



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO
INSTITUTO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS**

**Extracción del compuesto tecno-funcional de la
ortiga (*Euphorabiace Cnidoscolus aconitifolius*) para
la utilización como coagulante de origen vegetal en
quesos frescos tipo panela.**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
MAESTRO EN CIENCIA DE LOS ALIMENTOS**

Presenta:

Ing. Uriel González Lemus

Director de tesis:

Dra. Aurora Quintero Lira

Co-Director

Dr. Javier Piloni Martini

Asesores:

Dra. María Aurora Martínez Trujillo

Dra. Norma Güemes Vera



Tulancingo de Bravo, Hgo. Diciembre 2018



COORDINACION DE INVESTIGACION Y POSGRADO DEL ICAP

**Actas de la reunión del Comité de Tesis de Maestría en Ciencia de los Alimentos
Apertura:**

La reunión ordinaria para evaluar los avances de la tesis intitulada: "Extracción del compuesto tecno-funcional de la ortiga (*Euphorbiace Cnidocolus aconitifolius*) para la utilización como coagulante de origen vegetal en quesos frescos tipo panela", que desarrolla el estudiante Uriel González Lemus

Asistentes:

Dra. Aurora Quintero Lira

Dr. Javier Piloni Martini

Dra. Norma Güemes Vera

Dra. Maria Aurora Martínez Trujillo

A. Revisión de Trabajo de Tesis

Observaciones:

El comité revisó con antelación el trabajo de tesis en extenso propuesto por la estudiante, comunicando a el estudiante, Uriel González Lemus, oportunamente las correcciones, adiciones y/o modificaciones que debería considerar para mejorar su trabajo y poder continuar con el proceso de obtención de grado. El estudiante atendió de forma conveniente las sugerencias del comité.

B. Acuerdos

En esta fecha, se comunica atentamente que el comité conformado por los profesores firmantes, otorgamos nuestra autorización para que el estudiante imprima su trabajo final de tesis, y continúe con los trámites necesarios para la obtención del grado de maestría respectivo.

ATENTAMENTE

"AMOR, ORDEN Y PROGRESO"

Tulancingo de Bravo, Hidalgo a 9 de noviembre de 2018

Dra. Aurora Quintero Lira

Dr. Javier Piloni Martini

Dra. Norma Güemes Vera

Dra. Maria Aurora Martínez Trujillo



Agradecimientos

- Mamá, no solo me diste la vida, me hiciste la persona que hoy en día soy, muchas gracias por ser parte de mi vida, nunca me dejes, te amo con mi vida entera y jamás podré pagarte todo lo que has hecho por mí.
- Papá, agradezco que en la vida tenga a un padre como tú, eres lo máximo, las palabras que busco no existen, pues mi agradecimiento hacia ti no tiene comparación.
- Edgar, hermano, gracias por siempre estar a mi lado, no importa cuales sean mis ideales, siempre cuento con tu apoyo y sé que siempre así lo será, nunca podré pagarte todo lo que has hecho por mí.
- Nestor, el apoyo que me has dado desde que te conocí, nunca lo podré dejar de considerar, quiero darte las gracias por estar a mi lado en las buenas y malas, nunca olvidaré todas las aventuras que hemos pasado juntos y puedo asegurarte algo, siempre podrás contar conmigo y de mi tiempo cuando lo necesites, gracias mejor amigo.
- Fernando y Denis, doy gracias por haber encontrado tan buenos amigos y que esta amistad perdure por siempre, gracias por todos esos buenos momentos que hemos compartido, les deseo el mayor de los éxitos en sus vidas, sin duda las mejores amistades que pude encontrar.
- Ana Karen, gracias por hacer que cada día sea una mejor persona, porque me haces sentir la persona más afortunada del mundo, gracias por regalarme momentos tan maravillosos desde que te conocí, soy tan afortunado de que la vida te haya puesto en mi camino, por eso y mucho más te amo. "Cuando el amor no tiene cura, no queda más que seguir amando, aunque en ello se nos vaya la vida".
- Antonio de Jesús Cenobio, amigo gracias por tu apoyo, consejos y los momentos tan agradables que hemos pasado juntos, por todos esos segundos de diversión, gracias. Pero recuerda algo, siempre te ganaré en el PES.
- David, es poco el tiempo conociéndote, pero suficiente para demostrarme que eres una excelente persona, y que puedo contar contigo ojalá esta amistad siga creciendo por el resto de nuestras vidas, te quiero mucho amigo.
- Aurora Quintero, gracias por esa confianza que siempre sintió hacía a mí, por su apoyo, paciencia y compromiso que ha mostrado hacía mi persona, usted ha sido una de mis bases fundamentales para mejorar intelectual y personalmente, ya que gracias a sus consejos, enseñanza y sabiduría que ha compartido conmigo ahora sé cómo afrontar de la mejor manera los problemas y obstáculos que se pudiesen presentar en mi camino, la quiero mucho Dra Aurora.

ÍNDICE

RESUMEN	VI
1.1 Planteamiento del Problema	VIII
1.1 Justificación	IX
2 OBJETIVOS	X
2.1 Objetivo general	X
2.2 Objetivos específicos	X
2.3 Hipótesis	XI
3. MARCO TEORICO	1
3.1. Leche	1
3.2 Ganado vacuno para producción de leche	2
3.3 Composición química de la leche	3
3.3.1 Proteína de la leche	3
3.3.2 Carbohidratos de la leche	4
3.3.3 Grasa en leche	5
3.4 Productos lácteos	5
3.5 Queso	5
3.5.1 Clasificación de quesos	6
3.6 Proceso de elaboración de queso fresco	6
3.7 Queso Panela	9
3.8 Textura en queso (APT)	10
3.9 Antecedentes del cuajo	11
3.10 Cuajo animal	12
3.11 Sustitutos del cuajo	13
3.11.1 Coagulantes de origen microbiano	13
3.11.2 Coagulantes de origen vegetal	14
3.12 Ortiga (<i>Cnidocolus aconitifolius</i>) como coagulante de origen vegetal	15
3.13 Extracción de los componentes coagulantes vegetales	16
3.14 Técnicas de purificación de proteínas	16
3.14.1 Purificación por precipitación	17
3.14.2 Precipitación por salado “salting-out”	17
3.14.3 Purificación de Proteínas por ultrafiltración	18

3.15 Electroforesis en gel de poliacrilamida	18
3.16 Importancia de la microbiología en la elaboración de quesos	19
3.17 Tipos de grupos bacterianos en el queso.....	19
3.17.1. Bacterias ácido lácticas	19
3.17.2 Coliformes	20
3.17.3 Hongos y levaduras.	20
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
4.1 Obtención de la muestra vegetal	21
4.2 Obtención del extracto.....	21
4.3 Determinación de proteína en los extractos.....	23
4.4 Liofilización de los extractos vegetales	23
4.5 Tiempo de coagulación de leche bovina	23
4.6 Elaboración de los quesos tipo panela con extracto vegetal.....	24
4.7 Análisis físico-químicos de la planta de ortiga	25
4.7.1 Humedad.....	25
4.7.2 Cenizas.....	26
4.7.3 Proteína	26
4.7.4 Grasa	27
4.7.5 Fibra.....	29
4.8 Análisis físico-químicos de la leche y los quesos tipo panela elaborados con el extracto vegetal de tallo y hoja	29
4.8.1 Humedad.....	30
4.8.2 Cenizas.....	30
4.8.3 Grasa	31
4.8.4 Proteína	32
4.8.5 Cloruros	32
4.8.6 Color	33
4.8.7 pH	34
4.8.8 Acidez	34
4.9 Análisis de Perfil de Textura (APT)	35
4.10 Actividad proteolítica	35
4.12 Electroforesis en gel de poliacrilamida SDS-PAGE	36
4.13 Zimografía electroforética.....	37

4.15 Análisis microbiológicos en los quesos.	37
5. RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	38
5.1 Rendimiento de los extractos coagulantes de tallo y hoja.	38
5.2 Tiempo de coagulación del extracto de tallo y hoja	39
5.3 Rendimiento de los quesos elaborados con extracto de tallo y hoja	40
5.4 Características físico-químicas de la ortiga	41
5.5 Características físico-químicas leche bovina.....	42
5.6 Características físico-químicas de los quesos elaborados tipo panela con el extracto coagulante de la ortiga.....	43
5.7 Análisis de perfil de textura.....	52
5.8 Análisis de color.....	56
5.9 Análisis microbiológicos en los quesos tipo panela	59
5.10 Actividad Proteolítica	65
5.11 Electroforesis SDS PAGE y Zimograma	67
6 Conclusiones.....	72
6. Referencias.....	74

IIINDICE DE FIGURAS

Figura 1. Producción mundial de leche en comparación con otras especies lecheras.	1
Figura 2. Producción nacional de leche en México.	2
Figura 3. Diagrama para la elaboración de queso fresco (FAO, 2018).....	10
Figura 4. Desestabilización de las caseínas por la adición de cuajo.	12
Figura 5. Extractos vegetales.....	22
Figura 6 Rendimiento de queso en los distintos tratamientos elaborados con extracto de tallo y hoja a diferentes concentraciones.	41
Figura 7. Actividad proteolítica de los extractos de tallo y hoja de la ortiga (<i>Euphorabiace Cnidoscolus aconitifolius</i>).	66
Figura 8. Estabilidad de los ET y EH (<i>Euphorabiace Cnidoscolus aconitifolius</i>).....	67
Figura 9. Electroforesis en gel de poliacrilamida SDS PAGE para las muestras de extracto de tallo y hoja de la ortiga. EH: extracto de hoja; ET: extracto de Tallo.....	68
Figura 10. Estimación de pesos molecular de las proteínas presentes en el extracto de tallo y hoja de la ortiga por medio de electroforesis en gel de poliacrilamida SDS PAGE. EH: extracto de Hoja; ET: extracto de Tallo.	69
Figura 11. Zimograma y electroforesis en gel de poliacrilamida SDS PAGE EH: Extracto de Hoja; ET: extracto de Tallo.....	71

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Fracciones proteicas en la leche.	4
Cuadro 2. Formulación para la obtención de los extractos vegetales.....	22
Cuadro 3. Formulaciones de quesos tipo panela	24
Cuadro 4. Volúmenes obtenidos de extracto de hoja y tallo de la ortiga (<i>Euphorabiace Cnidoscolus aconitifolius</i>).	38
Cuadro 5 Tiempo de coagulación de los extractos de hoja expresados en minutos.....	40
Cuadro 6 Características físico-químicas del tallo y hoja de la planta de ortiga	42
Cuadro 7. Características físico-químicas de la leche bovina.	43
Cuadro 8. Porcentaje de proteína, grasa y humedad en los quesos frescos tipo panela coagulados con los extractos vegetales del tallo y hoja de la ortiga (<i>Euphorabiace Cnidoscolus aconitifolius</i>)	44
Cuadro 9. pH, Acidez y Aw en los quesos frescos tipo panela coagulados con los extractos vegetales del tallo y hoja de la ortiga (<i>Euphorabiace Cnidoscolus aconitifolius</i>).....	49
Cuadro 10. Cenizas y Cloruros en los quesos frescos tipo panela coagulados con los extractos vegetales del tallo y hoja de la ortiga (<i>Euphorabiace Cnidoscolus aconitifolius</i>)	51
Cuadro 11. Parámetros de dureza y adhesividad en los quesos tipo panela elaborados con extracto de ortiga a diferentes tiempos de maduración	53
Cuadro 12. Parámetros de Cohesividad y Gomosidad en los quesos tipo panela elaborados con extracto de ortiga a diferentes tiempos de maduración	54
Cuadro 13. Masticabilidad en los quesos tipo panela elaborados con extracto de ortiga en los diferentes tiempos de maduración.....	55
Cuadro 14. Análisis de color de los distintos tratamientos de queso tipo panela elaborado con los extractos vegetales de tallo y hoja de la ortiga.....	58
Cuadro 15. Análisis en agar MacConkey, Papa Dextrosa y cultivo estándar en los quesos tipo panela elaborados con extracto de tallo y hoja a distintas concentraciones a los 0, 7 y 14 días.....	61
Cuadro 16 Análisis en el medio de Cultivo Sal y Manitol y MRS en los quesos tipo panela elaborados con extracto de tallo y hoja a distintas concentraciones a los 0, 7 y 14 días..	64

RESUMEN

El queso es un producto que puede ser blando, semiduro, duro, madurado o no madurado obtenido mediante la coagulación total o parcial de la proteína de la leche, por acción del cuajo u otros coagulantes.

En el municipio de Tlanguistengo quesos frescos tipo panela son elaborados de manera artesanal con leche bovina, utilizando como agente coagulante el tallo y la hoja de la planta *Euphorbiacea Cnidoscolus aconitifolus*. Actualmente existe poca literatura científica que indique un estudio de la especie *Cnidoscolus aconitifolus* sobre su capacidad coagulante en la leche, ni las condiciones óptimas para realizar el proceso de elaboración de quesos frescos. Con base a lo anterior el presente trabajo de investigación fue llevado a cabo, donde fueron obtenidos distintos extractos del tallo y hoja de la ortiga a distintas concentraciones, donde fue evaluado el tiempo de coagulación en la leche, el rendimiento de cada extracto y la cantidad de queso obtenido.

De los diferentes extractos donde fue agregado 50 g de tallo u hoja en diferentes volúmenes de agua (10, 20 y 30 mL), el extracto obtenido con 20 mL tanto de tallo como de hoja presentó las mejores características para la elaboración de quesos tipo panela que a su vez fueron utilizados a diferentes concentraciones del extracto de tallo y hoja (0.75 y 1.00 %) y un control con cuajo animal, esto con la finalidad de comparar las características físico-químicas y microbiológicas de los tratamientos a distintos tiempos (0, 7 y 14 días) durante la maduración del queso. En los análisis físico-químico realizados el tratamiento elaborado con el extracto de tallo al 1% presentó mayor contenido de proteína (20.13%) entre los demás tratamientos, de igual forma el tratamiento con extracto de hoja al 1% obtuvo el mayor porcentaje de grasa (22.40%), mientras que el control contuvo el mayor porcentaje de humedad (64.73%). Por otra parte, en la medición de pH al final de la evaluación no mostraron diferencias significativas entre los tratamientos al igual que en el contenido de cloruros y cenizas. Para la prueba de medición de color en los tratamientos elaborados con extracto de hoja de acuerdo a los resultados mostraron una afinidad al color verde, además presentó menos luminosidad que el resto de los

tratamientos. En los análisis microbiológicos fueron mostrados resultados favorables ya que los tratamientos elaborados con los distintos extractos vegetales no superaron la concentración microbiana de acuerdo con la NOM en los distintos análisis microbiológicos respecto al control.

En el análisis de perfil de textura, los tratamientos elaborados con el extracto de tallo y hoja al 1 % resultaron los valores más elevados en el parámetro de dureza (20.22 y 14.72 N respectivamente) muy superior al control elaborado con cuajo animal 4.84 N.

En la caracterización de los extractos vegetales fue determinada la actividad proteolítica a un pH 6 siendo el óptimo para realizar la coagulación, debido a los resultados obtenidos en el extracto de tallo y hoja (23.47 U/g y 21.11 U/g) y para finalizar fue realizada una estimación de número de proteínas en el extracto de tallo obteniendo 6 enzimas de carácter proteolítico que oscilan en un peso molecular entre los 32kDa hasta los 65 KDa mientras que el extracto de hoja presentó dos enzimas proteolíticas entre los 31 KDa y 38 KDa.

1.1 Planteamiento del Problema

En la actualidad la industria quesera busca nuevas fuentes alternativas preparaciones enzimáticas, debido a que en esta área de la industria alimentaria para la obtención de los quesos busca requerir de enzimas coagulantes que actúan sobre la proteína de la leche. Actualmente los elevados precios de la fuente enzimática que por décadas fue utilizado ha sido un problema, debido a que generan el incremento en los costos de producción.

El cuajo (quimosina) comúnmente es una preparación obtenida de la cuarta porción (abomaso) del estómago del rumiante, pero debido a que estas enzimas solo son producidas en mayoría cuando el rumiante está en un periodo de vida joven y cuando crece, la producción de quimosina disminuye e incrementa la concentración de pepsina, enzima que genera cierto amargor a la hora de la producción del queso lo cual ha generado el desinterés de la industria láctea del uso de este tipo de coagulante mostrando el interés de la investigación continua para descubrir nuevas fuentes alternas de coagulantes que puedan sustituir al cuajo animal, como lo son los cuajos microbianos obtenidos de bacterias (*E. coli*) genéticamente modificadas (Egito et al., 2007), o los coagulantes obtenido de fuentes frutales y vegetales.

En México al igual que en otros países ha generado el interés sobre la investigación de coagulantes de origen vegetal para crear una alternativa sobre los de tipo enzimáticos (microbianos) o animales, que son utilizados comúnmente en la industria láctea y así potencializar el uso de cuajos vegetales para la fabricación de todo tipo de queso.

1.1 Justificación

En la actualidad existen diversos tipos de coagulantes, que pueden obtenerse de distintas fuentes las cuales son clasificadas en animal, microorganismos y vegetal. De este último en México existe poca investigación y es casi nulo el uso en la industria láctea debido al poco conocimiento que es generado en México sobre los coagulantes de origen vegetal, no obstante en países como España, Grecia y Portugal, desde años atrás hasta la fecha poco a poco ha incrementado el interés sobre el estudio de este tipo de coagulantes, los cuales pueden extraerse de las distintas partes de las plantas, específicamente como el fruto, semillas, raíz, savia, tallo pero muy a menudo en hojas y flores. Debido a las razones anteriores en el estado de Hidalgo en el municipio de Tianguistengo y sus alrededores, la ortiga (*Euphorbiace Cnidocolus aconitifolius*) es utilizada para la elaboración de quesos artesanales, donde los pobladores utilizan los tallos de la ortiga como un agente coagulante, obteniendo la coagulación de la leche en un menor tiempo en comparación con el cuajo animal, enzimático o microbiano. Debido a lo anterior surge el interés sobre la investigación de la ortiga con el fin de extraer y caracterizar el componente coagulante presente en la planta, donde se busca aprovechar su propiedad de coagular la leche, y generar el interés para una posible utilización de esta planta para la extracción del componente coagulante generando una alternativa para la producción de quesos en la industria.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Obtener y caracterizar el componente tecno-funcional coagulante de la ortiga (*Cnidoscolus aconitifolius*) por medio de una extracción acuosa para la elaboración de quesos frescos tipo panela.

2.2 Objetivos específicos

- Determinar los análisis físico-químicos de tallo y hoja de la ortiga (*Cnidoscolus aconitifolius*).
- Obtener el componente coagulante presente en tallo y hoja de la planta de ortiga por medio de una extracción acuosa. Establecer un método de extracción adecuado para captar mejor el componente coagulante presente en la planta de ortiga.
- Evaluar el tiempo y temperatura de coagulación de los extractos de tallo y hoja en distintas concentraciones.
- Evaluar la textura de los quesos elaborados con diferentes concentraciones de los extractos de la ortiga.
- Realizar estudios físico-químicos y microbiológicos en los quesos elaborados con los extractos de tallo y hoja.
- Caracterizar por el método de electroforesis SDS-PAGE y Zimografía el componente tecno-funcional extraído del tallo y hoja de la ortiga.

2.3 Hipótesis

La extracción del componente tecno-funcional de la ortiga tiene la capacidad de coagular la leche el cual pueda utilizarse como un sustituto del cuajo animal convencional para la elaboración de quesos frescos.

3. MARCO TEORICO

3.1. Leche

La leche es definida como el producto integro, no alterado, sustancia blanquecina y opaca, sabor dulce y pH cercano a la neutralidad secretada por las glándulas mamarias de cualquier mamífero hembra extraída tras el nacimiento de la cría. Esta sustancia blanquecina proporciona nutrientes esenciales y es una fuente importante de energía alimentaria, proteína de alta calidad biológica y grasa. La leche contribuye considerablemente a la ingestión necesaria de nutrientes como el calcio, magnesio, selenio, riboflavina, vitamina B₁₂ y ácido pantoténico (FAO, 2018). La leche bovina en el 2013 (Figura 1) fue considerada como el tipo de leche que comúnmente es producida a nivel mundial, donde la leche de vaca representa el 85% de la producción mundial en todo el mundo, la segunda mayor producción de leche es la proveniente de búfala (11%), seguida por la cabra (2.3%), ovejas (1.4%) y de camella (0.2%) (Gerosa & Skoet, 2012). Siendo la leche bovina la mayor producción mundial (Claeys et al., 2014).

Por otra parte, en México la producción de leche bovina nacional va en incremento conforme el paso del tiempo, mostrando en figura 2 la producción de 11 mil 607 millones de litros de leche para el año 2016 (SIAP 2016),



Figura 1. Producción mundial de leche en comparación con otras especies lecheras.



Figura 2. Producción nacional de leche en México.

3.2 Ganado vacuno para producción de leche

La producción lechera para la industria láctea es enfocada en el ganado vacuno, ya que presenta una gran cantidad de ventajas a las demás especies de ganado, debido a que existe una mayor facilidad para el ordeño, el tamaño de ubre y la gran producción de leche que puede generar las diferentes razas (Holstein, Jersey, Guernsey y Brown Swiss), la cual cuenta con características que influyen positivamente en el rendimiento lechero (FAO, 2018). En la actualidad debido al avanzado progreso genético, las vacas lecheras pueden incluso llegar a producir cantidades de leche inimaginables para el ser humano. En la raza Holstein, por ejemplo, han reportado producciones de hasta más de 15,000 kg de leche por lactancia o 50 kg de leche/vaca/día en promedio, con producciones al pico de lactancia de 80 L/día. Desafortunadamente, la producción de leche de esta raza de vaca es afectada debido a su capacidad de consumo de alimento, la cual limita para cubrir el nivel producción de leche, por lo que el animal debe recurrir a sus reservas corporales para alcanzar la producción de leche ya mencionada (Meléndez & Bartolomé, 2017).

3.3 Composición química de la leche

La leche es una mezcla compleja la cual contiene proteína, carbohidratos, grasa y minerales. Químicamente, es uno de los fluidos más completos que existen. El término “sólidos totales” es usado ampliamente para indicar todos los componentes con exclusión del agua y el de “sólidos no grasos” cuando se excluye el agua y la grasa. El agua representa aproximadamente el 82% de la leche, los sólidos totales alcanzan habitualmente la cifra de un 13% y los sólidos no grasos casi siempre están muy próximos al 9% (Mills et al., 2011).

3.3.1 Proteína de la leche

La proteína presente en la leche cuenta con un 3.5 % (Oscilando entre 2.9% - 3.9%) esta “proteína láctea” es una mezcla de numerosas fracciones proteicas diferentes (Cuadro 1) y de distintos pesos moleculares (Agudelo et al., 2005). Las caseínas son fosfoglucoproteínas, es decir son moléculas que contienen tanto residuos de carbohidratos como de fosfatos, prácticamente todas las moléculas de caseína están asociadas entre si integrando las miscelas, pero existen una cantidad que se encuentran en solución. Hay varias fracciones que componen la caseína (α , β y κ caseína) y otras fracciones en menor proporción como son la lactoalbúmina y la lactoglobulina (Brunner, 1981; Severin & Wenshui, 2005). El valor biológico de la caseína en la alimentación obedece a su contenido en aminoácidos esenciales que es separada de la parte acuosa de la leche por acción de la presencia de enzimas como la renina o la quimosina, siendo la proteína de la leche (caseína) la responsable de su alto valor nutricional (Wilbey & Robinson, 2002).

Cuadro 1. Fracciones proteicas en la leche.

Fracciones	Concentración en leche bovina (g/L)
Proteína total	36.00
Caseína	29.50
α1-caseína	11.90
α2-caseína	3.10
β-caseína	9.80
K- Caseína	3.50
γ-Caseína	1.20
Proteínas del suero	6.30
β-Lactoglobulina	3.20
α-Lactalbúmina sérica	1.20
Seroalbúmina	0.40
Inmunoglobulinas	0.80
Proteosa peptona	1.00

(Severin & Wenshui, 2005)

3.3.2 Carbohidratos de la leche

En la leche el principal carbohidrato presente es la lactosa, siendo las moléculas de glucosa (14 mg/100 g) y galactosa (12 mg/ 100 g) las que constituyen al disacárido. Debido a la presencia mayoritaria en concentración de este hidrato de carbono genera la percepción de dulzor en la leche. La presencia de la lactosa a diferencia de otros componentes como la grasa, humedad y proteína, el contenido de lactosa en la leche muestra un comportamiento relativamente constante y muestra un promedio que oscila en un 4% (3.4%-4.2%). Por lo que la concentración de lactosa en diferentes tipos de leche y distintas razas lecheras mantiene en un rango muy similar. (Agudelo et al., 2005).

3.3.3 Grasa en leche

La grasa láctea es sintetizada en gran porcentaje en las células secretoras de las glándulas mamarias, donde estará en partículas emulsionadas o suspendidas en pequeños glóbulos de grasa microscópicos cuyo tamaño será de 0.1 a 0.22 μm (Mills *et al.*, 2011). El contenido de grasa en la leche dependerá del tipo de raza del bovino de la cual provenga, oscilando entre un 3.4% a 5.1%, en donde podemos encontrar diacilglicéridos, monoacilglicéridos, fosfolípidos, ácidos grasos libres, esteroides y ésteres. La grasa presente en la leche denominada igual como grasa butírica, cuenta con la peculiaridad de presentar un contenido elevado de ácidos grasos de cadena corta, en especial ácido butírico que prácticamente es encontrado en este alimento (Jensen, 1991; Mills *et al.*, 2011).

3.4 Productos lácteos

Por definición, los productos lácteos son denominados así debido a que están elaborados con leche que pueden proceder de diferentes animales como cabras, ovejas, camella, búfalas o vacas. Estos productos son caracterizados por tener un contenido elevado de proteína, siendo la caseína la proteína característica de la leche, así como la presencia de carbohidratos como la lactosa y la grasa butírica. La gama de los productos lácteos es muy variada como lo son leches fermentadas, mantequillas, cremas, quesos, etc. Siendo este último el de mayor producción a nivel mundial (CODEX, 1999).

3.5 Queso

El queso es definido como el producto blando, semiduro, duro, madurado o no madurado y que puede estar recubierto por ceras, en el que la proporción entre las proteínas del suero y la caseína no sea superior al de la leche, obtenida mediante la coagulación total o parcial de la proteína, por acción del cuajo u otros coagulantes y por escurrimiento parcial del suero que es liberado como consecuencia de dicha coagulación (CODEX, 1999). Mediante este proceso se logra preservar el valor nutritivo de la mayoría de los componentes de la leche, incluidas las grasas,

proteínas y otros constituyentes menores, generando un sabor especial y una consistencia sólida o semisólida en el producto obtenido (Ramírez-López & Vélez-Ruiz, 2012).

3.5.1 Clasificación de quesos

El queso es un producto que es elaborado en todo el mundo, donde existen una gran variedad de aromas, sabores, texturas, colores y formas, existiendo un aproximado de 2000 variedades y tipos. Existen criterios para clasificar los diferentes tipos de quesos, los cuales van desde las formas de como es el proceso de elaboración o las características físico-químicas y son:

- **Contenido de humedad:** Son clasificados de acuerdo al porcentaje de humedad presente en la matriz siendo quesos duros (20%-42%), quesos semiduros (44%-55%) y quesos blandos (>55%).
- **Tipo de coagulación:** La formación de la cuajada obtenido por una coagulación de la caseína por acción enzimática, ácida o ácida/térmica.
- **Maduración:** La clasificación de acuerdo a su maduración siendo frescos (6 días), semi-maduros (40 días) y madurados (>70 días).

En México, la demanda y la producción de quesos frescos o de corta duración representan gran porcentaje (85 %) de la mayoría de este alimento comercializados en el país (Ramírez-López & Vélez-Ruiz, 2012).

3.6 Proceso de elaboración de queso fresco

El proceso de elaboración del queso es relativamente simple, no obstante, involucra fenómenos físicos y químicos muy complejos. Los cuales tratan esencialmente de un proceso de concentración a partir de la coagulación de la proteína mayoritaria de la leche (caseína) por la acción enzimática (cuajo) u otros coagulantes donde las principales operaciones unitarias que son realizadas para obtener el producto final: Pasteurización, coagulación, corte, desuerado y salado, moldeado etc.

- **La pasteurización:** Es un proceso térmico que combina tiempo y temperatura para asegurar la eliminación de las bacterias patógenas que pueden estar presentes en la leche, esto con el objetivo de mejorar la capacidad de conservación del producto, mantener la inocuidad sin alterar las propiedades físicas, químicas y nutricionales del alimento. Generalmente consiste en mantener la leche a 65°C durante 30 min, este método es denominado LTLT (Baja temperatura por largo tiempo). Actualmente en la industria láctea el proceso de pasteurización más usado es el HTST (High Temperature Short Time) en el cual la leche es mantenida a 73°C durante 15 s utilizando un pasteurizador de placas para optimizar. Existen procesos térmicos más fuertes donde puede llegar a la esterilización del producto, este proceso es conocido como UHT (Ultra High Temperature) y funciona a 140°C por 2 s. La leche UHT debe envasarse en condiciones de esterilidad y no requiere refrigeración, donde tiene un periodo de vida de anaquel. Para la elaboración del queso las pasteurizaciones utilizadas comúnmente son la LTLT y HTST para proceder a la coagulación (Ramírez-López, 2012).
- **Coagulación:** Proceso donde implica la incorporación de un coagulante una vez que la temperatura de la leche alcanza los 38°C debe colocarse cuajo; agitar brevemente para distribuirlo bien. Para determinar el momento óptimo de cuajado debe realizarse un corte en la cuajada. Normalmente el tiempo de cuajado varia ente 15 y 35 minutos, dependiendo de factores como el tipo de coagulante utilizado y el volumen de la leche (Ramírez-López, 2012).
- **Corte de la cuajada:** La utilización de liras de acero inoxidable horizontales y verticales son utilizadas para la realización de esta operación. El corte mejora la consistencia de la cuajada. El corte debe realizarse primero en forma horizontal y luego en forma vertical para formar pequeños cubos de cuajada. A la cuajada que ha sido cortada se le llama grano. En esta fase hay producción de dos productos: el grano y el suero (Ramírez-López, 2012).

- **Desuerado y salado:** El suero debe retirarse casi en su totalidad. La cuajada debe recolectarse y colocarse en un extremo del recipiente que la contiene y posteriormente triturada ya sea manual o con un molino. En seguida debe agregarse la sal, cuidando que quede bien distribuida. La cantidad de sal varía según el proceso y el tipo de queso (Ramírez-López, 2012).
- **Moldeado:** Para el moldeado son utilizados canastos o moldes de plástico con forma de canasto u otra forma, una vez la cuajada está escurrida y libre casi en su totalidad de suero, los quesos reposan por un periodo de 2 - 3 h antes de envasarse en bolsa de plástico y guardar en refrigeración (Ramírez-López, 2012).

3.7 Queso Panela

El queso panela también llamado “tipo panela” o “estilo panela” pertenece a la categoría de quesos frescos (porque no se somete a ningún proceso de maduración y altos contenidos de humedad). Este queso se obtiene de la separación del suero de la leche coagulada por acción del cuajo (y/o enzimas específicas) lo que da lugar a una pasta blanda denominada cuajada que, una vez solidada se prensa y escurre para separar el suero lácteo. Por otra parte, el queso panela es uno de los quesos que más son consumidos en México y es considerado una de las opciones lácteas más recurrentes dentro de los regímenes alimentarios (PROFECO, 2007).

En la figura 3 muestra el proceso que se lleva para la elaboración del queso tipo panela, donde todo comienza con la recepción de la materia prima (Leche bovina) la cual es llevada a un proceso de pasteurización para eliminar los microorganismos patógenos que pudiese contener, posteriormente la leche es enfriada hasta los 10°C y nuevamente la temperatura se eleva hasta los 38 °C para incorporar el cuajo animal y/o enzima específica para llevar a cabo el proceso de elaboración del queso. (FAO, 2018).

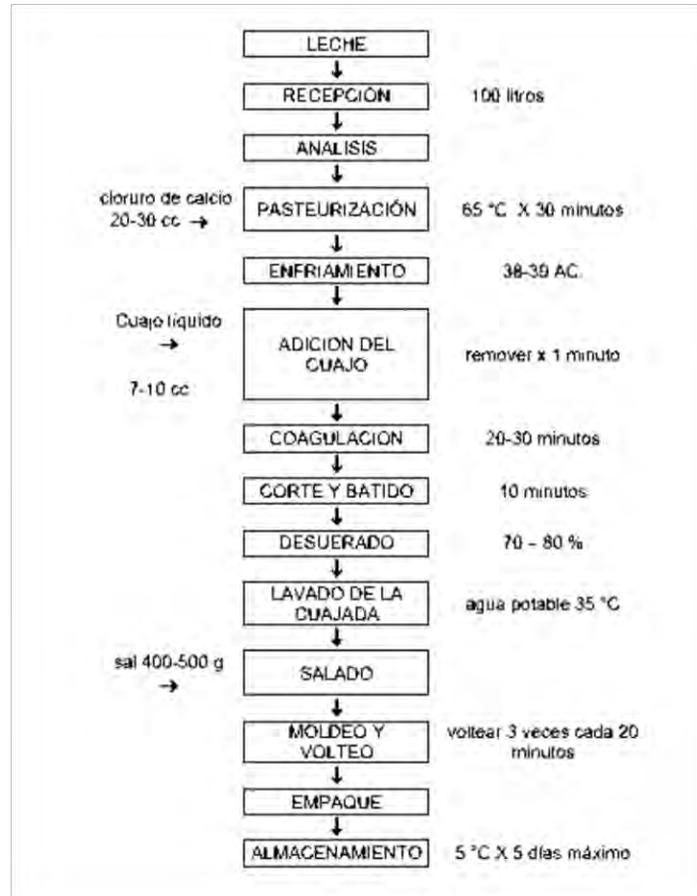


Figura 3. Diagrama para la elaboración de queso fresco (FAO, 2018)

3.8 Textura en queso (APT)

La industria láctea, así como la alimentaria en la actualidad toma como puntos clave el análisis de perfil de textura (APT) esto con el fin de evaluar parámetros que ayuden a medir atributos como la frescura, aceptación y calidad siendo características muy importantes para los consumidores (López-Orozco et al., 2016). El Análisis de Perfil de Textura es uno de los métodos instrumentales más ampliamente utilizados para la evaluación de textura en el queso, esto con el fin de cuantificar ciertos atributos en el producto terminado tal es el caso como la dureza, la gomosidad, cohesividad, masticabilidad entre otros; parámetros que están influenciados por la velocidad de deformación del alimento cuando es sometido al análisis instrumental y está demostrado que se correlacionan con las características

físico-químicas del producto. (Ramírez-López & Vélez-Ruiz, 2012). Las principales características de un queso son proporcionadas por los componentes que lo forman (grasa, humedad y proteína), las cuales proporcionarán las diferencias en los análisis de textura en quesos, como lo es el tiempo de maduración, variable principal debido a que los quesos sufren un fenómeno denominado sinéresis el cual modifica atributos del queso tal es el caso como la dureza, continuando con la adhesividad y la cohesividad (Jaros et al., 2001).

3.9 Antecedentes del cuajo

El cuajo es una mezcla enzimática (quimosina y pepsina) la cual propicia la coagulación de la leche, proceso fundamental en la fabricación del queso, donde las enzimas coagulantes han sido utilizadas durante siglos en la fabricación del queso (Puglisi et al., 2014). En la figura 4 muestra el proceso de cómo ocurre la hidrólisis específica del enlace peptídico Phe105-Met106 en la k-caseína la cual provoca la desestabilización de micelas de caseína y la posterior agregación, dando como resultado la transformación de la leche en cuajada. Tradicionalmente, los coagulantes enzimáticos se derivaban de fuentes animales, principalmente del cuarto compartimiento del estómago de los terneros, aunque los coagulantes producidos a partir de distintas especies de plantas también han sido usados desde hace mucho tiempo. En consecuencia, se ha desarrollado una gama de enzimas sustitutas coagulantes de la leche de otros animales, fuentes microbianas y plantas junto con coagulantes derivados biotecnológicamente. Sin embargo, en las condiciones de fabricación del queso, el rendimiento de cada coagulante variará ligeramente y afectará directamente a la calidad del queso (Puglisi et al., 2014).

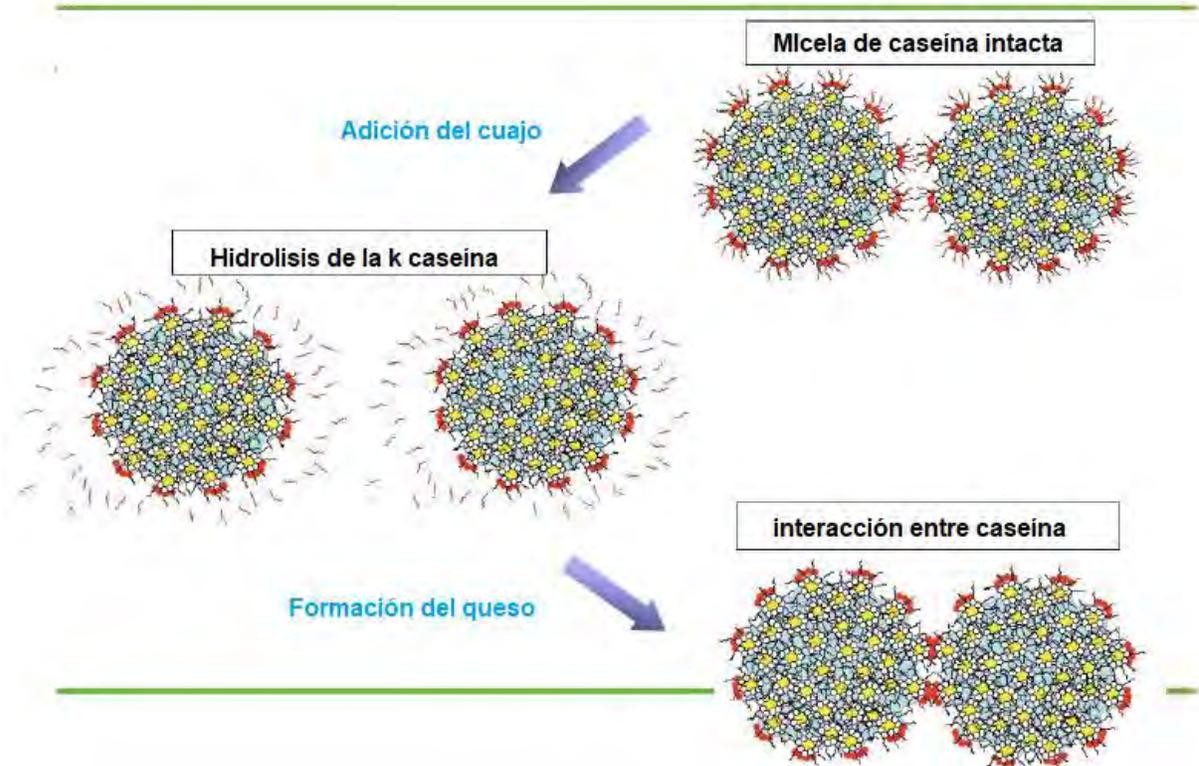


Figura 4. Desestabilización de las caseínas por la adición de cuajo.

3.10 Cuajo animal.

El coagulante de origen animal está constituido por quimosina (EC 3.4.23.4) la cual es una proteasa aspártica predominante que se secreta en el cuarto compartimiento del estómago de los rumiantes recién nacidos. Está estrechamente relacionado con la pepsina A (EC 3.4.23.1) que predomina en los mamíferos adultos. Ambas proteasas gástricas se secretan en forma de un precursor inactivo proquimosina, y se activan a la quimosina con la exposición al ácido por escisión auto catalítica de la prosequencia. la quimosina coagula eficazmente la leche y retiene la proteína láctea precipitada durante un período más prolongado en el estómago para que el precipitado quede suficientemente expuesto a las enzimas proteolíticas. Específicamente el enlace peptídico entre Phe 105-Met 106 en la cadena de la k-caseína para producir la coagulación de la leche que resulta la obtención del queso. También es responsable de los cambios de textura y la mejora del sabor durante la maduración (Justesen et al., 2009). El cuajo animal en algunos lugares puede estar

limitado por razones religiosas, como la certificación kosher y la aprobación vegetariana.

3.11 Sustitutos del cuajo.

En los últimos años se han realizado diferentes estudios sobre componentes capaces de coagular la leche, basado en el fundamento para generar alternativas para sustituir el cuajo animal, debido a temas religiosos e ideológicos que actualmente se presentan, así como la optimización de los procesos de coagulación. Existen muchas proteasas las cuales cuentan con la propiedad de coagular la leche bajo condiciones adecuadas (pH y Temperatura), pero muchas de estas son demasiado proteolíticas en relación a su actividad coagulante, lo cual resulta en una hidrólisis del coágulo demasiado rápida, causando una reducción en la producción y/o quesos defectuosos debido al amargor generado por los péptidos hidrofóbicos liberados en la maduración (Mazzorra et al., 2013). Desde tiempos remotos también se han utilizado proteasas de plantas, proteasas gástricas de cabritos y ovejas las cuales han sido usadas tradicionalmente como sustituto del cuajo (Ruiz, 2005).

3.11.1 Coagulantes de origen microbiano

Debido a la escasez, altos precios, problemas asociados con la matanza de animales y a la capacidad de producción para satisfacer la industria quesera, ha sido necesaria la búsqueda de otras alternativas para la sustitución de la renina de ternero. Sin embargo, las enzimas obtenidas a partir de fuentes fúngicas o microbianas presentan una mayor actividad proteolítica durante la fabricación de queso, lo que puede conducir a una pérdida de productos de degradación de proteínas en el suero y, por lo tanto, afectar negativamente el rendimiento de queso (Jacob, Jaros, & Rohm, 2010) (Morillo et al., 2015). Muchas proteasas extracelulares de origen microbiano actúan de manera similar a la quimosina y, en parte, son adecuadas para la producción de queso. Tales coagulantes pueden ser fácilmente producidos por fermentación. Como las enzimas no se derivan del tejido

de los rumiantes, no existen limitaciones en lo que respecta a la encefalopatía espongiforme bovina. Los quesos elaborados con enzimas de origen microbiano son aceptados por lacto-vegetarianos. El sustituto al coagulante animal está orientado a la búsqueda de proteasas de origen microbiano donde específicamente son obtenidos de fuentes bacterianas o fúngicas como pueden ser la especie (Merheb-Dini et al., 2010), *Bacillus subtilis natto* (Shieh et al., 2009) y la utilización de las enzimas producidas por *Mucor circinelloides* entre otras decenas más (Sathya et al., 2009).

3.11.2 Coagulantes de origen vegetal

Los coagulantes vegetales se pueden encontrar en plantas o frutas y muchas veces son obtenidos en forma de extractos. Los extractos vegetales se han utilizado como coagulantes en la fabricación de queso desde la antigüedad, aunque se sabe poco acerca de su acción. Los quesos elaborados con coagulante vegetal se pueden encontrar principalmente en países mediterráneos, del oeste de África y sur de Europa (Roseiro et al., 2003). Las enzimas vegetales que conforman los coagulantes de este origen son extraídas por maceración acuosa de órganos de plantas superiores, en la actualidad se ha incrementado el interés sobre la investigación de este tipo de enzimas y así limitar el uso de cuajo animal debido a razones religiosas (por ejemplo, judaísmo e islam), dieta (vegetarianismo) o estar en contra de alimentos genéticamente modificados (por ejemplo, Alemania y los Países Bajos prohíben el uso de cuajo recombinante de ternera) para generar una alternativa sobre los coagulantes animales y microbianos, mostrándose como posibles coagulantes alternos en la fabricación de queso, como han sido los obtenidos a partir del higo, papaya, piña, naranja, jengibre, kiwi entre otros (Roseiro Luisa et al., 2003; Jacob et al., 2010; Puglisi et al., 2014). En la actualidad las restricciones del consumidor sobre el uso de los cuajos han despertado un interés creciente en los coagulantes vegetales. Más recientemente, la incidencia de la encefalopatía espongiforme bovina (EEB) ha reducido tanto la oferta como la demanda de cuajo bovino. La primera investigación reportada sobre los coagulantes

vegetales data en el año de 1935, posteriormente en 1961 y hasta la fecha, se ha incrementado el interés sobre la investigación de este tipo de coagulantes debido a que muchos de ellos presentan características, como lo es generar la coagulación en menor tiempo y otorgarle ciertos sabores al queso. En la actualidad muchos de estos coagulantes se utilizan a nivel escala de producción artesanal tal es el caso de la enzima presente en el coagulante vegetal obtenido del cardo (*Cynara cardunculus*) (Roseiro et al., 2003).

3.12 Ortiga (*Cnidocolus aconitifolius*) como coagulante de origen vegetal

La ortiga (*Cnidocolus aconitifolius*) también conocida como “Chaaya” es un arbusto vigoroso originario del Sur de México y Guatemala, pertenece a la familia de las Euphorbiaceas la cual llega a alcanzar una altura de 3 a 5 metros de altura, también es conocida como “espinaca maya” debido a las propiedades nutritivas y medicinales, conocidas desde tiempos precolombinos, donde se consideraba como una fuente de alimento importante para los humanos. Su estructura de la ortiga cuenta con un follaje abundante donde presenta una gran cantidad de ramas largas y gruesas. Las hojas pueden ser lobuladas con peciolo carnosos entre 10 y 20 cm de largo. En épocas de primavera brotan unas pequeñas flores blancas (Porres, 2014). Existen diferentes tipos de ortiga, las cuales pueden ser clasificadas de acuerdo a la forma que presenta su hoja y puede ser ortiga estrella, mansa, plegada y picuda. Los cuatro cultivares se clasifican botánicamente como *Aconitifolius sp aconitifolilius* y tienen una similitud entre el 25 y 30% entre sí. Se cree que evolucionaron a partir de la especie silvestre *Cnidocolus sp (C. multilobus spp multilobus)* siendo la ortiga tipo estrella la más similar a esta (Porres, 2014)

En México, es utilizada para la alimentación humana y animal, así como medicamento para tratar ciertas enfermedades como la artritis (Porres, 2014). En los municipios de la parte sur-este del estado de Hidalgo, es utilizada la ortiga como coagulante de origen vegetal para la fabricación de quesos frescos artesanales típicos de esta región, donde actualmente existe escasa información científica del

compuesto que genera dicho cambio físico-químico en la leche para dar la formación de la cuajada (Quintero-Lira et al., 2014).

3.13 Extracción de los componentes coagulantes vegetales

La extracción de los componentes coagulantes en vegetales y frutas capaces de coagular la leche, son obtenidos con base a una extracción ya sea con solventes orgánicos o inorgánicos, la cual se define como la transferencia de un componente en una fase a otra. La extracción sólido-líquido es la técnica más utilizada para la obtención de estos componentes de interés. La eficiencia de la extracción dependerá de la solubilidad del componente de interés y la forma en que se ejecute la extracción (discontinua o continua) (Mafart & Béliard, 1994; Hulbert et al., 1998;).

3.14 Técnicas de purificación de proteínas

En la actualidad existen distintos métodos para separar componentes específicos (proteínas) en los extractos crudos obtenidos de distintas fuentes como bacterianas o vegetales son una mezcla heterogénea los cuales cuentan con distintos componentes como pueden ser azúcares, sales y proteínas. Actualmente, la precipitación es usualmente utilizada como un paso de separación durante las primeras etapas de un proceso de purificación de proteínas, y normalmente es seguida por otro tipo de separaciones como la cromatografía. La precipitación puede ser utilizada como un método de concentración de proteínas siendo un paso previo a un proceso de purificación. De acuerdo a lo anterior los procesos de precipitación cuentan con una gran ventaja debido a que pueden ser aplicados fácilmente y son reproducibles sin tener grandes diferencias a la hora de realizarse, la precipitación de proteínas es obtenida por la adición de sales, inducida por el cambio de pH o potencial iónico, o por adición de solventes los cuales pueden ser orgánicos, inertes o polímeros. Estos precipitados son recuperados por el uso de la filtración o centrifugación proceso muy práctico y eficiente para la obtención de cualquier precipitado, otro método comúnmente utilizado es el uso de lavado o por re-suspensión de un buffer adecuado dependiendo de las condiciones de la muestra (Rojas-Muñoz, 2009).

3.14.1 Purificación por precipitación

De los métodos existentes y de los menos complejos y/o relativamente fáciles, se lleva a cabo el ajuste de pH para la precipitación de proteínas, donde la solución es llevada a un pH cercano o igual al punto isoeléctrico de la proteína de intereses, este proceso se conoce o es llamado también como precipitación isoeléctrica. Esto debido a que las superficies de las proteínas están cubiertas por grupos cargados positiva y negativamente, de manera que, cuando están cargadas negativamente se dicen que está por encima del punto isoeléctrico y por contraparte cuando se encuentra cargada positivamente se dice que se encuentra por debajo del punto isoeléctrico (Harrison et al., 2003).

3.14.2 Precipitación por salado “*salting-out*”

La precipitación de proteínas por la adición de sales neutras tiene como característica principal en no desnaturalizar las proteínas y la actividad enzimática es recuperada mediante la resuspensión del pellet, por otra parte, las sales pueden estabilizar las proteínas contra la desnaturalización.

La característica principal de la precipitación por *Salting-out* sea diferente a la causada por el ajuste de pH, depende de la naturaleza hidrofóbica de la superficie de la proteína deseada. Los grupos hidrofóbicos predominan en el interior de ésta, pero algunos se localizan en diferentes regiones de la superficie; el agua es puesta en contacto con la superficie, haciendo que estas regiones no queden expuestas; cuando la sal es agregada, el agua solvata los iones, mientras la concentración incrementa, el agua es removida de los alrededores de la proteína eventualmente exponiendo las regiones hidrofóbicas. Dichas regiones pueden interactuar mutuamente o con las de otras moléculas, resultando en una aglomeración (Rojas-Muñoz, 2009).

3.14.3 Purificación de Proteínas por ultrafiltración

La ultrafiltración es una técnica donde el agua y pequeñas moléculas son pasadas a través de una membrana semi-permeable mediante una fuerza transmembranal tal como la centrifugación o las altas presiones. Las superficies de estas membranas cuentan con poros de diámetro para separar los distintos tamaños y formas de las moléculas disueltas, aquellas que son superiores a los tamaños de poros son retenidas, mientras las inferiores a este pasan a través del pro junto con el flujo del solvente permeado. Por otra parte, la relación del producto retenido o permeado no solo está en función del tamaño físico sino de igual manera a la forma y características eléctricas de la molécula, presentándose de manera lineales como polisacáridos que tenderán a ser permeados por el mismo tipo de membrana que retendrá moléculas del mismo peso molecular. De manera simple por eso es conveniente tener en cuenta el tamaño de poro de la membrana para poder tener una adecuada superación, como característica los diámetros de las membranas de filtración oscilan entre un diámetro de 1 y 20 nm. Las técnicas de separación por membrana por lo regular están dirigidas a la parcial purificación de biomoléculas de gran solubilidad en el agua siendo amigable con las moléculas a separar debido a que no involucra agentes químicos evitando la desnaturalización de las proteínas, Las aplicaciones más comunes de la ultra filtración es la concentración de enzimas, antibiotiicos, anticuerpos entre otros (Rojas-Muñoz, 2009)

3.15 Electroforesis en gel de poliacrilamida

La electroforesis es un método analítico semipreparativo, el cual tiene como fundamento separar biomoléculas en dependencia entre otros factores de su carga por la acción de un campo eléctrico es decir la migración de solutos iónicos con la influencia con una carga electrica; estas partículas migran hacía el cátodo o ánodo (electrodos – y +), en dependencia de su carga, peso molecular y estructura tridimensional donde se destaca que a escala analítica tienen la versatilidad para separar ácidos nucleicos, proteínas y otras biomoléculas donde aportan un potente

criterio de pureza. Por otra parte, mediante esta técnica se pueden conocer las características ácido-básicas de las proteínas presentes en un extracto crudo, lo que da información necesaria si se pretende realizar una separación cromatografía basada en diferencia de cargas. Este método es utilizado en la mayoría de los casos para iniciar la caracterización de una molécula del tipo proteína, es decir ayuda a determinar otros parámetros como lo es el peso molecular, punto isoeléctrico y número de cadenas polipeptídicas de las proteínas (Pérez, 2000).

3.16 Importancia de la microbiología en la elaboración de quesos

La inocuidad en los productos lácteos es importante y más cuando se trata de un alimento tan completo nutricionalmente como lo es el queso del tipo panela debido a que el control del crecimiento de los microorganismos en esta matriz depende de distintos parámetros como la humedad, a_w , pH, temperatura entre otros. El queso tipo panela cuenta con las condiciones adecuadas para el crecimiento de la mayoría de bacterias patógenas. Por otra parte, el crecimiento microbiano influye otros factores denominados biológicos como la disponibilidad de nutrientes para el metabolismo microbiano y la interacción entre los microorganismos presentes en el queso. Los microorganismos implicados en la elaboración de un queso tipo panela normalmente son mesófilos y termófilos, bacterias cuya temperatura óptima de crecimiento es de 30 y 42°C respectivamente (Palacios, 2006).

3.17 Tipos de grupos bacterianos en el queso

3.17.1. Bacterias ácido lácticas

Las bacterias ácido lácticas (BAL) tienen la función primaria de producir ácido láctico compuesto que ayuda a inhibir el crecimiento de bacterias patógenas debido a la disminución del pH pero un crecimiento excesivo de este grupo bacteriano podría generar compuestos sápidos y aromáticos que modifican las características organolépticas de un queso (Palacios, 2006).

3.17.2 Coliformes

Las bacterias coliformes son células del tipo Gram negativo, con forma de bacilo, que contaminan la leche debido a la exposición de la ubre a zonas fecales o malas prácticas de ordeña, estas bacterias son sensibles al calor y no sobreviven a la pasteurización por lo que se utilizan como indicadores de contaminación. Este grupo de bacterias son capaces de fermentar la lactosa produciendo ciertos fenómenos físicos en los quesos como puede ser hinchazón en el empaque debido a la producción de CO₂ además de producir ciertos aromas atípicos en el producto terminado.

3.17.3 Hongos y levaduras.

La contaminación por hongos y levaduras en quesos es muy común debido a las condiciones en que se almacena. Muchas veces son almacenados en obscuridad y gran porcentaje de humedad condiciones adecuadas para el crecimiento de los hongos, estas condiciones pueden presentarse en cámaras frigoríficas o refrigeradores comunes trayendo como consecuencia la presencia de manchas de diversos colores y olores desagradables para los quesos tipo frescos que son raros en ellos.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Obtención de la muestra vegetal

La ortiga (*Euphorbiaceae Cnidoscolus aconitifolius*) fue obtenida durante la estación primaveral (Marzo-Junio) en el municipio de Tianguistengo, ubicado geográficamente entre los paralelos 20° 43 de latitud norte y 98° 37 de longitud oeste, perteneciente al estado de Hidalgo. Se utilizó para esta investigación el tallo y hoja de la planta, siendo las partes de importancia para este trabajo de investigación. Las plantas contaban con 3 años aproximadamente de longevidad cuando fueron recolectadas, presentaban 5 cm de diámetro y 20 cm de largo para tallo y hoja respectivamente. Las muestras recolectadas fueron almacenadas en bolsas de plástico para ser trasladadas y analizadas en los laboratorios de Nutrición Animal y Análisis Especiales del Instituto de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo (UAEH).

4.2 Obtención del extracto

El extracto se obtuvo siguiendo la metodología propuesta por Ahmed et al., (2009) con modificaciones, donde se agregaron 50 g de tallo ó 50 g hoja de ortiga en trozos para ser sometidos a un lavado con agua destilada por 30 minutos con el objetivo de eliminar todo tipo de impurezas. Posteriormente se decantó el agua y las muestras fueron colocadas en contenedores, donde se le agregó distintos volúmenes de agua destilada (10, 20 y 30 mL) para obtener los extractos (Cuadro 2). La suspensión se llevó a un proceso de molienda con ayuda de una licuadora industrial (Blender, USA), las muestras previamente molidas fueron filtradas con ayuda de un paño de lino español y los distintos extractos vegetales obtenidos fueron almacenados en recipientes de plástico asépticos como se muestra en la figura 4 y se mantuvieron en refrigeración a una temperatura de 4°C hasta su utilización.



Figura 5. Extractos vegetales

Partes de la planta	Muestra (g)	Agua (mL)
Hoja	50	10
	50	20
	50	30
Tallo	50	10
	50	20
	50	30

Cuadro 2. Formulación para la obtención de los extractos vegetales

4.3 Determinación de proteína en los extractos

La determinación de la concentración de proteína en los extractos tanto de tallo y hoja de ortiga fue determinada mediante la técnica cuantitativa de medición espectrofotométrica basado en la formación de un complejo entre el azul brillante G y la solución proteica. La cuantificación del contenido de proteína se estimó de acuerdo al método de Bradford (1976) con modificaciones. Se agregó 1 mL de reactivo de Bradford a 200 μ L de los extractos, por otra parte, se hizo una curva estándar de solución BSA (Albúmina Sérica Bovina) posteriormente se realizó la lectura a las diferentes diluciones y se dejaron reposar durante 5 minutos, se leyó la absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro marca JENWAY 6715 UV/Vis.

4.4 Liofilización de los extractos vegetales

Los extractos de tallo y hoja obtenidos se sometieron al proceso de liofilizado. Los extractos se colocaron en frascos de cristal, los cuales fueron colocados a -78°C en un ultra congelador (Ultra-Low freezer Model U85-25) por 48h. Posteriormente los recipientes fueron colocados en la liofilizadora (LABCONCO) por un lapso de 8h esto con la finalidad de conservar los extractos vegetales.

4.5 Tiempo de coagulación de leche bovina

El tiempo de coagulación es definido de acuerdo con Paula et al. (2016) como el tiempo necesario para cuajar la leche después de agregar el extracto vegetal crudo, el cual es medido en minutos. Para medir el tiempo de coagulación de la leche se procedió a utilizar diferentes volúmenes de los extractos vegetales, realizando un ensayo por triplicado de las distintas concentraciones para cada extracto vegetal (0.25%, 0.5%, 0.75% y 1.0%) utilizando leche bovina como sustrato con un pH de 6.5 y a una temperatura de 90°C y 38°C para la elaboración del queso tipo panela control elaborado con cuajo animal. Una vez que se tenían estas condiciones fueron adicionadas las diferentes concentraciones de los extractos vegetales (0.25%, 0.5%, 0.75% y 1.0%).

2.5 Rendimiento del queso tipo panela

El rendimiento se define como la relación entre la masa del producto resultante y la del reactante consumido. El rendimiento quesero es un parámetro que corresponde a la expresión matemática de la cantidad de queso obtenida a partir de una determinada cantidad de leche y normalmente expresada como Kg de queso por 100 kg de leche en porcentaje. En la industria láctea es importante calcular el rendimiento quesero ya este nos indicara que tan bueno es el proceso utilizado para la fabricación del queso o que tan óptimos son los coagulantes utilizados para la fabricación del mismo. (Dalla, 2016). Se utilizó 200 mL de leche bovina y se agregó diferentes volúmenes de los extractos de tallo y hoja (0.25%, 0.50%, 0.75% y 1.0%).

4.6 Elaboración de los quesos tipo panela con extracto vegetal

En el cuadro 3 se muestran las cinco formulaciones de quesos tipo panela (C: Control, ET: extracto de tallo y EH: Extracto de hoja) las cuales fueron utilizadas para llevar acabo el trabajo de investigación. Se utilizó como materia prima leche bovina.

Cuadro 3. Formulaciones de quesos tipo panela

Formulaciones	% Extracto
C	0%
ET	0.75%
ET	1.0%
EH	0.75%
EH	1.0%

Se adquirió leche bovina (raza Holstein) de la planta PROUNILAC ubicada en el Instituto de Ciencias Agropecuarias (ICAp) de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo (UAEH). Para la elaboración del queso control, se siguió la metodología de Talib et al. (2009) con modificaciones. La leche se sometió a un proceso de pasteurización lenta (LTLT) a 65 °C por 30 min, posteriormente se enfrió hasta los 10 °C y nuevamente se elevó la temperatura a 39 °C para adicionar el cloruro de calcio (20g/100 L de leche bovina) y el cuajo animal (quimosina) en una proporción

de 10 mL de cuajo/100 L de leche, donde se realizó una agitación lenta y posteriormente se dejó reposar por 30 min, tiempo necesario para generar la coagulación en la leche. Una vez coagulada la leche fue cortada la cuajada en cubos de 1 cm x 1 cm (para la expulsión del suero), una vez la cuajada se había desuerado en un 75% se procedió a realizar el salado (600 g/ 100 Kg cuajada) finalizando con el prensado, moldeado y empaçado. Para elaborar los tratamientos con el extracto de tallo y hoja (0.75% y 1.00 %) se siguió la metodología modificada de Nasr et al. (2016), una vez que la leche fue pasteurizada, se elevó su temperatura a 95°C, se agregó el cloruro de calcio (20g/100 L de leche bovina) y simultáneamente se adicionó el extracto vegetal (tallo u hoja) en su respectiva concentración para cada tratamiento (EH 0.75%, EH 1.00%, ET 0.75% y ET 1.00%), se realizó una agitación lenta hasta ocurrir la precipitación de la proteína. Para finalizar se agregó cloruro de sodio (600 g/ 100 kg cuajada) donde se prensó, moldeó y empacó para su conservación, se elaboraron 15 quesos tipo panela de 50 g por cada tratamiento. Los quesos fueron almacenados a 4°C hasta su análisis.

4.7 Análisis físico-químicos de la planta de ortiga

4.7.1 Humedad

Para la determinación de humedad, se utilizó el método gravimétrico de secado por estufa (A.O.A.C, 1997). Este método consistió pesar 5 g de muestra en una pequeña charola de aluminio a peso constante. Las muestras fueron introducidas y secadas en una estufa marca Craft a 120°C, durante 8h, posteriormente las muestras fueron extraídas y colocadas en distintos desecadores por 30 min y finalmente fueron pesadas: Los resultados se calcularon de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Humedad} = \frac{B - A}{PM} * 100$$

Donde:

B: Peso de la charola con la muestra

A: Peso de la charola con la muestra seca

PM: Peso de la muestra

4.7.2 Cenizas

Fue utilizado el método gravimétrico (A.O.A.C., 1990). Se pesó 5 g de muestra donde fueron colocadas dentro de crisoles de porcelana a peso constante para ser calcinadas. Una vez calcinadas las muestras se introdujeron en una mufla marca Felisa durante 4h a 550°C. Los crisoles fueron colocados en un desecador para enfriarse y posteriormente se pesaron. Los resultados se calcularon de acuerdo a la siguiente formula.

$$\% \text{ de Cenizas} = \frac{B - A}{PM} * 100$$

Donde

B: Peso del crisol con cenizas.

A; Peso del crisol vacío

PM; Peso de la muestra,

4.7.3 Proteína

El método utilizado fue MicroKjeldahl para la determinación del porcentaje de proteína en las muestras de tallo y hoja, dicha técnica se basa en la digestión de la materia orgánica con ácido sulfúrico concentrado, sulfato de cobre y sulfato de potasio, formando sulfato de amonio que en exceso de hidróxido de sodio se libera

amoníaco el cual es destilado y captado en una solución de ácido bórico. Para este análisis se tomó una muestra de 0.5 g dicha cantidad se colocó en un matraz Kjeldahl adicionando subsecuentemente 15 mL de ácido sulfúrico concentrado y 5 g de mezcla digestora (20 g Sulfato cúprico pentahidratado y 200 g de sulfato de potasio), posteriormente los matraces fueron colocados en el equipo Micro-Kjeldahl (Büchi. Model b-426) donde se realizó la digestión por tres horas. La digestión se realizó con las parrillas de calentamiento las cuales estaban conectadas en una campana de extracción de humos. A partir de que el líquido cambió de coloración de negro a verde se calentó por una hora. Después se destiló con hidróxido de sodio, y el destilado fue captado en ácido bórico al 2% para ser titulado con ácido sulfúrico 0.1 N para conocer la concentración total de nitrógeno (A.O.A.C., 1980). El contenido de nitrógeno total se calculó usando la siguiente formula:

$$\% \text{ Nitrógeno} = \frac{V1 - V2 * N * 0.014}{PM} * 100$$

Donde

V1: mL problema de H₂SO₄ gastado en la titulación

V2: mL blanco de H₂SO₄ gastado

N: Normalidad del H₂SO₄

PM: Peso de la muestra en g

$$\% \text{ de Proteína: } (\% N)(6.38)$$

El 6.38 es el factor de conversión utilizado para determinar el contenido proteico en productos lácteos y 0.014 corresponde a los miliequivalentes de N.

4.7.4 Grasa

Con el fin de identificar el porcentaje de grasa en las muestras de tallo y hoja de ortiga, las muestras vegetales previamente deshidratadas se sometieron a una extracción con éter de petróleo o éter etílico, libre de peróxidos o mezcla de ambos. Para determinar la cantidad de grasa en las muestras se utilizó el método Soxhlet y

un sistema de extracción Büchi, modelo BUL36681 con vasos Büchi y cartuchos de celulosa en los que se colocaron las muestras secas dentro de los cartuchos de celulosa, utilizando como solvente éter de petróleo. Posteriormente se colocaron los vasos en el sistema de extracción de grasa añadiendo un volumen de 90 mL de solvente para lograr las descargas correctamente por 4h consecutiva. Después del tiempo de extracción fueron retiradas las muestras del equipo y se dejaron por 1h en un desecador para permitir la volatilización del solvente presentes en las muestras (A.O.A.C.,1997) Por último se calculó el porcentaje de grasa con la siguiente formula.

$$\text{Extracto etéreo} = \frac{B - A}{PM} * 100$$

Donde:

B: Peso del vaso Büchi con grasa

A: Peso del vaso vacío

PM: Peso muestra.

4.7.5 Fibra

La fibra cruda es la pérdida de masa que corresponde a la incineración del residuo orgánico que queda después de la digestión con soluciones de ácido sulfúrico e hidróxido de sodio en condiciones específicas (A.O.A.C., 1990). Para realizar este análisis se utilizó el método gravimétrico y un determinador de fibra marca Labconco modelo LAC300001-00. Las muestras de tallo y hoja encontradas en los cartuchos de extracción de grasa fueron colocados en vasos Berzelius, añadiendo 200mL de ácido sulfúrico (0.255N), se calentó cada vaso en el aparato condensador y dejó hervir por 30min, se filtró y lavó con agua caliente hasta pH neutro, el residuo fue colocado en los vasos Berzelius, añadiendo 200mL de NaOH (0.313N) se dejó hervir por 30min, se procedió a filtrar, adicionando 25mL de ácido sulfúrico, 150mL de agua destilada y 25mL de alcohol, se colocaron en los crisoles dejándolos secar por 2h a 120°C en una estufa marca Craft, se registró el peso y posteriormente se calcino a 530 °C durante 30 min en una mufla marca Felisa modelo 3510, se dejó enfriar en un desecador y se pesó. Los resultados de fibra cruda se calcularon de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Fibra} = \frac{\text{Peso crisol con muestra seca} - \text{Peso crisol con muestra calcinada}}{\text{Peso real de la muestra}} * 100$$

4.8 Análisis físico-químicos de la leche y los quesos tipo panela elaborados con el extracto vegetal de tallo y hoja

Los análisis físico-químicos se realizaron por triplicado para la leche y los quesos tipo panela elaborados con los extractos vegetales y cuajo animal. Para los quesos coagulados con el extracto vegetales (ET 0.75%, ET1.00%, EH 0.75%, EH 1.00%) y cuajo animal (C) fueron analizados en 3 distintos tiempos (0, 7 y 14 días) durante el tiempo de almacenamiento.

4.8.1 Humedad

Esta determinación se realizó para las muestras de leche bovina y los diferentes tratamientos del queso de acuerdo al método gravimétrico de secado por estufa (A.O.A.C, 1997) descrito en el apartado 2.8.1. Los resultados se calcularon de acuerdo a la siguiente formula:

$$\% \text{ Humedad} = \frac{B - A}{PM} * 100$$

Donde:

B: Peso de la charola con la muestra

A: Peso de la charola con la muestra seca

PM: Peso de la muestra

4.8.2 Cenizas

Esta determinación se realizó para las muestras de leche bovina y los diferentes tratamientos del queso de acuerdo al método gravimétrico de secado por estufa (A.O.A.C, 1997) descrito en el apartado 2.8.1. Los resultados se calcularon de acuerdo a la siguiente formula). Los resultados se calcularon de acuerdo a la siguiente formula.

$$\% \text{ de Cenizas} = \frac{B - A}{PM} * 100$$

Donde

B: Peso del crisol con cenizas.

A; Peso del crisol vacío

PM; Peso de la muestra,

4.8.3 Grasa

El principio de la determinación del contenido de grasa en la leche y los tratamientos de queso elaborados con los distintos extractos (ET 0.75%, ET1.00%, EH 0.75%, EH 1.00%) y cuajo animal (C) se basa en la separación del volumen total que se obtiene de la digestión de los componentes presentes en la leche a excepción de la grasa, separados por diferencia de densidades con ayuda de una centrifuga.

4.8.3.1 Determinación de grasa en la leche

Para la determinación de grasa en las muestras de leche se utilizó un butirometro para leche donde se vertió cuidadosamente por las paredes 10 mL de ácido sulfúrico con una densidad de 1.82 g/mL, posteriormente se agregó 11 mL de leche con la ayuda de una pipeta volumétrica y 1 mL de alcohol isoamílico, se cerró con un tapón de hule y se agitó vigorosamente hasta hacer la digestión de la materia no grasa. El butirómetro fue colocado en un baño María a 65°C por 30 min. Posteriormente se colocó en una centrifuga Gerber, y se tomó la lectura directa del porcentaje de grasa.

4.8.3.2 Determinación de grasa en el queso

Para determinar el porcentaje de grasa en queso se llevó a cabo siguiendo el método acido-butiro-métrico establecido el por Codex alimentario (CXS 283). El cual consintió en pesar 3 g de los quesos previamente rallado, los cuales fueron triturados para ser introducidos en la copa del butirómetro para queso Van Gulik, se agregó ácido sulfúrico con una densidad de 1.522 g/mL hasta cubrir completamente la copa, posteriormente se adicionó 1 mL de alcohol isoamílico. Para finalizar se adicionó más H₂SO₄ hasta llegar al 35% en la escala del butirómetro. Las muestras se incubaron en un baño María a 65°C por 30 min y posteriormente se colocó en una centrifuga Gerber. Para finalizar se tomó la lectura de forma directa del porcentaje de grasa.

4.8.4 Proteína

Esta determinación se realizó por el método MicroKjeldahl (A.O.A.C., 1980) para la determinación del porcentaje de proteína en las muestras de leche bovina y los distintos tratamientos de quesos tipo panela elaborados con los extractos vegetales (H1.00%, H0.75%, T1.00% y T0.75%), descrita en el apartado 2.8.3. El contenido de nitrógeno total se calculó usando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Nitrógeno} = \frac{V1 - V2 * N * 0.014}{PM} * 100$$

Donde

V1: mL problema de H₂SO₄ gastado en la titulación

V2: mL blanco de H₂SO₄ gastado

N: Normalidad del H₂SO₄

PM: Peso de la muestra en g

$$\% \text{ de Proteína: } (\% N)(6.38)$$

El 6.38 es el factor de conversión utilizado para determinar el contenido proteico en productos lácteos y 0.014 corresponde a los miliequivalentes de N.

4.8.5 Cloruros

La estimación de cloruros en queso se basa en el fundamento de digerir la materia orgánica con la presencia de permanganato de potasio, ácido nítrico y nitrato de plata. Titulando posteriormente tiocianato de potasio y utilizando como indicador sulfato férrico amoniacal. Se utilizó el método de Duran et al. (2010) donde se añade nitrato de plata respecto a la cantidad de cloruros presentes. La estimación de cloruros se realizó en los diferentes tratamientos de quesos elaborados con los extractos coagulantes vegetales (EH1.00%, EH0.75%, ET1.00% y ET0.75%) y el control (C) en tres diferentes tiempos (0, 7 y 14 días).

La técnica consistió en colocar 2 g de queso en un matraz Erlenmeyer de 250 mL, añadiendo 25 mL de nitrato de plata 0.1 N y 25 mL de ácido nítrico con una pureza del 70%. El matraz con la solución se colocó en una parrilla de calentamiento, donde posteriormente se agregó 10 mL de permanganato de potasio (solución saturada) y se llevó a una ebullición lenta por 5 min. Posteriormente se retiró de la parrilla y se agregó 100 mL de agua destilada y 5 mL de sulfato férrico amoniacal (solución saturada). Para finalizar se tituló con tiocianato de potasio 0.1 N hasta el vire de color. Los resultados de cloruro se calcularon de acuerdo a la siguiente formula.

$$\%NaCl \frac{(A - B) * N * Meq NaCl}{M} * 100$$

A: mL nitrato de plata 0.1N

B: mL de tiocianato de potasio

N: Normalidad

M: Peso de la muestra en g

Meq NaCl: 0.0585

4.8.6 Color

Mediante el uso de un colorímetro se realizó la medición de color en los quesos elaborados con los distintos extractos vegetales y el control. La medición se llevó acabo siguiendo la metodología de Diezhandino et al. (2016) con algunas modificaciones, utilizando el colorímetro marca Minotla (CM-508d) con sistema CIELAB, donde se realizaron 10 repeticiones para la toma del color en las muestras el cual fue calibrado previamente aplicando el haz de luz en una superficie blanca. Las muestras fueron colocadas en una superficie plana donde el equipo midió los parámetros L*, a* y b* en distintos lugares de la superficie del queso.

Donde:

L*: Luminosidad

a*: Verde a rojo

b*: Azul a amarillo

4.8.7 pH

Se realizó la medición de pH en la leche y los quesos elaborados con extracto vegetal siguiendo la metodología de Wehr and Frank (2004).

Para la medición en los diversos tratamientos de queso se tomó una alícuota de 10 g de queso previamente rallado donde se añadió a un vaso precipitado con 10 mL de agua destilada se mezcló perfectamente y se dejó reposar por 5 min. Posteriormente se introdujo el electrodo y se tomó la lectura.

Para la toma de pH en la leche, se utilizaron 10 mL los cuales fueron colocados en vaso precipitado introduciendo el electrodo del potenciómetro. Cada ensayo se hizo por triplicado en 3 diferentes tiempos (0, 7 y 14 días) a una temperatura de $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.5$.

4.8.8 Acidez

Para la determinación de acidez en leche y queso se siguió la metodología de Miranda et al. (2009) la cual tiene como fundamento medir el % de ácido láctico en las muestras, donde se tomaron 5 g de queso y fueron agregados en un matraz Erlenmeyer para adicionar 20 mL de agua destilada y 2 gotas de indicador fenolftaleína al 1%. Posteriormente se realizó la titulación con hidróxido de sodio al 0.1 N. Para la leche se tomó 25 mL de muestra (A.O.A.C., 1990). El cálculo de % de ácido láctico se calculó utilizando la siguiente formula.

$$\% \text{ de ácido lactico} = \frac{G * N * meq * V \text{ total}}{P * A} * 100$$

Donde:

G: mL NaOH 0.1N gastado en la titulación

N: Normalidad del NaOH

Meq: Equivales de ácido láctico

P: Gramos de la muestra

V: Volumen total.

4.9 Análisis de Perfil de Textura (APT)

La determinación de APT se realizó en los distintos tratamientos de queso elaborado (ET 0.75, ET1%, EH 0.75%, EH 1% y C), siguiendo la metodología de González et al. (2015); Guzmán et al. (2015) modificada, las muestras analizadas fueron cortadas en forma de cubo con dimensiones de 1 x 1 x 1 cm, se realizaron 15 repeticiones respectivamente para cada tratamiento.

Los parámetros evaluados fueron dureza, adhesividad, elasticidad, gomosidad y masticabilidad. La determinación de textura se realizó con ayuda de un texturómetro marca CTE-4500 equipado con una celda de carga de 4.5 Kg y una sonda TA/100 a una velocidad de 1mm/s^{-1} por una distancia de 40 mm en distintos tiempos (0, 7 y 14 días).

4.10 Actividad proteolítica

Para cuantificar la actividad proteolítica de los extractos vegetales de tallo y hoja de la ortiga se utilizó la técnica de Haddar et al. (2009) donde se utilizó 0.5 mL de una solución de caseína al 1% (p/v) disuelta en un buffer de 100mM de Glicina-NaOH (pH 6, 7, 8, 9 y 10) se incubaron a 90 °C con 0.5 mL de tallo u hoja durante 15 min. La reacción se detuvo con la adición de 0.5 mL de ácido tricloroacético al 20% (p/v). Luego de enfriarse, la muestra se centrifugó a 1000g durante 15 min para separar las fases. La tirosina liberada por acción de la enzima sobre la caseína se cuantificó en la fase superior, cuya densidad óptica se registró a 280 nm y se comparó con una curva de calibración de tirosina.

4.12 Electroforesis en gel de poliacrilamida SDS-PAGE.

Para la determinación del peso molecular de las proteínas presentes en los ET y EH, se utilizó la técnica de electroforesis en gel discontinuo de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico siguiendo la metodología descrita por Beka et al. (2014) con algunas modificaciones. Los geles fueron elaborados con una concentración de poliacrilamida de 18% para el gel separador y 3% el gel concentrador. Las muestras fueron centrifugadas a 10,000 rpm por 15 min. Posteriormente se separó el sobrenadante y se mezcló con buffer de muestra (10 µL Buffer 2x (0.25 M Tris-HCl pH 6.8, 4% p/v SDS y Glicerol al 20% p/v), 90 µL agua desionizada, 10 µL de 2-Mercaptoetanol y 200 µL de extracto), se agregó 20 µL de muestra combinada, así como 15 µL del marcador de peso molecular de 6.5 a 200 kDa (SIGMA ALDRICH) en los diferentes pozos en el gel de poliacrilamida. La electroforesis se realizó en una cámara vertical Miniprotean II (Bio-Rad). El proceso de electroforesis se realizó a una potencia eléctrica constante de 120V para dos geles por un periodo de tiempo de 2 h una vez concluido el proceso de electroforesis, los geles fueron teñidos con una solución de azul de coomassie incubados a temperatura ambiente y desteñidos por una solución destiñedora 1 (3 lavados de 30 minutos) de metanol-ácido acético (30% etanol, 7% ácido acético glacial y 63% agua desionizada) y una segunda solución destiñedora 2 (25% Metanol, 10% ácido acético glacial y 65% agua desionizada) para ser reveladas las bandas que indican el peso molecular de las proteínas presentes en los extractos.

Además, se utilizó un kit de Sigma Aldrich, Proteosilver Plus Stain Kit para revelar las proteínas presentes menor concentración (2 ng) en el gel de poliacrilamida, las cuales no eran posibles revelar con el azul de coomassie.

4.13 Zimografía electroforética

La zimografía es un método electroforético para la medición y la identificación de la actividad proteolítica de las proteínas separadas en la electroforesis. El método se basa en un gel de dodecil sulfato de sodio el cual se sumerge en un sustrato (proteína) que es degradado por las proteasas durante un periodo de incubación. Esta posteriormente se lleva con una tinción con azul de coomassie el cual revela los sitios donde ocurre la proteólisis manifestándose en forma de bandas blancas sobre un fondo azul oscuro. Dentro del rango mostrado (ancho de banda), la intensidad de la banda se puede relacionar linealmente con la concentración de la proteasa, esta técnica es relativamente sencilla y practica ya que revela en que zona, tamaño y banda se presenta la característica de una proteasa por lo cual se utiliza como un método de caracterización de proteínas (Leber & Balkwill, 1997).

4.15 Análisis microbiológicos en los quesos.

Para el estudio microbiológico de los diferentes tratamientos de queso (ET 0.75%, ET1%, EH 0.75%, EH 1% y C) se siguió la metodología de Beresford, et al. (2001). T. Beresford and Williams (2004), Fox et al. (2017). Donde se tomó 1 g de muestra y se le adicionó 9 ml de agua destilada, triturando la alícuota en una bolsa de stomacher. Posteriormente se realizaron distintas diluciones en tubos eppendof (1×10^{-1} , 1×10^{-2} y 1×10^{-3}) sembrando 100 μ L de cada dilución en los distintos medios de cultivo (Mac Conkey, Sal y Manitol, papa dextrosa, MRS y agar estándar) realizando una siembra mediante la técnica barrido en placa los cuales fueron incubadas en una estufa (ECOSHEL) a $34^{\circ}\text{C} \pm 0.1$, realizando el trabajo en los diferentes tiempos (0, 7 y 14 días).

5. RESULTADOS Y DISCUSIONES

5.1 Rendimiento de los extractos coagulantes de tallo y hoja.

El cuadro 4 muestra los rendimientos obtenidos de los extractos vegetales a partir de una extracción con agua existiendo diferencias significativas ($p < 0.05$) en los distintos tratamientos, debido al uso de diferentes volúmenes de agua (10, 20 y 30 mL) en 50 g de tallo y hoja, donde los extractos que presentaron un menor rendimiento fueron aquellos a los que se les agregó menor cantidad de agua (10 mL), teniendo al final como resultado un menor volumen de extracto respecto a la cantidad inicial de agua incorporada, debido a las pérdidas líquido por la absorción de las muestras vegetales, además de las mermas surgidas por la retención del material de filtrado. Por otra parte, Ahmed et al. (2009) en su estudio se realizaron una extracción con soluciones buffer utilizando un volumen de 500 mL para realizar la extracción del componente coagulante proveniente de las semillas de *Solanium dubium* siendo más compleja en comparación con la extracción acuosa realizada en la planta de ortiga además de requerir mucho más tiempo.

Cuadro 4. Volúmenes obtenidos de extracto de hoja y tallo de la ortiga (*Euphorbiace Cnidoscopus aconitifolius*).

	Agua (mL)	Muestra (g)	Extracto (mL)	Bagazo (g)
Hoja	10	50	3.4±0.03 ^a	55.9
	20	50	13.9±0.09 ^b	54
	30	50	24.2±1.11 ^c	53.5
Tallo	10	50	2.8±0.09 ^a	54
	20	50	17.2±0.80 ^b	51
	30	50	27.0±1.60 ^c	50.7

Los resultados se presentan en medias \pm desviación estándar donde las letras diferentes (a, b, c) indican diferencias significativas entre los tratamientos de cada muestra ($p < 0.05$)

5.2 Tiempo de coagulación del extracto de tallo y hoja

En el cuadro 5 se muestran los resultados experimentales de la evaluación con los extractos vegetales de tallo y hoja, donde se realizó la medición del tiempo necesario para coagular 100 mL de leche (tiempo de coagulación). Se puede observar que los diferentes extractos de hoja (10:50, 20:50 y 30:50) a una concentración de 0.25 % no fueron capaces de coagular la leche. Por otra parte, la concentración de 0.50 % de los extractos 10:50 y 20:50 presentaron una ligera floculación. Caso contrario ocurrió en los extractos de 10:50 y 20:50 a una concentración de 0.75 y 1.0 % donde los extractos fueron capaces de coagular la leche. En el extracto de tallo, la concentración al 1.0 % en la proporción 20:50, no mostró diferencias significativas respecto al tratamiento 10:50 a la misma concentración 1.0 %, se consideró mejor el extracto en la proporción 20:50 debido al rendimiento final obtenido el cual fue superior. Por otra parte, el extracto de hoja en la proporción 20:50 en concentración 1.0 % fue considerado el mejor extracto debido a que presentó un mayor volumen final mostrando las mismas características que el extracto de tallo en sus diferentes concentraciones. Los extractos vegetales que coagularon la leche, realizaron la coagulación de la leche en menor tiempo a comparación al control elaborado con cuajo animal (quimosina). Los resultados de este estudio muestran que los tiempos de coagulación que presentan los extractos vegetales (tallo y hoja) fueron menores en comparación a los reportados por Mazorra et al. (2013) quienes evaluaron tres tipos de extracto (jengibre, kiwi y melón) donde el tiempo de coagulación oscilaba entre los 40-60 minutos, por otra parte, en otro estudio elaborado por Rocha et al. (2010) se evaluó el extracto obtenido del fruto de la maleza conocido comúnmente “uvita de campos” (*Salpichroa organifolia*) siendo el extracto del fruto no maduro incapaz de coagular la leche, mientras que el fruto maduro logró la coagulación en un tiempo de 40 min siendo un tiempo muy superior a los presentados por los distintos extractos vegetales de tallo y hoja.

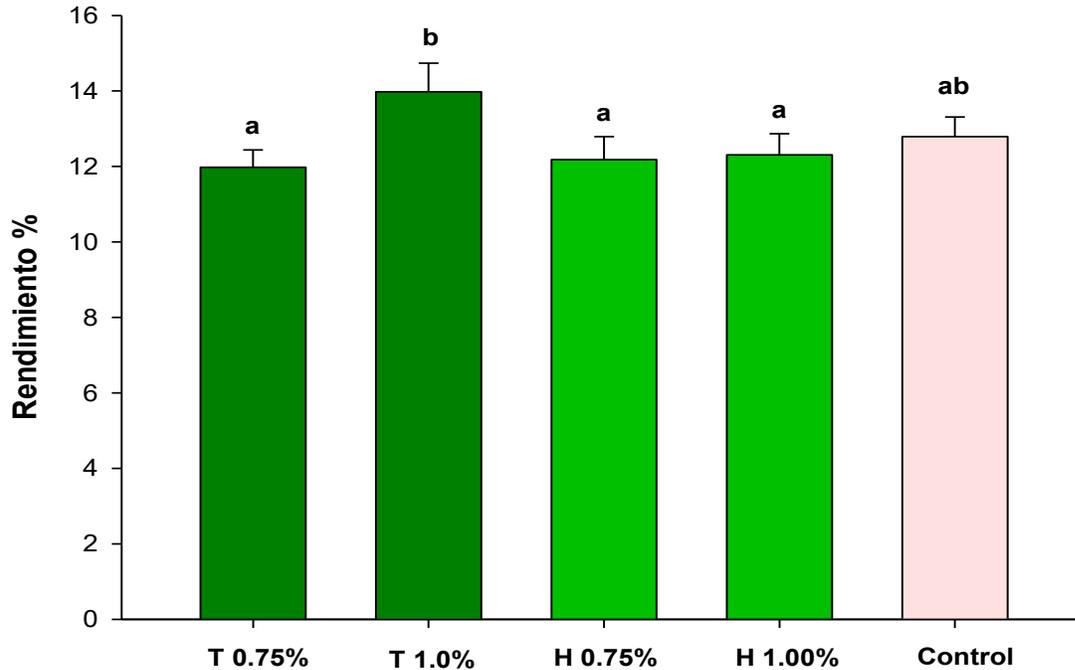
Cuadro 5 Tiempo de coagulación de los extractos de hoja expresados en minutos.

90°C	Tiempo de coagulación (min)					Testigo (Quimosina)
	Extractos	0.25%	0.50%	0.75%	1.00%	
Hoja	10:50	N/C	Floculación	8.02±0.29 ^b	4.36±0.20 ^a	35.5±0.45 ^c
	20:50	N/C	Floculación	8.53±0.32 ^b	4.50±0.35 ^a	
	30:50	N/C	N/C	N/C	Floculación	
Tallo	10:50	N/C	Floculación	4.59±0.49 ^b	2.01±0.17 ^a	
	20:50	N/C	Floculación	5.89±0.25 ^c	2.28±0.19 ^a	
	30:50	N/C	N/C	N/C	Floculación	

Los resultados se presentan en medias ± desviación estándar. Las letras diferentes (a, b y c) indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los tratamientos. N/C no coagulación.

5.3 Rendimiento de los quesos elaborados con extracto de tallo y hoja

En la figura 6 se muestran los resultados del rendimiento obtenido con los diferentes extractos vegetales y control en la obtención del queso fresco tipo panela. De acuerdo a los resultados experimentales, se observó que los tratamientos con los (ET 0.75%, EH 1.0% y EH 0.75%) en el rendimiento del queso no mostraron diferencias significativas ($p < 0.05$) respecto al control. Por otro lado, el tratamiento elaborado con el extracto de ET 1.00 % presentó mayor porcentaje en el rendimiento (13.58 %). Los resultados de los 4 tratamientos elaborados con los extractos vegetales mostraron un rendimiento satisfactorio debido a que ninguno fue menor en rendimiento del tratamiento control. Los resultados de este estudio fueron positivos en comparación con los reportados por Mazorra et al. (2013) debido a que los tratamientos elaborados con el extracto vegetal de ortiga no fueron inferiores al rendimiento del tratamiento control (12.92 %) caso contrario ocurrido en dicho estudio, donde el tratamiento control presentó mayor rendimiento en comparación a todos los extractos vegetales.



5.4 Características físico-químicas de la ortiga

En el cuadro 6 se describen los resultados obtenidos de los análisis físico-químicos del tallo y hoja de la ortiga (*Euphorbiaceae Cnidioscolus aconitifolius*) realizados en base húmeda, en cuanto al contenido de proteína, grasa, cenizas y fibra. De acuerdo a los resultados se observó que el tallo presentó un mayor contenido de proteína (8.63%) mostrando diferencias significativas ($p < 0.05$) respecto a la hoja de la ortiga, por otra parte, la hoja en promedio mostró tener mayor cantidad de cenizas, grasa, fibra y carbohidratos en comparación con el tallo, por otra parte de acuerdo con el trabajo de investigación de Ahmed et al. (2009) realizaron el estudio de la bayas de la planta *Solanum elaeagnifolium* las cuales cuentan con la propiedad de coagular la leche al igual que la ortiga, donde presentaron composición química proximal similar, ya que en cuanto al porcentaje de proteína el tallo y la hoja es inferior (8.63% y 6.40%) en comparación al contenido de proteína en las bayas de la *Solanum elaeagnifolium* (16.2%) esta diferencia tan significativa

se debe a que las bayas fueron analizadas en base seca mientras que el análisis del tallo y la hoja se realizó en base húmeda.

Cuadro 6 Características físico-químicas del tallo y hoja de la planta de ortiga

	Humedad (%)	Proteína (%)	Cenizas (%)	Fibra (%)	Grasa (%)	Carbohidratos (%)
Tallo	77.92±1.65 ^a	8.63±0.37 ^a	1.81±0.11 ^a	5.58±0.09 ^a	1.06±0.07 ^a	5.0±0.09 ^a
Hoja	78.52±0.73 ^a	6.40±0.55 ^b	2.75±0.02 ^b	4.03±0.12 ^b	1.62±0.04 ^b	6.68±0.16 ^b

Los resultados se presentan en medias ± desviación estándar donde las letras diferentes en las columnas (a y b) indican diferencias significativas entre los tratamientos.

5.5 Características físico-químicas leche bovina

En el cuadro 7 se presentan los resultados de los análisis físico-químicos de proteína 3.22%, grasa 3.45%, humedad 87.2% y ceniza 0.45% en la leche bovina. De acuerdo a los datos obtenidos coinciden con los presentados por Claeys et al. (2014) donde reportan un rango de 2.94 - 3.8% de proteína, 3.2 - 5.2% de grasa, 87.2- 88.5% de humedad y 0.68-0.78 % de cenizas asegurando que la leche bovina utilizada fue de buena calidad ya que los parámetros se encuentran dentro del rango establecido por la NOM-243-SSA1-2010 que menciona que los resultados de los parámetros son adecuados para considerarse una leche bovina de calidad.

Cuadro 7. Características físico-químicas de la leche bovina.

Parámetro	Leche Bovina
Humedad (%)	87.2 ±0.26
Grasa (%)	3.45 ±0.25
Proteína (%)	3.22 ±0.18
Cenizas (%)	0.45 ±0.04
Densidad	1.028 ±0.001
Acidez	0.18 ±0.04
pH	6.58 ± 0.02
A _w	0.98 ±0.002

5.6 Características físico-químicas de los quesos elaborados tipo panela con el extracto coagulante de la ortiga.

En el cuadro 8 se muestran los resultados de los parámetros físico-químicos de proteína, grasa y humedad en los 5 tratamientos de queso tipo panela elaborado con los distintos extractos vegetales de tallo y hoja a diferentes concentraciones (EH 0.75%, EH 1.0%, ET 0.75% y ET 1.0%) y el control (C) elaborado con quimosina, los cuales fueron evaluados en distintos tiempos (0, 7 y 14 días) durante su almacenamiento de los quesos tipo panela. Se puede observar que el contenido de proteína en cada uno de los tratamientos, se observaron diferencias significativas ($p < 0.5$) en los días 0 y 14 días de evaluación, donde se observa que los tratamientos elaborados con el extracto de tallo y hoja al 1.0 % al día cero presentaron el mayor porcentaje de proteína (19.23 % y 18.16 % respectivamente) en comparación de los demás tratamientos, mientras el control presentó el menor contenido de proteína (15.18 %). Estos parámetros fueron cambiando conforme al paso del tiempo los cuales mantuvieron una tendencia similar hasta el final de la evaluación, siendo el

Cuadro 8. Porcentaje de proteína, grasa y humedad en los quesos frescos tipo panela coagulados con los extractos vegetales del tallo y hoja de la ortiga (*Euphorabiace Cnidocolus aconitifolius*)

Tratamiento	Proteína %			Grasa %			Humedad %		
	0	7	14	0	7	14	0	7	14
C	15.18±0.34 ^{aA}	18.43±0.34 ^{aB}	18.09±0.03 ^{aC}	17.50±0.25 ^{aA}	20.75±0.22 ^{aB}	20.50±0.20 ^{aB}	66.98±0.15 ^{cC}	63.48±1.14 ^{cA}	64.73±1.40 ^{cB}
ET 0.75%	16.80±0.01 ^{bA}	19.85±0.95 ^{aB}	19.35±0.42 ^{abB}	20.60±0.25 ^{bA}	20.65±0.19 ^{aA}	20.45±0.22 ^{aA}	58.26±0.26 ^{aB}	56.37±0.94 ^{bA}	57.47±0.60 ^{aA}
ET 1.00%	19.23±0.40 ^{dA}	19.89±0.02 ^{aA}	20.13±0.61 ^{bA}	21.25±0.24 ^{bA}	21.00±0.21 ^{aA}	21.50±0.22 ^{bA}	58.48±0.31 ^{aB}	58.22±1.04 ^{abA}	56.51±0.18 ^{aA}
EH 0.75%	16.74±0.33 ^{bcA}	18.78±0.03 ^{aB}	18.71±0.27 ^{abB}	20.00±0.25 ^{abA}	21.60±0.20 ^{aB}	22.40±0.18 ^{cC}	61.06±0.04 ^{bB}	58.46±1.14 ^{aA}	58.50±0.16 ^{abA}
EH 1.00%	18.16±0.49 ^{cdA}	19.36±0.42 ^{aB}	18.55±0.25 ^{aB}	19.25±0.24 ^{abA}	20.90±0.22 ^{aB}	20.20±0.27 ^{aB}	61.99±0.31 ^{bB}	60.01±1.24 ^{aA}	61.03±0.06 ^{bA}

Las distintas letras ^{A, B, C} en la misma fila indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los tratamientos (0, 7 y 14 días)

Las distintas letras ^{a, b, c} la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los tratamientos elaborados con extracto de hoja y tallo a distintas concentraciones

Tratamientos= C(control), ET Extracto de Tallo, EH Extracto de Hoja.

tratamiento elaborado con extracto de tallo al 1.0 % el que mayor contenido de proteína presentó (20.13 %) al final de la evaluación.

Respecto al contenido de grasa existieron diferencias significativas entre los tratamientos al día cero, siendo los tratamientos elaborados con extracto de tallo (0.75 y 1.0 %) los que mayor contenido de grasa (20.60 y 21.25 %) presentaron, sin embargo, al día 7 no existieron diferencias significativas entre los tratamientos hasta el día 14 donde el tratamiento elaborado con el extracto de hoja 0.75 % y tallo 1.00 % presentaron el mayor contenido de grasa (22.40 y 21.50 %) al final de la evaluación. De acuerdo con Mazorra-Manzano et al. (2013) el incremento de la proteína y la grasa conforme al paso del tiempo es producido debido al desuerado que ocurre en los quesos, esto debido a la sinéresis el cual propicia el incremento de estas dos variables dado a la pérdida de humedad y el incremento de la concentración de la materia seca. Siendo como favorable el incremento y la presencia de la grasa butírica debido a que se ha demostrado que la actividad biológica de este tipo de grasa presente en los productos lácteos como el queso y aporta beneficios a la salud como lo es la presencia del ácido linoleico conjugado (CLA) en la inhibición de cáncer, aterosclerosis y el mejoramiento del sistema inmunológico además de disminuir la probabilidad de un padecimiento cardiovascular debido a la presencia de ácidos grasos de cadena corta como lo son, el butírico (C4:0), caproíco (C6:0), caprílico (C8:0) y capríco (C10:0) los cuales no ejercen efecto sobre el contenido de colesterol en el sangre (W. Parodi, 2004). Por otra parte, respecto al contenido de proteína al día cero en el tratamiento elaborado con extracto de tallo al 1% (19.23%) fue superior a lo reportado por Puglisi et al. (2014) en los quesos elaborados con extracto de kiwi (18.25%)

Por otra parte, el contenido de humedad en el tratamiento control mantuvo el mayor porcentaje durante todo el periodo de evaluación, existiendo diferencias significativas ($p < 0.05$) respecto a los elaborados con los distintos extractos vegetales, mientras que los quesos elaborados con el extracto de tallo (1.0% y 0.75%) presentaron el menor contenido de humedad en los distintos días de evaluación. Estas diferencias respecto al contenido de humedad pueden ser causada por la presencia de una o varias enzimas coagulantes presentes en los

extractos, de acuerdo a Chávez et al. (2016) el uso de coagulantes vegetales tiene como resultado la precipitación de la proteína de la leche en un menor tiempo ya que en muchos casos precipitan la proteína con mayor rapidez debido a la presencia de una o varias enzimas aspárticas las cuales hidrolizan distintos enlaces de la k caseína a diferencia de la quimosina (hidrolisis del enlace 105-106 Phe-Met), reflejando una actividad proteolítica superior propiciando la formación de un coagulo más pequeño que permite la salida del suero con mayor velocidad, dando como resultado una mayor compactación entre los distintos fragmentos de caseína y reflejando un menor contenido de humedad. Caso similar se reportó en el trabajo de investigación de Chávez et al. (2016) donde elaboraron un queso fresco con el extracto vegetal obtenido de las bayas de *Solanum elaeagnifolium* el cual contó con un menor contenido de humedad (67.66%) en comparación del control elaborado con quimosina (68.64%).

En el cuadro 9 se muestran los resultados obtenidos de los parámetros físico-químicos de pH, acidez y A_w de los tratamientos elaborados con extracto vegetal de la ortiga a diferentes concentraciones (EH 0.75%, EH 1%, ET 0.75% y ET 1%) y control (quimosina) a diferentes tiempos de evaluación (0, 7 y 14 días)

En el parámetro de pH, los quesos elaborados con los extractos de tallo, hoja y control no presentaron diferencias significativas ($p < 0.05$) con respecto al control, posteriormente existió una disminución en el pH conforme el paso del tiempo, esto puede deberse a que los extractos de tallo y hoja no cuentan con un pH inferior al de la leche bovina (6.5) por lo que no disminuye ni aumenta el pH al ser agregados a la leche como agente coagulante. Los resultados obtenidos fueron similares a los presentados por Puerto et al. (2003) donde obtuvieron un pH promedio de 6.3 durante la evaluación de los quesos frescos.

En cuanto a la acidez se observa que al día cero y siete no existieron diferencias significativas entre los tratamientos, es hasta el día 14 donde existe una diferencia en la acidificación los distintos tratamientos elaborados con los diferentes extractos presentando diferencias significativas ($p < 0.05$), mostrando que el queso control presentó la mayor acidez (0.84 mg de ácido láctico equivalente) al final de la evaluación esto pudo deberse a que la acidificación en los quesos es un fenómeno típico que ocurre cotidianamente, ya que cuentan con la presencia de bacterias ácido lácticas nativas, las cuales fermentan las azúcares del queso (lactosa) produciendo ácido láctico (Maldonado & Llanca, 2008). Dichos valores de acidez presentaron similitud (0.66 g/ ácido láctico equivalente) en valores reportados por Prieto et al. (2002) que incrementaron conforme al paso del tiempo.

Respecto al parámetro de actividad de agua (A_w) en los distintos quesos elaborados con los diferentes coagulantes vegetales en el cuadro 9 se observa la disminución paulatina de la A_w conforme el paso del tiempo, como resultado se observó que al día cero, el tratamiento elaborado con el coagulante animal presentó la mayor A_w (0.95) mientras que el tratamiento EH 0.75% a una concentración 0.75 % obtuvo la menor A_w (0.93), mientras que al día siete no existieron diferencias significativas entre los tratamientos y al día 14 los tratamientos elaborados con ET 0.75 y 1.0% fueron los que presentaron menor A_w (0.92) respecto a los demás tratamientos. Esto

puede deberse a que conforme pasa el tiempo la A_w es un parámetro íntimamente ligado con la humedad y el contenido total de sólidos de acuerdo a Duran et al. (2010) menciona que si cambia aumenta el contenido de sólidos y disminuye la humedad también la A_w disminuirá. Dichos resultados ya mencionados de los diferentes tratamientos son similares a los reportados por Duran et al. (2010) donde llevaron a cabo un monitoreo de la A_w de los quesos elaborados con leche de cabra, los cuales presentaron una A_w (0.95) muy similar a los obtenidos con el coagulante vegetal de tallo y hoja de la ortiga.

Cuadro 9. pH, Acidez y Aw en los quesos frescos tipo panela coagulados con los extractos vegetales del tallo y hoja de la ortiga (*Euphorbiace Cnidoscolus aconitifolius*)

Tratamiento	pH			Acidez			Aw		
	0	7	14	0	7	14	0	7	14
C	6.47±0.035 ^{aC}	6.41±0.014 ^{aB}	6.23±0.021 ^{Aa}	0.11±0.014 ^{aA}	0.44±0.007 ^{aB}	0.84±0.02 ^{cC}	0.956±0.002 ^{cA}	0.951±0.004 ^{bA}	0.940±0.003 ^{aB}
ET 0.75%	6.48±0.014 ^{aC}	6.43±0.021 ^{aB}	6.25±0.042 ^{Aa}	0.13±0.000 ^{aA}	0.44±0.003 ^{aB}	0.78±0.00 ^{bcC}	0.945±0.002 ^{bA}	0.932±0.008 ^{aB}	0.929±0.003 ^{bB}
ET 1.00%	6.48±0.000 ^{aC}	6.40±0.014 ^{aB}	6.26±0.021 ^{Aa}	0.13±0.003 ^{aA}	0.45±0.007 ^{aB}	0.74±0.02 ^{abC}	0.946±0.005 ^{bA}	0.933±0.010 ^{aA}	0.929±0.004 ^{bB}
EH 0.75%	6.50±0.028 ^{aC}	6.385±0.02 ^{aB}	6.28±0.028 ^{aA}	0.11±0.014 ^{aA}	0.44±0.003 ^{aB}	0.67±0.00 ^{aC}	0.939±0.004 ^{aA}	0.938±0.008 ^{aA}	0.934±0.003 ^{bA}
EH 1.00%	6.45±0.007 ^{aC}	6.42±0.049 ^{aB}	6.29±0.014 ^{aA}	0.14±0.007 ^{aA}	0.45±0.007 ^{aB}	0.73±0.03 ^{abC}	0.943±0.007 ^{bA}	0.940±0.013 ^{aA}	0.937±0.004 ^{aA}

Las distintas letras ^{A, B, C} en la misma fila indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los tratamientos (0, 7 y 14 días)

Las distintas letras ^{a, b, c} la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los tratamientos elaborados con extracto de hoja y tallo a distintas concentraciones

Tratamientos= C (Control), ET (Extracto de Tallo), EH (Extracto de Hoja).

Aw= Actividad de Agua

En el cuadro 10 se observan los resultados obtenidos de cenizas y cloruros en los tratamientos elaborados con los extractos vegetales (ET 0.75%, ET 1.0%, EH 0.75% y EH 1.0%) en los diferentes tiempos de evaluación (0, 7 y 14 días) en el contenido de cenizas al día cero existen diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0.05$) siendo el tratamiento EH 1.00% el que presentó la mayor concentración (3.0%). Por otra parte, al día 7 se observó un decremento en el porcentaje de cenizas en todos los tratamientos manteniendo esta tendencia a disminuir hasta el día 14 donde se muestra que los tratamientos ET y EH al 1.0 % presentaron el mayor contenido de cenizas con respecto al control existiendo diferencias significativas entre los tratamientos. La posible causa de la diferencia en la concentración de cenizas al día 0 así como el decremento paulatino conforme el paso del tiempo se ve relacionado con el hecho de que los tratamientos elaborados con el extracto ya sea de tallo u hoja en sus distintas concentraciones se le incorpora indirectamente sales y minerales que se encuentran en los extractos vegetales, lo que propicia el incremento de la concentración de cenizas en los quesos elaborados. La relación del decreciente porcentaje en la concentración de cenizas conforme el paso del tiempo se atribuye principalmente a la sinéresis fenómeno que presenta todo queso, ya que el lacto suero emigra de matriz, arrastra muchos componentes desde fracciones de proteína, grasa, azúcares y minerales, también muestra el resultado obtenido de la evaluación en el contenido de cloruros en los quesos elaborados con los distintos extractos del vegetales y el control, donde se observa que al día cero los tratamientos de ET y EH presentaron diferencias significativas, mientras que al finalizar el tiempo de coagulación el EH 1.0 % mantuvo el mayor porcentaje de cloruros que el resto de los tratamientos. Dichos resultados obtenidos fueron similares a los presentados por Rodríguez-Gutierrez (2014) donde analizó el contenido de cloruros en quesos elaborados a partir de calostro presentando un contenido de 1.5% de cloruros en el queso, porcentaje muy similar al 1.41% en promedio de los quesos elaborados con los EH y ET a diferentes concentraciones.

Cuadro 10. Cenizas y Cloruros en los quesos frescos tipo panela coagulados con los extractos vegetales del tallo y hoja de la ortiga (*Euphorbiace Cnidoscolus aconitifolius*)

Tratamiento	Cenizas			Cloruros		
	0	7	14	0	7	14
C	2.17±0.002 ^{Ac}	2.13±0.01 ^{aB}	2.02±0.01 ^{aA}	1.41±0.09 ^{aA}	1.39±0.02 ^{aA}	1.41±0.02 ^{aA}
ET 0.75%	2.75±0.004 ^{Db}	2.32±0.03 ^{aA}	2.26±0.09 ^{abA}	1.49±0.01 ^{aB}	1.38±0.04 ^{aA}	1.39±0.02 ^{aA}
ET 1.00%	2.63±0.004 ^{Cb}	2.36±0.02 ^{aA}	2.34±0.01 ^{bA}	1.65±0.02 ^{bC}	1.42±0.04 ^{aB}	1.37±0.00 ^{aA}
EH 0.75%	2.38±0.030 ^{Ba}	2.28±0.09 ^{aA}	2.30±0.10 ^{bA}	1.45±0.02 ^{aA}	1.42±0.00 ^{aA}	1.39±0.04 ^{aA}
EH 1.00%	3.00±0.058 ^{Ec}	2.37±0.06 ^{aB}	2.27±0.04 ^{abA}	1.62±0.03 ^{bA}	1.50±0.02 ^{bA}	1.49±0.00 ^{bA}

Las distintas letras ^{A, B, C} en la misma fila indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los tiempos tratamientos (0, 7 y 14 días)
 Las distintas letras ^{a, b, c} la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los tratamientos elaborados con extracto de hoja y tallo a distintas concentraciones

Tratamientos= C (Control), ET Extracto de Tallo, EH Extracto de Hoja.

5.7 Análisis de perfil de textura

En el cuadro 11 se muestran los resultados de los parámetros de dureza y adhesividad en los quesos tipo panela coagulados con el extracto de tallo y hoja de ortiga a distintas concentraciones (ET 0.75%, ET 1.0% EH 0.75% y EH 1.0%) y el tratamiento control elaborado con quimosina, los resultados fueron obtenidos durante el monitoreo del almacenamiento de los quesos, el cual se llevó a cabo a los tiempos (0, 7 y 14 días)

Se puede observar que al día cero el tratamiento control presentó la dureza más baja (3.07 N) mientras que EH 1.0% presentó la mayor dureza (11.4 N) existiendo diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los tratamientos. Por otra parte, cabe destacar la tendencia a incrementar la dureza en cada uno de los distintos tratamientos conforme el paso del tiempo, donde se observa que al final de la evaluación (día 14) los tratamientos elaborados con ET y EH al 1.0% fueron los que presentaron la mayor dureza (20.22 y 14.72 N) muy superior a lo presentado por el control 4.84 N. Como se mencionó anteriormente, la mayoría de los tratamientos mantuvieron una tendencia a incrementar dicho parámetro a excepción del control que al día 14 presentó disminución en la dureza. Como posible consecuencia Marshall (2010) menciona que la pérdida de dureza en una estructura como el queso, se debe a diversos factores, uno de ellos es el comienzo de la desnaturalización de la proteína o la elevada cantidad de humedad dentro de la matriz por lo que dicho fenómeno puede atribuirse a la humedad presente en el tratamiento control. Por otra parte García et al. (2014) mencionan que el incremento de la dureza se debe al fenómeno de la sinéresis, propiciando la compactación de la estructura por el reacomodo constante de la caseína. Los resultados en este estudio muestran muy superiores a la dureza que pudiese mostrar un queso fresco, tal es el caso del estudio elaborado por Mazorra et al. (2010) donde obtuvieron una dureza de 4.67 N en un queso fresco.

Por otra parte, en cuanto a la adhesividad se puede observar como aumenta en cada uno de los tratamientos conforme el paso del tiempo, habiendo diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0.05$), El aumento de la adhesividad puede

atribuirse de acuerdo a lo descrito por Pereira et al. (2002); Álvarez et al. (2007), donde menciona que la adhesividad se ve modificada cuando el contenido de humedad disminuye y el porcentaje de grasa aumenta, razón por la cual la adhesividad es mayor al día 14.

Cuadro 11. Parámetros de dureza y adhesividad en los quesos tipo panela elaborados con extracto de ortiga a diferentes tiempos de maduración

Tratamiento	Dureza (N)			Adhesividad (mJ)		
	0	7	14	0	7	14
C	3.07±0.23 ^{Da}	6.07±0.61 ^{cB}	4.84±0.60 ^{bB}	0.07±0.01 ^e	0.10±0.01 ^a	0.22±0.01 ^c
EH 0.75%	5.19±0.59 ^{Aa}	7.77±0.77 ^{aB}	9.94±0.76 ^{aC}	0.15±0.01 ^a	0.17±0.00 ^b	0.32±0.02 ^a
EH 1.00%	11.4±1.59 ^{Ca}	20.63±1.25 ^{dB}	20.22±1.8 ^{dC}	0.13±0.00 ^b	0.15±0.02 ^{ab}	0.20±0.00 ^{ab}
ET 0.75%	7.42±0.53 ^{Ba}	7.58±0.50 ^{aA}	11.56±1.16 ^{aB}	0.11±0.00 ^{cA}	0.13±0.01 ^{abB}	0.14±0.00 ^{aC}
ET 1.00%	6.13±0.46 ^{Aa}	10.53±1.42 ^{bB}	14.72±1.05 ^{cC}	0.12±0.01 ^d	0.14±0.00 ^{ab}	0.17±0.01 ^{ab}

Las distintas letras ^{A, B, C} en la misma fila indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los tiempos de almacenamiento (0, 7 y 14 días)

Las distintas letras ^{a, b, c} en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los tratamientos elaborados con extracto de hoja y tallo a distintas concentraciones
 Tratamientos= C (control), ET (Extracto de Tallo), EH (Extracto de Hoja)

En el cuadro 12 se muestran los resultados de cohesividad y gomosidad obtenidos durante los periodos de evaluación de 0, 7 y 14 días en los tratamientos y el control. La cohesividad de acuerdo a Bryant et al. (2005) es la medida en que puede deformarse un queso antes de que la matriz llegue a la ruptura. Los tratamientos con EH y ET presentaron la tendencia en disminuir en este parámetro conforme el paso del tiempo, siendo los tratamientos EH 1.0% y ET 0.75% los más cohesivos al final del periodo de evaluación, esto puede deberse a que un queso disminuya o aumente en esta variable va directamente al contenido de humedad y grasa. Si aumenta su contenido graso y disminuye la humedad, la cohesividad disminuirá (Bryant et al., 2005). Por otra parte, los resultados obtenidos de la gomosidad durante el trabajo de investigación se encuentran en el cuadro 12. La gomosidad se define de acuerdo por Torres et al. (2015) como la fuerza necesaria para

desintegrar una muestra de alimento sólido necesario para realizar su ingesta. Al día cero de la experimentación el tratamiento elaborado con extracto de hoja (EH 1.0 %) a comparación con los demás tratamientos mostró diferencias significativas ($p < 0.05$) al presentar los mayores valores de gomosidad, manteniendo una creciente tendencia a incrementar conforme el paso del tiempo, de igual manera dicha tendencia se vio reflejada en los distintos tratamientos. Por otra parte, el control fue el que presentó los menores resultados. De manera general cabe destacar que todos los tratamientos presentaron la tendencia en aumentar en la gomosidad conforme el paso del tiempo, esto puede deberse a que este parámetro depende de la dureza y la cohesividad, variables que incrementan debido a los cambios físico-químicos que se presentan en las muestras. Dichos resultados obtenidos del parámetro fueron similares a los reportados por Joshi et al. (2004) donde obtuvieron resultados de 62.33 N en la dureza del queso.

Cuadro 12. Parámetros de Cohesividad y Gomosidad en los quesos tipo panela elaborados con extracto de ortiga a diferentes tiempos de maduración

Tratamiento	Cohesividad			Gomosidad		
	0	7	14	0	7	14
C	0.63±0.01 ^{eB}	0.49±0.06 ^{dA}	0.50±0.03 ^{dA}	2.00±0.12 ^{aA}	2.86±0.32 ^{aB}	2.37±0.47 ^{aB}
EH 0.75%	0.77±0.008 ^{aB}	0.64±0.02 ^{aA}	0.61±0.05 ^{aA}	4.00±0.46 ^{bA}	5.02±0.43 ^{bB}	5.34±0.43 ^{bB}
EH 1.00%	0.74±0.02 ^{bA}	0.70±0.03 ^{bA}	0.67±0.05 ^{bA}	8.49±0.82 ^{dA}	13.72±0.68 ^{dB}	13.64±1.62 ^{dB}
ET 0.75%	0.78±0.02 ^{cB}	0.70±0.03 ^{cA}	0.64±0.05 ^{bA}	5.80±0.57 ^{cA}	5.34±0.24 ^{bA}	7.34±1.28 ^{cB}
ET 1.00%	0.77±0.03 ^{dB}	0.71±0.07 ^{cB}	0.59±0.04 ^{cA}	4.74±0.41 ^{bA}	7.50±0.0.90 ^{cA}	8.73±0.83 ^{cB}

Las distintas letras ^{A, B, C} en la misma fila indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los tiempos de almacenamiento (0, 7 y 14 días)

Las distintas letras ^{a, b, c} la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los tratamientos elaborados con extracto de hoja y tallo a distintas concentraciones
 Tratamientos= C(control), ET (Extracto de Tallo), EH (Extracto de Hoja)

La masticabilidad es definida como la fuerza necesaria (N) para masticar un alimento hasta el estado que pueda tragarse (Torres et al., 2015). En el cuadro 13 se muestran los resultados obtenidos de la medición de este parámetro en los distintos días de evaluación en los diferentes tratamientos, donde las muestras elaboradas con los extractos de tallo y hoja a diferentes concentraciones presentaron mayor masticabilidad en comparación al control. El tratamiento ET 1.00% fue el que mayor fuerza requirió al final de la evaluación (día 14) mientras que el control requirió la menor fuerza necesaria en la medición. Este parámetro evaluado presentó una tendencia a incrementar conforme el paso del tiempo, debido a que la masticabilidad tiene relación directa con otros parámetros de textura como lo son la dureza, la cohesividad y la elasticidad, variables que se ven afectadas en una estructura proteínica como lo es un queso, que sufre diversos cambios físicos y químicos, como la pérdida de humedad (sinéresis), el incremento de la materia grasa y proteína. Los resultados obtenidos fueron similares de acuerdo a los obtenidos por Guzman et al. (2015) donde evaluó en diferentes tiempos (1, 6, 12 y 18 días) la masticabilidad de quesos, resultando que a los 18 días los quesos elaborados con leche de vaca y cabra contaban con una dureza de 20.98 N y 25.91 siendo similares a los resultados obtenido de los distintos tratamientos ET 0.75 %, EH 0.75 %, y EH 1.0% (22.24, 58.96, 31.35 y 37.28).

Cuadro 13. Masticabilidad en los quesos tipo panela elaborados con extracto de ortiga en los diferentes tiempos de maduración

Tratamiento	Masticabilidad		
	0	7	14
C	7.74±0.46 ^{Aa}	11.42±1.13 ^{aB}	10.08±2.02 ^{Ab}
H 0.75%	16.91±1.88 ^{Ba}	20.24±1.84 ^{bB}	22.59±2.34 ^{bB}
H 1.0%	35.59±3.11 ^{Ea}	57.01±3.20 ^{dB}	58.96±6.94 ^{dB}
T 0.75%	24.70±2.54 ^{Da}	22.32±1.31 ^{bA}	31.35±5.13 ^{cB}
T 1.0%	20.18±1.67 ^{Ca}	31.11±3.59 ^{cB}	37.28±3.58 ^{cB}

Las distintas letras ^{A, B, C} en la misma fila indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los tiempos almacenamiento (0, 7 y 14 días)

Las distintas letras ^{a, b, c} en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los tratamientos elaborados con extracto de hoja y tallo a distintas concentraciones

Tratamientos= C (control), ET (Extracto de Tallo), EH (Extracto de Hoja)

5.8 Análisis de color

En el cuadro 14 se muestran los resultados obtenidos en la prueba de color de los quesos tipo panela elaborados con distintos extractos vegetales a diferentes concentraciones (EH 0.75%, EH 1.0%, ET 0.75% y ET 1.0%) y el control (C), donde se puede observar los parámetros L* (Luminosidad), a* (rojo a verde) y b* (Amarillo a azul).

De acuerdo con los resultados obtenidos, los tratamientos EH (0.75 % y 1.0 %) presentaron los valores más bajos en los distintos tiempos de evaluación (0, 7 y 14 días) en el parámetro L* (76.50 y 76.90 respectivamente) en comparación de los demás tratamientos existiendo diferencias significativas ($p < 0.05$), lo cual indica que los tratamientos elaborados con EH tienden a ser más oscuros es decir menos luminosos. La posible razón que los tratamientos de EH hayan presentado menor luminosidad, se le atribuye a que los extractos presentaban un color verde oscuro en comparación del ET que era un verde claro, y el control. En consecuencia, la adición de estos a distintas concentraciones, pigmentaba la leche de color verde, debido a la posible presencia de clorofilas que pudiesen ser concentradas durante el proceso durante la obtención de los extractos, resultando quesos de color verde. Los resultados de los valores obtenidos en el parámetro L* de los tratamientos coagulados con extracto de tallo (0.75 y 1.0%) fueron similares a los reportados por García et al. (2012), ya que los tratamientos ET 1.0% y 0.75% presentaron valores (L*) de 88.42 y 90.18 respectivamente, mientras que los resultados de García et al. (2012) fueron de 87.95 y 89.42 en quesos elaborados con leche de cabra coagulados con extracto de *Cynara Cardunculus sp cardunculus* y *Cynara Cardunculus sp flavescens*. De tal manera que, los valores de L* en los tratamientos de hoja en las distintas concentraciones (0.75 y 1.00%) fueron inferiores (77.22 y 77.02) en comparación de los ya mencionados. Por otra parte, para los valores de b* durante los tiempos de evaluación (0, 7 y 14 días) se puede observar que, el tratamiento control presentó el menor valor, lo que significa que tiende al color azul en comparación de los tratamientos elaborados con los distintos extractos (ET y EH) los cuales al presentar un valor mayor en el parámetro b y de acuerdo al espacio de

color CIELab significa una tendencia al color amarillo, existiendo diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los tratamientos a los distintos tiempos de evaluación. Los valores obtenidos en el parámetro b^* de los tratamientos elaborados con extracto de tallo y hoja presentan similitud con los quesos elaborados en el trabajo de investigación de Olson et al. (2011) donde monitorean el color de queso tipo Chihuahua, obteniendo valores en el parámetro b^* de 20.6 mientras que los EH y ET a distintas concentraciones (0.75% y 1.0%) se obtuvieron valores similares (14.13, 16.20, 18.78 y 18.10 respectivamente).

Para los resultados del parámetro a^* los tratamientos elaborados con extracto de hoja (0.75 y 1.0%) presentaron valores negativos en comparación de los demás tratamientos, de acuerdo al espacio de color CIELab los valores negativos indican una tendencia al color verde, mientras que valores positivos indican tendencia al color azul. Por lo que se observan diferencias significativas ($p < 0.05$) de los tratamientos obtenidos con el EH (0.75% y 1.0%) en comparación de los demás tratamientos, esto es debido a que los extractos de hoja presentan un color verde intenso producido por diversos compuestos que generan la pigmentación verdosa en el extracto siendo la clorofila uno de ellos, componente presente en cualquier planta. Los tratamientos con extracto de tallo no presentaron color verde a diferencia de los elaborados con extracto de hoja, donde se obtuvieron valores positivos (0.50 y 0.72) no existiendo diferencias significativas entre el tratamiento elaborado con extracto de tallo (0.75%) y control. Resultados similares han sido obtenidos por García et al. (2012) donde elaboraron distintos tratamientos con coagulantes vegetal obtenido de la *Cynara Cardunculus sp cardunculus* y *Cynara Cardunculus sp flavescens* sin presentar diferencias significativas ($p < 0.05$) con el tratamiento elaborado con coagulante de origen animal en la medición del parámetro a^* .

Cuadro 14. Análisis de color de los distintos tratamientos de queso tipo panela elaborado con los extractos vegetales de tallo y hoja de la ortiga

Tratamiento	L*			a			b		
	0	7	14	0	7	14	0	7	14
C	92.02±0.65 ^{cA}	91.88±0.65 ^{Ca}	92.02±0.65 ^{cA}	0.52±0.08 ^{aA}	0.45±0.01 ^{aB}	0.43±0.04 ^{aB}	12.97±0.40 ^{aA}	12.27±0.60 ^{aA}	13.87±0.30 ^{aB}
T 1.0%	88.42±0.45 ^{bA}	89.82±1.20 ^{Ba}	88.42±0.65 ^{bA}	0.65±0.04 ^{aB}	0.72±0.02 ^{bC}	0.60±0.02 ^{bA}	16.20±0.40 ^{bA}	15.91±0.30 ^{bA}	16.44±0.60 ^{bA}
T 0.75%	90.18±0.35 ^{bcA}	91.32±0.35 ^{bcB}	90.18±0.65 ^{bA}	0.60±0.02 ^{aC}	0.50±0.06 ^{aB}	0.48±0.03 ^{aA}	14.13±0.60 ^{aA}	15.18±0.80 ^{bB}	14.17±0.30 ^{aA}
H 1.0%	77.22±0.70 ^{aA}	76.90±0.50 ^{Aa}	77.50±0.65 ^{aA}	-3.36±0.30 ^{bA}	-3.20±0.4 ^{dA}	-3.24±0.30 ^{dA}	18.78±0.80 ^{cA}	18.99±0.30 ^{cA}	18.62±0.90 ^{cA}
H 0.75%	77.02±0.0 ^{aA}	76.50±0.45 ^{Aa}	77.82±0.65 ^{aA}	-3.35±0.30 ^{bB}	-2.89±0.10 ^{cA}	-2.62±0.10 ^{cA}	18.10±0.40 ^{cA}	18.66±0.30 ^{cA}	17.2±0.50 ^{bA}

Las distintas letras ^{a, b, c} en la misma columna indican diferencias significativas (p<0.05) entre los tratamientos elaborados con extracto de hoja y tallo a distintas concentraciones

Las distintas letras ^{A, B, C} en la misma fila indican diferencias significativas (p<0.05) entre los tiempos almacenamiento (0, 7 y 14 días)

Tratamientos= C (control), ET (Extracto de Tallo), EH (Extracto de Hoja)

L*: Luminosidad, a: rojo a verde, b: amarillo a azul.

5.9 Análisis microbiológicos en los quesos tipo panela

En el cuadro 15 se muestran los recuentos microbianos totales (log UFC g⁻¹ de queso) en los medios de cultivo MacConkey, Papa dextrosa (PDA), Agar nutritivo, Sal y manitol y MRS durante el almacenamiento de los tratamientos elaborados con los extractos vegetales a diferentes concentraciones (EH 0.75%, EH 1.0%, ET 0.75% y ET 1.0%) y el control.

Los resultados obtenidos en el conteo de UFC en el agar MacConkey de los distintos tratamientos muestra que a los diferentes tiempos (0, 7 y 14 días) presentaron un incremento gradual en la concentración de bacterias, existiendo diferencias significativas ($p < 0.05$). Apreciando que, la concentración de bacterias al día 0 y 7 en los EH y ET al 0.75% y 1.0% fueron inferiores al control (> 2.45 log UFC g⁻¹), sin embargo, al día 14 el EH 0.75% mostró la menor concentración de bacterias respecto a los demás tratamientos, existiendo diferencias significativas. La posible razón de que la concentración de bacterias en los EH y ET haya sido inferior al control puede atribuirse a la temperatura, ya que los tratamientos excepto el control necesitan 90 °C para llevar a cabo la coagulación, propiciando una posible disminución en la carga microbiana debido a que microorganismos que crecen en el medio de cultivo MacConkey son bacterias mesófilos (37°C) lo que es importante debido a que en la industria alimentaria, la contaminación biológica es uno de los principales factores de intoxicación en los consumidores además de que los productos lácteos son un excelente medio nutritivo para la proliferación de microorganismos debido a su alto contenido de nutrientes (Carbohidratos, grasa, proteínas etc.) (Delgado & Torres, 2003).

De acuerdo a la investigación de Vioque et al. (2000) donde utilizaron los extractos de *Cynara cardunculus* y *Cynara humilis* para la coagulación de la leche y la obtención de queso, presentaron concentraciones de (6.66 y 6.39 log UFC/ g⁻¹) en comparación con ET y EH en sus distintas concentraciones (2.32, 2.20, 1.97 y 2.20 UFC/ g⁻¹) donde se puede interpretar que los extractos crudos no confieren alguna contaminación.

Respecto a los resultados obtenidos en el medio PDA en los distintos tratamientos (EH 0.75%, EH 1.0%, ET 0.75% y ET 1.0%) y el control, se observa que al día 0 y 7 existieron diferencias significativas entre los tratamientos, a diferencia del día 14 donde el tratamiento EH 1.0 % respecto a los demás tratamientos, mostrando la mayor cantidad de bacterias ($2.36 \log \text{ UFC g}^{-1}$) respecto a los demás tratamientos. Cabe mencionar que la posible concentración de hongos y levaduras en cada uno de los tratamientos durante todo el periodo de evaluación (0, 7 y 14 días) permaneció dentro del límite máximo permisible de hongos y levaduras ($2.69 \log \text{ UFC g}^{-1}$) en quesos frescos esto de acuerdo a la (NOM-243-SSA1-2010)

Se puede observar que la concentración de bacterias en el medio de cultivo estándar en los tratamientos EH y ET en distintas concentraciones, presentaron diferencias significativas ($p < 0.05$) respecto al control, debido a que el control presentó la menor concentración de células ($1.38 \text{ Log UFC g}^{-1}$) en comparación con los demás tratamientos. Se aprecia que conforme el paso del tiempo la concentración de bacterias fue aumentando en cada uno de los tratamientos. Al final de la evaluación (día 14) se interpreta o que no existieron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los distintos tratamientos. La presencia de bacterias mesofilos aerobias crecen regularmente en el medio de cultivo estándar y engloban una gran gama de microorganismos (hongos, levaduras y *Enterobacteriaceae*) que crecen a temperatura de $37 \text{ }^\circ\text{C}$ y muchas de ellas nocivas para el consumidor. Haciendo alusión a las bacterias mesofilos al final de la evaluación fue de $2.45 \text{ Log UFC g}^{-1}$ (H 0.75%) y una concentración mínima de $2.21 \text{ Log UFC g}^{-1}$ (Control). Si bien, en México la secretaria de Salud, específicamente en la NOM-243-SSA1-2010, no menciona una especificación Máxima permisible para mesofilos aerobios en queso frescos.

Cuadro 15. Análisis en agar MacConkey, Papa Dextrosa y cultivo estándar en los quesos tipo panela elaborados con extracto de tallo y hoja a distintas concentraciones a los 0, 7 y 14 días.

Tratamiento	MacConkey (log UFC g ⁻¹)			Papa Dextrosa (log UFC g ⁻¹)			Cultivo estándar (log UFC g ⁻¹)		
	0	7	14	0	7	14	0	7	14
C	1.73±0.05 ^{Ba}	2.45±0.03 ^{bB}	2.34±0.05 ^{aB}	1.77±0.00 ^{abA}	1.86±0.12 ^{abB}	2.03±0.05 ^{aC}	1.38±0.12 ^{aA}	2.25±0.03 ^{aB}	2.21±0.11 ^{aB}
T 0.75%	0.0±0.00 ^{Aa}	2.05±0.08 ^{aB}	2.32±0.05 ^{aC}	1.53±0.08 ^{Aa}	1.69±0.00 ^{aB}	2.06±0.02 ^{aC}	2.08±0.08 ^{bA}	2.35±0.04 ^{aA}	2.31±0.04 ^{aA}
T 1%	1.15±0.21 ^{Ba}	1.95±0.08 ^{aB}	2.20±0.03 ^{aC}	1.92±0.24 ^{Ba}	2.15±0.06 ^{cB}	2.22±0.07 ^{abC}	2.21±0.35 ^{bA}	2.49±0.02 ^{bB}	2.36±0.18 ^{aB}
H 0.75%	0.0±0.00 ^{Aa}	1.77±0.10 ^{cB}	1.97±0.03 ^{bC}	1.95±0.03 ^{bcA}	1.99±0.06 ^{bcA}	2.07±0.05 ^{aB}	2.05±0.08 ^{bA}	2.24±0.05 ^{aB}	2.45±0.12 ^{aA}
H 1%	1.53±0.33 ^{Ba}	2.05±0.08 ^{aB}	2.20±0.07 ^{aC}	2.20±0.07 ^{Ca}	2.21±0.01 ^{cA}	2.36±0.05 ^{bB}	2.20±0.07 ^{bA}	2.31±0.01 ^{aB}	2.42±0.09 ^{aB}

Las distintas letras ^{A, B, C} en la misma fila indican diferencias significativas (p<0.05) entre los tiempos de almacenamiento (0, 7 y 14 días)

Las distintas letras ^{a, b, c} en la misma columna indican diferencias significativas (p<0.05) entre los tratamientos elaborados con extracto de hoja y tallo a distintas concentraciones

Tratamientos= C (control), ET (Extracto de Tallo), EH (Extracto de Hoja)

En el cuadro 16 se muestra los resultados obtenidos en el medio de sal y manitol en los tratamientos elaborados con el EH y ET a diferentes concentraciones y el control, se puede observar que al día 0 en los tratamientos de ET 0.75% y 1.00% no se observó el crecimiento de UFC (Unidades Formadoras de Colonia), no obstante fue así para los demás tratamientos, siendo los elaborados con EH 0.75, 1.0% y el control, donde se presentó el desarrollo y crecimiento de UFC mostrando diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los tratamientos. De igual manera también se observa que conforme transcurrió el tiempo, la mayoría de los tratamientos presentaron la tendencia a incrementar la concentración de bacterias, excepto en los tratamientos de hoja y tallo a 1.0% donde se observa una ligera disminución de la presencia de UFC. Por otra parte, al finalizar la evaluación (día 14) el control y el EH 0.75% fueron aquellos que tuvieron mayor proliferación de bacterias. De forma complementaria respecto a los resultados obtenidos, la disminución de UFC en los tratamientos elaborados con extracto de tallo y hoja al 1.0% pudo deber a factores, de acuerdo con Roberts et al. (2005), las vacas lecheras son susceptibles a padecer mastitis, enfermedad que alberga una fuente importante de bacterias enterotoxigénicas *Staphylococcus aureus*, que contaminan la leche y son inhibidas con la pasteurización o el incremento de la acidez en el medio. Los quesos con baja acidez (quesos frescos) deben ser analizados para determinar la presencia de esta bacteria, Sin embargo, *Staphylococcus* al ser sensible a la acidez esta se ve eliminada durante la maduración de los quesos debido al incremento de ácido láctico generado por otro tipo de bacterias como lo son las bacterias ácido lácticas. Es interesante observar que en todos los tratamientos elaborados con los extractos vegetales no favorecen un efecto adverso en la concentración de bacterias de los tratamientos, manteniendo concentraciones de microorganismos similares a los elaborados con un coagulante de origen animal. Los resultados son favorables que de acuerdo al trabajo de Galán et al. (2012) donde elaboraron 3 diferentes tipos de queso con leche de oveja, utilizando cuajo animal como agente coagulante, extracto vegetal de la *Cynara cardunculus*, y una mezcla 50-50%, la concentración de *Staphylococcus* para el tratamiento elaborado con extracto vegetal presentó un valor de 4.4 Log UFC g⁻¹ al segundo día de su elaboración, mientras que los

tratamientos elaborados con extracto de ortiga (Tallo y hoja) la máxima concentración que se alcanzó fue de 2.31 Log UFC⁻¹ a los 14 días de su almacenamiento.

Como se puede observar en el mismo cuadro 16 se exponen los resultados del conteo de bacterias ácido lácticas (BAL) en los tratamientos elaborados con extracto de hoja y tallo. Se puede apreciar que al día cero la presencia de BAL en los tratamientos con el EH y ET son inferiores en comparación al tratamiento control el cual presentó la mayor presencia de bacterias log UFC 2.20 g⁻¹ manteniendo esta tendencia hasta la finalización de la experimentación. La posible causa de que la presencia de BAL haya sido inferior al control es atribuido a la temperatura a la cual se somete la leche por un periodo de tiempo considerable ya que las BAL son organismos mesofilos y temperaturas mayores a los 50°C dañan considerablemente la concentración de estas bacterias productoras de ácido láctico ya que de acuerdo a Galán et al. (2012) la presencia de ácido láctico ayuda a inhibir el crecimiento de ciertas bacterias patógenas sensibles al pH ácido.

Cuadro 16 Análisis en el medio de cultivo sal y manitol y MRS en los quesos tipo panela elaborados con extracto de tallo y hoja a distintas concentraciones a los 0, 7 y 14 días.

Tratamiento	<i>Sal y Manitol</i> (log UFC g ⁻¹)			<i>MRS</i> (log UFC g ⁻¹)		
	0	7	14	0	7	14
C	1.80±0.14 ^{bcA}	2.25±0.06 ^{cb}	2.31±0.04 ^{cb}	2.20±0.07 ^{ba}	2.62±0.09 ^{cb}	2.89±0.05 ^{cc}
T 0.75%	0.00±0.00 ^{aA}	1.86±0.12 ^{abB}	2.31±0.02 ^{cc}	1.73±0.05 ^{aA}	2.07±0.05 ^{aB}	2.43±0.05 ^{bc}
T 1.0%	0.00±0.00 ^{aA}	2.17±0.08 ^{bcB}	2.07±0.04 ^{aB}	1.84±0.00 ^{aA}	2.28±0.04 ^{bB}	2.50±0.05 ^{bB}
H 0.75%	1.23±0.33 ^{ba}	1.77±0.10 ^{aB}	2.20±0.07 ^{bc}	1.58±0.15 ^{aA}	2.20±0.03 ^{bB}	2.33±0.04 ^{aC}
H 1.0%	1.95±0.00 ^{ca}	2.03±0.05 ^{abcB}	1.97±0.03 ^{aAB}	1.65±0.06 ^{aA}	2.28±0.04 ^{bB}	2.32±0.10 ^{aB}

Las distintas letras ^{A, B, C} en la misma fila indican diferencias significativas (p<0.05) entre los tiempos de maduración (0, 7 y 14 días)

Las distintas letras ^{a, b, c} en la misma columna indican diferencias significativas (p<0.05) entre los tratamientos elaborados con extracto de hoja y tallo a distintas concentraciones

Tratamientos= C (control), ET (Extracto de Tallo), EH (Extracto de Hoja)

5.10 Actividad Proteolítica

Como se observa en las figuras 7 y 8 se observa los valores obtenidos de la actividad proteolítica y los porcentajes de la estabilidad de las enzimas presentes en los ET y EH de la planta de ortiga (*Euphorbiaceas Cnidoscolus aconitifolius*) con una concentración de proteína en los extractos de 87.3 mg/mL para tallo y 86.88 mg/mL hoja.

Las actividades de las proteasas presentes en los dos tipos de extractos fueron evaluadas en un rango de 6 a 10 en la escala de pH para determinar la estabilidad de la enzima y su actividad proteolítica presente en los ET y EH que genera la coagulación de la leche. De acuerdo a los resultados obtenidos la enzima mostró una variación en su estabilidad de acuerdo al pH, esto se vio reflejado en la actividad proteolítica de los extractos, De tal manera que se obtuvieron resultados donde se muestra en la figura 7 que el ET a un pH 6 presenta la mayor actividad proteolítica (23.47 U/g) caso contrario ocurre cuando la enzima se encuentra a un pH 10 donde disminuye su actividad proteolítica y por ende pierde estabilidad la enzima (17.53 U/g). De igual forma EH mostró la misma tendencia mostrando la mayor actividad proteolítica (21.11 U/g) a un pH 6 y disminuyendo dicha actividad conforme el pH aumentó mostrando una menor estabilidad de la enzima aspártica de EH (16.2 U/g) a pH 10 siendo inferior a la actividad proteolítica del ET. En la figura 8 la estabilidad de la enzima fue representada en porcentaje donde de manera arbitraria fue representado como 100 % la estabilidad del ET a pH 6, cabe destacar que los ET y EH a diferente pH fue comparado respecto al 100 %, con base en ello, la asignación del porcentaje a cada una de las distintas actividades. Por otra parte, el EH muestra la misma tendencia a decrecer su estabilidad de la enzima conforme el pH aumenta. Los resultados de la actividad proteolítica presentados con anterioridad en las figuras 7 y 8 de acuerdo a la bibliografía consultada, fueron similares a los obtenidos por Sun et al. (2016) donde realizaron una recopilación de la actividad proteolítica de 90 plantas y frutas con la capacidad de coagular la leche, en las cuales algunas presentaron actividades relativamente mayores (*Actinidiaceae* 28.8 U/g pH 4) y otras bajas (*Sapotacea* 3.8 U/g pH 7.5), de igual manera es el caso de acuerdo con

Chalabi et al. (2014) el extracto obtenido de papaya con 23.1 U/g dato muy similar a los obtenidos en el extracto de tallo y hoja de la ortiga (23.47 y 21.11 U/g respectivamente). Por lo que la actividad proteolítica del extracto de tallo y hoja es muy favorable para la coagulación de la leche ya que los valores más altos se suscitan en un pH de 6 siendo óptimo ya que la leche cuenta con un pH promedio de 6.5.

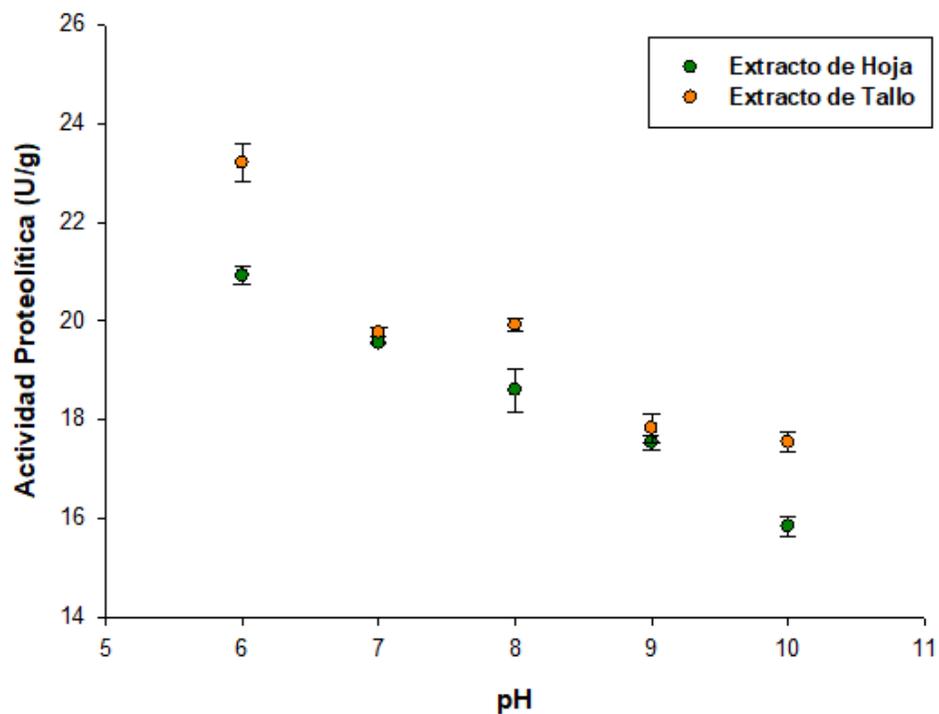


Figura 7. Actividad proteolítica de los extractos de tallo y hoja de la ortiga (*Euphorbiace Cnidoscolus aconitifolius*).

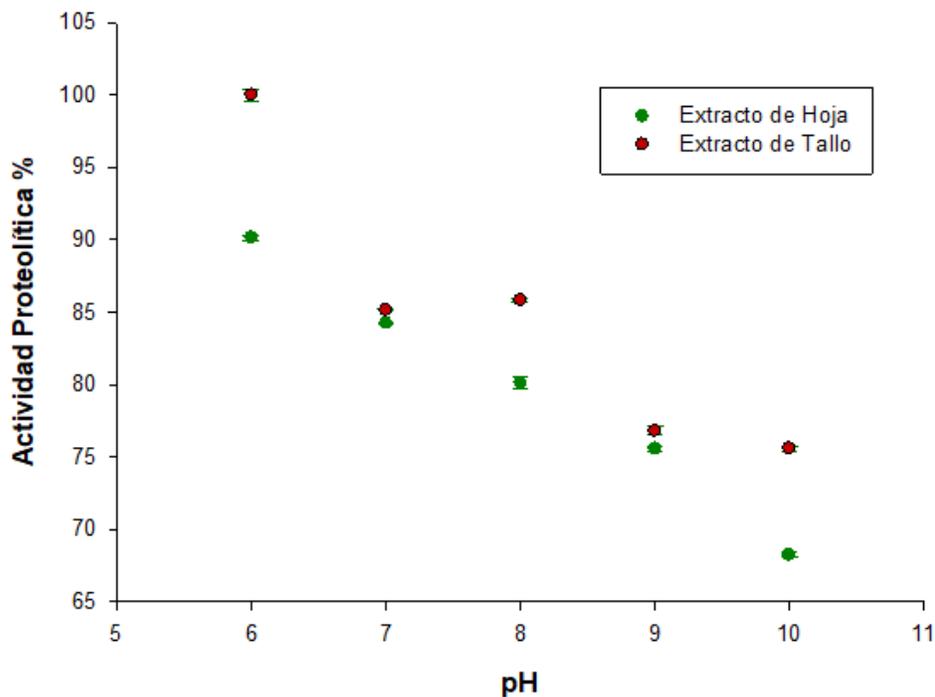


Figura 8. Estabilidad de los ET y EH (*Euphorbiace Cnidocolus aconitifolius*)

5.11 Electroforesis SDS PAGE y Zimograma

Para realizar la caracterización parcial de los EH y ET se realizó una electroforesis SDS PAGE en conjunto con la técnica Zimográfica para determinar el número de proteínas presentes en los extractos, el peso molecular aproximado además de identificar las proteínas con carácter proteolítico es decir la capacidad de hidrolizar la caseína. En la figura 9 se muestra el gel de poliacrilamida donde se pueden apreciar 8 bandas de color azul y color café, donde cada banda indica la presencia de una proteína las cuales fueron separadas con ayuda de la electroforesis SDS PAGE, de igual manera se muestra un marcador de peso molecular en un rango de 6.5 kDa a los 65 kDa esto con el fin de estimar el peso molecular (PM) de las proteínas presentes en los extracto, los cuales fueron revelados con el colorante azul de coomassie y un kit de plata sigma. Las condiciones específicas de la técnica se muestran en el apartado de materiales y métodos. Los ET y EH contaban con

una cantidad de proteína de 87.3 mg/mL y 86.88 mg/mL respectivamente, las muestras se colocaron en los distintos pozos donde se aprecia en la figura 10a que ET presentó 9 proteínas las cuales se ven reflejadas como bandas horizontales azules, mientras que 6 de ellas presentaron un peso molecular aproximado de 32 a 65 kDa como se muestra en la figura 10a, mientras que el extracto de hoja mostró 7 distintas bandas siendo 4 de estas cuyo peso molecular osciló entre los 22 kDa y los 65 kDa, En la figura 10b se reveló el gel de poliacrilamida con un kit de plata de la marca Sigma Aldrich ya que este método actúa con mayor sensibilidad en concentración menores a los 10 ng de proteína, debido que el colorante azul de comassie no se fijaba en algunas proteína presentes en EH, donde se reveló una proteína con peso molecular aproximado de 31 kDa, la poca nitidez específicamente de esta proteína se atribuye a la baja concentración de esta proteína en el extracto.

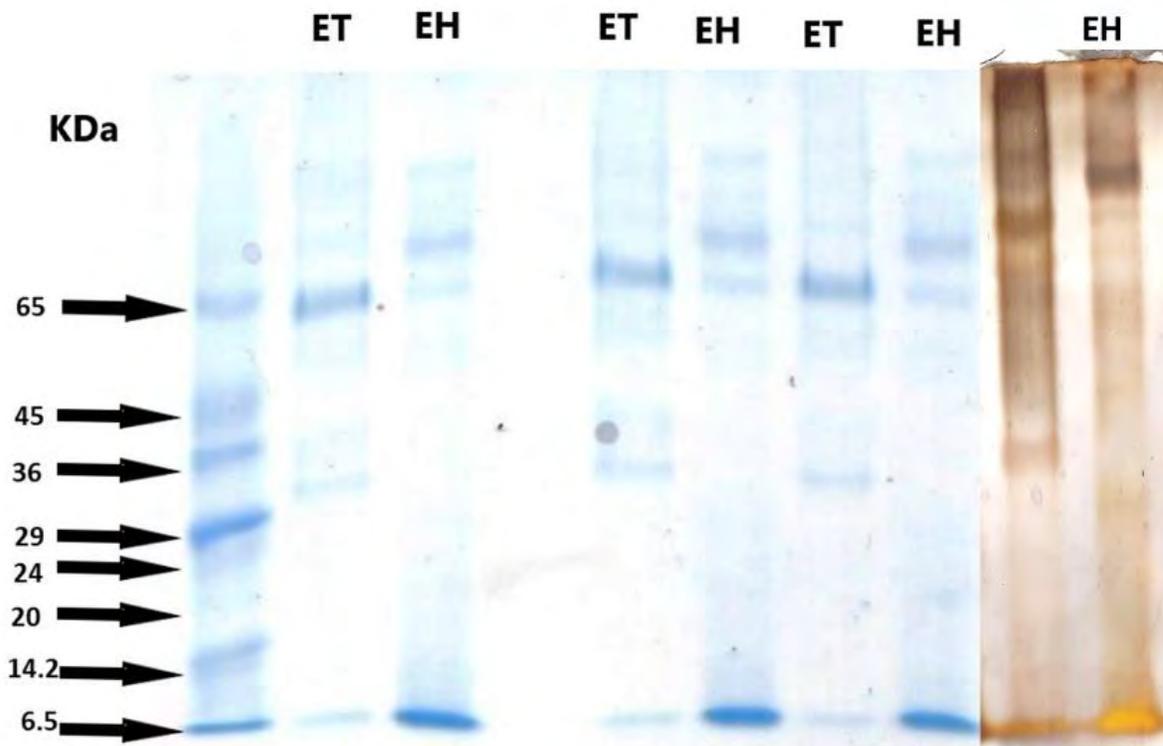


Figura 9. Electroforesis en gel de poliacrilamida SDS PAGE para las muestras de extracto de tallo y hoja de la ortiga. EH: extracto de hoja; ET: extracto de Tallo

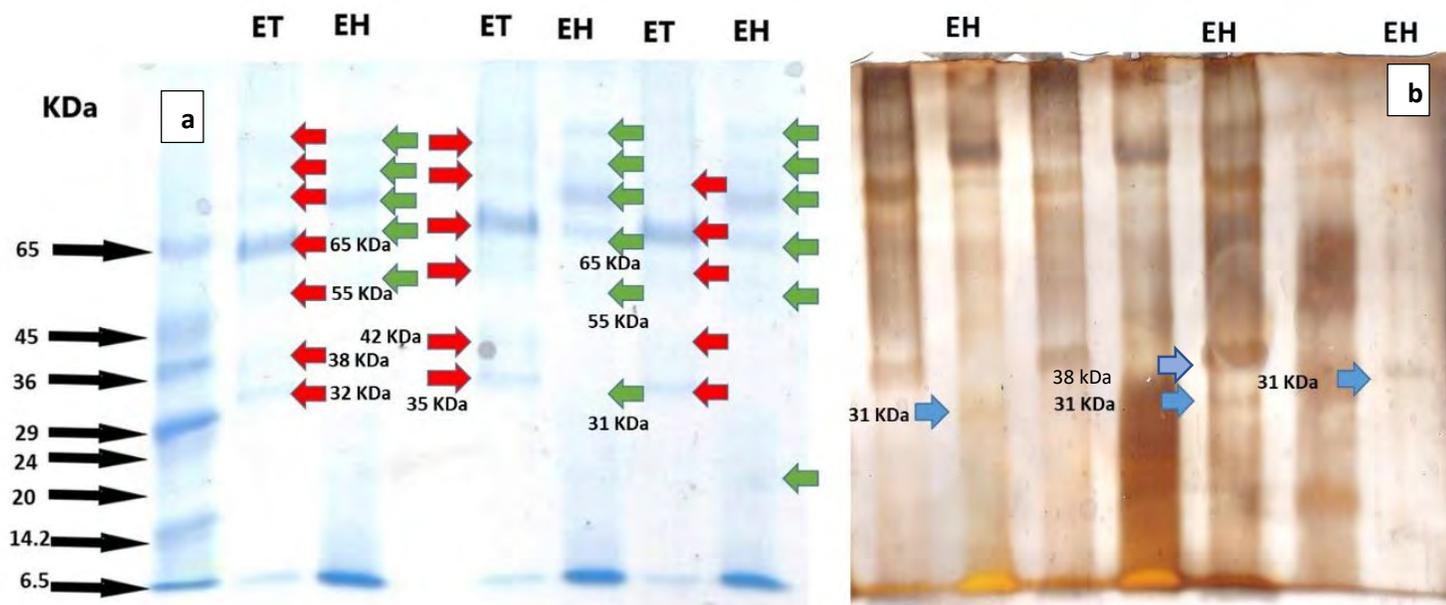


Figura 10. Estimación de pesos molecular de las proteínas presentes en el extracto de tallo y hoja de la ortiga por medio de electroforesis en gel de poliacrilamida SDS PAGE. EH: extracto de Hoja; ET: extracto de Tallo.

Una vez reveladas las distintas proteínas en los ET y EH, se procedió a identificar el carácter proteolítico de las proteínas presentes en los extractos, y a su vez caracterizar el peso molecular y el número de enzimas presentes. En la figura 10 muestra el Zimograma obtenido donde las muestras de ET y EH fueron colocados en los espacios ubicados en la parte superior denominados pozos, y el espacio conocido como carril que desde el pozo hasta la parte inferior del gel se puede apreciar que las muestras del ET y EH revelaron un espacio denominado “zona clara” en el Zimograma, donde el azul de comassie no se fija debido a que al someter el gel en un baño de caseína a un pH y temperatura óptimo de la enzima proteolítica, causará que ésta hidrolice la proteína de la solución mostrando el espacio donde se encuentre ubicada en gel, debido a que en el gel de poliacrilamida no se fija la proteína de la solución evitando el teñimiento del colorante azul de comassie. Una vez que se revelaron las zonas claras en el gel ya teñido con el azul de comassie se compara con la electroforesis en gel de poliacrilamida SDS PAGE donde se separaron las distintas proteínas y estimó su peso molecular con ayuda

de un marcador de peso molecular para identificar el número de enzimas y la caracterización de ellas. De acuerdo a los pesos moleculares, resultó que ET cuenta con aproximadamente 6 proteínas del carácter proteolítico, debido a que esta zona clara cuenta con un tamaño aproximado desde los 32kDa hasta los 65 KDa ubicando 6 proteínas en este rango de pesos moleculares. Por otra parte, para el EH se pueden apreciar de igual una zona clara, pero a menor intensidad y tamaño, estas zonas claras se interpolan en un rango de 31 KDa a 38 KDa donde se encuentran localizadas dos proteínas, mostrando que el ET cuenta con más proteínas proteolíticas en comparación del EH. De acuerdo con los resultados obtenidos se afirma la presencia de enzimas de carácter proteolítico en los extractos, es por ello que los extractos vegetales son capaces de realizar el hidrolisis de la caseína de la leche y por ende la coagulación para la formación de un queso. Los resultados obtenidos en la estimación del peso molecular y el número de proteínas proteolíticas tienen similitud con literatura ya reportada, tal es el caso en el trabajo de investigación de Puglisi et al. (2014) donde identificaron en el jugo de kiwi enzimas con carácter proteolítico con un peso molecular aproximado de 27.8, 25.8, y 31.7 KDa. Por otra parte, en el estudio realizado por Nasr et al. (2016) donde realizaron una pre caracterización del extracto de *Helianthus anus* identificaron enzimas que iban desde los 62.5 KDa hasta los 120 KDa.

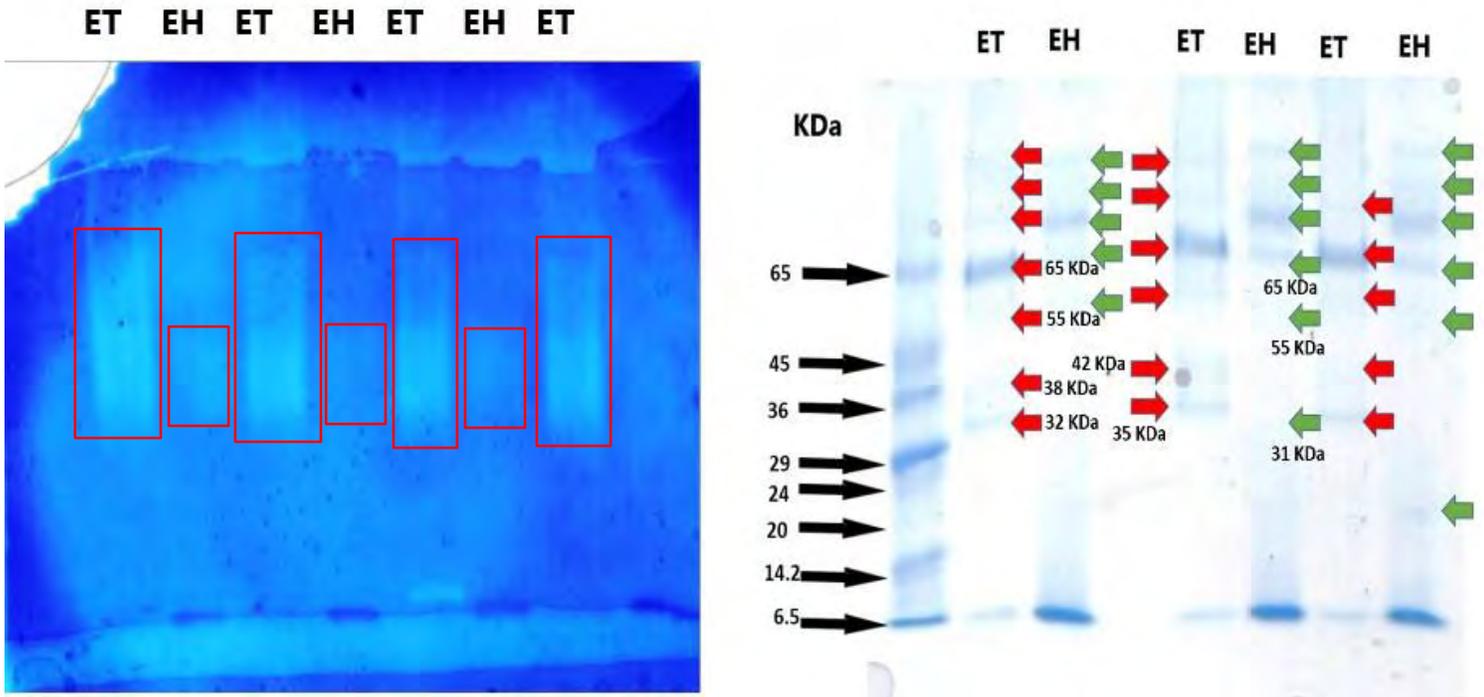


Figura 11. Zimograma y electroforesis en gel de poliacrilamida SDS PAGE EH: Extracto de Hoja; ET: extracto de Tallo.

6 Conclusiones

- La ortiga presenta una elevada cantidad de proteína en su estructura tanto en tallo (8.63%) y hoja (6.40%), siendo el tallo el de mayor porcentaje.
- Los extractos vegetales (tallos y hojas) a concentraciones de 0.75% y 1.00%, fueron los que tuvieron los mejores resultados de coagulación en la leche presentando un menor tiempo respecto al control elaborado con quimosina.
- En los análisis físico-químicos se observó que los quesos elaborados con el ET 1.00% y EH 0.75% presentaron el menor porcentaje de humedad (56.67%) mostrando diferencia significativa entre los demás tratamientos ($p < 0.05$). Respecto al porcentaje de proteína el ET 1% mostró el mayor contenido de proteína (20.13%). El tratamiento con el extracto de hoja (0.75%) presentó los porcentajes más altos en contenido de grasa (21.5%).
- El control mostró los valores más altos de acidez (1.12%) y una A_w (0.93) mientras que en el parámetro de pH no hubo diferencias significativas al final de la evaluación.
- En análisis de Perfil de Textura (APT) todos los tratamientos elaborados con el EH y ET mostraron un incremento en la dureza y la adhesividad conforme el paso del tiempo, de igual manera en el parámetro de masticabilidad y la gomosidad. El tratamiento elaborado con EH 1.0% fueron los que presentaron la mayor dureza (20.1N), gomosidad (13.64), adhesividad (0.32 mJ) y masticabilidad (58.96).
- En los análisis microbiológicos se obtuvieron resultados satisfactorios debido a que los tratamientos de ET y EH a diferentes concentraciones (0.75% y 1.0%) no fueron superiores a la concentración bacteriana del tratamiento control elaborado con cuajo animal, por lo que se atribuye que el extracto vegetal no incorpora células bacterianas que pudiesen alterar la inocuidad de los quesos tipo panela.
- En la caracterización de los extractos vegetales se determinó que la actividad proteolítica y estabilidad de la enzima a un pH 6 es el más adecuado para realizar la coagulación, debido a los resultados obtenidos en los ET y EH (23.47 U/g y 21.11 U/g) además de la identificación de las proteínas de

carácter proteolítico (proteasas) que se encuentran en el extracto de tallo, identificando 6 que oscilan en un peso molecular entre los 32kDa hasta los 65 KDa mientras que el extracto de hoja presentó dos enzimas proteolíticas entre los 31 KDa y 38 KDa.

6. Referencias

- AOAC. (1997). Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemist International. Method 923.03.
- AOAC. (1997). Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemist International. Method 957.01
- AOCS. (1993). Official Methods and Recommended Practices of the American oil Chemists society.4th Ed. Champaign.
- Ahmed, I. A. M., Morishima, I., Babiker, E. E., & Mori, N. (2009). Characterisation of partially purified milk-clotting enzyme from *Solanum dubium* Fresen seeds. *Food Chemistry*, 116(2), 395-400. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.11.072>
- Beka, R. G., Krier, F., Botquin, M., Guiama, V. D., Donn, P., Libouga, D. G., Vercaigne-Marko, D. (2014). Characterisation of a milk-clotting extract from *Balanites aegyptiaca* fruit pulp. *International Dairy Journal*, 34(1), 25-31. doi: <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2013.06.013>
- Beresford, T., & Williams, A. (2004). The microbiology of cheese ripening. *Cheese: chemistry, physics and microbiology*, 1, 287-318.
- Beresford, T. P., Fitzsimons, N. A., Brennan, N. L., & Cogan, T. M. (2001). Recent advances in cheese microbiology. *International Dairy Journal*, 11(4), 259-274. doi: [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(01\)00056-5](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(01)00056-5)
- Berk, Z. (2018). Chapter 23 - Freeze drying (lyophilization) and freeze concentration *Food Process Engineering and Technology (Third Edition)* (pp. 567-581): Academic Press.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1), 248-254. doi: [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Broome, M. C., & Limsowtin, G. K. Y. (1998). *Milk coagulants* Aus. *Journal Dairy Technology*. 53: 188–190.

- Brunner, J. R. (1981). Cow Milk Proteins: Twenty-Five Years of Progress¹. *Journal of Dairy Science*, 64(6), 1038-1054. doi: [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(81\)82682-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(81)82682-3)
- Bryant, A., Ustunol, Z., & Steffe, j. (2005). Texture of Cheddar Cheese as Influenced by Fat Reduction. *Journal of Food Science*, 60(6), 1216-1219. doi: [doi:10.1111/j.1365-2621.1995.tb04559.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1995.tb04559.x)
- Claeys, W. L., Verraes, C., Cardoen, S., De Block, J., Huyghebaert, A., Raes, K., . . . Herman, L. (2014). Consumption of raw or heated milk from different species: An evaluation of the nutritional and potential health benefits. *Food Control*, 42, 188-201. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.01.045>
- CODEX, S. 283-1978. Codex Alimentarius. *Normas general del Codex para el queso. Normas Internacionales de los Alimentos. Organización de las Naciones unidas para la alimentación y la Agricultura.*
- Chalabi, M., Khademi, F., Yarani, R., & Mostafaie, A. (2014). Proteolytic activities of kiwifruit actinidin (*Actinidia deliciosa* cv. Hayward) on different fibrous and globular proteins: a comparative study of actinidin with papain. *Applied Biochemistry Biotechnology*, 172(8), 4025-4037. doi: [10.1007/s12010-014-0812-7](https://doi.org/10.1007/s12010-014-0812-7)
- Chávez-Garay, D. R., Gutiérrez-Méndez, N., Valenzuela-Soto, M. E., & García-Triana, A. (2016). Partial characterization of a plant coagulant obtained from the berries of *Solanum elaeagnifolium*. *CyTA - Journal of Food*, 14(2), 200-205. doi: [10.1080/19476337.2015.1080763](https://doi.org/10.1080/19476337.2015.1080763)
- Delgado, R. L. C., & Torres, D. J. M. (2003). Evaluación bacteriológica de quesos frescos artesanales comercializados en Lima, Perú, y la supuesta acción bactericida de *Lactobacillus* spp. *Revista Panamericana de Salud Pública*, 14, 158-164.
- Diezhandino, I., Fernández, D., Sacristán, N., Combarros-Fuertes, P., Prieto, B., & Fresno, J. M. (2016). Rheological, textural, colour and sensory characteristics of a Spanish blue cheese (Valdeón cheese). *LWT - Food Science and Technology*, 65, 1118-1125. doi: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.10.003>

- Duran, L., Sánchez, C., Palmero, J., Chaparro, L., Garcia, T., & Sánchez, E. (2010). Caracterización fisicoquímica y microbiológica de quesos de cabra en Carora, estado Lara, Venezuela. *Zootecnia Tropical*, 28(4), 467-476. Recuperado en 24 de octubre de 2018, de http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-72692010000400003&lng=es&tlng=es.
- Duran, L., Sánchez, C., Palmero, J., Chaparro, L., Garcia, T., & Sánchez, E. (2010b). Caracterización fisicoquímica y microbiológica de quesos de cabra en Carora, estado Lara, Venezuela. *Zootecnia Tropical*, 28(4), 467-476.
- Egito, A. S., Girardet, J. M., Laguna, L. E., Poirson, C., Mollé, D., Miclo, L., Gaillard, J. L. (2007). Milk-clotting activity of enzyme extracts from sunflower and albizia seeds and specific hydrolysis of bovine κ -casein. *International Dairy Journal*, 17(7), 816-825. doi: <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2006.09.012>
- FAO. (2018a). Ganado vacuno. from <http://www.fao.org/dairy-production-products/production/productiondairy-animals/productiondairy-animalscattle/es/>
- FAO. (2018b). Portal Lacteo from <http://www.fao.org/dairy-production-products/products/composicion-de-la-leche/es/>
- Fox, P. F., Guinee, T. P., Cogan, T. M., & McSweeney, P. L. (2017). Microbiology of cheese ripening *Fundamentals of Cheese Science* (pp. 333-390): Springer.
- Galán, E., Cabezas, L., & Fernández-Salguero, J. (2012). Proteolysis, microbiology and sensory properties of ewes' milk cheese produced with plant coagulant from cardoon *Cynara cardunculus*, calf rennet or a mixture thereof. *International Dairy Journal*, 25(2), 92-96. doi: <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2012.02.001>
- Garcia, V., Rovira, S., Boutoial, K., Ferrandini, E., & Lopez Morales, M. B. (2014). Effect of starters and ripening time on the physicochemical, nitrogen fraction and texture profile of goat's cheese coagulated with a vegetable coagulant (*Cynara cardunculus*). *Journal Science Food Agricultural*, 94(3), 552-559. doi: 10.1002/jsfa.6292

- García, V., Rovira, S., Teruel, R., Boutoial, K., Rodríguez, J., Roa, I., & López, M. B. (2012). Effect of vegetable coagulant, microbial coagulant and calf rennet on physicochemical, proteolysis, sensory and texture profiles of fresh goats cheese. *Dairy Science & Technology*, 92(6), 691-707. doi: 10.1007/s13594-012-0086-1
- Gerosa, S., & Skoet, J. (2012). Milk availability: Trends in production and demand and medium-term outlook Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- González, J. D. T., morelos, K. J. G., & correa, D. A. (2015). Análisis del perfil de textura en frutas, productos cárnicos y quesos. *Ciencia Tecnología Alimentara*. Vol.14 No.2 64-75
- Guzman, L. E., Tejada, C., de la Ossa, Y. J., & Rivera, C. A. (2015). Análisis comparativo de perfiles de textura de quesos frescos de leche de cabra y vaca. *Bioteología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 13(1), 139-147.
- Haddar, A., Agrebi, R., Bougatef, A., Hmidet, N., Sellami-Kamoun, A., & Nasri, M. (2009). Two detergent stable alkaline serine-proteases from *Bacillus mojavensis* A21: Purification, characterization and potential application as a laundry detergent additive. *Bioresource Technology*, 100(13), 3366-3373. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.01.061>
- Hulbert, G., Biswal, R., Mehr, C., Walker, T., & Collins, J. (1998). Solid/liquid extraction of caffeine from guaraná with methylene chloride/Extracción sólido-liquido de cafeina de guarana con cloruro de metileno. *Food Science and Technology International*, 4(1), 53-58.
- Jacob, M., Jaros, D., & Rohm, H. (2010). Recent advances in milk clotting enzymes. *International Journal of Dairy Technology*, 64(1), 14-33. doi: 10.1111/j.1471-0307.2010.00633.x
- Jaros, D., Petrag, J., Rohm, H., & Ulberth, F. (2001). Milk fat composition affects mechanical and rheological properties of processed cheeses. *Applied Rheology* .11 (1) 19.25.

- Jensen, R. G., Ferris, A. M., & Lammi-Keefe, C. J. (1991). The Composition of Milk Fat1. *Journal of Dairy Science*, 74(9), 3228-3243. doi: [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(91\)78509-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(91)78509-3)
- Joshi, N. S., Jhala, R. P., Muthukumarappan, K., Acharya, M. R., & Mistry, V. V. (2004). Textural and Rheological Properties of Processed Cheese. *International Journal of Food Properties*, 7(3), 519-530. doi: 10.1081/JFP-200032962
- Justesen, S. F., Lamberth, K., Nielsen, L. L., Schafer-Nielsen, C., & Buus, S. (2009). Recombinant chymosin used for exact and complete removal of a prochymosin derived fusion tag releasing intact native target protein. *Protein Science*, 18(5), 1023-1032. doi: 10.1002/pro.112
- Leber, T. M., & Balkwill, F. R. (1997). Zymography: a single-step staining method for quantitation of proteolytic activity on substrate gels. *International Biochemistry*, 249(1), 24-28. doi: 10.1006/abio.1997.2170
- Lo Piero, A. R., Puglisi, I., & Petrone, G. (2002). Characterization of "lettucine", a serine-like protease from *Lactuca sativa* leaves, as a novel enzyme for milk clotting. *Journal Agricultural Food Chemistry*, 50(8), 2439-2443.
- Mafart, P., & Béliard, E. (1994). *Ingeniería industrial alimentaria*: Acribia.
- Maldonado, R., & Llanca, L. (2008). Estudio de la calidad del queso de mano comercializado en el municipio Girardot, estado Aragua, Venezuela. *Revista Científica*, 18(4), 431-436.
- Marshall, R. J. (1990). Composition, structure, rheological properties, and sensory texture of processed cheese analogues. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 50(2), 237-252. doi: doi:10.1002/jsfa.2740500211
- Mazorra-Manzano, M. A., Moreno-Hernández, J. M., Ramírez-Suarez, J. C., Torres-Llanez, M. d. J., González-Córdova, A. F., & Vallejo-Córdova, B. (2013). Sour orange *Citrus aurantium* L. flowers: A new vegetable source of milk-clotting proteases. *LWT - Food Science and Technology*, 54(2), 325-330. doi: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.07.009>
- Mazorra-Manzano, M. A., Perea-Gutiérrez, T. C., Lugo-Sánchez, M. E., Ramírez-Suarez, J. C., Torres-Llanez, M. J., González-Córdova, A. F., & Vallejo-

- Cordoba, B. (2013). Comparison of the milk-clotting properties of three plant extracts. *Food Chemistry*, 141(3), 1902-1907. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.05.042>
- Meléndez, P., & Bartolomé, J. (2017). Avances sobre nutrición y fertilidad en ganado lechero: Revisión. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 8(4), 407-417.
- Merheb-Dini, C., Gomes, E., Boscolo, M., & Da Silva, R. (2010). *Production and characterization of a milk-clotting protease in the crude enzymatic extract from the newly isolated Thermomucor indicae-seudaticae*. *Food Chemistry*, 120, 87-93. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.07.105>.
- Mills, S., P. Ross, R., Hill, C., F. Fitzgerald, G., & Stanton, C. (2011). *Milk intelligence: Mining milk for bioactive substances associated with human health International Dairy Journal*. 2011;21(6):377-401.
- Miranda, O., Ponce, I., Fonseca, P., Cutiño, M., Díaz, R., & Cedeño, C. (2009). Características físico-químicas de sueros de queso dulce y ácido producidos en el combinado de quesos de Bayamo. *Revista Cubana Alimentaria de Nutrición*, 19 (1), 6-11.
- Morillo, O. T., Lugo, P. J. G., Cardena, B. R. G., Vielma, Y. T., & Ruiz, R. C. (2015). Evaluación de la producción experimental de enzimas coagulantes de leche utilizando cepas de Rhizomucor spp. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 17(1), 54-60.
- Nasr, A. I. A. M., Ahmed, I. A. M., & Hamid, O. I. A. (2016). Characterization of partially purified milk-clotting enzyme from sunflower (*Helianthus annuus*) seeds. *Food Science & Nutrition*, 4(5), 733-741. doi: [doi:10.1002/fsn3.338](https://doi.org/10.1002/fsn3.338)
- NOM-243-SSA1-2010, P. y. s. L., fórmula láctea, producto lácteo combinado y derivados lácteos. Disposiciones y especificaciones sanitarias. Métodos de prueba.
- Olson, D. W., Van Hekken, D. L., Tunick, M. H., Tomasula, P. M., Molina-Corral, F. J., & Gardea, A. A. (2011). Mexican Queso Chihuahua: Functional properties of aging cheese¹. *Journal of Dairy Science*, 94(9), 4292-4299. doi: <https://doi.org/10.3168/jds.2010-3884>

- Pereira, R. B., Bennett, R. J., Mcmath, K. L., & Lckman, M. S. (2002). In-hand sensory evaluation of textural characteristics in model processed cheese analogues. *Journal of Texture Studies*, 33(4), 255-268. doi: doi:10.1111/j.1745-4603.2002.tb01348.x
- Porres, V., & Cifuentes, R. (2014). *La Chaya (Cnidoscopus aconitifolius), Una planta muy nutritiva*. Recuperado de [http://www.researchgate.net/publication/272490267_La_Chaya_\(Cnidoscopus_aconitifolius\)_una_planta_muy_nutritiva](http://www.researchgate.net/publication/272490267_La_Chaya_(Cnidoscopus_aconitifolius)_una_planta_muy_nutritiva)
- Prieto, B., Franco, I., Prieto, J. G., Bernardo, A., & Carballo, J. (2002). Compositional and Physico-chemical Modifications during the Manufacture and Ripening of León Raw Cow's Milk Cheese. *Journal of Food Composition and Analysis*, 15(6), 725-735. doi: <https://doi.org/10.1006/jfca.2002.1055>
- Puerto, P. P., Baquero, M. R. F., Romero, C. D., & Martín, J. D. (2003). Physicochemical characterization of fresh cheeses elaborated with goat milk in the island of tenerife. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 4(2), 103-108. doi: 10.1080/11358120309487750
- Puglisi, I., Petrone, G., & Lo Piero, A. R. (2014). A kiwi juice aqueous solution as coagulant of bovine milk and its potential in Mozzarella cheese manufacture. *Food and Bioproducts Processing*, 92(1), 67-72. doi: <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2013.07.011>
- Quintero-Lira, A. (2015) Determinación de la concentración de las diferentes partes de la ortiga Euphorbiaceae *Cnidoscopus multilobus* que tiene efecto coagulante en leche. *Biologico Agropecuarias*. Vol. 2(3): 682-686
- Ramírez-López, C., & Vélez-Ruiz, J. (2012). Quesos frescos: propiedades, métodos de determinación y factores que afectan su calidad. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 6(2), 131-148.
- Roberts, T. A., Cordier, J.-L., Gram, L., Tompkin, R. B., Pitt, J. I., Gorris, L. G. M., & Swanson, K. M. J. (2005). *Micro-Organisms in Foods* 6 (S. US Ed. Vol. 6).
- Rocha, G. F., Fernández, G., & Parisi, M. G. (2010). Estudios de Caracterización Cinética y Fisicoquímica de una Proteinasas Aspártica Aislada de Frutos Maduros de *Salpichroa organifolia*. *Información Tecnológica*, 21, 21-28.

- Roseiro Luisa, B., Barbosa, M., Ames Jennifer, M., & Wilbey, R. A. (2003). Cheesemaking with vegetable coagulants—the use of *Cynara L.* for the production of ovine milk cheeses. *International Journal of Dairy Technology*, 56(2), 76-85. doi: 10.1046/j.1471-0307.2003.00080.x
- Ruiz, J. (2005). *Extracción y caracterización de proteasas de especies vegetales nativas y su potencial utilización en quesería*. Tesis Licenciatura). Universidad Austral de Chile. Valdivia, Chile.
- Sathya, R., Pradeep, B. V., Angayarkanni, J., & Palaniswamy, M. (2009). Production of milk clotting protease by a local isolate of *Mucor circinelloides* under SSF using agro-industrial wastes. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 14(6), 788-794. doi: 10.1007/s12257-008-0304-0
- Severin, S., & Wenshui, X. (2005). Milk biologically active components as nutraceuticals: review. *Food Science Nutrition*, 45(7-8), 645-656. doi: 10.1080/10408690490911756
- Shieh, C.-J., Phan Thi, L.-A., & Shih, I.-L. (2009). Milk-clotting enzymes produced by culture of *Bacillus subtilis natto*. *Biochemical Engineering Journal*, 43(1), 85-91. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bej.2008.09.003>
- Talib, M. A., Abubakar, M. M., Jideani, I. A., & Hassan, A. (2009). Use of Jiben seeds extract to manufacture soft white cheese. *American Journal of Applied Sciences*, 6(4), 551-554.
- Torres, J., Gonzalez-Morelo, K., & Acevedo Correa, D. (2015). *Análisis del Perfil de Textura en Frutas, Productos Cárnicos y Quesos ReCiTelA* (Vol. 14) 2(64-69).
- Vioque, M., Gomez, R., Sanchez, E., Mata, C., Tejada, L., & Fernandez-Salguero, J. (2000). Chemical and microbiological characteristics of ewes' milk cheese manufactured with extracts from flowers of *Cynara cardunculus* and *Cynara humilis* as coagulants. *Journal Agricultural Food Chemistry*, 48(2), 451-456.
- W. Parodi, P. (2004). *Milk fat in human nutrition*. *Australian Journal of Dairy Technology* 59:3–59.
- Wehr, H. M., & Frank, J. F. (2004). *Standard Methods for the Examination of Dairy Products*: American Public Health Association.

Wilbey, R. A., & Robinson, R. K. (2002). *Fabricación de Quesos* (Acribia Ed. 3 ed.).