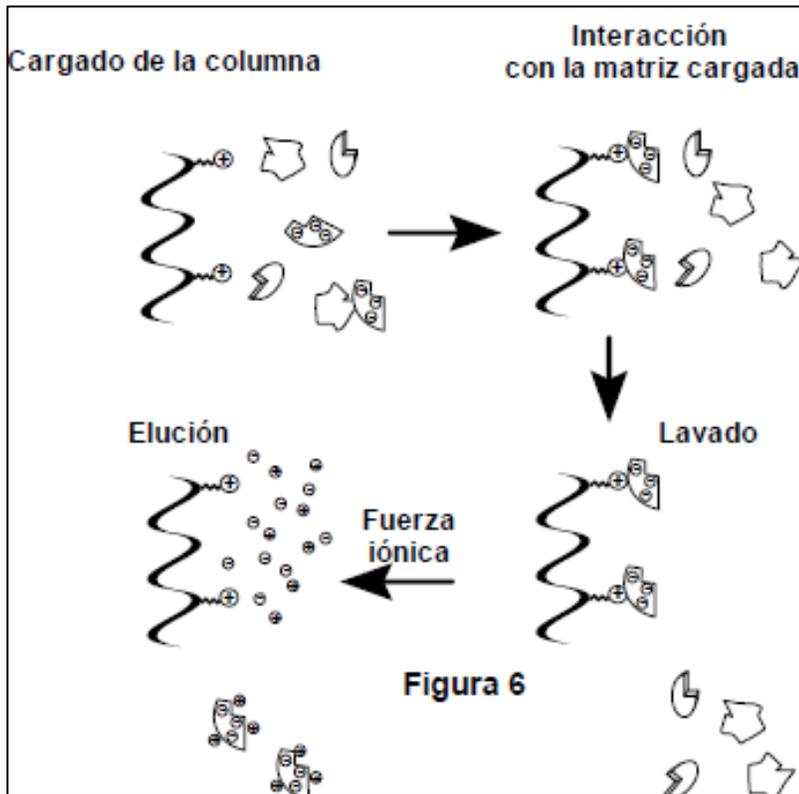
- Elección del disolvente: el disolvente tiene que conducir a una buena separación de los componentes de la mezcla, utilizándose en muchos casos mezclas de disolventes y realizándose una elución en gradiente.

2.7.2.3. Separación de proteínas, enzimas

Las proteínas tienen numerosos grupos funcionales que tienen cargas positivas y negativas. La cromatografía de intercambio iónico separa las proteínas de acuerdo a su carga neta, la cual depende la composición de la fase móvil. Ajustando el pH o la concentración de iones de la fase móvil, varias moléculas de proteína pueden ser separadas. Por ejemplo, si la proteína tiene una carga positiva con un pH de 7, entonces puede unirse a una columna cargada negativamente, mientras que una proteína con carga negativa no lo podría hacer; también podría eliminarse cambiando el pH para que la carga neta de la proteína sea negativa.

La elución puede realizarse de dos formas diferentes. La más usual consiste en aumentar progresivamente la concentración de un contraion, a modo de desplazar el equilibrio de unión de la macromolécula hacia la forma libre. El contraion es normalmente una sal (NaCl, KCl, entre otros) disuelta en el eluyente. El cambio de la fuerza iónica en la fase móvil tiene un efecto más sutil, trabaja con iones de la fase móvil interactuando con los iones inmovilizados, de preferencia sobre estos, en la fase estacionaria. Estos escudos de la fase estacionaria de la proteína permiten a la proteína eluirse.

Figura 7. **Cromatografía de intercambio iónico**



Fuente: Universidad Nacional del Rosario. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. *Métodos cromatográficos*. <http://www.fbioyf.unr.edu.ar/evirtual/pluginfile.php/6799/modresource/Content/0/separacióndebiomoleculas.pdf>. [Consulta: 18 de febrero de 2015].

3. DISEÑO METODOLÓGICO

3.1. Localización

Laboratorio de Investigaciones de Extractos Vegetales (LIECVE), sección Química Industrial, Centro de Investigaciones de Ingeniería (CII), Universidad de San Carlos de Guatemala (campus central).

Estudios realizados: variación térmica y de pH en abomasos bovinos para obtención de quimosina.

3.2. Variables

Representa todo aquello que varía o que está sujeto a algún tipo de cambio, se trata de algo que se caracteriza por ser inestable, inconstante y mudable.

Tabla I. **Variables independientes**

| Operación | Descripción | Instrumentos de medición |
|--------------------|---|---------------------------------|
| Temperatura | Variación de temperatura | Termómetro |
| pH | Variación de pH a temperatura constante | Potenciómetro |

Continuación de la tabla I.

| | | |
|-----------------------------|-----------------------------------|---|
| Tiempo de extracción | Maceración Tiempo (2 horas) | Reloj |
| Agitación | Revoluciones por minuto (RPM) 600 | Reóstato |
| Etapas de extracción | Ciclos | <ul style="list-style-type: none"> • Extracción sólido-líquido • Extracción líquido-líquido • Cromatografía de columna |
| Etapas de elución | Separación | <ol style="list-style-type: none"> 1. Elución de la columna empleando una solución salina con NaCl a 18 % en peso de la solución mezclada para eliminación de residuos de PEG y pepsina. 2. Re-elución de la resina con fosfato disódico 0,05 M a pH 5,8 con NaCl 2 M para recuperar la quimosina de la resina. |
| Solución salina | Concentración | % g/mL |

Fuente: elaboración propia.

Tabla II. **Variables dependientes**

| Operación | Descripción |
|-----------------------------|---|
| Fuerza de cuaje | Coagulación en función del tiempo y cantidad de leche utilizada (s ¹) |
| Índice de refracción | Índice de refracción de quimosina bovina |

Fuente: elaboración propia.

3.2.1. Variable de respuesta

La variable de respuesta para cada tratamiento fue la obtención del rendimiento extractivo o fuerza de cuaje de quimosina bovina en función de la variación de pH y temperatura.

3.3. Delimitación del campo de estudio

La investigación es de carácter cuantitativo-experimental-comparativo en donde se evaluó, a nivel laboratorio, el rendimiento extractivo, contenido en el abomaso, realizando una caracterización fisicoquímica de la enzima extraída, determinando el pH y la temperatura óptima de extracción.

3.4. Obtención de la materia prima

La materia prima, abomaso bovino, es el cuarto estómago de la vaca y es vendido en los mercados cantonales en puestos de cholojería a un precio de aproximadamente Q 15,00. El abomaso tiene un peso aproximado de 2,5 libras, que incluye grasa, restos de otros estómagos, recto, materia fecal y otros contaminantes. Al limpiar y descartar los restos no útiles, se deja únicamente la membrana interna, la cual contiene las enzimas de interés. Se obtienen aproximadamente 1,2 libras de membrana, con lo cual se puede llegar a obtener 400 ml de quimosina.

3.5. Recurso humano disponible

- Investigador: Vivian María Cano Salazar.
- Asesor: ingeniera química Telma Maricela Cano Morales, directora Centro de Investigaciones de Ingeniería/USAC.

- Asesor: ingeniero químico Mario José Mérida Meré, coordinador del Laboratorio de Investigación de Extractos Vegetales (LIEXVE), sección Química Industrial, Centro de Investigaciones de Ingeniería/ USAC.

3.6. Recursos materiales

Es la materia prima, materiales auxiliares, cristalería, reactivos y equipos utilizados en el desarrollo adecuado de la parte experimental del proyecto de investigación, a continuación se presenta el detalle de los mismos.

3.6.1. Equipo

A continuación se presenta todo el equipo utilizado en este trabajo de graduación.

3.6.1.1. Instrumentos de medición

- Balanza digital
- Termómetros de mercurio o de alcohol
- Potenciómetro
- Refractómetro Fisher Scientificde 60 Hz
- *Beakers* de 100, 250, 600 mL
- Pipetas volumétricas de 5, 10, 25 y 50 mL
- Probetas de 10, 50, 100, 250 y 500 mL respectivamente
- Erlenmeyers de 150, 250 mL
- Picnómetro 1mL

3.6.1.2. Equipo auxiliar

- Compresor, 100CFM, 100 PSIA
- Centrífuga
- Plancha de calentamiento con agitación
- Columna de intercambio iónico

3.6.1.3. Otros materiales

- Varillas de agitación
- Soporte universal
- Pinzas para soporte
- Ampollas de decantación

3.6.2. Equipo de protección personal

- Guantes
- Bata
- Mascarillas

3.6.3. Reactivos

- Polietilenglicol (PEG) 400, Distribuidora del Caribe.
- Sal inorgánica (sulfato de sodio anhídrido) grado industrial, Distribuidora del Caribe.
- Resina catiónica de ácido fuerte destinada a aplicaciones de suavizado de agua, marca Durolite.
- NaCl grado industrial, Distribuidora del Caribe.
- Fosfato diácido de sodio, Distribuidora del Caribe.

- Ácido sulfúrico 1 M, Distribuidora del Caribe.

3.6.4. Técnica cuantitativa o cualitativa

- Medición de densidades (g/mL)
- Medición del índice de refracción (adimensional)
- Monitoreo de variación de pH de extracción (2, 3, 4)
- Monitoreo de variación térmica de extracción (25 °C, 35 °C, 45 °C)
- Fuerza de cuajo (s^{-1})

3.6.5. Metodología experimental

- Descripción del procedimiento de extracción de quimosina bovina para la producción de cuajo, sometida a variación térmica y de pH
 - Se limpia el abomaso a mano, con un lienzo húmedo o bien sumergiéndolo en agua para eliminar, si tuviera en su interior, pasto digerido.
 - Licuado de los cuajos: en este proceso los estómagos se muelen en un medio líquido adecuado (agua desionizada), para romper la membrana del cuajo. La solución acuosa resultante contiene quimosina producida de forma natural, pepsina y otros contaminantes.
 - Filtrado de los restos celulares licuados.
 - A la solución del paso anterior se realiza una variación de pH.

- La solución del paso anterior se coloca en maceración dinámica durante dos horas con solución salina. Se le agregan cantidades efectivas de polietilenglicol (PEG 400) a 8 % en peso con respecto al volumen y de una sal inorgánica (sulfato disódico anhidro a 11 % respecto al volumen), para formar el sistema de dos fases.
- La solución resultante se deja reposar hasta que se separa en dos fases, una de polietilenglicol rica en quimosina y pepsina, y otra salina pobre en enzimas y rica en residuos enzimáticos inactivos.
- Luego, la fase de polietilenglicol rica en quimosina y pepsina se recupera mediante técnicas convencionales (centrifugado).
- La fase de polietilenglicol se pone en contacto con una resina de intercambio iónico, manteniendo o ajustando el pH de tal forma que la quimosina se una a la resina.
- Tras el contacto inicial, la resina se lava con una solución de NaCl, preferentemente bajo condiciones que no eliminen la quimosina de la resina pero que sí eliminen el polietilenglicol y la pepsina residuales.
- A continuación, la quimosina se eluye de la columna empleando una solución salina con NaCl a 18 % en peso de la solución mezclada, para eliminar los residuos de PEG y pepsina.
- Re-elución de la resina con fosfato disódico 0,05 M a pH 5,8 con NaCl 2 M para recuperar la quimosina de la resina.

- Descripción del procedimiento de medición del índice de refracción
 - Se limpia el prisma de Nicol con etanol y agua desmineralizada.
 - Se agregan 2 gotas de la enzima extraída al prisma, utilizando una micropipeta.
 - Utilizando el interruptor del lado izquierdo se enciende la lámpara y se ajusta para asegurar el brillo adecuado en el prisma de medición.
 - Se observa por el ocular y se gira la perilla de compensación de color hasta que aparece una línea clara y definida en el campo de visión.
 - Se gira la perilla de medición alineando la línea delimitadora con las líneas de intersección (ajustando claro y oscuro al centro).
 - Se mueve el interruptor de la parte inferior izquierda y se lee en la escala superior el índice de refracción. La operación se repite en función del pH y de la temperatura.
 - Se registra el índice de refracción.

3.7. Recolección y ordenamiento de la información para la obtención de la fuerza de cuaje

En el presente estudio de investigación, se recolectaron, ordenaron y procesaron los datos obtenidos del rendimiento, llamado también fuerza de

cuaje, de la producción de cuajo de la enzima quimosina extraída y de la enzima pepsina, que es un subproducto del proceso. Para ambas enzimas se utilizaron las ecuaciones que se presentan a continuación:

Ecuación número 1.

Rendimiento de quimosina para la obtención de cuajo (fuerza de cuaje)

$$F = \frac{10\ 000 * 24}{N}$$

Donde:

F = fuerza de cuaje (s⁻¹)

N = cantidad de tiempo, en segundos, en formar el cuajo

Esta ecuación se basa en la experimentación de un cuajo con una fuerza 1/1 0000, lo cual significa que 1 mL de cuajo, coagula 10 L de leche a 35 °C en 40 minutos.

Ecuación número 2.

Cantidad de cuajo en mililitros, por cada 100 litros de leche

$$C = \frac{L * 35 * 40}{F * T * M}$$

Donde:

C = cantidad de cuajo (mL cuajo / 100 mL leche)

L = cantidad de leche (mL)

F = fuerza de cuajo (s^{-1})

T = temperatura ($^{\circ}C$)

M = tiempo que toma en cuajar (min)

3.8. Análisis estadístico

Se realizó el análisis utilizando el software Minitab 16. Los análisis estadísticos realizados se basaron en ANOVA de factores descompilados y la prueba de chi-cuadrado, para la relación de la diferencia del rendimiento del extracto de la enzima quimosina para la producción de cuajo.

Los datos analizados son función de las variaciones de pH (2, 3, 4) y de temperatura (25 $^{\circ}C$, 35 $^{\circ}C$, 45 $^{\circ}C$), para cada una de las corridas realizadas.

Tabla III. **Análisis cuantitativo del rendimiento de quimosina (fuerza de cuaje), con variación pH (2, 3, 4) a 25 $^{\circ}C$**

| Media (s^{-1}) | Desviación estándar | Desviación estándar agrupada |
|--|----------------------------|---|
| 60,33 | 5,77 | 11,18 |
| 67,67 | 18,48 | |
| 57,00 | 0 | |

Fuente: elaboración propia.

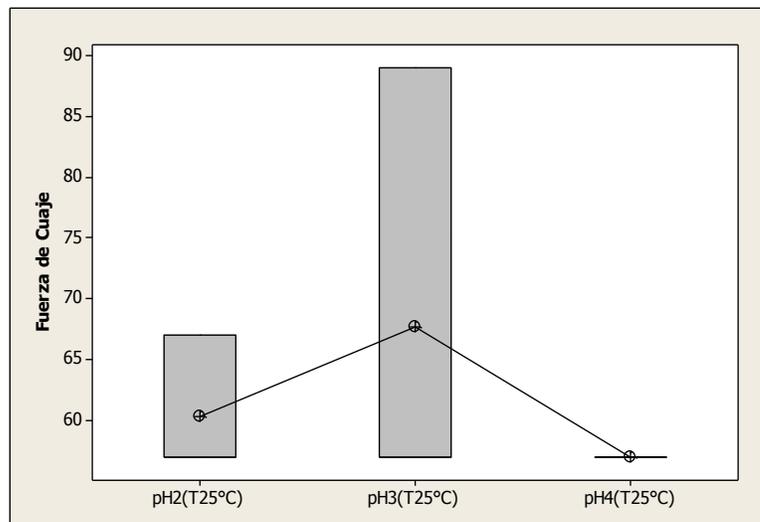
Tabla IV. **Análisis de varianza del rendimiento de quimosina (fuerza de cuajo), con variación de pH (2, 3, 4) a 25°C**

| pH | Agrupación por el método de Fisher** | F | Grados de libertad | Suma de cuadrado | Promedio de cuadrado | Probabilidad |
|-------|--------------------------------------|------|--------------------|------------------|----------------------|--------------|
| 2 | A | 0,72 | 2 | | 89 | 0,526 |
| 3 | A | | | | | |
| 4 | A | | | | | |
| Error | | | 6 | 749 | 125 | |
| Total | | | 8 | 928 | | |

* **Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes

Fuente: elaboración propia.

Figura 8. **Relación de rendimiento de quimosina respecto a la variación de pH (2, 3, 4) a 25 °C**



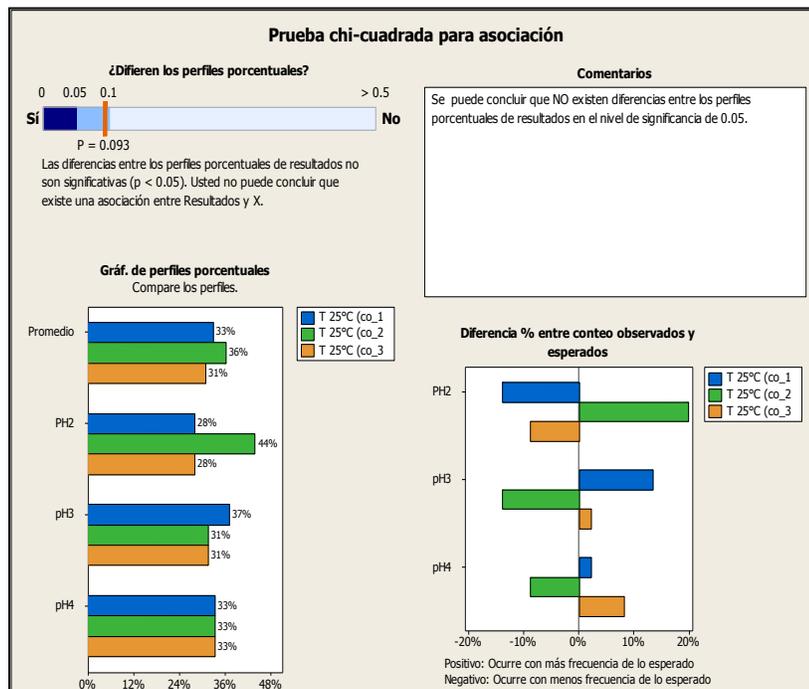
Fuente: elaboración propia, con programa Minitab 16.

Tabla V. Valores típicos, figura 8

| Número de muestras | T °C | pH | Q 1 | Mediana | Q 3 | Rango intercuartil I | Bigotes |
|----------------------|------|----|-----|---------|-----|----------------------|---------|
| 3 (corrida 1,2,3) | 25 | 2 | 57 | 57 | 63 | 10 | 57-67 |
| | | 3 | 57 | 57 | 89 | 32 | 57-89 |
| | | 4 | - | - | - | - | - |

Fuente: elaboración propia.

Figura 9. Prueba de chi-cuadrado, comparación de diferencias del rendimiento de quimosina (fuerza de cuaje), con variación de pH (2, 3, 4) a 25 °C



Fuente: elaboración propia, con programa Minitab 16.

Tabla VI. **Análisis cuantitativo del rendimiento de quimosina (fuerza de cuaje), con variación de pH (2, 3, 4) a 35 °C**

| Media (s⁻¹) | Desviación estándar | Desviación estándar agrupada |
|-------------------------------|----------------------------|-------------------------------------|
| 57,667 | 1,1155 | 7,696 |
| 64,667 | 13,279 | |
| 57,000 | 0,000 | |

Fuente: elaboración propia.

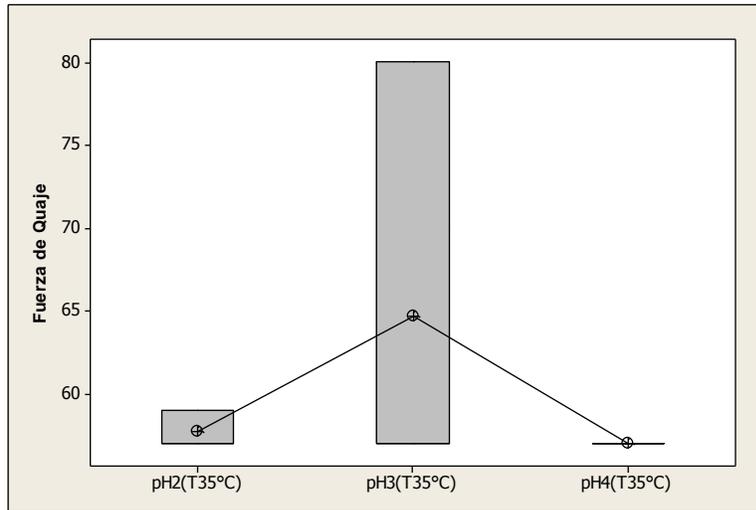
Tabla VII. **Análisis de varianza del rendimiento de quimosina (fuerza de cuaje), con variación de pH a 35 °C**

| pH | Agrupación por el método de Fisher** | F | Grados de libertad | Suma de cuadrado | Promedio de los cuadrado | Probabilidad |
|-----------|---|----------|---------------------------|-------------------------|---------------------------------|---------------------|
| 2 | A | 0,91 | 2 | 108,2 | 54,1 | 0,450 |
| 3 | A | | | | | |
| 4 | A | | | | | |
| Error | | | 6 | 355,3 | 59,2 | |
| Total | | | 8 | 463,6 | | |

** Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes

Fuente: elaboración propia.

Figura 10. **Relación del rendimiento de quimosina (fuerza de cuaje) respecto de la variación de pH a 35 °C**



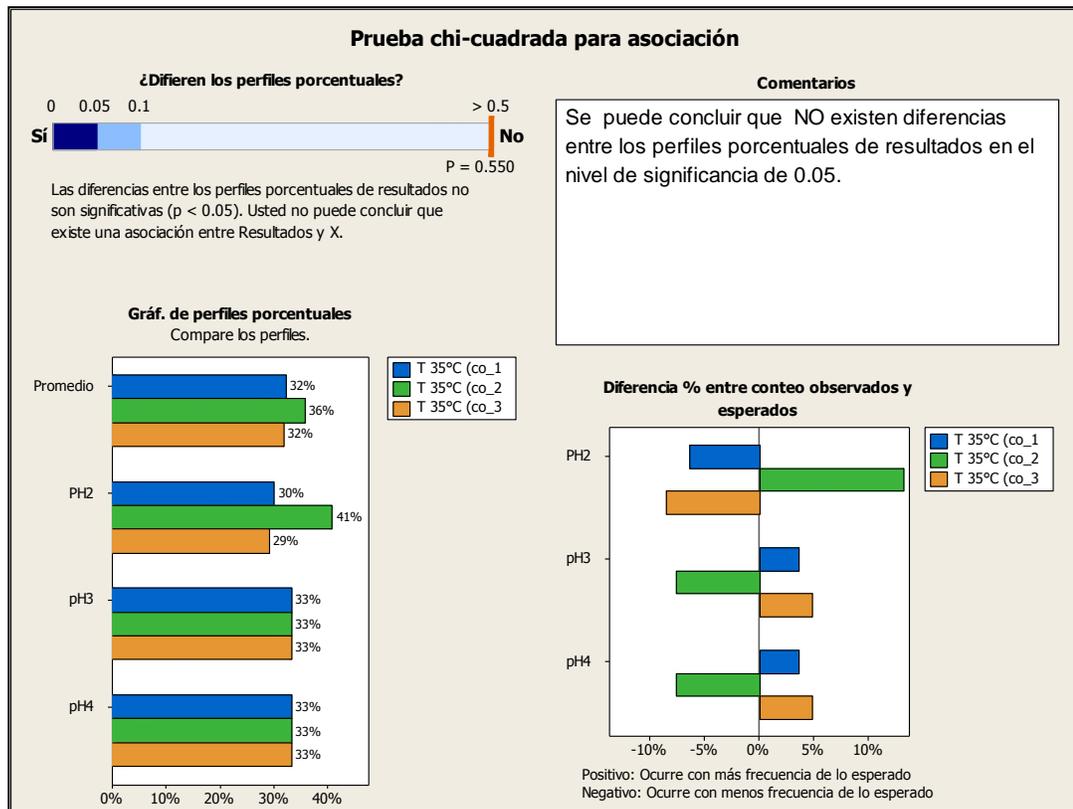
Fuente: elaboración propia, con programa Minitab 16.

Tabla VIII. **Valores típicos, figura 10**

| Número de muestras | T °C | pH | Q 1 | mediana | Q 3 | Rango intercuartil | Bigotes |
|--------------------|------|----|-----|---------|-----|--------------------|---------|
| 3(corrída 1,2,3) | 35 | 2 | 57 | 57 | 59 | 2 | 57-59 |
| | | 3 | 57 | 57 | 80 | 23 | 57-80 |
| | | 4 | - | 57 | - | - | - |

Fuente: elaboración propia.

Figura 11. Prueba de chi-cuadrado, comparación de diferencias del rendimiento de quimosina (fuerza de cuaje), con variación de pH (2, 3, 4) a 35 °C



Fuente: elaboración propia, con programa Minitab 16.

Tabla IX. **Análisis cuantitativo del rendimiento de quimosina (fuerza de cuaje), con variación pH (2, 3, 4) y 45 °C**

| Media (s⁻¹) | Desviación estándar | Desviación estándar agrupada |
|-------------------------------|----------------------------|-------------------------------------|
| 76 | 32,91 | 81,24 |
| 127 | 121,94 | |
| 93,67 | 63,51 | |

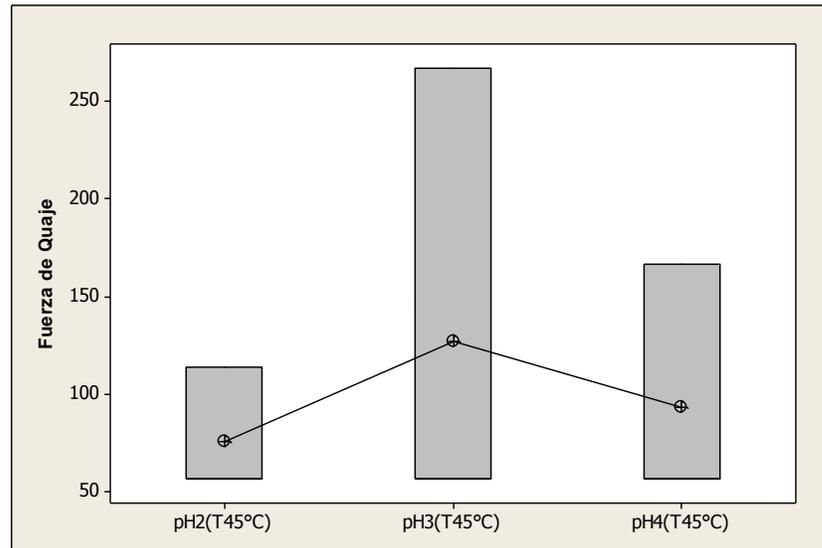
Fuente: elaboración propia.

Tabla X. **Análisis de varianza del rendimiento de quimosina (fuerza de cuaje), con variación de pH a 45 °C**

| pH | Agrupación por el método de Fisher** | F | Grados de libertad | Suma de cuadrados | Promedio de los cuadrado | Probabilidad |
|--|---|----------|---------------------------|--------------------------|---------------------------------|---------------------|
| 2 | A | 0,30 | 2 | 4024 | 2012 | 0,748 |
| 3 | A | | | | | |
| 4 | A | | | | | |
| Error | | | 6 | 39633 | 6605 | |
| Total | | | 8 | 43657 | | |
| ** Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes | | | | | | |

Fuente: elaboración propia.

Figura 12. **Relación del rendimiento de quimosina (fuerza de cuaje) respecto de la variación de pH a 45 °C**



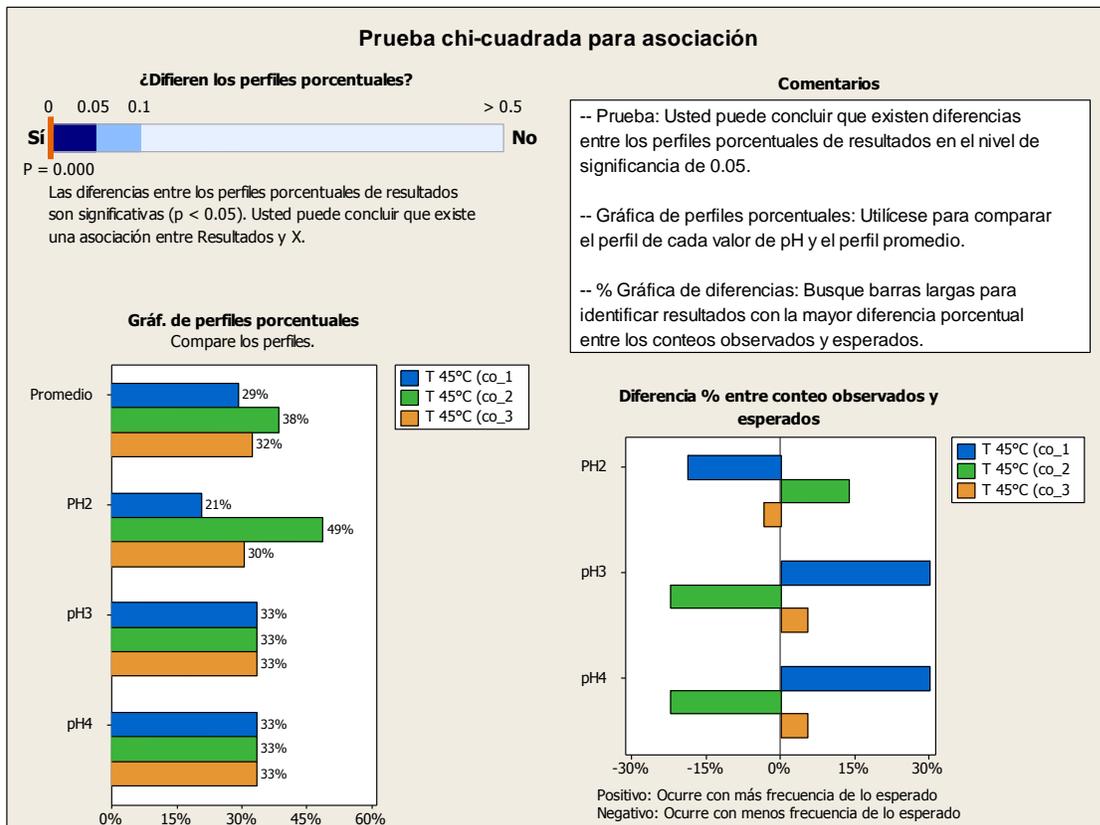
Fuente: elaboración propia, con programa Minitab 16.

Tabla XI. **Valores típicos, figura 12**

| Número de muestra | T °C | pH | Q 1 | mediana | Q 3 | Rango intercuartil | Bigotes |
|-------------------|------|----|-----|---------|-----|--------------------|---------|
| 3 (corrida 1,2,3) | 45 | 2 | 57 | 57 | 114 | 57 | 57-114 |
| | | 3 | 57 | 57 | 267 | 210 | 57-267 |
| | | 4 | 57 | 57 | 167 | 110 | 57-167 |

Fuente: elaboración propia.

Figura 13. Prueba de chi-cuadrado, comparación de diferencias del rendimiento de quimosina (fuerza de cuaje), con variación de pH (2, 3, 4) a 45 °C



Fuente: elaboración propia, con programa Minitab 16.

Tabla XII. **Análisis cuantitativo del rendimiento de pepsina (fuerza de cuaje), con variación pH (2, 3, 4) a 25 °C**

| Media (s⁻¹) | Desviación estándar | Desviación estándar agrupada |
|-------------------------------|----------------------------|-------------------------------------|
| 129,7 | 104,7 | 107,4 |
| 145,3 | 105,5 | |
| 139,7 | 111,9 | |

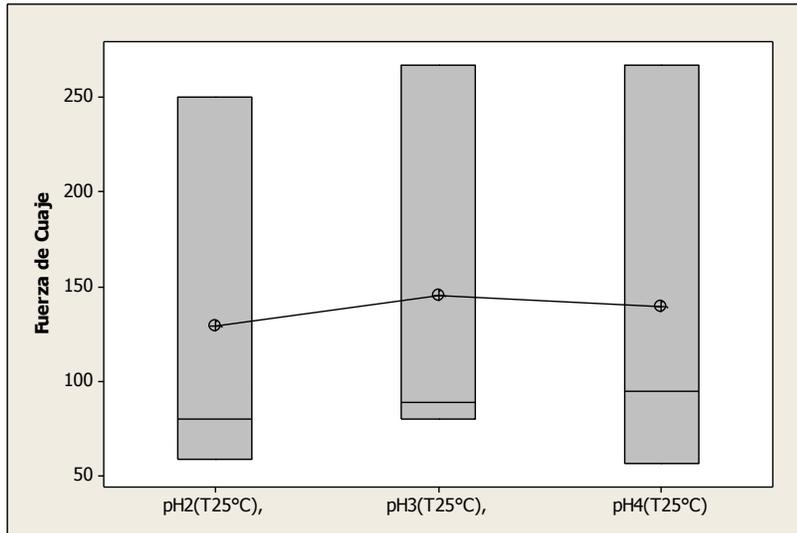
Fuente: elaboración propia.

Tabla XIII. **Análisis de varianza del rendimiento de pepsina (fuerza de cuaje), con variación de pH (2, 3, 4) a 25 °C**

| pH | Agrupación por el método de Fisher** | F | Grados de libertad | Suma de cuadrado | Promedio de cuadrado | Probabilidad |
|--|---|----------|---------------------------|-------------------------|-----------------------------|---------------------|
| 2 | A | 0,02 | 2 | 378 | 189 | 0,984 |
| 3 | A | | | | | |
| 4 | A | | | | | |
| Error | | | 6 | 6 922 | 11538 | |
| Total | | | 8 | 6966 | | |
| ** Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes | | | | | | |

Fuente: elaboración propia.

Figura 14. **Relación del rendimiento de pepsina (fuerza de cuajo) respecto de la variación de pH (2, 3, 4) a 25 °C**



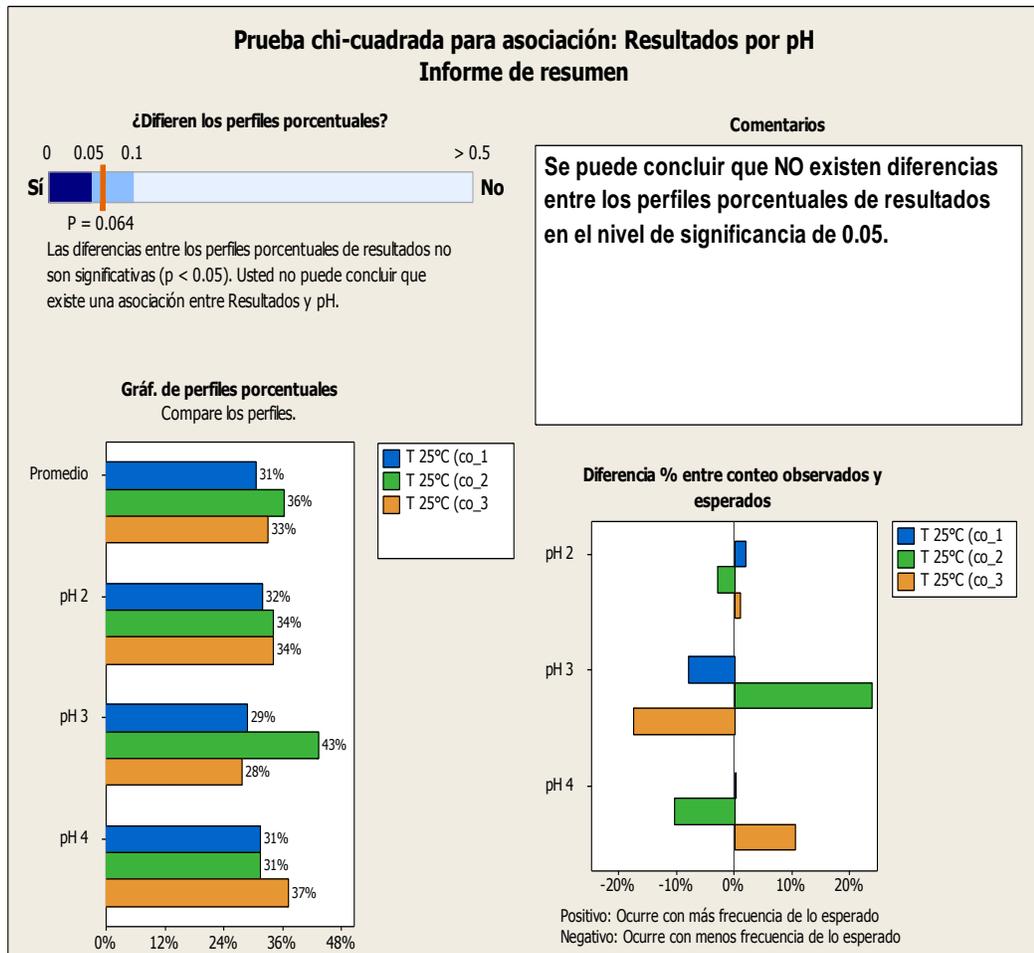
Fuente: elaboración propia, con programa Minitab 16.

Tabla XIV. **Valores típicos, figura 14**

| Numero muestras | T °C | pH | Q 1 | mediana | Q 3 | Rango intercuartil | Bigotes |
|-------------------------|------|----|-----|---------|-----|--------------------|---------|
| 3 (corrida 1,2,3) | 25 | 2 | 59 | 80 | 250 | 191 | 59-250 |
| | | 3 | 80 | 89 | 267 | 187 | 80-267 |
| | | 4 | 57 | 95 | 267 | 210 | 57-267 |

Fuente: elaboración propia.

Figura 15. Prueba de chi-cuadrado, comparación de diferencias del rendimiento de pepsina (fuerza de cuaje), con variación de pH (2, 3, 4) a 25 °C



Fuente: elaboración propia, con programa Minitab 16.

Tabla XV. **Análisis cuantitativo del rendimiento de pepsina (fuerza de cuaje) con variación pH (2, 3, 4) a 35 °C**

| Media (s ⁻¹) | Desviación estándar | Desviación estándar agrupada |
|--------------------------|---------------------|------------------------------|
| 313,3 | 312,8 | 233,4 |
| 267,3 | 218,3 | |
| 166,3 | 136,4 | |

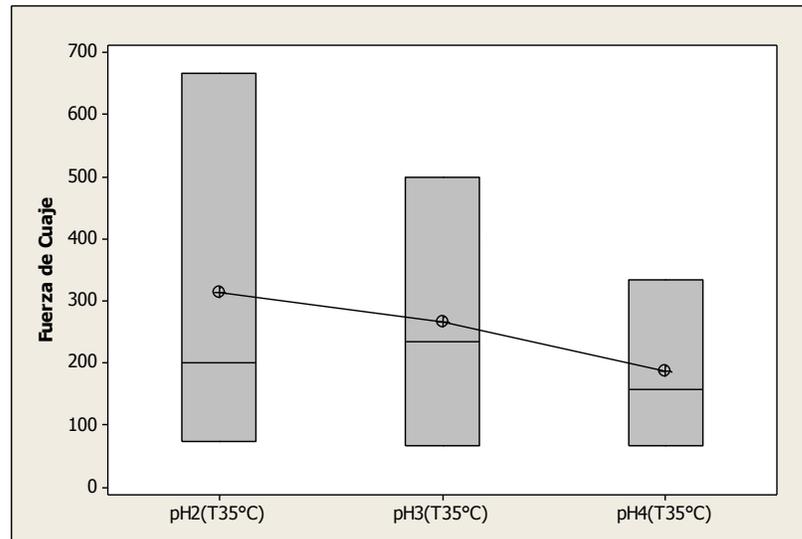
Fuente: elaboración propia.

Tabla XVI. **Análisis de varianza del rendimiento de pepsina (fuerza de cuaje), con variación de pH (2, 3, 4) a 35 °C**

| pH | Agrupación por el método de Fisher** | F | Grados de libertad | Suma de cuadrado | Promedio de cuadrado | Probabilidad |
|--|--------------------------------------|------|--------------------|------------------|----------------------|--------------|
| 2 | A | 0,23 | 2 | 24806 | 12403 | 0,804 |
| 3 | A | | | | | |
| 4 | A | | | | | |
| Error | | | 6 | 28200 | 5 400 | |
| Total | | | 8 | 33006 | | |
| ** Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes | | | | | | |

Fuente: elaboración propia.

Figura 16. **Relación de la variación de pH (2, 3, 4) a 35 °C respecto del rendimiento de pepsina (fuerza de cuaje)**



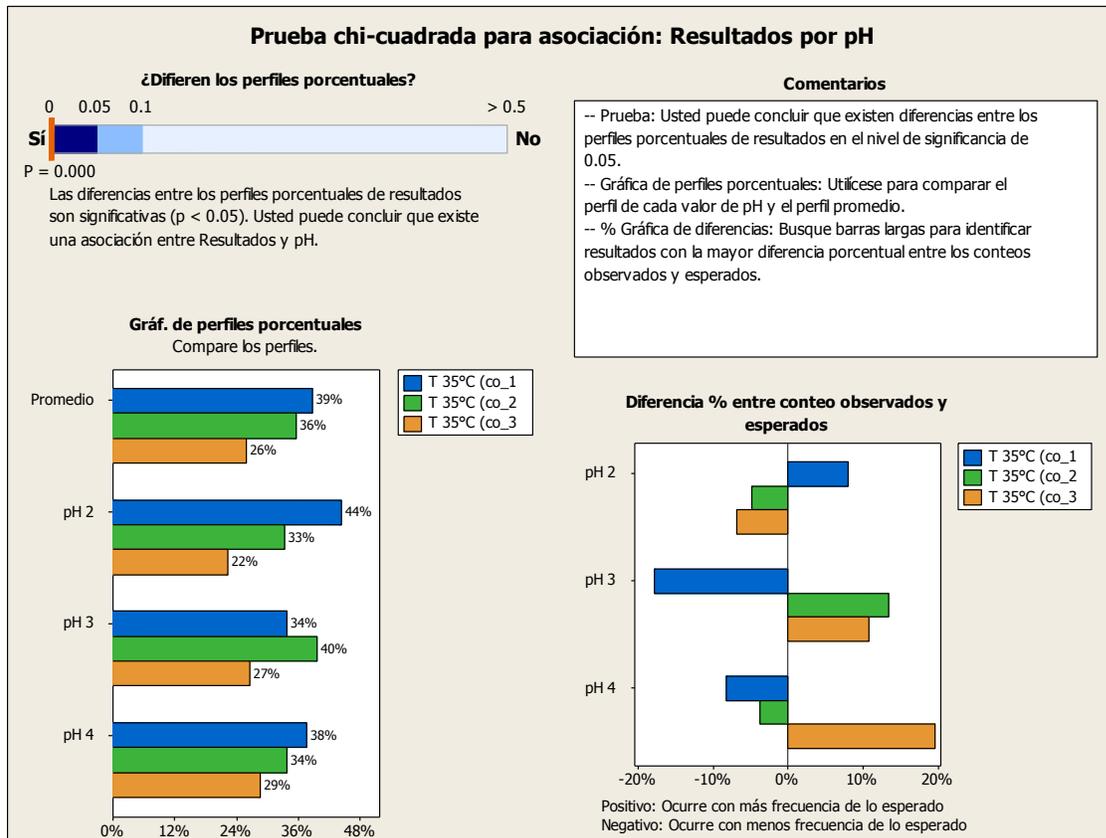
Fuente: elaboración propia, con programa Minitab 16.

Tabla XVII. **Valores típicos, figura 16**

| Número de muestras | T °C | pH | Q 1 | mediana | Q 3 | Rango intercuartil | Bigotes |
|----------------------|------|----|-----|---------|-----|--------------------|---------|
| 3 (corrida 1,2,3) | 35 | 2 | 73 | 200 | 667 | 584 | 73-167 |
| | | 3 | 67 | 235 | 500 | 433 | 67-500 |
| | | 4 | 67 | 157 | 335 | 268 | 67-335 |

Fuente: elaboración propia.

Figura 17. Prueba de chi-cuadrado, comparación de diferencias del rendimiento de pepsina (fuerza de cuaje), con variación de pH (2, 3, 4) a 35 °C



Fuente: elaboración propia, con programa Minitab 16.

Tabla XVIII. **Análisis cuantitativo del rendimiento de pepsina (fuerza de cuaje), con variación pH (2, 3, 4) a T 45 °C**

| Media (s⁻¹) | Desviación estándar | Desviación estándar agrupada |
|-------------------------------|----------------------------|-------------------------------------|
| 460,7 | 467,2 | 412 |
| 460,7 | 467,2 | |
| 355,7 | 269,6 | |

Fuente: elaboración propia.

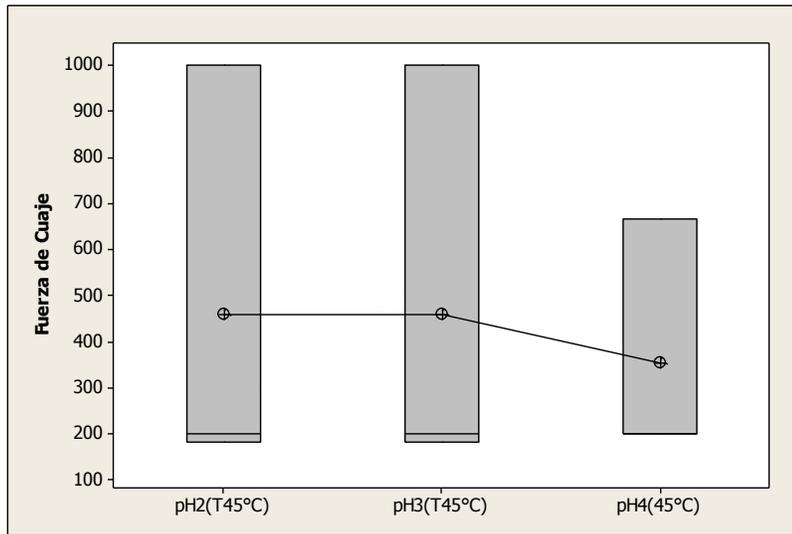
Tabla XIX. **Análisis de varianza del rendimiento de pepsina (fuerza de cuaje), con variación de pH (2, 3, 4) a 45 °C**

| pH | Agrupación por el método de Fisher** | F | Grados de libertad | Suma de cuadrado | Promedio de los cuadrado | Probabilidad |
|-----------|---|----------|---------------------------|-------------------------|---------------------------------|---------------------|
| 2 | A | 0,06 | 2 | 22050 | 11025 | 0,938 |
| 3 | A | | | | | |
| 4 | A | | | | | |
| Error | | | 6 | 1018358 | 169726 | |
| Total | | | 8 | 1040408 | | |

** Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes

Fuente: elaboración propia.

Figura 18. **Relación de la variación de pH (2, 3, 4) a 45 °C respecto al rendimiento de pepsina (fuerza de cuaje)**



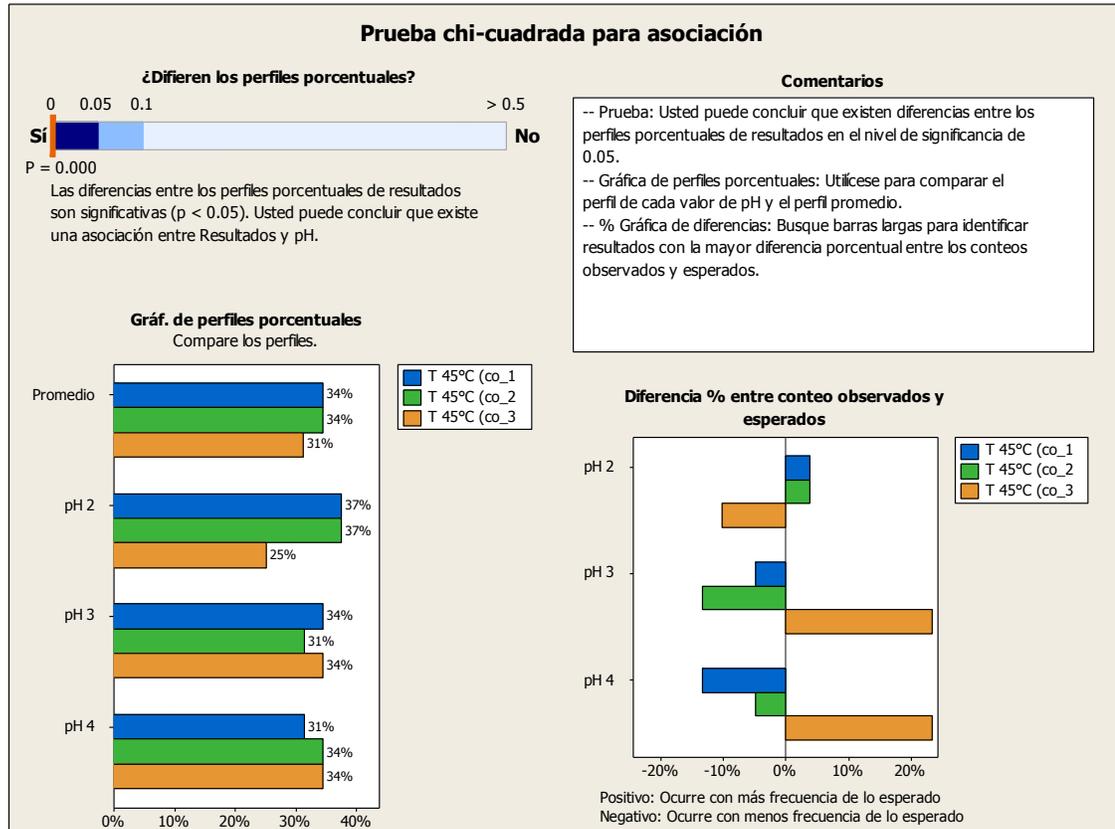
Fuente: elaboración propia, con programa Minitab 16.

Tabla XX. **Valores típicos, figura 18**

| Numero muestras | T °C | pH | Q 1 | mediana | Q 3 | Rango intercuartil | Bigotes |
|-------------------------|------|----|-----|---------|------|--------------------|----------|
| 3 (corrida 1,2,3) | 45 | 2 | 182 | 200 | 1000 | 818 | 182-1000 |
| | | 3 | 182 | 200 | 1000 | 818 | 182-100 |
| | | 4 | 200 | 200 | 667 | 467 | 200-667 |

Fuente: elaboración propia.

Figura 19. Prueba de chi-cuadrado, comparación de diferencias del rendimiento de pepsina con variación de pH (2, 3, 4) a 45 °C



Fuente: elaboración propia, con programa Minitab 16.

Tabla XXI. **Análisis cuantitativo del rendimiento de quimosina (fuerza de cuaje), a los distintos pH (2, 3, 4) y temperaturas (25 °C, 35 °C, 45 °C)**

| Media (s ⁻¹) | Desviación estándar | Desviación estándar agrupada |
|--------------------------|---------------------|------------------------------|
| 61,72 | 10,66 | 40,90 |
| 59,87 | 7,57 | |
| 87,83 | 69,63 | |

Fuente: elaboración propia.

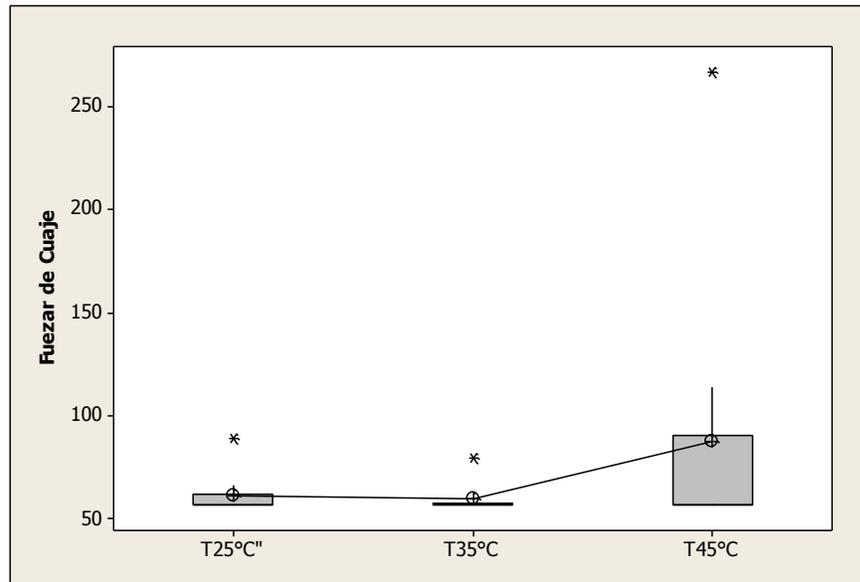
Tabla XXII. **Análisis de varianza del rendimiento de quimosina (fuerza de cuaje), a los distintos pH (2, 3, 4) y temperaturas (25 °C, 35 °C, 45 °C)**

| pH | Agrupación por el método de Fisher | F | Grados de libertad | Suma de cuadrad | Promedio de los cuadrado | Probabilidad |
|-------|------------------------------------|------|--------------------|-----------------|--------------------------|--------------|
| 2 | A | 1,32 | 2 | 4 400 | 2200 | 0,287 |
| 3 | A | | | | | |
| 4 | A | | | | | |
| Error | | | 24 | 40 150 | 1673 | |
| Total | | | 26 | 44 550 | | |

** Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes

Fuente: elaboración propia.

Figura 20. **Relación del rendimiento de quimosina (fuerza de cuaje) a los distintos pH (2, 3, 4) y temperaturas (25 °C, 35 °C, 45 °C)**



Fuente: elaboración propia, con programa Minitab 16.

Tabla XXIII. **Valores típicos, figura 20**

| Número de muestra | T °C | pH | Q 1 | Mediana | Q 3 | Rango intercuartil | Bigotes |
|----------------------|------|----|-------|---------|-------|--------------------|-------------|
| 9 (corrida 1,2,3) | 25, | 2 | 57,14 | 57,14 | 61,9 | 4,76 | 57,14-66,66 |
| | 35, | 3 | 57,14 | 57,14 | 57,98 | 0,84 | 57,14-58,82 |
| | 45 | 4 | 57,14 | 57,14 | 90,47 | 33,33 | 57,14-114,8 |

Fuente: elaboración propia.

Tabla XXIV. **Análisis de comparación cuantitativa del rendimiento de pepsina (fuerza de cuaje) a los distintos pH (2, 3, 4) y temperaturas (25 °C, 35 °C, 45 °C)**

| Media (s ⁻¹) | Desviación estándar | Desviación estándar agrupada |
|--------------------------|---------------------|------------------------------|
| 138 | 93,3 | 215,1 |
| 59,9 | 7,6 | |
| 425,6 | 360,7 | |

Fuente: elaboración propia.

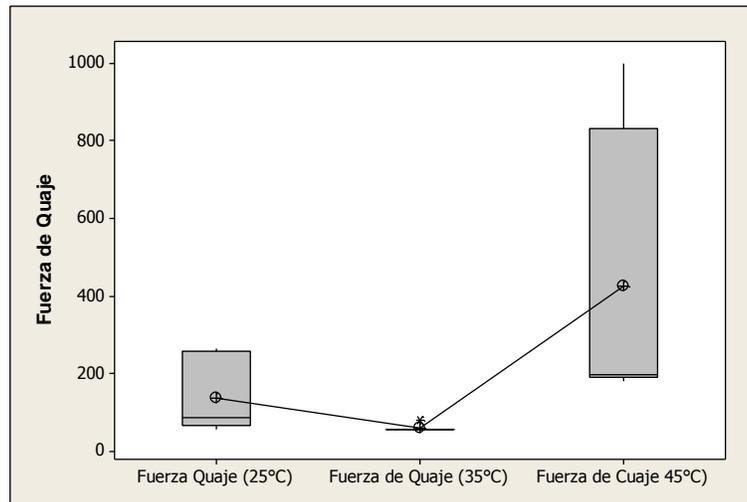
Tabla XXV. **Análisis de varianza del rendimiento de pepsina (fuerza de cuaje), a los distintos pH (2, 3, 4) y temperaturas (25 °C, 35 °C, 45 °C)**

| pH | Agrupación por el método de Fisher | F | Grados de libertad | Suma de cuadrados | Promedio de los cuadrados | Probabilidad |
|-------|------------------------------------|------|--------------------|-------------------|---------------------------|--------------|
| 2 | B | 7,22 | 2 | 667873 | 333937 | 0,004 |
| 3 | B | | | | | |
| 4 | A | | | | | |
| Error | | | 24 | 1110748 | 46281 | |
| Total | | | 26 | 1778622 | | |

* Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes,

Fuente: elaboración propia.

Figura 21. **Relación del rendimiento de pepsina (fuerza de cuaje) respecto a los distintos pH (2, 3, 4) y temperaturas (25 °C, 35 °C, 45 °C)**



Fuente: elaboración propia, con programa Minitab 16.

Tabla XXVI. **Valores típicos, figura 21**

| Numero muestras | T °C | pH | Q 1 | mediana | Q 3 | Rango intercuartil | Bigotes |
|-------------------------|------------------|----|--------|---------|--------|--------------------|------------------|
| 9 (corrida 1,2,3) | 25, 35, 45 | 2 | 68,57 | 88,88 | 258,33 | 183,76 | 57,14- 266,66 |
| | | 3 | - | 59,88 | - | - | - |
| | | 4 | 190,90 | 200 | 833,5 | 642,59 | 181,81- 1 000 |

Fuente: elaboración propia.

4. RESULTADOS

A continuación se presentan los resultados de la densidad, tiempo de cuajo, fuerza de cuajo e índice de la refracción de la quimosina.

Tabla XXVII. **Densidades, tiempo de cuajo, fuerza de cuajo e índice de refracción de la quimosina extraída utilizando maceración dinámica de 2 horas a pH 2**

| T °C | Densidad (g/mL) | Tiempo total de cuaje (s) | Rendimiento (fuerza de cuaje) (s ⁻¹) | Índice de refracción |
|------|-----------------|---------------------------|--|----------------------|
| 25 | 1,059±0,001 | 3 700± 866,025 | 67,720±-18,821 | 1,3480±-0,002 |
| 35 | 1,059±-0,002 | 4 000±- 916.515 | 65,320±-12,741 | 1,395 ±-0 |
| 45 | 1,059±0,001 | 2 200±-1 352,775 | 149,200±/104,478 | 1,349 ±- 0,001 |

Fuente: elaboración propia.

Tabla XXVIII. **Densidades, tiempo de cuajo, fuerza de cuajo e índice de refracción de la quimosina extraída utilizando maceración dinámica de 2 horas a pH 3**

| T °C | Densidad (g/mL) | Tiempo total de cuaje (s) | Rendimiento (fuerza de cuaje) (s ⁻¹) | Índice de refracción |
|------|-----------------|---------------------------|--|----------------------|
| 25 | 1,058±0,001 | 4 000±/346,410 | 60,312±-5,496 | 1,3480±-0,002 |
| 35 | 1,060±-0,001 | 4 200±- 0 | 57,140±-0 | 1,395 ±-0 |
| 45 | 1,058±0,001 | 4 200±-0 | 57,140±-0 | 1,349 ±-0,001 |

Fuente: elaboración propia.

Tabla XXIX. **Densidades, tiempo de cuajo, fuerza de cuajo e índice de refracción de la quimosina extraída utilizando maceración dinámica de 2 horas a pH 4**

| T °C | Densidad (g/mL) | Tiempo total de cuaje (s) | Rendimiento (fuerza de cuaje) (s⁻¹) | Índice de refracción |
|-------------|------------------------|----------------------------------|---|-----------------------------|
| 25 | 1,057+/-0,001 | 4200+/-0 | 57,140+/-0 | 1,3513+/-0,001 |
| 35 | 1,056+/- 0 | 4 200+/- 0 | 57,140+/-0 | 1,395 +/-0 |
| 45 | 1,057+/-0,001 | 4 200+/-0 | 57,140+/-0 | 1,349 +/-0 |

Fuente: elaboración propia.

Tabla XXX. **Densidades, tiempo de cuajo, fuerza de cuajo e índice de refracción de la pepsina acuosa extraída utilizando maceración dinámica de 2 horas a pH 2**

| T °C | Densidad (g/mL) | Tiempo total de cuaje (s) | Rendimiento (Fuerza de cuaje) (s⁻¹) | Índice de Refracción |
|-------------|------------------------|----------------------------------|---|-----------------------------|
| 25 | 1,059+/-0,001 | 920+/-34,641 | 261,106+/-9,618 | 1,349 +/- 0 |
| 25 | 1,060+/-0,002 | 620+/-351,568 | 467,293+/-217,581 | 1,349 +/- 0 |
| 45 | 1,050+/-0,002 | 280+/- 69,282 | 889+/-192,257 | 1,348 +/- 0 |

Fuente: elaboración propia.

Tabla XXXI. **Densidades, tiempo de cuajo, fuerza de cuajo e índice de refracción de la pepsina acuosa extraída utilizando maceración dinámica de 2 horas a pH 3**

| pH | Densidad (g/mL) | Tiempo total de cuaje (s) | Rendimiento (fuerza de cuaje) (s⁻¹) | Índice de refracción |
|-----------|------------------------|----------------------------------|---|-----------------------------|
| 25 | 1,060+/-0,002 | 620+/-351,568 | 467,293+/- 217,581 | 1,349+/-0 |
| 35 | 1,058+/-0,001 | 1 240+/- 69,282 | 67,720+/-18,325 | 1,349 +/- 0 |
| 45 | 1,052+/-0,002 | 3700+/-866,025 | 193,937+/-10,502 | 1,348+/- 0,001 |

Fuente: elaboración propia.

Tabla XXXII. **Densidades, tiempo de cuajo, fuerza de cuajo e índice de refracción de la pepsina extraída utilizando maceración dinámica de 2 horas a pH 4**

| pH | Densidad (g/mL) | Tiempo total de cuaje (s) | Rendimiento (Fuerza de cuaje) (s⁻¹) | Índice de Refracción |
|-----------|------------------------|----------------------------------|---|-----------------------------|
| 25 | 1,058+/-0,001 | 2 840+/-277,128 | 85,080+/-8,798 | 1,349 +/- 0 |
| 35 | 1,055+/-0 | 3 266+/-230,940 | 68,680+/-3,498 | 1,349 +/- 0 |
| 45 | 1,054+/-0,003 | 1 240+/- 69,282 | 193,937+/-10,502 | 1,349 +/- 0 |

Fuente: elaboración propia.

Tabla XXXIII. **Densidades, tiempo de cuajo, fuerza de cuajo e índice de refracción de la quimosina con variación de NaCl (*salting out*) utilizando maceración dinámica de 2 horas a pH 2 a 25 °C**

| Densidad (g/mL) | Tiempo total de cuaje (s) | Rendimiento (fuerza de cuaje) (s ⁻¹) | Índice de refracción |
|-----------------|---------------------------|--|----------------------|
| 1,055+/- 0,001 | 300+/- 57,735 | 700+/-173,203 | 1.345+/-0,001 |

Fuente: elaboración propia.

Tabla XXXIV. **Densidades, tiempo de cuajo, fuerza de cuajo e índice de refracción de la pepsina con variación de NaCl (*salting out*) utilizando maceración dinámica de 2 horas a pH 2 a 25 °C**

| Densidad (g/mL) | Tiempo total de cuaje (s) | Rendimiento (fuerza de cuaje) (s ⁻¹) | Índice de refracción |
|-----------------|---------------------------|--|----------------------|
| 1,055+/- 0,001 | 240+/- 60,000 | 1 044,333+/-264,412 | 1,345+/- 0,001 |

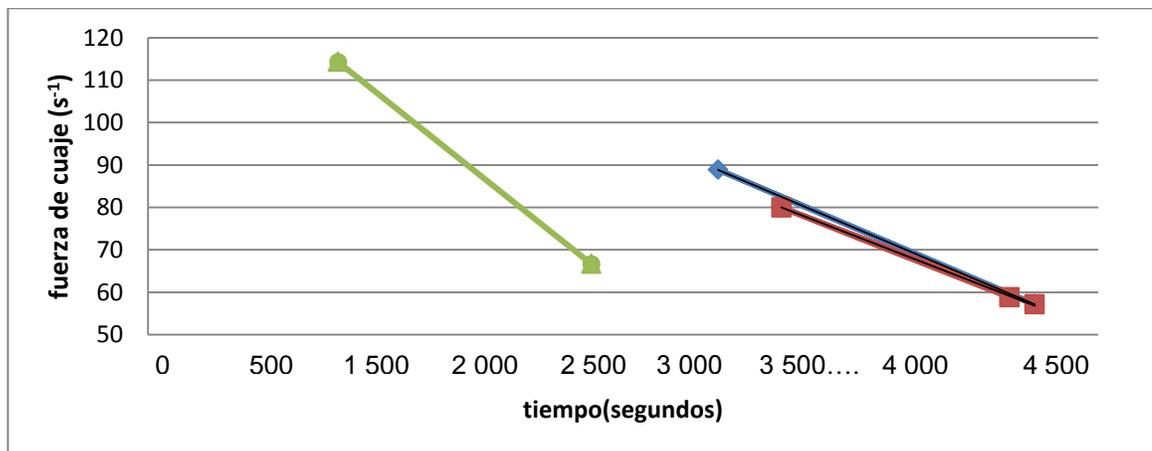
Fuente: elaboración propia.

Tabla XXXV. **Densidades, tiempo de cuajo, fuerza de cuajo del cuajo comercial**

| Densidad (g/mL) | Tiempo total de cuaje (s) | Rendimiento (fuerza de cuaje) (s ⁻¹) |
|-----------------|---------------------------|---|
| 1,080+/-0 | 118,833+/-2,886 | 2028,666+/-49,652 |

Fuente: elaboración propia.

Figura 22. **Fuerza de cuajo de la quimosina en función del tiempo de coagulación a pH 2 y temperaturas (25 °C, 35 °C y 45 °C)**



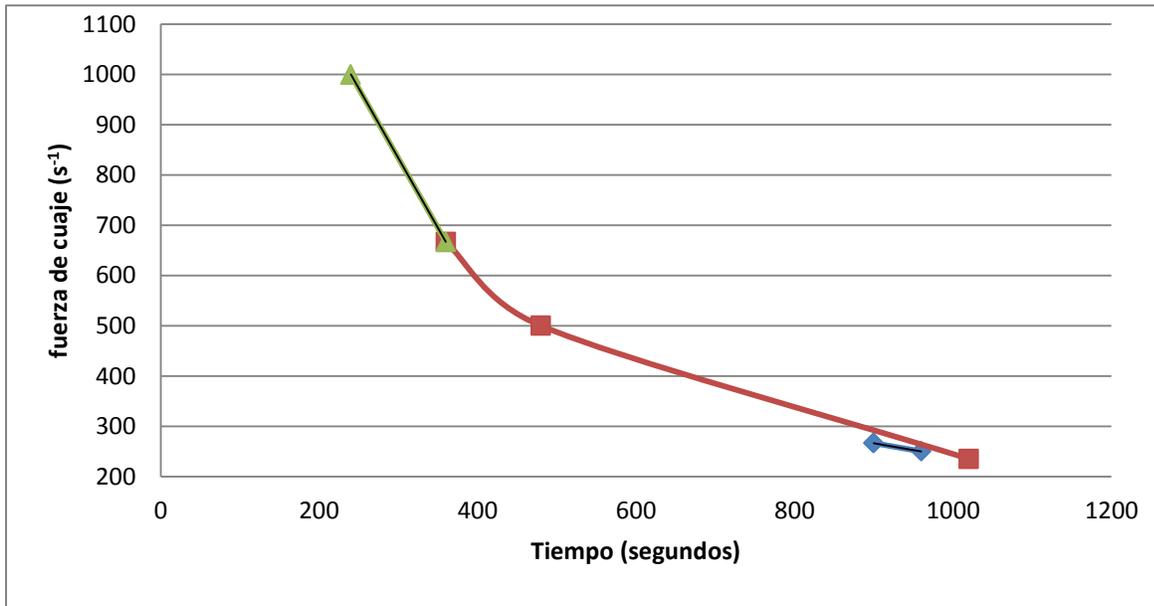
Fuente: elaboración propia.

Tabla XXXVI. **Correlación y coeficientes, figura 22**

| Color | Descripción | Modelo matemático | R ² |
|---|--|---------------------------------|----------------|
|  | fuerza de cuajo <i>versus</i> tiempo 25 °C | fuerza de cuaje =0,0212x+146,01 | 1 |
|  | fuerza de cuajo <i>versus</i> tiempo 35 °C | fuerza de cuaje =0,0193x+137,78 | 0,99 |
|  | fuerza de cuajo <i>versus</i> tiempo 45 °C | fuerza de cuaje =- 0,00397x+150 | 1 |

Fuente: elaboración propia.

Figura 23. **Fuerza de cuajo de la pepsina en función del tiempo de coagulación a pH 2 y temperatura (25 °C, 35 °C y 45 °C)**



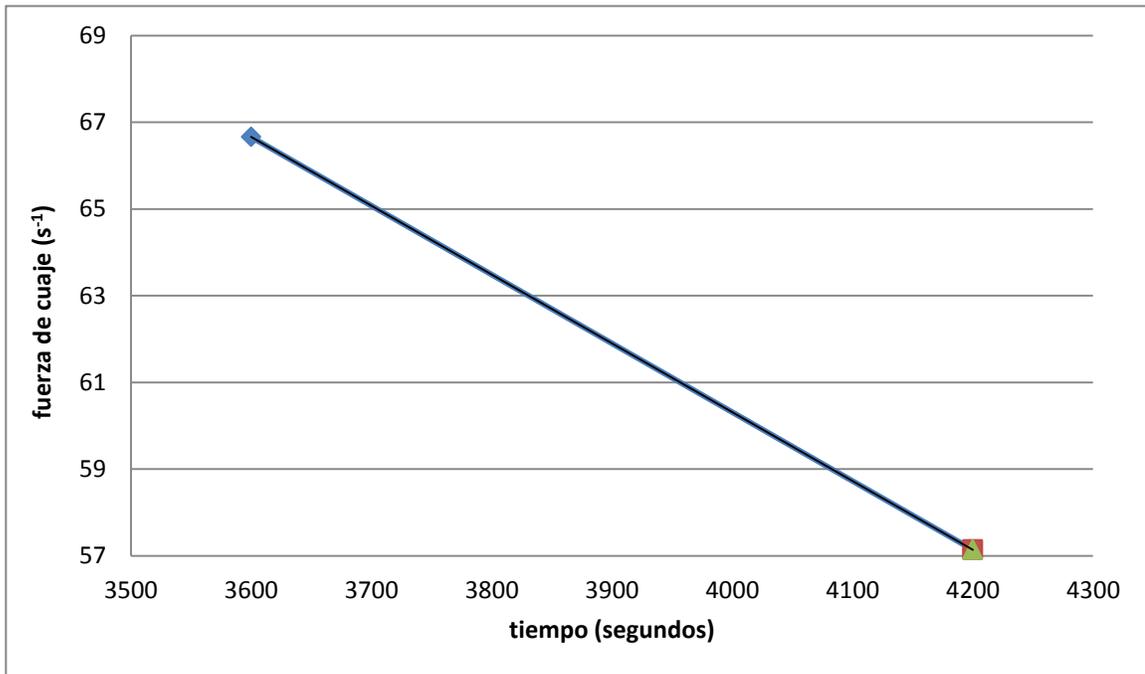
Fuente: elaboración propia.

Tabla XXXVII. **Correlación y coeficientes, figura 23**

| Color | Descripción | Modelo matemático | R ² |
|---|--|---|----------------|
|  | fuerza de cuajo <i>versus</i> tiempo 25 °C | fuerza de cuaje =2,775x+1666 | 1 |
|  | fuerza de cuajo <i>versus</i> tiempo 35 °C | fuerzadecuaje =1100,3e ^{-0,002x} | 0,99 |
|  | fuerza de cuajo <i>versus</i> tiempo 45 °C | fuerza de cuaje =0,2777x+516,5 | 1 |

Fuente: elaboración propia.

Figura 24. **Fuerza de cuajo de la quimosina en función del tiempo de coagulación a pH 3 y temperaturas (25 °C, 35 °C, 45 °C)**



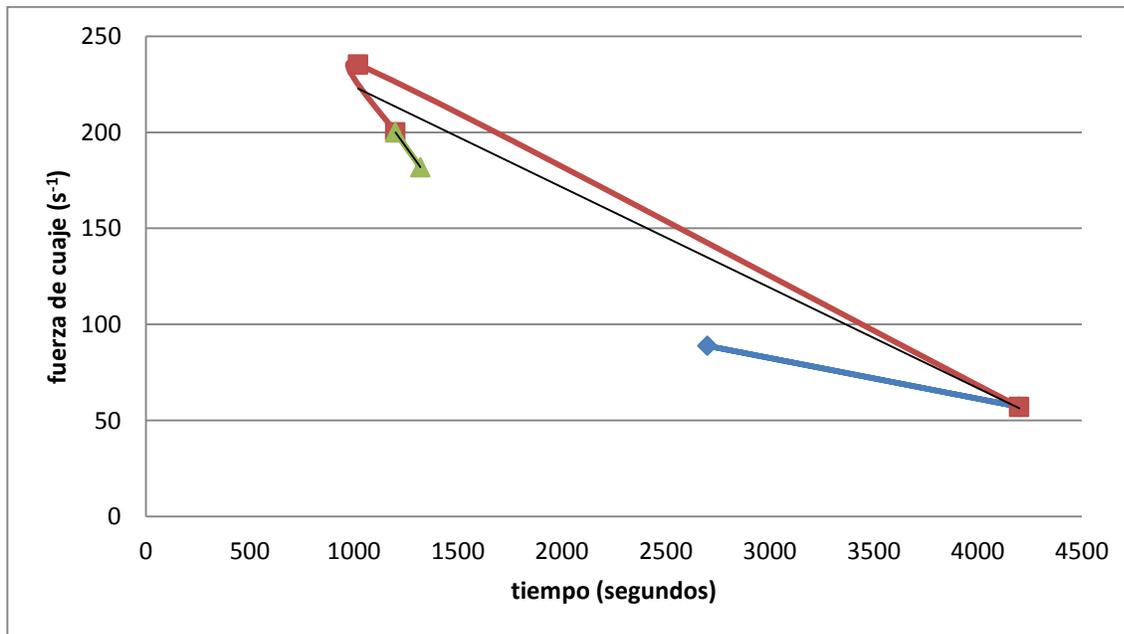
Fuente: elaboración propia.

Tabla XXXVIII. **Temperatura, correlación y coeficiente, figura 24**

| Color | Descripción | Modelo matemático | R ² |
|---|--|--------------------------------------|----------------|
|  | fuerza de cuajo <i>versus</i> tiempo 25 °C | fuerza decuaje = $-0,0159x + 123,78$ | 1 |
|  | fuerza de cuajo <i>versus</i> tiempo 35 °C | | |
|  | fuerza de cuajo <i>versus</i> tiempo 45 °C | | |

Fuente: elaboración propia.

Figura 25. **Fuerza de cuajo de la pepsina en función del tiempo de coagulación a pH 3 y diferentes temperaturas (25 °C, 35 °C, 45 °C)**



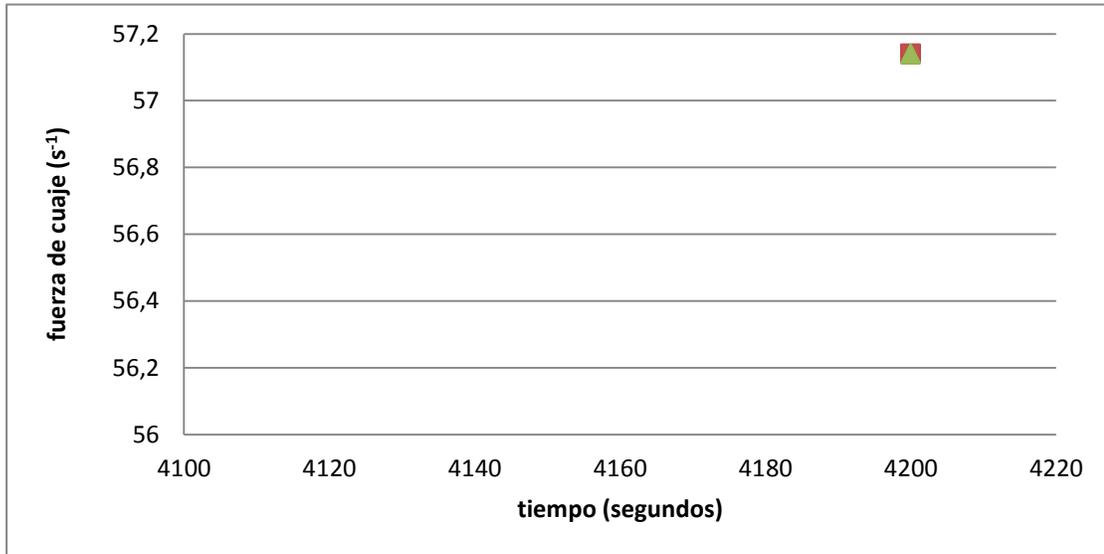
Fuente: elaboración propia.

Tabla XXXIX. **Temperatura, correlación y coeficiente, figura 25**

| Color | Descripción | Modelo matemático | R ² |
|---|---|--------------------------------------|----------------|
|  | fuerza de cuajo <i>versus</i> tiempo 25 °C | fuerza de cuaje = -0,0212x+146,01 | 1 |
|  | fuerza de cuajo <i>versus</i> tiempo 35 °C | fuerza de cuaje = -0,0523x+276,09 | 0,9811 |
|  | fuerza de cuajo <i>versus</i> tiempo 45 °C | fuerza de cuaje = -0,1516x+381,9 | 2 |

Fuente: elaboración propia.

Figura 26. **Fuerza de cuajo de la quimosina a pH 4 en función del tiempo de coagulación diferentes temperaturas (25 °C, 35 °C, 45 °C)**



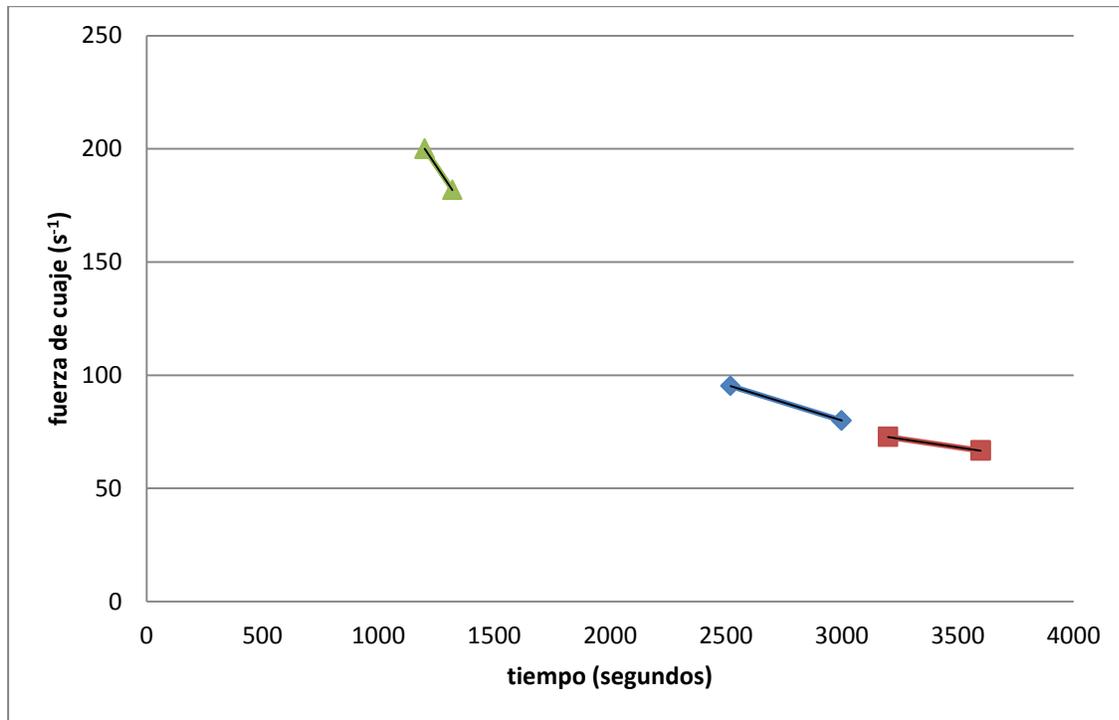
Fuente: elaboración propia.

Tabla XL. **Temperatura, correlación y coeficiente, figura 26 diferentes**

| Color | Descripción |
|---|---|
|  | fuerza de cuajo <i>versus</i> tiempo 25 °C |
|  | fuerza de cuajo <i>versus</i> tiempo 35 °C |
|  | fuerza de cuajo <i>versus</i> tiempo 45 °C |

Fuente: elaboración propia.

Figura 27. **Fuerza de cuaje de la pepsina a pH 4 en función del tiempo de coagulación de diferentes temperaturas (25 °C, 35 °C, 45 °C)**



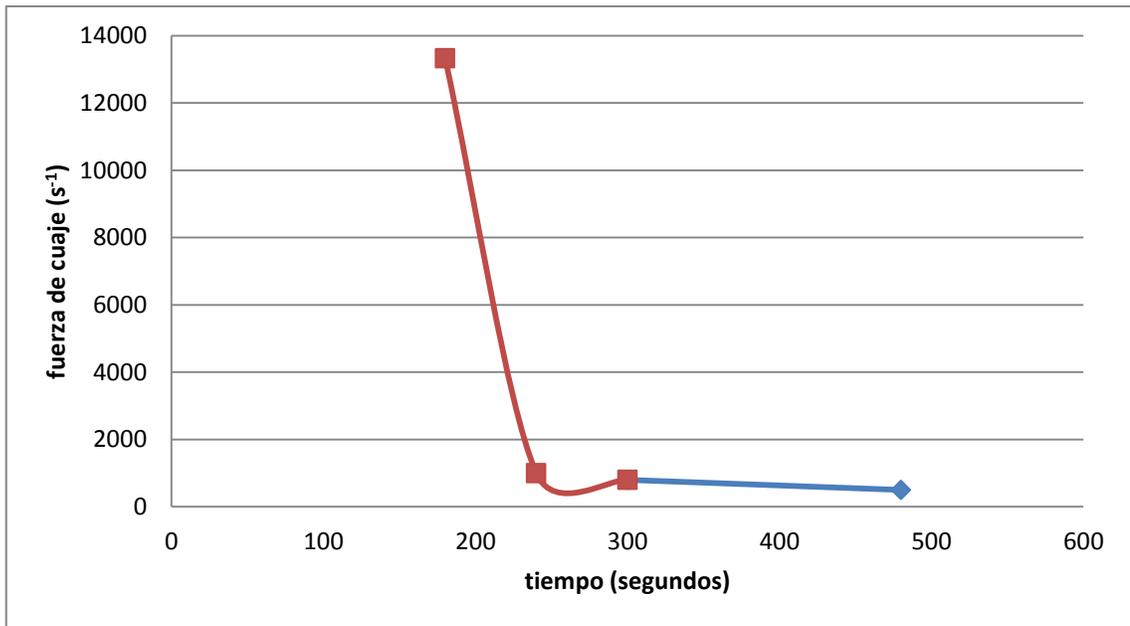
Fuente: elaboración propia.

Tabla XLI. **Temperatura, correlación y coeficiente, figura 27**

| Color | Descripción | Modelo matemático | R ² |
|---|---|-------------------------------------|----------------|
|  | fuerza de cuajo <i>versus</i> tiempo 25 °C | fuerza de cuaje = 0,0317x+175,25 | - 1 |
|  | fuerza de cuajo <i>versus</i> tiempo 35 °C | fuerza de cuaje = 0,0152x+121,2 | - 1 |
|  | fuerza de cuajo <i>versus</i> tiempo 45 °C | fuerza de cuaje = -0,1516x+381,9 | 1 |

Fuente: elaboración propia.

Figura 28. **Fuerza de cuajo de la quimosina en función del tiempo de coagulación con variación de NaCl (*salting out*) a pH 2**



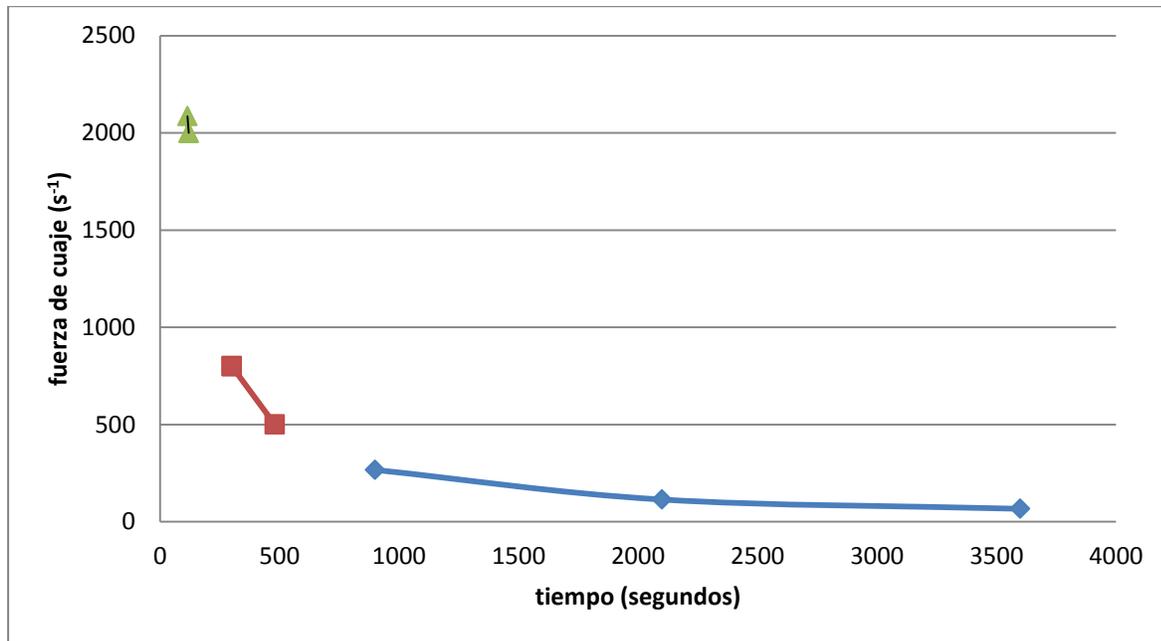
Fuente: elaboración propia.

Tabla XLII. **Fuerza de cuajo, correlación y coeficiente, figura 28**

| Color | Descripción | Modelo matemático | R ² |
|---|--|--|----------------|
|  | fuerza de cuajo <i>versus</i> tiempo Quimosina | fuerza de cuaje = $-1,6667x + 1300$ | 1 |
|  | fuerza de cuajo <i>versus</i> tiempo Pepsina | fuerza de cuaje = $1,6851x^2 - 913,31x + 12130$ | 1 |

Fuente: elaboración propia.

Figura 29. **Fuerza de cuajo de las distintas variedades de quimosina (natural, *salting out*, comercial) en función del tiempo de coagulación**



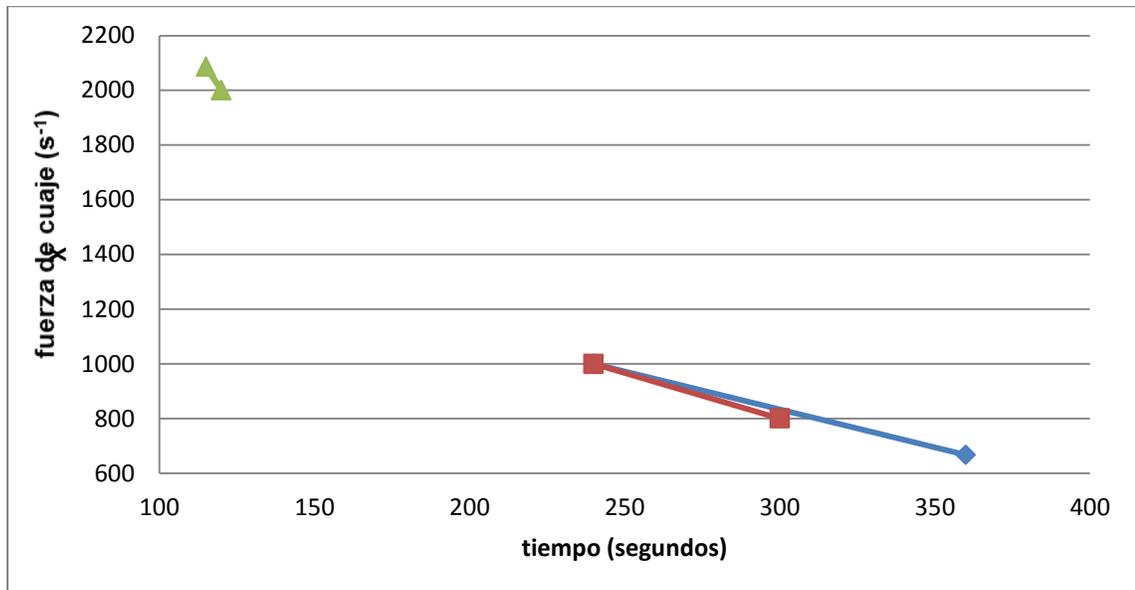
Fuente: elaboración propia.

Tabla XLIII. **Fuerza de cuajo, correlación y coeficiente, figura 29**

| Color | Descripción | Modelo matemático | R ² |
|---|---|--|----------------|
|  | fuerza de cuajo <i>versus</i> tiempo Quimosina | fuerzadecuaje = - 4E-05x ² -0,2328x+447,63 | 1 |
|  | fuerza de cuajo <i>versus</i> tiempo Quimosina <i>salting out</i> | fuerza de cuaje =-1,6667x+1300 | 1 |
|  | fuerza de cuajo <i>versus</i> tiempo Cuajo commercial | fuerza de cuaje =-0,17,2x+4062 | 1 |

Fuente: elaboración propia.

Figura 30. **Fuerza de cuajo de las distintas variedades de pepsina (natural, *salting out*, comercial) en función del tiempo de coagulación**



Fuente: elaboración propia.

Tabla XLIV. **Fuerza de cuajo, correlación y coeficiente, figura 30**

| Color | Descripción | Modelo matemático | R ² |
|---|---|---------------------------------------|----------------|
|  | fuerza de cuajo <i>versus</i> tiempo Pepsina | fuerza de cuaje = $-2,775x + 1666$ | 1 |
|  | fuerza de cuajo <i>versus</i> tiempo Pepsina <i>salting out</i> | fuerza de cuaje $-3,333x+1800$ | 1 |
|  | fuerza de cuajo <i>versus</i> tiempo Cuajo comercial | fuerza de cuaje $=-0,172x+4062$ | 1 |

Fuente: elaboración propia.

5. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En el presente trabajo de investigación a nivel de tesis, se evaluó el rendimiento o fuerza de cuajo a partir de la obtención y caracterización fisicoquímica de la quimosina bovina cuyo código es E.C.3.4.23.4, extraída del abomaso de la vaca. La extracción se llevó a cabo con variaciones de pH y temperatura, a escala laboratorio. Asimismo, se evaluó el rendimiento de la pepsina, la cual es una enzima obtenida como subproducto del proceso para la obtención de quimosina. Dicha enzima tiene la misma finalidad que la quimosina, variando la cantidad presente en el abomaso según la edad del animal, a mayor edad la presencia de pepsina es mayor que la de quimosina. Dada su utilidad, se llevó a cabo el estudio para esta enzima, de la misma manera que para la quimosina.

La materia prima, abomaso bovino, es el cuarto estomago de la vaca, se obtienen aproximadamente 1,2 libras de membrana por cada estómago de vaca, con lo cual se puede llegar a obtener 400 mL de quimosina y pepsina respectivamente; teniendo un rendimiento porcentual de 66 %.

Dado que se realizaron pruebas preliminares, se observó que la cantidad de polietilenglicol utilizado para la separación de la enzima puede ser del 20 % en peso, generalmente se necesita menos del 15 % con el polietilenglicol apropiado. Esto influye en el costo, por lo que se puede utilizar polietilenglicol de alto peso molecular, por ejemplo PEG 800 el cual tiene alto costo; o se puede utilizar uno de menor peso molecular (PEG 400) y utilizar una mayor cantidad del mismo. Por otra parte, la concentración de sal inorgánica mínima

depende de la concentración de la sal necesaria para formar un sistema de dos fases con el polietilenglicol.

Al haber obtenido la enzima, se eluyó de la columna empleando una solución salina de NaCl al 18 % para eliminación de residuos de PEG y pepsina. Debido a que el polietilenglicol no está cargado bajo estas condiciones, pasa a través de la resina.

En estas condiciones, la pepsina tampoco se une a la resina de intercambio iónico y pasa a través de ella, por lo tanto, este paso provoca la purificación de la quimosina no solo del polietilenglicol sino también de la pepsina.

La columna de intercambio iónico fue diseñada basada en la tesis *Evaluación del uso de una resina de adsorción comercial en el proceso de refinación de biodiesel producido a partir del aceite de jatropha*.

El tiempo requerido para la extracción de la quimosina en la fase de polietilenglicol es generalmente tan bajo que no es un factor significativo en el diseño del procedimiento. Este proceso es, en consecuencia, muy eficiente y económico en cuanto a manipulación; por lo tanto, y puede incrementarse fácilmente el volumen para su producción comercial.

A los dos extractos se les determinó la densidad experimental, obteniéndose, en promedio, 1,058 g/mL tanto para la quimosina como para la pepsina. Según el artículo *The Chesse maker, Welcoren Rennet*, la densidad teórica es desde 1 g/mL hasta 1,14 g/mL, siendo, por lo tanto, aceptable el valor experimental obtenido. En las mediciones del índice de refracción se

obtuvo un promedio de 1,345, siendo también un valor aceptable según *Food Biochemistry and food processing*.

Asimismo, se calculó el rendimiento de la quimosina por medio de la fuerza de cuajo, que representa la cantidad de centímetros cúbicos cuajados en un intervalo de tiempo (en segundos), por cada centímetro cúbico de enzima agregada a determinada cantidad de leche, a 35 °C; esto se calculó a partir de la ecuación número uno, sección 3.7.

Las tablas de la XXVII-XXXIII contienen datos tabulados donde se observa la fuerza de cuajo. En el caso de la quimosina, la mayor fuerza se obtuvo a pH 2 y temperatura de 45 °C, con 149 mL de leche cuajada por cada mililitro de extracto de enzima agregado, en un periodo de 2 200 segundos. Bajo las mismas condiciones, pH 2 y temperatura de 45 °C, la pepsina obtuvo una fuerza de cuajo mayor, con 889 mL de leche cuajada por cada mililitro de enzima agregada en un periodo de 280 segundos. Los tiempos de formación de cuajo y la fuerza de cuajo, al utilizar extracto de quimosina, denotaron poco cambio al realizar variación de pH y temperatura; mientras que la pepsina tomó tiempos menores al aumentar temperatura y bajar pH por lo que se obtuvo mayor fuerza de cuajo.

Por medio del análisis de variación de factores descompilados y la prueba de chi-cuadrado, se comprobó estadísticamente que en el caso de la quimosina no existe diferencia significativa en el rendimiento del extracto al realizar variación de pH y temperatura. Asimismo, se comprobó que con la pepsina sí existe diferencia significativa en la fuerza de cuajo al hacer variaciones de pH y temperatura.

Estos resultados, donde la pepsina tiene mayor fuerza de cuajo que la quimosina, están relacionadas a la literatura, *The industrial Enzimology*, ya que en el abomaso de animales adultos, la enzima contenida en mayor cantidad es la pepsina, alcanzando hasta un 90 %, mientras que la quimosina tiene una presencia de 10 %.

Asimismo, el mayor rendimiento se llevó a cabo en la temperatura más alta (45°C) y pH más bajo (pH 2), esto se debe porque a mayor temperatura, aumenta la reacción enzimática, como en la mayoría de las reacciones químicas, y si el pH es menor, el coeficiente de reparto es más elevado, teniendo una mayor selectividad para la separación de las enzimas, acorde a *Food biochemistry and food processing*

De este modo, es aceptado el resultado experimental ya que concuerda con la parte teórica, teniendo además una base estadística que lo comprueba. Por lo tanto, para la quimosina, la hipótesis nula queda como verdadera. Esta sugería que no existe diferencia significativa en el rendimiento (fuerza de cuaje) de quimosina extraída, en la producción de cuajo a partir de variación térmica y de pH.

Sin embargo, dado que la quimosina no es la única capaz de producir cuajo y que el proceso da como subproducto la pepsina, se tomaron en cuenta las fuerzas de cuajo de esta enzima, dando como resultado la aceptación de la hipótesis alternativa. Esta indica que sí existe diferencia significativa en el rendimiento (fuerza de cuaje) de pepsina extraída para la producción de cuajo a partir de variación térmica y de pH. Esta última hipótesis solamente se comprobó con fines informativos, dado que la enzima de interés es la quimosina

También se realizó una prueba variando la concentración de sal en la etapa de elución (aumentando NaCl a 23 % *salting in-saltin out*), en la cual se pudo observar que el tiempo tomado para formar el cuajo es considerablemente menor, obteniendo una fuerza de cuajo mayor, en promedio 1 044 mL de cuajo por cada mililitro de extracto de la enzima en un periodo de 240 segundos. Esto es debido a que las proteínas son menos solubles a altas concentraciones de sal, por lo que, al aumentar la concentración, la fuerza de cuajo aumentó, esto llevó a cabo a pH 2 y temperatura de 25 °C.

Al momento de comparar la fuerza de cuajo de las enzimas extraídas y la del cuajo comercial, se observó una gran diferencia en dicha fuerza, la cual puede entenderse mejor con los datos de las tablas XXXIII y XIV, figuras 28 y 29, en donde se ve la diferencia entre dichas fuerzas, principalmente en los tiempos requeridos para la coagulación.

La diferencia de fuerza de cuajo de la enzima extraída y la comercial se debió en gran parte al tipo de resina utilizada, dado que la patente europea en la cual se basa el procedimiento experimental, sugería una resina catiónica de ácido fuerte para proteínas y el uso de abomaso de ternera. Sin embargo, en el presente trabajo de tesis se realizó, no solamente la variación de temperatura y pH, sino también se sustituyó la resina para proteínas por resina catiónica de ácido fuerte, utilizada para la deionización de agua en la industria, y abomaso de novillo, el cual contiene menor cantidad de la enzima de interés.

Como complemento, se realizaron análisis microbiológicos (recuento de coliformes totales, recuento de coliformes fecales, aislamiento e identificación de *Escherichia coli*, recuento e identificación de *Staphylococcus aureus*). Dichos análisis se realizaron en el Laboratorio de Análisis Físicoquímicos y

Microbiológicos (LAFYM) de la Universidad de San Carlos de Guatemala, dando como resultados pruebas aptas para el consumo humano.

Por último se calculó el porcentaje en peso de cuajo formado tomando el peso de la leche y posteriormente del queso, obteniendo un porcentaje del 89 % en todos los casos. El factor importante es el tiempo que toma en cuajar, denotando que a pesar de las variantes de materia prima y resina se logró obtener cuajo, dando como satisfactoria la parte experimental de este estudio de investigación.

CONCLUSIONES

1. Es posible la extracción de la quimosina a partir del abomaso bovino, teniendo un mayor rendimiento a temperaturas altas (45 °C) y pH 2, debido a la velocidad de reacción. Sin embargo, no hay una diferencia significativa al variar temperaturas obteniendo 149 mL de cuajo por cada mililitro de enzima.
2. Es posible la extracción de la quimosina a partir del abomaso aumentando la concentración de NaCl en un 5 % (de 18 a 23 %), con una diferencia significativa, obteniendo 700 mL de cuajo por cada mililitro de enzima.
3. La actividad enzimática de la quimosina obtenida de forma natural es considerablemente menor a la las pastillas de cuajo comercial, siendo la diferencia de 2 000 mililitros de extracto.
4. La pepsina representa una buena alternativa para la producción de cuajo, teniendo diferencia significativa a pH bajos (pH 2) y temperaturas altas (45 °C).

RECOMENDACIONES

1. Realizar extracciones de quimosina bovina seleccionando otras variables independientes (edad de animal, tiempos de maceración) para comparar los resultados con este estudio.
2. Establecer una línea de investigación en Guatemala en extracción de enzimas para la producción de cuajo.
3. Realizar extracciones de quimosina a partir de estómagos de otros mamíferos para comparar los resultados con este estudio.
4. Realizar un estudio de investigación para conocer la factibilidad de reproducir a nivel de planta piloto.
5. Realizar variantes de reactivos salinos, polietilenglicol de mayor cadena, resinas para proteínas para la extracción de quimosina refinada.

BIBLIOGRAFÍA

1. ALAIS, Charles. *Ciencia de la leche, principios de la técnica lechera*. Locasa Godina, Antonio (trad.) 2a ed. España: Editorial Continental, 1970. 515 p.
2. CALVO, Miguel. *Bioquímica de los alimentos, enzimas coagulantes*. [en línea]. <<http://milksci.unizar.es/bioquimica/temas/proteins/enzimascoagul.html>>. [Consulta: 15 de junio de 2013].
3. DARDEL, Francois. *El intercambio ionico, principios básicos*. [en línea]. <http://dardel.info/IX/IX_Intro_ES.html> [Consulta: 10 de junio de 2013].
4. European Patent Office. *Method for the purification of calf rennet*. SUBRAMANIAN, Sethuraman. 0 219 31 A2. 1986.
5. JENNES, Robert. *Fundamentals of dairy chemistry*. 3a ed. Nueva York: Chapman & Hall Publicaciones, 1988. 615 p.
6. KING, Judson. *Procesos de separación*. Costa López, José (Trad.). New York: Editorial Mac Graw Hill, 1970. 155 p.
7. KUMAR, Karesh. *Hydrophobic interaction chromatography [HIC] theory and principle*. [en línea]. <<http://www.slideshare.net/ajithnandanam/hydrophobic->

interaction-chromatography-hic-theory-and-principle.> [Consulta:
15 de agosto de 2014].

8. LEMUS FUENTES, Rosa María. *Evaluación del uso de una resina de adsorción comercial en el proceso de refinación de biodiésel producido a partir del aceite de jatropha*. Trabajo de graduación de Ing. Química, Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Ingeniería, 2012. 150 p.
9. MANTALLANA VENTURA, Santiago. *Fuerza y calculo del cuajo*. Madrid: Ministerio de Agricultura, 1950. 215 p.
10. MARTÍNEZ, Alejandra. *Extracción de enzimas coagulantes a partir del abomaso de rumiantes adultos*. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, 2006. 25 p.
11. MESTRES LARRARIGA, Josep. *Coagulación enzimática*. [en línea].
<[90](http://books.google.com,gt/books?id=HUugK6Ep_JkC&pg=PA143&lpg=PA143&dq=Mestres,+Josep+/+Roser+Shelly++%E2%80%9CCoagulaci%C3%B3n+enzim%C3%A1tica&source=bl&ots=FMiRfCihxB&sig=uMRELOkAofx3vHttDDCWdc2v2wM&hl=es&sa=X&ei=hl7yU-O7MM6syASotIG4DQ&ved=0CBoQ6AEwAA#v=onepage&q=Mestres%2C%20Josep%20%2F%20Roser%20Shelly%20%20%E2%80%9CCoagulaci%C3%B3n%20enzim%C3%A1tica&f=false.>
[Consulta: 2 de agosto de 2013].</div><div data-bbox=)

12. MIALHER, Louis. *Tratado de química aplicada a la fisiología*. Borriell, Felix. (Trad.). Madrid: Editorial el Clamor, 1988. p. 230.
13. MOYANO, María Alejandra. *Extracción con solventes*. [en línea]. <<http://www.fbqf.unt.edu.ar/institutos/quimicaanalitica/Analitica%20I/pdf/EXTRACCIÓN%20CON%20SOLVENTES.pdf>>. [Consulta: 2 de agosto de 2013].
14. Oficina Española de patentes y Marcas. *Método para enternecer carne*. 2250163. 2006
15. Oficina Española de patentes y Marcas. *Procedimiento para la recuperación quimosina producida de forma natural*. HEINSOHN, Henry, LORCH, G., JEFFREY, D. ES, 2078345. 1995
16. SIMPSON, Benjamin. *Food biochemistry and food processing*. 2a ed. Iowa: Editorial Blackwell Publishing, 2012. 185 p.
17. TANGIENT, LLC. *Extracción solido- líquido*. [en línea]. <<http://procesosbio.wikispaces.com/Extracci%C3%B3n+s%C3%B3lido-l%C3%ADquido>> [Consulta: 5 de agosto de 2014].
18. *Tecnología de los plásticos*. [en línea]. <<http://tecnologiadelosplasticos.blogspot.com/2013/06/peg.html>>. [Consulta: 8 agosto de 2013].
19. THORNTON, Jannet. *Rennin, enzyme structures chymosin*. [en línea]. <http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/cgi-bin/enzymes/GetPage.pl?ec_number=3,4,23,4>. [Consulta: 2 de agosto de 2013].

20. TREYBAL, Robert E. *Operaciones de transferencia de masa*. García Rodríguez, Amelia (Trad.). 2a ed. México: Editorial Mac Graw Hill, 2010. 113 p.

21. Universidad Nacional del Rosario, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmaceuticas. *Métodos cromatográficos*. [en línea]. <http://www.fbioyf.unr.edu.ar/evirtual/pluginfile.php/6799/mod_resource/content/0/Separacion_de_biomoleculas.pdf. > [Consulta: 18 de febrero de 2015].

22. URROZ, Carlos. *Anatomía y fisiología animal*. Costa Rica: Editorial EUNED, 2004. p. 177.

23. VALCÁRCEL CASES, A.; GÓMEZ, Hens. *Técnicas analíticas de separación*. Barcelona: Editorial Reverte, 1998. p. 305.

APÉNDICE

Datos originales (utilizando las ecuaciones de la sección 3.7.)

Apéndice 1. Tiempos, observaciones, fuerza de cuaje y cuajo necesario por cada 100 L de leche, de la quimosina extraída a pH 2 y 25 °C (corrida 1)

| t (min) | Observaciones en tiempo transcurrido | t total (s) | Rendimiento (fuerza de cuaje) (s ⁻¹) | cm ³ de cuajo por cada 100 L de leche |
|---------|--------------------------------------|-------------|--|--|
| 1 | No se observa cambio | 4 200 | 57,14 | 1 750 |
| 2 | Se observa mayor viscosidad | | | |
| 15 | No se observa otro cambio | | | |
| 20 | No se observa otro cambio | | | |
| 40 | No se observa otro cambio | | | |
| 60 | Se observa cuajo débil | | | |

Fuente: elaboración propia.

Apéndice 2. Tiempos, observaciones, fuerza de cuaje y cuajo necesario por cada 100 L de leche, de la quimosina extraída a pH 2 y 25 °C (corrida 2)

| t (min) | Observaciones en tiempo transcurrido | t total (s) | Rendimiento (Fuerza de cuaje) (s ⁻¹) | cm ³ de cuajo por cada 100 L de leche |
|---------|---|-------------|--|--|
| 1 | Se observa mayor viscosidad | 2 700 | 88,89 | 1 125 |
| 2 | Se observa cuajo en el fondo del recipiente | | | |
| 10 | Se observa cuajo fuerte | | | |

Fuente: elaboración propia.

Apéndice 3. Tiempos, observaciones, fuerza de cuaje y cuajo necesario por cada 100 L de leche, de la quimosina extraída a pH 2 y 25 °C (corrida 3)

| t (min) | Observaciones en tiempo transcurrido | t total (s) | Rendimiento (fuerza de cuaje) (s ⁻¹) | cm ³ de cuajo por cada 100 L de leche |
|---------|--------------------------------------|-------------|--|--|
| 1 | No se observa cambio | 4 200 | 57,14 | 1 750 |
| 2 | Se observa mayor viscosidad | | | |
| 15 | No se observa otro cambio | | | |
| 20 | No se observa otro cambio | | | |
| 40 | No se observa otro cambio | | | |
| 60 | No se observa otro cambio | | | |
| 70 | Se observa cuajo débil | | | |

Fuente: elaboración propia.

Apéndice 4. Tiempos, observaciones, fuerza de cuaje y cuajo necesario por cada 100 L de leche, de la quimosina extraída a pH 3 y 25 °C (corrida 1)

| t (min) | Observaciones en tiempo transcurrido | t total (s) | Rendimiento (fuerza de cuaje) (s ⁻¹) | cm ³ de cuajo por cada 100 L de leche |
|---------|--------------------------------------|-------------|--|--|
| 5 | No se observa cambio | 3 600 | 66,66 | 1 500 |
| 10 | No se observa cambio | | | |
| 15 | No se observa cambio | | | |

Fuente: elaboración propia.

Continuación del apéndice 4.

| t (min) | Observaciones en tiempo transcurrido | t total (s) | Rendimiento (fuerza de cuaje) (s ⁻¹) | cm ³ de cuajo por cada 100 L de leche |
|---------|---|-------------|--|--|
| 20 | Se observa mayor viscosidad | 3 600 | 66,66 | 1500 |
| 30 | Se observa cuajo en el fondo del recipiente | | | |
| 45 | No se observa otro cambio | | | |
| 60 | Cuajo fuerte | | | |

Fuente: elaboración propia.

Apéndice 5. Tiempos, observaciones, fuerza de cuaje y cuajo necesario por cada 100 L de leche, de la quimosina extraída a pH 3 y 25 °C (corrida 2)

| t (min) | Observaciones en tiempo transcurrido | t total (s) | Rendimiento (fuerza de cuaje) (s ⁻¹) | cm ³ de cuajo por cada 100 L de leche |
|---------|--------------------------------------|-------------|--|--|
| 1 | No se observa cambio | 4 200 | 57,14 | 1750 |
| 2 | Se observa mayor viscosidad | | | |
| 15 | No se observa otro cambio | | | |
| 20 | No se observa otro cambio | | | |
| 40 | No se observa otro cambio | | | |
| 60 | No se observa otro cambio | | | |
| 70 | Se observa cuajo débil | | | |

Fuente: elaboración propia.

Apéndice 6. Tiempos, observaciones, fuerza de cuaje y cuajo necesario por cada 100 L de leche, de la quimosina extraída a pH 3 y 25 °C (corrida 3)

| t (min) | Observaciones en tiempo transcurrido | t total (s) | Rendimiento (fuerza de cuaje) (s ⁻¹) | cm ³ de cuajo por cada 100 L de leche |
|---------|--------------------------------------|-------------|--|--|
| 1 | No se observa cambio | 4 200 | 57,14 | 1 750 |
| 2 | Se observa mayor viscosidad | | | |
| 15 | No se observa otro cambio | | | |
| 20 | No se observa otro cambio | | | |
| 40 | No se observa otro cambio | | | |
| 60 | No se observa otro cambio | | | |
| 70 | Se observa cuajo débil | | | |

Fuente: elaboración propia.

Apéndice 7. Tiempos, observaciones, fuerza de cuaje y cuajo necesario por cada 100 L de leche, de la quimosina extraída a pH 4 y 25 °C (corrida 1)

| t (min) | Observaciones en tiempo transcurrido | t total (s) | Rendimiento (fuerza de cuaje) (s ⁻¹) | cm ³ de cuajo por cada 100 L de leche |
|---------|--------------------------------------|-------------|--|--|
| 1 | No se observa cambio | 4 200 | 57,14 | 1 750 |
| 2 | Se observa viscosidad | | | |
| 15 | No se observa otro cambio | | | |
| 20 | No se observa otro cambio | | | |
| 40 | No se observa otro cambio | | | |
| 60 | No se observa otro cambio | | | |
| 70 | Se observa cuajo débil | | | |

Fuente: elaboración propia.

Apéndice 8. Tiempos, observaciones, fuerza de cuaje y cuajo necesario por cada 100 L de leche, de la quimosina extraída a pH 4 y 25 °C (corrida 2)

| t (min) | Observaciones en tiempo transcurrido | t total (s) | Rendimiento (fuerza de cuaje) (s ⁻¹) | cm ³ de cuajo por cada 100 L de leche |
|---------|--------------------------------------|-------------|--|--|
| 1 | No se observa cambio | 4 200 | 57,14 | 1 750 |
| 2 | Se observa viscosidad | | | |
| 15 | No se observa otro cambio | | | |
| 20 | No se observa otro cambio | | | |
| 40 | No se observa otro cambio | | | |
| 60 | No se observa otro cambio | | | |
| 70 | Se observa cuajo débil | | | |

Fuente: elaboración propia.

Apéndice 9. Tiempos, observaciones, fuerza de cuaje y cuajo necesario por cada 100 L de leche, de la quimosina extraída a pH 4 y 25 °C (corrida 3)

| t (min) | Observaciones en tiempo transcurrido | t total (s) | Rendimiento (Fuerza de cuaje) (s ⁻¹) | cm ³ de cuajo por cada 100 L de leche |
|---------|--------------------------------------|-------------|--|--|
| 1 | No se observa cambio | 4 200 | 57,14 | 1 750 |
| 2 | Se observa mayor viscosidad | | | |
| 15 | No se observa otro cambio | | | |
| 20 | No se observa otro cambio | | | |
| 40 | No se observa otro cambio | 4 200 | 57,14 | 1 750 |
| 60 | No se observa otro cambio | | | |
| 70 | Se observa cuajo débil | | | |

Fuente: elaboración propia.

Apéndice 10. Tiempos, observaciones, fuerza de cuaje y cuajo necesario por cada 100 L de leche, de la quimosina extraída a pH 2 y 35 °C (corrida 1)

| t (min) | Observaciones en tiempo transcurrido | t total (s) | Rendimiento (fuerza de cuaje) (s ⁻¹) | cm ³ de cuajo por cada 100 L de leche |
|---------|--------------------------------------|-------------|--|--|
| 5 | Se observa viscosidad | 4 080 | 58,82 | 1 700 |
| 10 | No se observa otro cambio | | | |
| 15 | No se observa otro cambio | | | |
| 20 | No se observa otro cambio | | | |
| 30 | No se observa otro cambio | | | |
| 68 | Se observa cuajo débil | | | |

Fuente: elaboración propia.

Apéndice 11. Tiempos, observaciones, fuerza de cuaje y cuajo necesario por cada 100 L de leche, de la quimosina extraída a pH 2 y 35 °C (corrida 2)

| t (min) | Observaciones en tiempo transcurrido | t total (s) | Rendimiento (fuerza de cuaje) (s ⁻¹) | cm ³ de cuajo por cada 100 L de leche |
|---------|--------------------------------------|-------------|--|--|
| 5 | Se observa viscosidad | 3 000 | 80 | 1 250 |
| 10 | No se observa otro cambio | | | |
| 15 | No se observa otro cambio | | | |
| 20 | No se observa otro cambio | | | |
| 30 | No se observa otro cambio | | | |
| 50 | Se observa cuajo débil | | | |

Fuente: elaboración propia.

Apéndice 12. Tiempos, observaciones, fuerza de cuaje y cuajo necesario por cada 100 L de leche, de la quimosina extraída a pH 2 y 35 °C (corrida 3)

| t (min) | Observaciones en tiempo transcurrido | t total (s) | Rendimiento (fuerza de cuaje) (s ⁻¹) | cm ³ de cuajo por cada 100 L de leche |
|---------|--------------------------------------|-------------|--|--|
| 1 | No se observa cambio | 4 200 | 57,14 | 1 750 |
| 2 | Se observa viscosidad | | | |
| 15 | No se observa otro cambio | | | |
| 20 | No se observa otro cambio | | | |
| 40 | No se observa otro cambio | | | |
| 60 | No se observa otro cambio | | | |
| 70 | Se observa cuajo débil | | | |

Fuente: elaboración propia.

Apéndice 13. Tiempos, observaciones, fuerza de cuaje y cuajo necesario por cada 100 L de leche, de la quimosina extraída a pH 3 y 35 °C (corrida 1)

| t (min) | Observaciones en tiempo transcurrido | t total (s) | Rendimiento (fuerza de cuaje) (s ⁻¹) | cm ³ de cuajo por cada 100 L de leche |
|---------|--------------------------------------|-------------|--|--|
| 1 | No se observa cambio | 4 200 | 57,14 | 1 750 |
| 2 | Se observa viscosidad | | | |
| 15 | No se observa otro cambio | | | |
| 20 | No se observa otro cambio | | | |
| 40 | No se observa otro cambio | | | |
| 60 | No se observa otro cambio | | | |
| 70 | Se observa cuajo débil | | | |

Fuente: elaboración propia.

Apéndice 14. Tiempos, observaciones, fuerza de cuaje y cuajo necesario por cada 100 L de leche, de la quimosina extraída a pH 3 y 35 °C (corrida 2)

| t (min) | Observaciones en tiempo transcurrido | t total (s) | Rendimiento (fuerza de cuaje) (s ⁻¹) | cm ³ de cuajo por cada 100 L de leche |
|---------|--------------------------------------|-------------|--|--|
| 1 | No se observa cambio | 4 200 | 57,14 | 1 750 |
| 2 | Se observa mayor viscosidad | | | |
| 15 | No se observa otro cambio | | | |
| 20 | No se observa otro cambio | | | |
| 40 | Se observa cuajo débil | | | |

Fuente: elaboración propia.

Apéndice 15. Tiempos, observaciones, fuerza de cuaje y cuajo necesario por cada 100 L de leche, de la quimosina extraída a pH 3 y 35 °C (corrida 3)

| t (min) | Observaciones en tiempo transcurrido | t total (s) | Rendimiento (fuerza de cuaje) (s ⁻¹) | cm ³ de cuajo por cada 100 L de leche |
|---------|--------------------------------------|-------------|--|--|
| 1 | No se observa cambio | 4 200 | 57,14 | 1 750 |
| 2 | Se observa viscosidad | | | |
| 15 | No se observa otro cambio | | | |
| 20 | No se observa otro cambio | | | |
| 40 | No se observa otro cambio | | | |
| 60 | No se observa otro cambio | | | |
| 70 | Se observa cuajo débil | | | |

Fuente: elaboración propia.

Apéndice 16. Tiempos, observaciones, fuerza de cuaje y cuajo necesario por cada 100 L de leche, de la quimosina extraída a pH 4 y 35 °C (corrida 1)

| t (min) | Observaciones en tiempo transcurrido | t total (s) | Rendimiento (fuerza de cuaje) (s ⁻¹) | cm ³ de cuajo por cada 100 L de leche |
|---------|--------------------------------------|-------------|--|--|
| 1 | No se observa cambio | 4 200 | 57,14 | 1 750 |
| 2 | Se observa mayor viscosidad | | | |
| 15 | No se observa otro cambio | | | |
| 20 | No se observa otro cambio | | | |
| 40 | Se observa cuajo débil | | | |

Fuente: elaboración propia.

Apéndice 17. Tiempos, observaciones, fuerza de cuaje y cuajo necesario por cada 100 L de leche, de la quimosina extraída a pH 4 y 35 °C (corrida 2)

| t (min) | Observaciones en tiempo transcurrido | t total (s) | Rendimiento (fuerza de cuaje) (s ⁻¹) | cm ³ de cuajo por cada 100 L de leche |
|---------|--------------------------------------|-------------|--|--|
| 1 | No se observa cambio | 4 200 | 57,14 | 1 750 |
| 2 | Se observa viscosidad | | | |
| 15 | No se observa otro cambio | | | |
| 20 | No se observa otro cambio | | | |
| 40 | No se observa otro cambio | | | |
| 60 | No se observa otro cambio | | | |
| 70 | No se observa otro cambio | | | |

Fuente: elaboración propia.

Apéndice 18. Tiempos, observaciones, fuerza de cuaje y cuajo necesario por cada 100 L de leche, de la quimosina extraída a pH 4 y 35 °C (corrida 3)

| t (min) | Observaciones en tiempo transcurrido | t total (s) | Rendimiento (fuerza de cuaje) (s ⁻¹) | cm ³ de cuajo por cada 100 L de leche |
|---------|--------------------------------------|-------------|--|--|
| 1 | No se observa cambio | 4 200 | 57,14 | 1 750 |
| 2 | Se observa viscosidad | | | |
| 15 | No se observa otro cambio | | | |
| 20 | No se observa otro cambio | | | |
| 40 | Se observa cuajo débil | | | |

Fuente: elaboración propia.

Apéndice 19. Tiempos, observaciones, fuerza de cuaje y cuajo necesario por cada 100 L de leche, de la quimosina extraída a pH 2 y 45 °C (corrida 1)

| t (min) | Observaciones en tiempo transcurrido | t total (s) | Rendimiento (fuerza de cuaje) (s ⁻¹) | cm ³ de cuajo por cada 100 L de leche |
|---------|--------------------------------------|-------------|--|--|
| 1 | No se observa cambio | 900 | 266,66 | 375 |
| 2 | Se observa mayor viscosidad | | | |
| 3 | No se observa otro cambio | | | |
| 4 | No se observa otro cambio | | | |
| 5 | Se observa cuajo por partes | | | |
| 10 | Se observa cuajo débil | | | |
| 15 | cuajo con fuerza | | | |

Fuente: elaboración propia.

Apéndice 20. Tiempos, observaciones, fuerza de cuaje y cuajo necesario por cada 100 L de leche, de la quimosina extraída a pH 2 y 45 °C (corrida 2)

| t (min) | Observaciones en tiempo transcurrido | t total (s) | Rendimiento (fuerza de cuaje) (s ⁻¹) | cm ³ de cuajo por cada 100 L de leche |
|---------|---|-------------|--|--|
| 1 | No se observa cambio | 2 100 | 114,28 | 875 |
| 2 | Se observa mayor viscosidad | | | |
| 4 | Se observa cuajo en el fondo del recipiente | | | |
| 10 | No se observa otro cambio | | | |
| 30 | Cuajo débil | 2 100 | 114,28 | 875 |
| 35 | Cuajo fuerte | | | |

Fuente: elaboración propia.

Apéndice 21. Tiempos, observaciones, fuerza de cuaje y cuajo necesario por cada 100 L de leche, de la quimosina extraída a pH 2 y 45 °C (corrida 3)

| t (min) | Observaciones en tiempo transcurrido | t total (s) | Rendimiento (fuerza de cuaje) (s ⁻¹) | cm ³ de cuajo por cada 100 L de leche |
|---------|--------------------------------------|-------------|--|--|
| 1 | No se observa cambio | 3 600 | 66,66 | 1 500 |
| 2 | Se observa viscosidad | | | |
| 15 | No se observa otro cambio | | | |
| 20 | No se observa otro cambio | | | |
| 40 | No se observa otro cambio | | | |
| 60 | Se observa cuajo con fuerza | | | |

Fuente: elaboración propia.

Apéndice 22. Tiempos, observaciones, fuerza de cuaje y cuajo necesario por cada 100 L de leche, de la quimosina extraída a pH 3 y 45 °C (corrida 1)

| t (min) | Observaciones en tiempo transcurrido | t total (s) | Rendimiento (fuerza de cuaje) (s ⁻¹) | cm ³ de cuajo por cada 100 L de leche |
|---------|--------------------------------------|-------------|--|--|
| 1 | No se observa cambio | 4 200 | 57,14 | 1 750 |
| 2 | Se observa viscosidad | | | |
| 15 | No se observa otro cambio | | | |
| 20 | No se observa otro cambio | | | |
| 40 | No se observa otro cambio | | | |
| 60 | No se observa otro cambio | | | |
| 70 | Se observa cuajo débil | | | |

Fuente: elaboración propia.

Apéndice 23. Tiempos, observaciones, fuerza de cuaje y cuajo necesario por cada 100 L de leche, de la quimosina extraída a pH 3 y 45 °C (corrida 2)

| t (min) | Observaciones en tiempo transcurrido | t total (s) | Rendimiento (fuerza de cuaje) (s ⁻¹) | cm ³ de cuajo por cada 100 L de leche |
|---------|--------------------------------------|-------------|--|--|
| 1 | No se observa cambio | 4 200 | 57,14 | 1 750 |
| 2 | Se observa viscosidad | | | |
| 15 | No se observa otro cambio | | | |
| 20 | No se observa otro cambio | | | |
| 40 | No se observa otro cambio | | | |
| 60 | No se observa otro cambio | | | |
| 70 | Se observa cuajo débil | | | |

Fuente: elaboración propia.

Apéndice 24. Tiempos, observaciones, fuerza de cuaje y cuajo necesario por cada 100 L de leche, de la quimosina extraída a pH 3 y 45 °C (corrida 3)

| t (min) | Observaciones en tiempo transcurrido | t total (s) | Rendimiento (fuerza de cuaje) (s ⁻¹) | cm ³ de cuajo por cada 100 L de leche |
|---------|--------------------------------------|-------------|--|--|
| 1 | No se observa cambio | 4 200 | 57,14 | 1 750 |
| 2 | Se observa r viscosidad | | | |
| 15 | No se observa otro cambio | | | |
| 20 | No se observa otro cambio | | | |
| 40 | No se observa otro cambio | | | |
| 60 | No se observa otro cambio | | | |
| 70 | Se observa cuajo débil | | | |

Fuente: elaboración propia.

Apéndice 25. Tiempos, observaciones, fuerza de cuaje y cuajo necesario por cada 100 L de leche, de la quimosina extraída a pH 4 y 45 °C (corrida 1)

| t (min) | Observaciones en tiempo transcurrido | t total (s) | Rendimiento (fuerza de cuaje) (s ⁻¹) | cm ³ de cuajo por cada 100 L de leche |
|---------|--------------------------------------|-------------|--|--|
| 1 | No se observa cambio | 4 200 | 57,14 | 1 750 |
| 2 | Se observa viscosidad | | | |
| 15 | No se observa otro cambio | | | |
| 20 | No se observa otro cambio | | | |
| 40 | No se observa otro cambio | | | |
| 60 | No se observa otro cambio | 4 200 | 57,14 | 1 750 |
| 70 | Se observa cuajo débil | | | |

Fuente: elaboración propia.

Apéndice 26. Tiempos, observaciones, fuerza de cuaje y cuajo necesario por cada 100 L de leche, de la quimosina extraída a pH 4 y 45 °C (corrida 2)

| t (min) | Observaciones en tiempo transcurrido | t total (s) | Rendimiento (fuerza de cuaje) (s ⁻¹) | cm ³ de cuajo por cada 100 L de leche |
|---------|--------------------------------------|-------------|--|--|
| 1 | No se observa cambio | 4 200 | 57,14 | 1 750 |
| 2 | Se observa viscosidad | | | |
| 15 | No se observa otro cambio | | | |
| 20 | No se observa otro cambio | | | |
| 40 | No se observa otro cambio | | | |
| 60 | No se observa otro cambio | | | |
| 70 | Se observa cuajo débil | | | |

Fuente: elaboración propia.

Apéndice 27. Tiempos, observaciones, fuerza de cuaje y cuajo necesario por cada 100 L de leche, de la quimosina extraída a pH 4 y 45 °C (corrida 3)

| t (min) | Observaciones en tiempo transcurrido | t total (s) | Rendimiento (fuerza de cuaje) (s ⁻¹) | cm ³ de cuajo por cada 100 L de leche |
|---------|--------------------------------------|-------------|--|--|
| 1 | No se observa cambio | 4 200 | 57,14 | 1 750 |
| 2 | Se observa viscosidad | | | |
| 15 | No se observa otro cambio | | | |
| 20 | No se observa otro cambio | | | |
| 40 | No se observa otro cambio | | | |
| 60 | No se observa otro cambio | | | |
| 70 | Se observa cuajo débil | | | |

Fuente: elaboración propia.

Apéndice 28. Tiempos, observaciones, fuerza de cuaje y cuajo necesario por cada 100 litros de leche, de la pepsina extraída a pH 2 y temperatura 25 °C (corrida 1)

| t (min) | Observaciones en tiempo transcurrido | t total (s) | Rendimiento (fuerza de cuaje) (s ⁻¹) | cm ³ de cuajo por cada 100 L de leche |
|---------|---|-------------|--|--|
| 5 | No se observa cambio | 960 | 250 | 400 |
| 10 | Se observa mayor viscosidad | | | |
| 15 | Se observa cuajo en el fondo del recipiente | | | |
| 16 | Cuajo fuere | | | |

Fuente: elaboración propia.

Apéndice 29. Tiempos, observaciones, fuerza de cuaje y cuajo necesario por cada 100 L de leche, de la pepsina extraída a pH 2 y 25 °C (corrida 2)

| t (min) | Observaciones en tiempo transcurrido | t total (s) | Rendimiento (fuerza de cuaje) (s ⁻¹) | cm ³ de cuajo por cada 100 L de leche |
|---------|--------------------------------------|-------------|--|--|
| 1 | No se observa cambio | 900 | 266,66 | 375 |
| 2 | Se observa mayor viscosidad | | | |
| 3 | No se observa otro cambio | | | |
| 4 | No se observa otro cambio | | | |
| 5 | Se observa cuajo por partes | | | |
| 10 | Se observa cuajo débil | | | |
| 15 | Cuajo con fuerza | | | |

Fuente: elaboración propia.

Apéndice 30. Tiempos, observaciones, fuerza de cuaje y cuajo necesario por cada 100 L de leche, de la pepsina extraída a pH 2 y 25 °C (corrida 3)

| t (min) | Observaciones en tiempo transcurrido | t total (s) | Rendimiento (fuerza de cuaje) (s ⁻¹) | cm ³ de cuajo por cada 100 L de leche |
|---------|--------------------------------------|-------------|--|--|
| 1 | No se observa cambio | 900 | 266,66 | 375 |
| 2 | Se observa viscosidad | | | |
| 3 | No se observa otro cambio | | | |
| 4 | No se observa otro cambio | | | |
| 5 | Se observa cuajo por partes | | | |
| 10 | Se observa cuajo débil | 900 | 266,66 | 375 |
| 15 | Se observa cuajo fuerte | | | |

Fuente: elaboración propia.

Apéndice 31. Tiempos, observaciones, fuerza de cuaje y cuajo necesario por cada 100 L de leche, de la pepsina extraída a pH 3 y 25 °C (corrida 1)

| t (min) | Observaciones en tiempo transcurrido | t total (s) | Rendimiento (fuerza de cuaje) (s ⁻¹) | cm ³ de cuajo por cada 100 L de leche |
|---------|--------------------------------------|-------------|--|--|
| 1 | No se observa cambio | 4 200 | 57,14 | 1 750 |
| 2 | Se observa viscosidad | | | |
| 15 | No se observa otro cambio | | | |
| 20 | No se observa otro cambio | | | |
| 40 | No se observa otro cambio | | | |
| 60 | Se observa cuajo débil | | | |

Fuente: elaboración propia.

Apéndice 32. Tiempos, observaciones, fuerza de cuaje y cuajo necesario por cada 100 L de leche, de la pepsina extraída a pH 3 y 25 °C (corrida 2)

| t (min) | Observaciones en tiempo transcurrido | t total (s) | Rendimiento (fuerza de cuaje) (s ⁻¹) | cm ³ de cuajo por cada 100 L de leche |
|---------|--------------------------------------|-------------|--|--|
| 1 | No se observa cambio | 4 200 | 57,14 | 1 750 |
| 2 | Se observa viscosidad | | | |
| 15 | No se observa otro cambio | | | |
| 20 | No se observa otro cambio | | | |
| 40 | No se observa otro cambio | | | |
| 60 | Se observa cuajo débil | | | |

Fuente: elaboración propia.

Apéndice 33. (corrida 3)

| t (min) | Observaciones en tiempo transcurrido | t Total (s) | Rendimiento (Fuerza de cuaje) (s ⁻¹) | cm ³ de cuajo por cada 100 L de leche |
|---------|---|-------------|--|--|
| 1 | Se observa viscosidad | 3 300 | 72,72 | 1 375 |
| 2 | No se observa otro cambio | | | |
| 5 | No se observa otro cambio | | | |
| 10 | No se observa otro cambio | | | |
| 15 | No se observa otro cambio | | | |
| 20 | Se observa cuajo en el fondo del recipiente | | | |
| 55 | Cuajo con fuerza | | | |

Fuente: elaboración propia.

Apéndice 33. Tiempos, observaciones, fuerza de cuaje y cuajo necesario por cada 100 L de leche, de la pepsina extraída a pH 4 y 25 °C (corrida 1)

| t (min) | Observaciones en tiempo transcurrido | t total (s) | Rendimiento (fuerza de cuaje) (s ⁻¹) | cm ³ de cuajo por cada 100 L de leche |
|---------|--------------------------------------|-------------|--|--|
| 1 | No se observa cambio | 3 000 | 80 | 1 250 |
| 2 | Se observa viscosidad | | | |
| 15 | No se observa otro cambio | | | |
| 20 | No se observa otro cambio | | | |
| 40 | No se observa otro cambio | | | |
| 50 | Cuajo con fuerza | | | |

Fuente: elaboración propia.

Apéndice 34. Tiempos, observaciones, fuerza de cuaje y cuajo necesario por cada 100 L de leche, de la pepsina extraída a pH 4 y 25 °C (corrida 2)

| t (min) | Observaciones en tiempo transcurrido | t total (s) | Rendimiento (fuerza de cuaje) (s ⁻¹) | cm ³ de cuajo por cada 100 L de leche |
|---------|--------------------------------------|-------------|--|--|
| 1 | No se observa cambio | 3 000 | 80 | 1 250 |
| 2 | Se observa viscosidad | | | |
| 15 | No se observa otro cambio | | | |
| 20 | No se observa otro cambio | | | |
| 40 | No se observa otro cambio | | | |
| 50 | Cuajo con fuerza | | | |

Fuente: elaboración propia.

Apéndice 35. Tiempos, observaciones, fuerza de cuaje y cuajo necesario por cada 100 L de leche, de la pepsina extraída a pH 4 y 25 °C (corrida 3)

| t (min) | Observaciones en tiempo transcurrido | t total (s) | Rendimiento (fuerza de cuaje) (s ⁻¹) | cm ³ de cuajo por cada 100 L de leche |
|---------|--------------------------------------|-------------|--|--|
| 1 | No se observa cambio | 2 520 | 95,23 | 1 050 |
| 2 | Se observa viscosidad | | | |
| 15 | No se observa otro cambio | | | |
| 20 | No se observa otro cambio | | | |
| 40 | No se observa otro cambio | | | |
| 42 | Cuajo con fuerza | | | |

Fuente: elaboración propia.

Apéndice 36. Tiempos, observaciones, fuerza de cuaje y cuajo necesario por cada 100 L de leche, de la pepsina extraída a pH 2 y 35 °C (corrida 1)

| t (min) | Observaciones en tiempo transcurrido | t total (s) | Rendimiento (fuerza de cuaje) (s ⁻¹) | cm ³ de cuajo por cada 100 L de leche |
|---------|---|-------------|--|--|
| 1 | Se observa viscosidad | 360 | 666,66 | 150 |
| 2 | Se observa cuajo en el fondo del recipiente | | | |
| 6 | Se observa cuajo fuerza | | | |

Fuente: elaboración propia.-.

Apéndice 37. Tiempos, observaciones, fuerza de cuaje y cuajo necesario por cada 100 L de leche, de la pepsina extraída a pH 2 y 35 °C (corrida 2)

| t (min) | Observaciones en tiempo transcurrido | t total (s) | Rendimiento (fuerza de cuaje) (s ⁻¹) | cm ³ de cuajo por cada 100 L de leche |
|---------|---|-------------|--|--|
| 1 | No se observa cambio | 480 | 500 | 200 |
| 2 | Se observa viscosidad | | | |
| 3 | Se observa cuajo en el fondo del recipiente | | | |
| 4 | Se observa cuajo débil | | | |
| 8 | Se observa cuajo con fuerza | | | |

Fuente: elaboración propia.

Apéndice 38. Tiempos, observaciones, fuerza de cuaje y cuajo necesario por cada 100 L de leche, de la pepsina extraída a pH 2 y 35 °C (corrida 2)

| t (min) | Observaciones en tiempo transcurrido | t total (s) | Rendimiento (fuerza de cuaje) (s ⁻¹) | cm ³ de cuajo por cada 100 L de leche |
|---------|---|-------------|--|--|
| 5 | No se observa cambio | 1 020 | 235,29 | 425 |
| 10 | Se observa mayor viscosidad | | | |
| 15 | Se observa cuajo en el fondo del recipiente | | | |
| 17 | Se observa cuajo con fuerza | | | |

Fuente: elaboración propia.

Apéndice 39. Tiempos, observaciones, fuerza de cuaje y cuajo necesario por cada 100 L de leche, de la pepsina extraída a pH 3 y 35 °C (corrida 1)

| t (min) | Observaciones en tiempo transcurrido | t total (s) | Rendimiento (fuerza de cuaje) (s ⁻¹) | cm ³ de cuajo por cada 100 L de leche |
|---------|---|-------------|--|--|
| 1 | No se observa cambio | 1 200 | 200 | 500 |
| 2 | No se observa cambio | | | |
| 4 | Se observa viscosidad | | | |
| 5 | Empieza cuajado | | | |
| 10 | Se observa cuajo en el fondo del recipiente | | | |
| 15 | Se observa cuajo en por partes | | | |
| 20 | Cuajo con fuerza | | | |

Fuente: elaboración propia.

Apéndice 40. Tiempos, observaciones, fuerza de cuaje y cuajo necesario por cada 100 L de leche, de la pepsina extraída a pH 3 y 35 °C (corrida 2)

| t (min) | Observaciones en tiempo transcurrido | t total (s) | Rendimiento (fuerza de cuaje) (s ⁻¹) | cm ³ de cuajo por cada 100 L de leche |
|---------|--------------------------------------|-------------|--|--|
| 5 | No se observa cambio | 1 020 | 235,29 | 425 |
| 10 | Se observa viscosidad | | | |
| 17 | Cuajo en el fondo del recipiente | | | |

Fuente: elaboración propia.

Apéndice 41. Tiempos, observaciones, fuerza de cuaje y cuajo necesario por cada 100 litros de leche, de la pepsina extraída a pH 3 y Temperatura 35 °C (corrida 3)

| t (min) | Observaciones en tiempo transcurrido | t total (s) | Rendimiento (fuerza de cuaje) (s ⁻¹) | cm ³ de cuajo por cada 100 L de leche |
|---------|--------------------------------------|-------------|--|--|
| 1 | No se observa cambio | 4 200 | 57,14 | 1 750 |
| 2 | Se observa viscosidad | | | |
| 15 | No se observa otro cambio | | | |
| 20 | No se observa otro cambio | | | |
| 40 | No se observa otro cambio | | | |
| 60 | No se observa otro cambio | | | |
| 70 | Se observa cuajo débil | | | |

Fuente: elaboración propia.

Apéndice 42. Tiempos, observaciones, fuerza de cuaje y cuajo necesario por cada 100 L de leche, de la pepsina extraída a pH 4 y 35 °C (corrida 1)

| t (min) | Observaciones en tiempo transcurrido | t total (s) | Rendimiento (fuerza de cuaje) (s ⁻¹) | cm ³ de cuajo por cada 100 L de leche |
|---------|---|-------------|--|--|
| 5 | Se observa viscosidad | 3 200 | 74,07 | 1 350 |
| 10 | No se observa otro cambio | | | |
| 15 | No se observa otro cambio | | | |
| 20 | No se observa otro cambio | | | |
| 30 | Se observa cuajo en el fondo del recipiente | | | |
| 54 | Cuajo con fuerza | | | |

Fuente: elaboración propia.

Apéndice 43. Tiempos, observaciones, fuerza de cuaje y cuajo necesario por cada 100 L de leche, de la pepsina extraída a pH 4 y 35 °C (corrida 2)

| t (min) | Observaciones en tiempo transcurrido | t total (s) | Rendimiento (fuerza de cuaje) (s ⁻¹) | cm ³ de cuajo por cada 100 L de leche |
|---------|---|-------------|--|--|
| 5 | No se observa cambio | 3 600 | 66,66 | 1 500 |
| 10 | No se observa cambio | | | |
| 15 | No se observa cambio | | | |
| 20 | Se observa viscosidad | | | |
| 30 | Se observa cuajo en el fondo del recipiente | | | |
| 45 | No se observa otro cambio | | | |
| 60 | cuajo con fuerza | | | |

Fuente: elaboración propia.

Apéndice 44. Tiempos, observaciones, fuerza de cuaje y cuajo necesario por cada 100 L de leche, de la pepsina extraída a pH 4 y 35 °C (corrida 3)

| t (min) | Observaciones en tiempo transcurrido | t total (s) | Rendimiento (fuerza de cuaje) (s ⁻¹) | cm ³ de cuajo por cada 100 L de leche |
|---------|---|-------------|--|--|
| 5 | No se observa cambio | 3 600 | 66,66 | 1 500 |
| 10 | No se observa cambio | | | |
| 15 | No se observa cambio | | | |
| 20 | Se observa mayor viscosidad | | | |
| 30 | Se observa cuajo en el fondo del recipiente | 3 600 | 66,66 | 1 500 |
| 45 | No se observa otro cambio | | | |
| 60 | Cuajo con fuerza | | | |

Fuente: elaboración propia.

Apéndice 45. Tiempos, observaciones, fuerza de cuaje y cuajo necesario por cada 100 L de leche, de la pepsina extraída a pH 2 y 45 °C (corrida 1)

| t (min) | Observaciones en tiempo transcurrido | t total (s) | Rendimiento (fuerza de cuaje) (s ⁻¹) | cm ³ de cuajo por cada 100 L de leche |
|---------|---|-------------|--|--|
| 1 | Se observa viscosidad | 240 | 1 000 | 100 |
| 2 | Se observa cuajo en el fondo del recipiente | | | |
| 4 | Cuajo con fuerza | | | |

Fuente: elaboración propia.

Apéndice 46. Tiempos, observaciones, fuerza de cuaje y cuajo necesario por cada 100 L de leche, de la pepsina extraída a pH 2 y 45 °C (corrida 2)

| t (min) | Observaciones en tiempo transcurrido | t total (s) | Rendimiento (fuerza de cuaje) (s ⁻¹) | cm ³ de cuajo por cada 100 L de leche |
|---------|---|-------------|--|--|
| 1 | Se observa mayor viscosidad | 240 | 1 000 | 100 |
| 2 | Se observa cuajo en el fondo del recipiente | | | |
| 4 | Se observa cuajo fuerte | | | |

Fuente: elaboración propia.

Apéndice 47. Tiempos, observaciones, fuerza de cuaje y cuajo necesario por cada 100 L de leche, de la pepsina extraída a pH 2 y 45 °C (corrida 3)

| t (min) | Observaciones en tiempo transcurrido | t total (s) | Rendimiento (fuerza de cuaje) (s ⁻¹) | cm ³ de cuajo por cada 100 L de leche |
|---------|---|-------------|--|--|
| 1 | Se observa mayor viscosidad | 360 | 666,66 | 150 |
| 2 | Se observa cuajo en el fondo del recipiente | | | |

Fuente: elaboración propia.

Apéndice 48. Tiempos, observaciones, fuerza de cuaje y cuajo necesario por cada 100 L de leche, de la pepsina extraída a pH 3 y 45 °C (corrida 1)

| t (min) | Observaciones en tiempo transcurrido | t total (s) | Rendimiento (fuerza de cuaje) (s ⁻¹) | cm ³ de cuajo por cada 100 L de leche |
|---------|---|-------------|--|--|
| 1 | No se observa cambio | 1 200 | 200 | 500 |
| 2 | No se observa cambio | | | |
| 4 | Se observa mayor viscosidad | | | |
| 5 | Empieza cuajado | | | |
| 10 | Se observa cuajo en el fondo del recipiente | | | |
| 15 | Se observa cuajo por partes | | | |
| 20 | Cuajo con fuerza | | | |

Fuente: elaboración propia.

Apéndice 49. Tiempos, observaciones, fuerza de cuaje y cuajo necesario por cada 100 L de leche, de la pepsina extraída a pH 3 y 45 °C (corrida 2)

| t (min) | Observaciones en tiempo transcurrido | t total (s) | Rendimiento (fuerza de cuaje) (s ⁻¹) | cm ³ de cuajo por cada 100 L de leche |
|---------|--------------------------------------|-------------|--|--|
| 5 | Se observa viscosidad | 1 320 | 181,81 | 550 |
| 10 | Se observa cuajo por partes | | | |
| 15 | Se observa cuajo por partes | | | |
| 20 | Se observa cuajo débil | | | |

Fuente: elaboración propia.

Apéndice 50. Tiempos, observaciones, fuerza de cuaje y cuajo necesario por cada 100 L de leche, de la pepsina extraída a pH 3 y 45 °C (corrida 3)

| t (min) | Observaciones en tiempo transcurrido | t total (s) | Rendimiento (fuerza de cuaje) (s ⁻¹) | cm ³ de cuajo por cada 100 L de leche |
|---------|---|-------------|--|--|
| 1 | No se observa cambio | 1 200 | 200 | 500 |
| 2 | No se observa cambio | | | |
| 4 | Se observa viscosidad | | | |
| 5 | Empieza cuajado | | | |
| 10 | Se observa cuajo en el fondo del recipiente | | | |
| 15 | Se observa cuajo en por partes | | | |
| 20 | Cuajo con fuerza | | | |

Fuente: elaboración propia.

Apéndice 51. Tiempos, observaciones, fuerza de cuaje y cuajo necesario por cada 100 L de leche, de la quimosina extraída con variación de NaCl a pH 2 y 25 °C (corrida 1)

| t (min) | Observaciones en tiempo transcurrido | t total (s) | Rendimiento (fuerza de cuaje) (s⁻¹) | cm³ de cuajo por cada 100 L de leche |
|----------------|---|--------------------|---|--|
| 1 | No se observa cambio | 480 | 500 | 200 |
| 2 | Se observa viscosidad | | | |
| 3 | Se observa cuajo en el fondo del recipiente | | | |
| 8 | Se observa cuajo fuerte | | | |

Fuente: elaboración propia.

Apéndice 52. Tiempos, observaciones, fuerza de cuaje y cuajo necesario por cada 100 L de leche, de la quimosina extraída con variación de NaCl a pH 2 y 25 °C (corrida 2)

| t (min) | Observaciones en tiempo transcurrido | t total (s) | Rendimiento (fuerza de cuaje) (s⁻¹) | cm³ de cuajo por cada 100 L de leche |
|----------------|---|--------------------|---|--|
| 1 | Se observa viscosidad | 3 00 | 800 | 125 |
| 2 | Se observa cuajo en el fondo del recipiente | | | |
| 3 | Se observa cuajo débil | | | |
| 5 | Se observa cuajo con fuerza | | | |

Fuente: elaboración propia.

Apéndice 53. Tiempos, observaciones, fuerza de cuaje y cuajo necesario por cada 100 L de leche, de la quimosina extraída con variación de NaCl a pH 2 y 25 °C (corrida 3)

| t (min) | Observaciones en tiempo transcurrido | t total (s) | Rendimiento (fuerza de cuaje) (s⁻¹) | cm³ de cuajo por cada 100 L de leche |
|----------------|---|--------------------|---|--|
| 1 | Se observa mayor viscosidad | 300 | 800 | 125 |
| 2 | Se observa cuajo en el fondo del recipiente | | | |
| 3 | Se observa cuajo débil | | | |
| 5 | Se observa cuajo con fuerza | | | |

Fuente: elaboración propia.

Apéndice 54. Tiempos, observaciones, fuerza de cuaje y cuajo necesario por cada 100 L de leche, de la pepsina extraída con variación de NaCl a pH 2 y 25 °C (corrida 1)

| t (min) | Observaciones en tiempo transcurrido | t total (s) | Rendimiento (fuerza de cuaje) (s⁻¹) | cm³ de cuajo por cada 100 L de leche |
|----------------|---|--------------------|---|--|
| 1 | Se observa mayor viscosidad | 180 | 1 333,33 | 75 |
| 2 | Se observa cuajo en el fondo del recipiente | | | |
| 3 | Se observa cuajo con fuerza | | | |

Fuente: elaboración propia.

Apéndice 55. Tiempos, observaciones, fuerza de cuaje y cuajo necesario por cada 100 L de leche, de la pepsina extraída con variación de NaCl a pH 2 y 25 °C (corrida 2)

| t (min) | Observaciones en tiempo transcurrido | t total (s) | Rendimiento (fuerza de cuaje) (s ⁻¹) | cm ³ de cuajo por cada 100 L de leche |
|---------|---|-------------|--|--|
| 1 | Se observa mayor viscosidad | 240 | 1 000 | 100 |
| 2 | Se observa cuajo en el fondo del recipiente | | | |
| 3 | Se observa cuajo débil | | | |
| 4 | Se observa cuajo con fuerza | | | |

Fuente: elaboración propia.

Apéndice 56. Tiempos, observaciones, fuerza de cuaje y cuajo necesario por cada 100 L de leche, de la pepsina extraída con variación de NaCl a pH 2 y 25 °C (corrida 3)

| t (min) | Observaciones en tiempo transcurrido | t total (s) | Rendimiento (fuerza de cuaje) (s ⁻¹) | cm ³ de cuajo por cada 100 L de leche |
|---------|---|-------------|--|--|
| 1 | Se observa mayor viscosidad | 300 | 800 | 125 |
| 2 | Se observa cuajo en el fondo del recipiente | | | |
| 3 | Se observa cuajo débil | | | |
| 5 | Se observa cuajo con fuerza | | | |

Fuente: elaboración propia.

Apéndice 57. Tiempos, observaciones, fuerza de cuaje y cuajo necesario quimosina comercial

| t (min) | Observaciones en tiempo transcurrido | t total (s) | Rendimiento (fuerza de cuaje) (s⁻¹) | cm³ de cuajo por cada 100 L de leche |
|--------------------|---|------------------------|---|--|
| 1 | Se observa cuajo débil | 120 | 2 000 | 50 |
| 2 | Se observa cuajo con fuerza | | | |

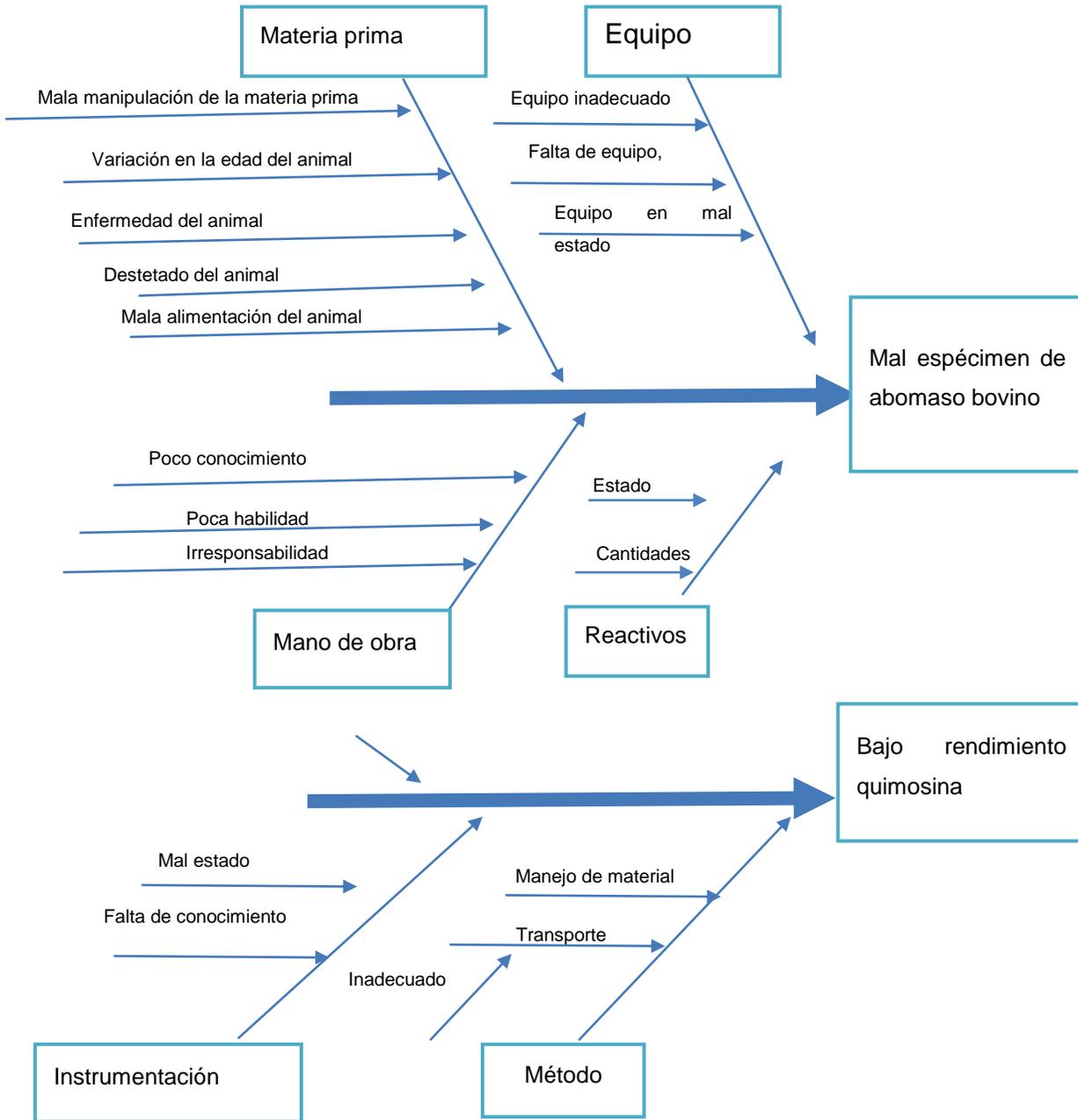
Fuente: elaboración propia.

Apéndice 58. **Requisitos académicos**



Fuente: elaboración propia.

Apéndice 59. Diagrama de causa y efecto



Fuente: elaboración propia.

Apéndice 60. Recolección de datos

Materia prima



Fuente: Laboratorio de Investigaciones de Extractos Vegetales (LIEXVE), Centro de Investigaciones de la Universidad de San Carlos.

Apéndice 61. Limpieza de materia prima



Fuente: Laboratorio de Investigaciones de Extractos Vegetales (LIEXVE), Centro de Investigaciones de la Universidad de San Carlos.

Apéndice 62. **Separación de membrana que contiene quimosina**



Fuente: Laboratorio de Investigaciones de Extractos Vegetales (LIEXVE), Centro de Investigaciones de la Universidad de San Carlos.

Apéndice 63. **Rompimiento de membrana**



Fuente: Laboratorio de Investigaciones de Extractos Vegetales (LIEXVE), Centro de Investigaciones de la Universidad de San Carlos.

Apéndice 64. **Ajuste de pH**



Fuente: Laboratorio de Investigaciones de Extractos Vegetales (LIECVE), Centro de Investigaciones de la Universidad de San Carlos.

Apéndice 65. **Maceración dinámica**



Fuente: Laboratorio de Investigaciones de Extractos Vegetales (LIECVE), Centro de Investigaciones de la Universidad de San Carlos.

Apéndice 66. **Centrifugado**



Fuente: Laboratorio de Investigaciones de Extractos Vegetales (LIEXVE), Centro de Investigaciones de la Universidad de San Carlos.

Apéndice 67.

Cromatografía iónica



Fuente: Laboratorio de Investigaciones de Extractos Vegetales (LIEXVE), Centro de Investigaciones de la Universidad de San Carlos.

Apéndice 68.

Solución salina conteniendo quimosina y pepsina



Fuente: Laboratorio de Investigaciones de Extractos Vegetales (LIEXVE), Centro de Investigaciones de la Universidad de San Carlos.

Apéndice 69. **Fuerza de cuajo**



Fuente: Laboratorio de Investigaciones de Extractos Vegetales (LIECVE), Centro de Investigaciones de la Universidad de San Carlos.

Apéndice 70. **Comparación fuerza de cuaje de la quimosina obtenida, contra cuajo comercial**



Fuente: Laboratorio de Investigaciones de Extractos Vegetales (LIEXVE), Centro de Investigaciones de la Universidad de San Carlos.

ANEXOS

Anexo 4. Informe de realización, extracción y caracterización fisicoquímica de quimosina bovina sometida a variación térmica y de pH

| | | |
|---|---|---|
|  | CENTRO DE INVESTIGACIONES DE INGENIERIA FACULTAD DE INGENIERIA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA |  |
| | | No. 0784 |
| | | O.T. No. 32563 No. Informe LIEXVE-QI 15- 2014 |
| Interesado: | Vivian María Cano Salazar Estudiante de Ingeniería Química Carné estudiantil: 2005-12129 | |
| Proyecto: | Trabajo de Graduación "EXTRACCIÓN Y CARACTERIZACIÓN FISICOQUÍMICA DE QUIMOSINA PARA PRODUCCIÓN DE CUAJO EN LA BASE A VARIACIONES TÉRMICAS Y pH, A ESCALA LABORATORIO" | |
| Fecha: | Guatemala, 21 de Mayo del 2014 | |
| <hr/> | | |
| EXTRACCIÓN Y CARACTERIZACIÓN FISICOQUÍMICA DE QUIMOSINA A ESCALA LABORATORIO | | |
| <p>Se realizó la extracción de la enzima Quimosina código E.C.3.23.4. a partir del abomaso de vaca mediante maceración dinámica a tres temperaturas, tres pH diferentes y una variación de concentración de NaCl.</p> <p>Para poder llegar al material celular se rompieron las membranas triturando los cuajos utilizando agua desionizada obteniendo una solución acuosa con un contenido de Quimosina y Pepsina y otros contaminantes.</p> <p>Se estableció el pH de trabajo utilizando en el estudio (pH de 2, 3 y 4), para luego realizar una maceración en solución salina variando la temperatura de maceración utilizando las temperaturas de 25 °C, 35 °C y 45 °C.</p> <p>Luego se agregó una cantidad de polietilenglicol (PEG-400) de un 8% en peso respecto al volumen y una cantidad de sulfato disódico anhidro de 11% respecto al volumen para formar una solución de dos fases. La maceración dinámica para la extracción de la enzima se llevó a cabo en un periodo de dos horas.</p> <p>La solución resultante se dejó reposar hasta que se separó en una fase de polietilenglicol rica en Quimosina y Pepsina y una fase salina pobre en enzimas y rica en contaminantes que fueron recuperados mediante centrifugado. La fase de polietilenglicol se colocó en contacto con una resina de intercambio iónico manteniendo el pH de forma que la Quimosina se uniera a la resina.</p> <p>Posteriormente la Quimosina se eluyó de la columna empleando una solución salina y un tampón que mantuviera el pH que separe la Quimosina, después que la Quimosina se adhirió a la resina de intercambio iónico, la fase de polietilenglicol recuperada es rica en Pepsina.</p> <p>La resina de intercambio iónico pudo regenerarse para el uso de lotes sucesivos de polietilenglicol con contenido de Quimosina mediante el lavado de la resina de intercambio iónico con una solución acuosa ajustado con un pH apropiado.</p> | | |
| | | Página 1 de 7 |
| <hr/> <small>FACULTAD DE INGENIERÍA –USAC– Edificio T-5, Ciudad Universitaria zona 12 Teléfono directo: 2418-9115, Planta: 2418-8000 Exts. 86209 y 86221 Fax: 2418-9121 Página web: http://cii.usac.edu.gt</small> | | |

Continuación del anexo 4.



No. 0785

A los dos extractos enzimáticos se pudo determinar la densidad, fuerza de cuajo (cantidad de centímetros cubico cuajados por un centímetro cubico de quimosina o pepsina).

Para la determinación de la fuerza de cuajo se determina reportando el volumen de leche en mL producido por cada mL de cuajo adicionado (quimosina y pepsina).

RESULTADOS

Tabla No.1 Densidades, tiempo total de cuajo, fuerza de cuaje e índice de refracción de la Quimosina utilizando maceración dinámica de 2 horas y temperatura de 25°C.

| pH | Repeticiones | Densidad (g/mL) | Promedio de densidad (g/mL) | Tiempo total de cuaje (segundos) | Fuerza de cuaje | Índice de Refracción |
|----|--------------|-----------------|-----------------------------|----------------------------------|-----------------|----------------------|
| 2 | 1 | 1.060 | 1.059 +/-0.001 | 4200 | 57.14 | 1.3495 |
| | 2 | 1.060 | | 2700 | 88.88 | 1.3452 |
| | 3 | 1.058 | | 4200 | 57.14 | 1.3495 |
| 3 | 1 | 1.060 | 1.058 +/- 0.001 | 3600 | 66.66 | 1.3495 |
| | 2 | 1.057 | | 4200 | 57.14 | 1.3495 |
| | 3 | 1.057 | | 4200 | 57.14 | 1.3480 |
| 4 | 1 | 1.058 | 1.057 +/- 0.001 | 4200 | 57.14 | 1.3520 |
| | 2 | 1.058 | | 4200 | 57.14 | 1.3500 |
| | 3 | 1.055 | | 4200 | 57.14 | 1.3520 |

Fuente: Datos experimentales LIEXVE

Tabla No.2 Densidades, tiempo total de cuajo, fuerza de cuaje e índice de refracción de la Quimosina utilizando maceración dinámica de 2 horas y temperatura de 35°C.

| pH | Repeticiones | Densidad (g/mL) | Promedio de densidad (g/mL) | Tiempo total de cuaje (segundos) | Fuerza de cuaje | Índice de Refracción |
|----|--------------|-----------------|-----------------------------|----------------------------------|-----------------|----------------------|
| 2 | 1 | 1.062 | 1.059 +/- 0.002 | 4080 | 58.82 | 1.3482 |
| | 2 | 1.058 | | 3000 | 80.00 | 1.3495 |
| | 3 | 1.058 | | 4200 | 57.14 | 1.3495 |
| 3 | 1 | 1.061 | 1.060 +/- 0.001 | 4200 | 57.14 | 1.3495 |
| | 2 | 1.062 | | 4200 | 57.14 | 1.3495 |
| | 3 | 1.059 | | 4200 | 57.14 | 1.3495 |
| 4 | 1 | 1.057 | 1.056 +/- 0 | 4200 | 57.14 | 1.3495 |
| | 2 | 1.056 | | 4200 | 57.14 | 1.3495 |
| | 3 | 1.057 | | 4200 | 57.14 | 1.3495 |

Fuente: Datos experimentales LIEXVE

Continuación del anexo 4.



No. 0786

Tabla No. 3 Densidades, tiempo total de cuaje, fuerza de cuaje e índice de refracción de la Quimosina utilizando maceración dinámica de 2 horas y temperatura de 45°C.

| pH | Repeticiones | Densidad (g/mL) | Promedio de densidad (g/mL) | Tiempo total de cuaje (segundos) | Fuerza de cuaje (mL) | Índice de Refracción |
|----|--------------|-----------------|-----------------------------|----------------------------------|----------------------|----------------------|
| 2 | 1 | 1.060 | 1.059 +/- 0.001 | 2100 | 114.28 | 1.3495 |
| | 2 | 1.060 | | 900 | 266.67 | 1.3495 |
| | 3 | 1.058 | | 3600 | 66.66 | 1.3495 |
| 3 | 1 | 1.060 | 1.058 +/- 0.001 | 4200 | 57.14 | 1.3500 |
| | 2 | 1.057 | | 4200 | 57.14 | 1.3495 |
| | 3 | 1.057 | | 4200 | 57.14 | 1.3495 |
| 4 | 1 | 1.058 | 1.057 +/- 0.001 | 4200 | 57.14 | 1.3490 |
| | 2 | 1.058 | | 4200 | 57.14 | 1.3495 |
| | 3 | 1.055 | | 4200 | 57.14 | 1.3500 |

Fuente: Datos experimentales LIEXVE

Tabla No. 4 Densidades, tiempo total de cuaje, fuerza de cuaje e índice de refracción de la Pepsina utilizando maceración dinámica de 2 horas y temperatura de 25°C.

| pH | Repeticiones | Densidad (g/mL) | Promedio de densidad (g/mL) | Tiempo total de cuaje (segundos) | Fuerza de cuaje | Índice de refracción |
|----|--------------|-----------------|-----------------------------|----------------------------------|-----------------|----------------------|
| 2 | 1 | 1.058 | 1.059 +/- 0.001 | 960 | 250 | 1.3490 |
| | 2 | 1.061 | | 900 | 266.66 | 1.3490 |
| | 3 | 1.060 | | 900 | 266.66 | 1.3490 |
| 3 | 1 | 1.060 | 1.058 +/- 0.001 | 4200 | 57.14 | 1.3490 |
| | 2 | 1.057 | | 2700 | 88.88 | 1.3490 |
| | 3 | 1.058 | | 4200 | 57.14 | 1.3490 |
| 4 | 1 | 1.057 | 1.058 +/- 0.001 | 3000 | 80 | 1.3495 |
| | 2 | 1.060 | | 3000 | 80 | 1.3490 |
| | 3 | 1.058 | | 2520 | 95.24 | 1.3495 |

Fuente: Datos experimentales LIEXVE

Continuación del anexo 4.



No. 0787

Tabla No. 5 Densidades, tiempo total de cuaje, fuerza de cuaje e índice de refracción de la Pepsina utilizando maceración dinámica de 2 horas y temperatura de 35°C.

| pH | Repeticiones | Densidad (g/mL) | Promedio de densidad (g/mL) | Tiempo total de cuaje (segundos) | Fuerza de cuaje | Índice de refracción |
|----|--------------|-----------------|-----------------------------|----------------------------------|-----------------|----------------------|
| 2 | 1 | 1.062 | 1.060 +/- 0.002 | 360 | 666.67 | 1.3490 |
| | 2 | 1.062 | | 480 | 500 | 1.3490 |
| | 3 | 1.058 | | 1020 | 235.21 | 1.3495 |
| 3 | 1 | 1.060 | 1.058 +/- 0.001 | 1200 | 200 | 1.3490 |
| | 2 | 1.058 | | 1020 | 235.29 | 1.3490 |
| | 3 | 1.058 | | 4200 | 57.14 | 1.3490 |
| 4 | 1 | 1.055 | 1.055 +/- 0 | 3200 | 72.72 | 1.3490 |
| | 2 | 1.055 | | 3600 | 66.66 | 1.3500 |
| | 3 | 1.055 | | 3600 | 66.66 | 1.3490 |

Fuente: Datos experimentales LIEXVE

Tabla No. 6 Densidades, tiempo total de cuaje, fuerza de cuaje e índice de refracción de la Pepsina utilizando maceración dinámica de 2 horas y temperatura de 45°C.

| pH | Repeticiones | Densidad (g/mL) | Promedio de densidad (g/mL) | Tiempo total de cuaje (segundos) | Fuerza de cuaje | Índice de refracción |
|----|--------------|-----------------|-----------------------------|----------------------------------|-----------------|----------------------|
| 2 | 1 | 1.048 | 1.050 +/- 0.002 | 240 | 1000 | 1.3490 |
| | 2 | 1.052 | | 240 | 1000 | 1.3482 |
| | 3 | 1.052 | | 360 | 667 | 1.3492 |
| 3 | 1 | 1.052 | 1.052 +/- 0.002 | 1200 | 200.00 | 1.3492 |
| | 2 | 1.055 | | 1320 | 181.81 | 1.3495 |
| | 3 | 1.050 | | 1200 | 200.00 | 1.3470 |
| 4 | 1 | 1.052 | 1.054 +/- 0.003 | 1320 | 181.81 | 1.3492 |
| | 2 | 1.058 | | 1200 | 200 | 1.3495 |
| | 3 | 1.052 | | 1200 | 200 | 1.3495 |

Fuente: Datos experimentales LIEXVE

Continuación del anexo 4.



No. 0788

Tabla No. 7 Densidades, tiempo total de cuajo, fuerza de cuaje e índice de refracción de la Quimosina con variación de NaCl (Salting out) utilizando maceración dinámica de 2 horas y pH 2.

| Temperatura | Repeticiones | Densidad (g/mL) | Promedio de densidad (g/mL) | Tiempo total de cuaje (segundos) | Fuerza de cuaje | Índice de Refracción |
|-------------|--------------|-----------------|-----------------------------|----------------------------------|-----------------|----------------------|
| 25 | 1 | 1.057 | 1.055 +/- 0.001 | 480 | 500 | 1.3495 |
| | 2 | 1.055 | | 300 | 800 | 1.3500 |
| | 3 | 1.054 | | 300 | 800 | 1.3500 |

Fuente: Datos experimentales LIEXVE

Tabla No. 8 Densidades, tiempo total de cuajo, fuerza de cuaje e índice de refracción de la Pepsina con variación de NaCl (salting out) utilizando maceración dinámica de 2 horas y pH 2.

| Temperatura | Repeticiones | Densidad (g/mL) | Promedio de densidad (g/mL) | Tiempo total de cuaje (segundos) | Fuerza de cuaje | Índice de Refracción |
|-------------|--------------|-----------------|-----------------------------|----------------------------------|-----------------|----------------------|
| 25 | 1 | 1.055 | 1.056 +/- 0.001 | 180 | 1333.3 | 1.3450 |
| | 2 | 1.058 | | 240 | 1000 | 1.3500 |
| | 3 | 1.055 | | 300 | 800 | 1.3500 |

Fuente: Datos experimentales LIEXVE

Continuación del anexo 4.

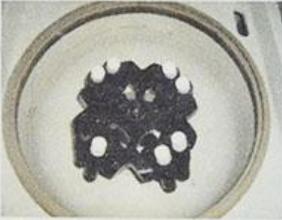
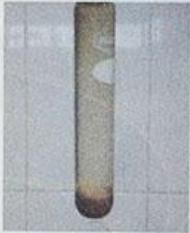
 **CENTRO DE INVESTIGACIONES DE INGENIERIA
FACULTAD DE INGENIERIA
UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA** 

No. **0789**

ANEXOS
Extracción de quimosina y pepsina
Separación, lavado y rompimiento de membrana de abomaso de vaca y ajuste de pH

Ajuste de pH, Centrifugado

Cromatografía Iónica

Página 6 de 7

FACULTAD DE INGENIERÍA —USAC—
Edificio T-5, Ciudad Universitaria zona 12
Teléfono directo: 2418-9115, Planta: 2418-8000 Exts. 86209 y 86221 Fax: 2418-9121
Página web: <http://cii.usac.edu.gt>

Continuación del anexo 4.

 **CENTRO DE INVESTIGACIONES DE INGENIERIA
FACULTAD DE INGENIERIA
UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA** 

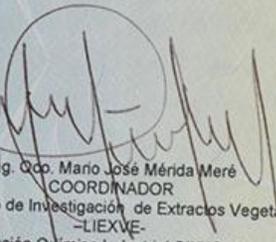
No. 0790

Solución salina de Quimosina y Pepsina

Fuerza de Cuajo


Ing. Qoo. Mario José Mérida Meré
COORDINADOR
Laboratorio de Investigación de Extractos Vegetales
-LIEXE-
Sección Química Industrial CII/USAC


Vo.Bo. Inga. Qca. Telma Mancela Cano Morales
DIRECTORA
Centro de Investigaciones de Ingeniería/USAC

Página 7 de 7

FACULTAD DE INGENIERÍA —USAC—
Edificio T-5, Ciudad Universitaria zona 12
Teléfono directo: 2418-9115, Planta: 2418-8000 Exts. 86209 y 86221 Fax: 2418-9121
Página web: <http://cii.usac.edu.gt>