

11
24j



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN**



Departamento de
Ciencias y Profesiones

**EVALUACION DE LA PRESENCIA DE PROTEINA DE
SOYA EN QUESOS TIPO MANCHEGO EXPEDIDOS
EN LA CIUDAD DE MEXICO.**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
INGENIERO EN ALIMENTOS
P R E S E N T A :
ELSA MARGARITA OROZCO LIZARRAGA

ASESORA :

DRA. SARA E. VALDES MARTINEZ

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX.

1996

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

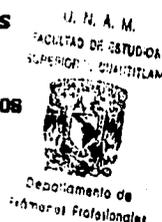
Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVANZADA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES



ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

DR. JAIME KELLER TORRES
DIRECTOR DE LA F.E.S.-CUAUTITLAN
P R E S E N T E .

AT'N: Ing. Rafael Rodríguez Ceballos
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la F.E.S. - C.

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS TITULADA:

Evaluación de la presencia de proteína de soya en quesos tipo manchego
expandidos en la ciudad de México.

que presenta la pasante: Elsa Margarita Orozco Lizárraga.

con número de cuentas: 9156249 - B para obtener el TITULO de:
Ingeniera en Alimentos.

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E .

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 24 de Mayo de 1996

PRESIDENTE I.B.Q. Norma B. Casas Alencaster

VOCAL Dra. Sara E. Valdés Martínez

SECRETARIO Q.F.B. Ma. Esther Revuelta Miranda

PRIMER SUPLENTE I.B.Q. Leticia Figueroa Villarreal

SEGUNDO SUPLENTE I.B.Q. Saturnino Maya Ramírez

AGRADECIMIENTOS

Por Por Por Por Por Por Por Por

A la Dra. Sara E. Valdés Martínez gracias mil por su ayuda y apoyo en la realización de éste proyecto.

**A los integrantes del jurado I.B.Q. Norma Casas Alencaster,
Q.F.B. Ma. Esther Revuelta Miranda,
I.B.Q. Leticia Figueroa Villarreal, I.B.Q. Saturnino Maya Ramírez,
por su ayuda en el mejoramiento de éste trabajo.**

A la Universidad Nacional Autónoma de México por la formación Profesional que recibí.

A los integrantes del Laboratorio de Tecnología de Calidad de Alimentos.

Todo mi cariño y gracias a Marcela y Meche por su amistad y estar conmigo en esas horas de trabajo extra.

A mis abuelitos, tíos y primos por su cariño y apoyo.

A la Familia Rotaache Guerrero por su cariño y su buena fé.

A Edgar por su ayuda incondicional.

DEDICATORIAS

Por Por Por Por Por Por Por Por Por

**A MIS PAPAS por su amor, fuerza y valor, por sus enseñanzas
que hoy día me hacen ser quien soy.**

A MIS HERMANOS Jorge, María Eva y Luis por estar junto a mí.

**A JOSÉ ANTONIO por escucharme, entender
mi vida y amarme, gracias por existir
y existir junto a mí.**

ÍNDICE GENERAL

| | |
|---|------------|
| ÍNDICE GENERAL | I |
| ÍNDICE DE FIGURAS | III |
| ÍNDICE DE TABLAS | IV |
| ÍNDICE DE GRÁFICAS | V |
| RESUMEN | VI |
| INTRODUCCIÓN | 1 |
| | |
| CAPÍTULO I. ANTECEDENTES | 5 |
| 1.1 Leche | 6 |
| 1.1.1 Definición de leche | 6 |
| 1.1.2 Composición de la leche de vaca | 6 |
| 1.1.3 Componentes de la leche de vaca | 7 |
| 1.1.4 Conservación de la leche | 8 |
| 1.2 Queso | 9 |
| 1.2.1 Elaboración del queso | 10 |
| 1.2.2 Clasificación de los quesos | 11 |
| 1.2.3 Queso Manchego | 12 |
| 1.2.4 Elaboración de queso manchego | 13 |
| 1.3 Adulteración en queso | 15 |
| 1.4 Electroforesis | 17 |
| 1.4.1 Electroforesis en gel de poliacrilamida | 19 |
| | |
| OBJETIVOS | 23 |
| General | 23 |
| Particulares | 23 |
| | |
| CAPÍTULO II. DESARROLLO METODOLÓGICO | 24 |
| Descripción del Cuadro Metodológico | 25 |
| Cuadro Metodológico. Desarrollo experimental de la tesis | 26 |
| | |
| 2.1 Queso Patrón | 28 |
| 2.1.1 Elaboración de queso patrón | 28 |
| 2.2 Queso Patrón adulterado | 28 |
| 2.2.1 Elaboración de queso patrón adulterado con proteína de soya | 28 |
| 2.3 Extracción de proteína | 28 |
| 2.3.1 Solución salina fisiológica | 28 |
| 2.3.2 Solución de hidróxido de sodio | 29 |
| 2.3.3 Método de Olivera (1990) | 29 |
| 2.4 Método standar Bradford | 29 |

| | Indice |
|---|---------------|
| 2.5 Clasificación de quesos tipo manchego comerciales | 30 |
| 2.6 Análisis químico proximal de quesos tipo manchego comerciales y queso patrón | 30 |
| 2.7 Electroforesis en gel de poliacrilamida | 31 |
| 2.7.1 Electroforesis en geles discontinuos | 31 |
| 2.7.2 Obtención de patrones electroforeticos aparentes de queso, proteína de soya y queso adulterado | 32 |
| 2.7.3 Curva de calibración de pesos moleculares | 32 |
| 2.8 Obtención de perfiles electroforeticos de quesos tipo manchego comerciales | 33 |
| | |
| CAPÍTULO III. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS | 34 |
| 3.1 Selección del Método de extracción | 35 |
| 3.2 Clasificación de quesos tipo manchego comerciales | 40 |
| 3.3 Análisis químico proximal de quesos tipo manchego comerciales y queso patrón | 41 |
| 3.4 Electroforesis en gel de poliacrilamida | 45 |
| 3.5 Curva de calibración de pesos moleculares | 50 |
| 3.6 Obtención de patrones electroforéticos aparentes de queso, proteína de soya y queso adulterado | 50 |
| 3.7 Obtención de perfiles electroforeticos aparentes de quesos tipo manchego comerciales | 63 |
| | |
| CAPÍTULO IV. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES | 69 |
| | |
| ANEXOS | 71 |
| I Norma Oficial Mexicana Queso Manchego | 72 |
| II Montaje y preparación de geles | 79 |
| III Método standar Bradford | 84 |
| IV Elaboración de queso patrón | 86 |
| | |
| REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 89 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|-----------|
| • Diagrama 1. Clasificación de leches y sus derivados. | 9 |
| • Diagrama 2. Elaboración general de queso manchego. | 14 |
| • Diagrama 3. Cuadro Metodológico. Desarrollo teórico y experimental de la tesis. | 25 |
| • Diagrama 4. Elaboración de queso manchego (método tradicional de procesamiento). | 88 |
| • Figura 1A. 10% gel separador. | 46 |
| • Figura 2A. 12.5% gel separador. | 46 |
| • Figura 3A. 15% gel separador. | 47 |
| • Figura 1B. Solución Olivera (Tris HCl 0.006M/2% Mercaptoetanol). | 49 |
| • Figura 2B. Solución salina fisiológica 0.9%. | 49 |
| • Figura 1C. Perfil proteico de queso patrón. | 54 |
| • Figura 2C. Perfil proteico de soya. | 54 |
| • Figura 3C. Perfil proteico de queso-soya. | 55 |
| • Figura 1D. Perfil proteico de quesos tipo manchego comerciales I. | 64 |
| • Figura 2D. Perfil proteico de quesos tipo manchego comerciales II. | 64 |
| • Figura 1E. Representación gráfica del cumplimiento de especificaciones de la Norma Oficial Mexicana para quesos tipo manchego comerciales. | 45 |
| • Figura 1F. Representación gráfica del porcentaje de Adulteración en quesos comerciales. | 67 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|---|-----------|
| • Tabla 1. Composición cuantitativa de la leche de vaca. | 6 |
| • Tabla 2. Componentes de la leche de vaca. | 7 |
| • Tabla 3. Elaboración general de queso. | 10 |
| • Tabla 4. Proteínas utilizadas en la elaboración de queso. | 16 |
| • Tabla 5. Técnicas para determinar adulteraciones y contaminaciones en leche y productos lácteos. | 17 |
| • Tabla 6. Técnicas del análisis químico proximal. | 30 |
| • Tabla 7. Método standar Macro. | 35 |
| • Tabla 8. Extracción de proteína de soya. | 37 |
| • Tabla 9. Extracción de proteína de quesos comerciales y patrón. | 38 |
| • Tabla 10. Volumen (μ l) a emplear en los geles. | 40 |
| • Tabla 11. Clasificación de quesos tipo manchego comerciales. | 41 |
| • Tabla 12. Composición química de quesos manchego comerciales. | 42 |
| • Tabla 13. Proteínas del marcador de PM. | 50 |
| • Tabla 14. Perfil electroforético de queso patrón. | 51 |
| • Tabla 15. Perfil proteico bibliográfico de la leche. | 52 |
| • Tabla 16. Identificación de proteínas de queso patrón. | 53 |
| • Tabla 17. Perfil electroforético de aislado proteico de soya. | 56 |
| • Tabla 18. Perfil proteico bibliográfico de la soya. | 57 |
| • Tabla 19. Identificación de proteínas de soya. | 58 |
| • Tabla 20. Perfil electroforético de queso patrón adulterado con proteína de soya. | 59 |
| • Tabla 21. Identificación de bandas "adulterantes". | 61 |
| • Tabla 22. Perfil electroforético de quesos tipo manchego comerciales. | 65 |

ÍNDICE DE GRÁFICAS

- **Gráfica 1.** Curva Patrón Bradford Macro. 36
- **Gráfica 2.** Curva semilog de calibración de pesos moleculares. 60

RESUMEN

El presente trabajo se realizó con la finalidad de identificar la presencia de proteína de soya en quesos comerciales tipo manchego expendidos en la Ciudad de México, a través del análisis electroforético de su proteína.

A los quesos comerciales se les realizó un análisis químico proximal para conocer la composición y tener una referencia del contenido de proteína presente.

Se evaluó el método de extractibilidad proteica más adecuado, estudiándose la extracción con solución Tris HCl 0.006M/2% Mercaptoetanol pH = 7.46; solución salina fisiológica 0.9% y solución de Hidróxido de sodio 0.1 M, encontrándose diferencias en la concentración de proteína extraída. Se efectuó la extracción de proteína para soya, queso patrón, queso adicionado con proteína de soya al 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0 % en peso y quesos comerciales bajo las mismas condiciones, siendo la más adecuada la solución Tris HCl 0.006M/2% Mercaptoetanol por ofrecer una concentración mayor de proteína.

Se probaron diferentes concentraciones del gel separador de poliacrilamida con el fin de estandarizar los geles utilizados en la electroforesis. Se analizaron por electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (DSS), sistemas modelo queso patrón y queso patrón adulterado con proteína de soya al 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0 %, y se obtuvieron los perfiles electroforéticos correspondientes.

En base al análisis electroforético se hizo una contrastación de los perfiles electroforéticos de queso patrón, quesos comerciales y quesos adulterados y se evaluó la adición de proteína de soya en los quesos comerciales, se encontró que en 12 de las 15 marcas estaban presentes proteínas de soya, por lo que se considera que se encuentran adulterados. Por lo tanto esta adulteración representa el 80% de las marcas analizadas.

INTRODUCCIÓN

La leche es un alimento altamente valuado, representa uno de los productos más completos y resulta de mucha importancia para la alimentación, aún cuando la leche puede ser sustituida por otros alimentos, es muy recomendable que se consuma, ya que su proteína es de buena calidad, además de que contribuye con otros nutrimentos muy valiosos.

De una manera general el término leche, se aplica a la leche de vaca, siendo la especie animal referida cuando la leche es de origen diferente¹.

La producción nacional de leche no es suficiente para cubrir las necesidades internas de consumo, el consumo tiende a aumentar, por lo cual las proyecciones de las importaciones de leche aumentan con el tiempo y se calcula que para este año será necesario importar 11,350 millones de litros².

Durante los últimos 30 años se han dado una serie de cambios en la sociedad y avances en la ciencia y la tecnología que han conducido a cambios en la forma de industrializar y controlar la industria láctea. Dentro de los cambios se puede mencionar:

- la automatización de procesos
- desarrollo de nuevas tecnologías (ultrafiltración, ultrapasteurizado)
- presencia en el mercado de un mayor número de productos lácteos
- cambios en patrones de consumo
- cambios en tipos de envases
- aumentos en el consumo de constituyentes de los alimentos (caseinatos, proteínas del suero).
- desarrollo de nuevos productos
- cambios en la legislación, principalmente regulando la presencia y concentración de aditivos

Introducción

Actualmente existe la necesidad de aumentar la disponibilidad y el tiempo de conservación de los alimentos. La conservación de la leche permite retardar el proceso de descomposición de sus componentes. Existe una gran variedad de productos o derivados lácteos que consiguen conservarla. Los productos lácteos más comunes son: leche descremada y semidescremada, leche en polvo entera o maternizada, yoghurt natural, leche evaporada azucarada o sin azúcar, crema dulce o ácida, mantequilla, margarina, helados de crema, quesos.

El queso es una forma de conservación de los componentes proteícos de la leche, obtenido por la coagulación de las caseínas y separación del suero de la leche. Dentro de la industria láctea se encuentra el queso como uno de los productos manufacturados de mayor demanda en el mercado; existen una gran variedad de quesos, donde el queso manchego es uno de los principales.

De acuerdo a la Norma Oficial de Calidad NOM-F-462-1984 se entiende por queso tipo manchego al " producto que se obtiene a partir de leche pasteurizada entera de vaca, sometida a procesos de coagulación, cortado, desuerado, fermentado, salado, prensado y madurado durante un período mínimo de 7 días a temperatura y humedad controladas; sin que se hayan empleado en su elaboración grasas o proteínas no provenientes de leche"⁴.

El queso tipo manchego debe cumplir con las siguientes especificaciones:

- Sensoriales: color ligeramente amarillo, olor característico libre de olores extraños, sabor característico, libre de sabores extraños, consistencia semidura y rebanable.
- Microbiológicos: No debe contener microorganismos patógenos, toxinas microbianas e inhibidores microbianos, que puedan afectar a la salud del consumidor o provocar deterioro del producto.

Los aditivos permitidos por la Secretaria de Salubridad y Asistencia en la elaboración de queso manchego son: cultivo láctico, cloruro de sodio, cuajo

Introducción

vegetal o animal, anatto (semilla de achiote y caroteno en proporción no mayor de 0.06%), cloruro de calcio en una proporción no mayor de 0.02%, ácido sórbico o sus sales de sodio o potasio 1 g/Kg ⁴ .

De acuerdo a esta Norma (NOM- F- 462-1984) no está permitido el empleo de ningún otro tipo de proteína vegetal o animal que no provenga de la leche en la elaboración de queso tipo manchego, por lo que el uso de proteína de soya en la elaboración de queso tipo manchego se considera una adulteración. La adición de proteína de soya en estos productos es frecuente y esto es debido a su bajo costo y a sus características de gelificación, absorción de agua, cuando no se informa al consumidor el contenido de proteína de origen no láctico se está llevando a cabo un fraude al consumidor.

La calidad del producto depende de múltiples variables como son: calidad de la materia prima, controles durante proceso, empaque, condiciones de almacenamiento, transporte, venta, etc.

Como ya se mencionó es posible utilizar diferentes proteínas vegetales y animales como aditivos en la elaboración de queso, sustituyendo la presencia de proteínas de origen lácteo, para esto es necesario que tengan propiedades funcionales similares a las proteínas de la leche, por lo que son pocas las proteínas que pueden ser empleadas para este fin, siendo la soya, la proteína de origen vegetal más ampliamente utilizada, por su alta capacidad de emulsificación, gelificación y retención de agua ²³.

El desarrollo de tecnologías de producción que permiten la incorporación de estas proteínas no ha sido acompañado por el desarrollo de técnicas analíticas para verificar su presencia en los productos terminados. No existe en el momento un método de referencia para la detección y cuantificación de soya en productos lácteos. De los utilizados hasta la fecha, los más estudiados son los inmunológicos y electroforéticos, sin embargo las desventajas que presentan los

Introducción

primeros (falta de reactividad del antisuero con muestras calentadas o con variedades de soya diferentes a la especifica para ese antisuero), los métodos electroforéticos son los que se han estudiado más intensamente ¹.

El interés que existe en la detección y/o cuantificación de la proteína de soya en quesos tipo manchego, tiene importancia desde el punto de vista legal, ya que de acuerdo a la legislación existente en nuestro país no está permitido la adición de proteínas no provenientes de la leche para la elaboración del mismo. De acuerdo a lo anterior la presencia de proteína de soya en estos productos es considerada una adulteración y un fraude al consumidor por estar reportando un porcentaje de proteína que no corresponde en su totalidad a proteína de origen lácteo.

Antecedentes

CAPÍTULO I. ANTECEDENTES

1.1 LECHE

1.1.1 DEFINICIÓN DE LECHE

La leche es la secreción normal de la glándula mamaria y está definida como "la secreción láctea, prácticamente libre de calostro, obtenida mediante el ordeño completo de una o más vacas sanas"⁵.

1.1.2 COMPOSICIÓN DE LA LECHE DE VACA

Los diversos componentes de la leche varían considerablemente en vacas de diferentes razas e incluso en vacas de la misma raza. Se han definido bien las tendencias generales estacionales en la composición de la leche. El contenido de grasa es superior en octubre y noviembre (4.0%) e inferior en mayo y junio (3.55%). El valor medio para los sólidos no grasos es más alto en octubre (8.7%), baja al mínimo de 8.5% en marzo y abril, vuelve a elevarse en mayo y junio de 8.65 - 8.7%, pero decrece ligeramente en julio y agosto. Estos cambios son un reflejo de los efectos de otros factores, en especial las variaciones estacionales en la alimentación y el estado de lactancia. Los cambios estacionales también varían de acuerdo a la localidad. Por lo tanto, solamente se pueden especificar valores límites para esas variaciones. Las cifras de la siguiente Tabla 1 muestran la composición promedio de la leche de vaca.

Tabla 1. Composición cuantitativa de la leche de vaca.

| Constituyente principal | Límites de variación (%) | Valor medio (%) |
|-------------------------|--------------------------|-----------------|
| Agua | 85.5-89.5 | 87.5 |
| Sólidos totales | 10.5-14.5 | 13.0 |
| Grasa | 2.5-6.0 | 3.9 |
| Proteínas | 2.9-5.0 | 3.4 |
| Lactosa | 3.6-5.5 | 4.8 |
| Minerales | 0.6-0.9 | 0.8 |

ANA Laval, Manual de Industrias Lácteas, Ediciones Madru, España, pag. 12.

1.1.3 COMPONENTES DE LA LECHE DE VACA

Los componentes que constituyen la leche de vaca se describen en la Tabla 2.

Tabla 2. Componentes de la leche de vaca.

| Grupo principal | Componentes |
|-----------------|---|
| Lípidos | <p>a) El principal componente de la fase lipídica es la grasa láctea, mezcla compleja de triglicéridos (ácidos grasos saturados e insaturados, ácido butírico).</p> <p>b) Los fosfolípidos constituyen una fracción pequeña, los principales componentes son la fosfatidilcolina (30%), fosfatidiletanolamina (30%), fosfatidilserina (10%), esfingomielina (25%) y en menor cantidad, fosfatidilinositol, cerebrósidos y plasmalógenos.</p> <p>c) Otros lípidos como esteroides, cetoácidos, carotenoides y vitaminas liposolubles A, D, E y K.</p> |
| Proteínas | <p>a) Caseína. Es la principal proteína láctea y se define como un grupo heterogéneo de fosfoproteínas, consta de tres componentes principales, α-caseína (55%), β-caseína (25%), y κ-caseína (5%).</p> <p>b) Proteínas séricas. Las restantes proteínas de la leche descremada se clasifican en proteínas séricas y constan de β-lactoglobulina (60%), α-lactoalbúmina, inmunoglobulinas, albúmina sérica y la fracción compleja proteasa-peptona.</p> <p>c) Enzimas. Las enzimas se encuentran presentes como proteínas simples o como complejos lipoproteicos. Las enzimas de la leche se hallan repartidas por todo el sistema, sobre la superficie del glóbulo graso, asociadas a las micelas de caseína y en forma libre en suspensión coloidal.</p> <p>(1) Fosfatasa alcalina. Es un complejo lipoproteico y se distribuye entre las fases lipídicas y acuosa.</p> <p>(2) Lipasa. Está asociada a las micelas de caseína y en particular al componente κ-caseína.</p> <p>(3) Proteasa. Está asociada a la fracción caseínica.</p> <p>(4) Xantinaoxidasa. Se encuentra a grandes concentraciones en la membrana del glóbulo de grasa.</p> |
| Lactosa | <p>El principal hidrato de carbono de la leche es la lactosa (azúcar de la leche), disacárido de la galactosa y glucosa. La lactosa es el principal agente osmótico de la leche con lo que permite el transporte de agua desde la sangre.</p> |

Continuación tabla 2.

| | |
|-----------------|---|
| Cenizas y Sales | Cenizas y sales de la leche no son términos sinónimos. Las cenizas son el residuo blanco que permanece después de la incineración de la leche a 600°C y están compuestas por óxidos de sodio, potasio, calcio, magnesio, hierro, fósforo y azufre, más algo de cloruro. El azufre y fracciones de fósforo y hierro proceden de las proteínas. Las sales de la leche son fosfatos, cloruros o citratos de potasio, sodio, calcio y magnesio. |
| Vitaminas | Las vitaminas liposolubles son componentes de la fase lipídica, mientras que las vitaminas B y C están en la fase acuosa. Muchas de las vitaminas desempeñan un papel en la estabilidad del sabor de la leche. Gran número de vitaminas B se presentan en la leche en varias formas químicas como especies libres o formando complejos con proteínas. |

Parham, Owen K., Introducción a la ciencia de los alimentos, Editorial Reverte, pag. 724-742.

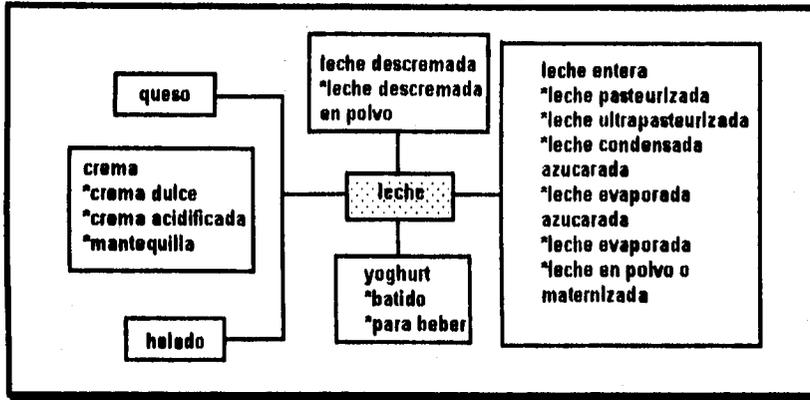
1.1.4 CONSERVACIÓN DE LA LECHE

Los términos leche y productos lácteos se emplean en la industria alimentaria en relación a una escala muy amplia de materias primas y productos fabricados.

La leche fluida es la sustancia básica. Se le puede procesar para que sea consumida en forma de leche fluida entera, generalmente pasteurizada y homogeneizada, y su composición cuando se pone en venta difiere muy poco de la que tiene cuando sale de la ubre de la vaca.

Con la finalidad de conservar la leche es posible separar los componentes principales de ésta, o sea la crema y la leche descremada. Estas se venden y utilizan como productos en sí, o bien se procesan para convertirlas en mantequilla, queso, helado y otros productos lácteos conocidos. Asimismo, la leche original se puede modificar mediante la condensación, la deshidratación, la añadidura de sabores, el fortalecimiento, la desmineralización, y por otros tratamientos más⁶, en el diagrama 1 se muestran una clasificación de leches y sus derivados.

Diagrama 1. Clasificación de leches y sus derivados



1.2 QUESO

La leche utilizada en el proceso de elaboración de quesos debe ser de buena calidad. La validez de la leche como materia prima para la elaboración de quesos viene determinada por su tratamiento en la granja. Además de los niveles normales de higiene requeridos, la leche debe estar libre de antibióticos, que destruirían los cultivos utilizados en la maduración de los quesos. La leche calostroal y la leche de animales enfermos no debe ser utilizada para la elaboración de queso³.

La propiedad más importante de la leche utilizada en este proceso es la velocidad de coagulación cuando se mezcla con cuajo y la capacidad del coágulo formado para eliminar suero. Estas características varían de forma considerable de leche procedente de vacas sometidas a crianzas distintas e incluso varían también para un mismo animal. Dichas diferencias pueden ser compensadas mezclando la leche de distintos productores, pero aún así y todo se seguirán produciendo variaciones estacionales. Las propiedades de la leche para elaborar quesos pueden ser mejoradas, hasta un cierto punto, por la adición de cloruro cálcico o por una maduración previa de dicha leche. Sin embargo, el almacenamiento bajo

Antecedentes

frio, los tratamientos mecánicos y los tratamientos térmicos fuertes perjudican las características generales de la leche para elaborar quesos³.

La definición internacionalmente aceptada para el queso ha sido hecha por la FAO/OMS. El queso es el producto fresco o madurado obtenido por la coagulación y separación del suero de la leche, nata, leche parcialmente desnatada, mazada o por una mezcla de estos productos³.

El queso contiene proteínas, grasas, agua y sales en proporciones diversas, dependiendo de los tipos. Las posibilidades de las proteínas lácteas que la elaboración de quesos ofrece ha dado lugar a una enorme variedad de quesos, con diferentes características referentes al sabor, contenido de sólidos y vida comercial³.

1.2.1 ELABORACIÓN DE QUESO

Una explicación general de las etapas necesarias para la elaboración del queso, aunque existen variantes específicas para cada tipo, es la siguiente:

Tabla 3. Elaboración general de queso.

| |
|--|
| Recepción y tratamientos previos de la leche: 1. Refrigeración (de 3 a 6°C) 2. Higienización (eliminación de impurezas y bacterias) 3. Pasteurización (calentamiento a 70/80°C durante 15/40 segundos) |
| Elaboración del queso propiamente dicho: 4. Adición de fermentos lácticos para acidificar la leche con lo que coagulará más fácilmente. 5. Si es necesario, y está permitido, se añade a la leche: • Cloruro cálcico (favorece la coagulación) • Nitrito potásico o sódico (inhibe el crecimiento de bacterias perjudiciales) • Colorantes naturales (para mantener uniforme el color del queso) • Hongos y bacterias lácticas que ayudan a desarrollar aromas y sabores durante la maduración, en algunos tipos de quesos. 6. Adición del cuajo a una temperatura de 28 a 35°C generalmente 7. Coagulación de la leche y separación parcial del suero 8. Lienado de moldes y prensado previo 9. Moldeado y prensado (con eliminación de más suero) 10. Salado de los quesos en salmuera o por sal seca. |
| 11. Maduración de los quesos en cámaras con control de humedad, temperatura y aireación. En los quesos frescos no es necesaria la maduración. 12. Control de calidad, envasado y salida del productos elaborado. |

Carrazo, T., Los quesos, Ediciones Espasa, pag. 11-18.

1.2.2 CLASIFICACIÓN DE LOS QUESOS

Los quesos se pueden clasificar atendiendo a diversas circunstancias (contenido en grasa, dureza, origen, tipo de leche empleada en su elaboración, etc). De acuerdo al sistema seleccionado para la coagulación de la leche se tiene⁷:

- Quesos al cuajo (Ejemplo: Gouda, Manchego, Emmenthal)
- Quesos ácidos (Ejemplo: Cottage, crema)

En los primeros se consigue la coagulación por la adición de cuajo a la leche, el principio activo del cuajo es la quimosina (renina), que es una enzima proteolítica que tiene la propiedad de hidrolizar los enlaces peptícos de las proteínas, la coagulación se realiza de la siguiente forma: el caseinato de calcio al ser atacado por el cuajo se transforma en paracaseinato de calcio, y en seguida, este paracaseinato se combina con los iones libres del calcio (sales solubles), se vuelve insoluble y se precipita formando gel o cuajada. En los segundos se consigue por acidificación, a través del ácido láctico que transforma progresivamente el fosfato bicálcico de la caseína en fosfato monocálcico que, a su vez, es desmineralizado poco a poco, perdiendo el resto del calcio hasta que es precipitado, llegando al estado de caseína pura con formación secundaria de lactato de calcio soluble. En su punto isoeléctrico la caseína (pH 4.5-4.7 a 21°C) se encuentra en su estado más puro y en el punto más bajo de su solubilidad, por esto en las condiciones usuales de trabajo (pH 5.2 a 5.3) la caseína se coagula a medida que aumenta la temperatura a niveles más altos de pH. Otros quesos combinan los dos sistemas acidificación y adición del cuajo, por ejemplo requesón.

Según la textura del queso estos se clasifican en:

- Quesos compactos
- Quesos con ojos redondeados
- Quesos granulares de formas irregulares

Antecedentes

Según el tipo de microorganismos utilizados en la maduración tendremos la siguiente clasificación:

- Quesos veteados donde se produce el crecimiento de mohos como el *Penicillium* durante la maduración, dando esas vetas de color azul.
- Quesos de moho blanco
- Quesos con desarrollo bacteriano en la corteza, en los que se unta la superficie con un cultivo de bacterias que se desarrollan dando características especiales a los quesos.

De acuerdo con su contenido de grasa se clasifican en:

- Doble grasa: El que contenga un mínimo del 60%
- Extragrasso: El que contenga un mínimo del 45%
- Semigrasso: El que contenga un mínimo del 20%
- Magro: el que contenga menos del 20%

Por último la más conocida que se basa en el contenido de agua:

- Quesos frescos
- Quesos blandos
- Quesos semiblandos
- Quesos duros
- Quesos semiduros

1.2.3 QUESO MANCHEGO

Como ya se mencionó anteriormente el queso tipo manchego se clasifica como un **queso extragrasso, compacto y semiblando**. El queso manchego es el producto que se obtiene a partir de leche pasteurizada entera de vaca, sometida a procesos de coagulación, cortado, desuerado, fermentado, salado, prensado y madurado, durante un periodo mínimo de 7 días a temperatura y humedad controladas; sin que se hayan empleado en su elaboración grasas o proteínas no provenientes de la leche⁴.

Antecedentes

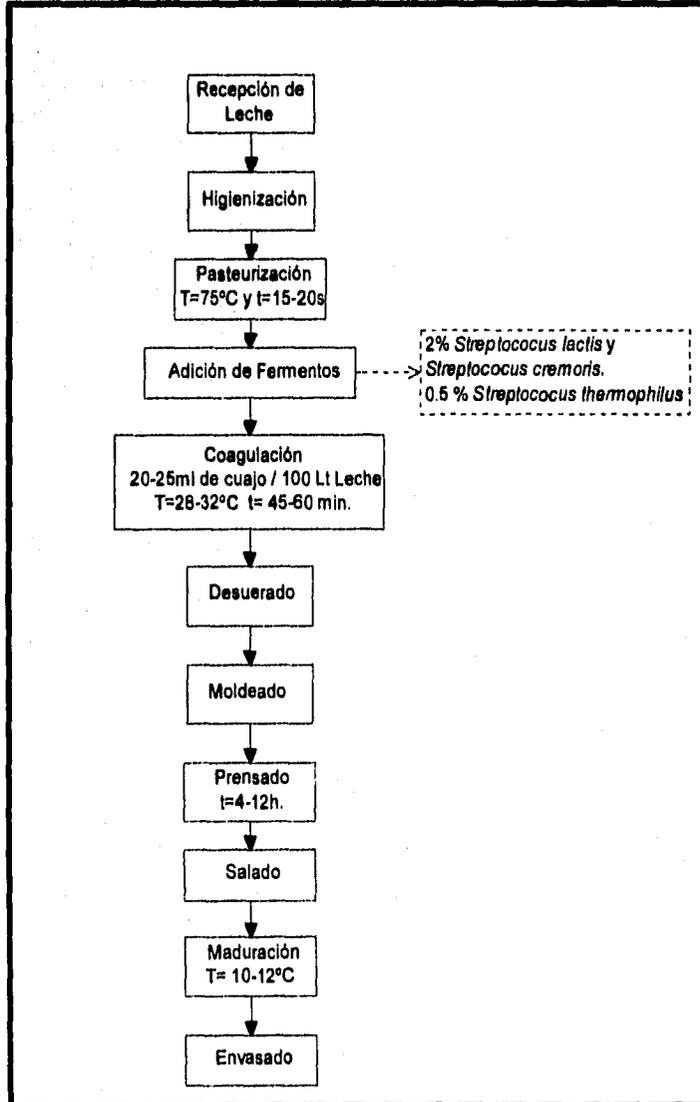
El queso manchego se clasifica en un sólo grado de calidad y debe cumplir con las especificaciones de la Norma Oficial Mexicana (ver anexo I).

1.2.4 ELABORACIÓN DE QUESO MANCHEGO

Los pasos a seguir para la elaboración de queso manchego son los que se describen a continuación y se muestra en el diagrama 2 ^{6,7}.

- **Higienización previa de la leche:** Es el proceso por el cual la leche que se recibe en la instalación queda libre de las impurezas o residuos extraños a la misma. Se puede hacer por centrifugación o filtración.
- **Pasteurización:** Sobre el proceso anterior la higienización homóloga la pureza de la leche que al ser pasteurizada mediante un tratamiento térmico, eleva su temperatura a 75 °C durante 15 a 20 segundos. De esta forma se destruyen los microorganismos patógenos que pudiese contener la leche.
- **Adición de fermentos:** La pasteurización elimina parte de la flora bacteriana de la leche que interviene en la maduración del queso, por lo que es necesario reintegrar a la misma los microorganismos destruidos mediante la adición de fermentos. Estos fermentos acidificantes ayudan a que la leche coagule mejor. Normalmente se utiliza un 2% de un cultivo compuesto por Streptococcus lactis y Streptococcus cremoris, mas un 0.5% del Streptococcus thermophilus.
- **Coagulación de la leche:** Físicamente este fenómeno supone la coagulación de las micelas de la caseína y glóbulos de grasa que se unen para formar un gel compacto, aprisionando el líquido de dispersión que constituye el suero. Se suele utilizar como agente coagulante, el cuajo o el extracto del cuajo (20-25 mililitros de extracto de cuajo o su equivalente por cada 100 litros de leche). El proceso se realiza a unos 28-32°C durante unos 45 a 60 minutos.

Diagrama 2. Elaboración general de queso manchego.



Potter, Norman N., (1973. La ciencia de los alimentos. AVI Publishing Company. Pág. 379-380.

Cenzano, I., Los quesos, Ediciones España, pág. 25-27.

Antecedentes

- **Desuerado de la cuajada:** Su objeto es obtener una masa con la consistencia y humedad necesarias, para que en ella se puedan desarrollar los procesos de maduración adecuados que den como producto final el queso. La cuajada se corta hasta obtener granos con un tamaño de 5 a 10 milímetros.
- **Moldeado y prensado:** Con el prensado se completa el desuerado forzando la eliminación del suero, y con el moldeado se le confiere al queso su forma definitiva, con su característica cilíndrica. En el moldeado, los paños clásicos han sido mayoritariamente sustituidos por moldes de acero inoxidable con gran número de perforaciones. Para el prensado se pueden utilizar prensas de varios tipos (horizontales, verticales, prensado artesanal, etc.) y se efectúa durante 4 a 12 horas, generalmente.
- **Salazón:** se efectúa introduciendo los quesos en una salmuera o bien espolvoreándolos con sal muy fina, y tiene como objetivos: el regular el desarrollo microbiano, desuero el queso, despojarlo de cierta cantidad de agua y favorecer la formación de corteza que lo protege de los agentes exteriores.
- **Maduración:** se puede considerar como el afinamiento de la fermentación, influyendo en ello la humedad y temperatura adecuadas que se realiza en cámaras. La temperatura oscila entre los 10 y 12°C y los quesos son volteados con frecuencia. La humedad relativa es del orden del 80%. Según transcurre la maduración, se debe aumentar la humedad y disminuir la temperatura.

1.3 ADULTERACIÓN EN QUESO

El Sector Público marca los aditivos permitidos en la leche y productos lácteos los cuales fueron publicados por última vez en el Diario Oficial de la Federación (18 enero de 1988).

Los alimentos deben considerarse adulterados:

- Si algún ingrediente importante del alimento ha sido todo o en partes extraído u omitido del producto.
- Si cualquier sustancia ha sido sustituida toda o en partes.
- Si se le ha añadido cualquier sustancia, o si se le ha mezclado con alguna sustancia, de tal modo que incremente su volumen o peso, o reduzca su calidad o resistencia o haga que parezcan mejor o más valiosos de lo que realmente es ⁸.

La presencia de cualquier componente no permitido en la leche o productos lácteos se considera adulteración¹. La presencia de proteína de otros orígenes en productos lácteos no es permitida; sin embargo, la adición de ésta es frecuente, sobre todo en quesos. El aislado protéico de soya es por su bajo costo una de las proteínas más favorecidas en la adulteración de leche y productos lácteos, sin embargo existen otras proteínas que son utilizadas en la elaboración de queso como se observa en la Tabla 4.

Tabla 4. Proteínas utilizadas en la elaboración de queso.

| Proteína | Ventajas | Desventajas |
|---------------------|--|------------------|
| Soya | Bajo costo ↑ Rendimiento (alta capacidad de gelificación y retención de agua) | Sabor Textura |
| Caseinato de Calcio | ↑ Rendimiento | Textura |
| Suero lácteo | ↑ Rendimiento | Textura |
| Huevo en polvo | ↑ Rendimiento | Sabor Textura |

La detección en los productos lácteos de la presencia de proteína de soya puede realizarse a través de pruebas caras como pueden ser el perfil de amino

Antecedentes

ácidos obtenido con un autoanizador de amino ácidos. Otro tipo de pruebas empleadas son la detección de las proteínas por medios Inmunológicos; estas pruebas son muy sensibles y capaces de detectar hasta un 3% de adulteración como se observa en la Tabla 5, sin embargo no son pruebas de fácil implementación y por otra parte pueden dar reacciones cruzadas . La electroforesis es una herramienta útil en la búsqueda de proteína no láctea ya que el perfil electroforético de las diferentes proteínas es como su huella digital. La presencia de proteína de soya puede ser detectada por la prueba de la ureasa; sin embargo no es concluyente, debido a que si el producto ha sido tratado térmicamente la enzima se inactiva dando un resultado negativo¹.

Tabla 5. Técnicas para determinar adulteraciones y contaminaciones en leche y productos lácteos.

| Producto | Adulteración | Técnica recomendada |
|----------|------------------------------------|--|
| Queso | Grasa (no láctea) | Índices de Reichert- Meissl-Polenske Índice de Kirschner |
| | Proteína * Otras (no lácteas) | Inmunológicas Perfil de amino ácidos |
| | Secuestrantes de agua * Almidón | Prueba Iodométrica |

Valdes Martínez, Sara E., Análisis de leche y productos lácteos, Tecnología Alimentaria, Vol. 26, No. 3, pag. 30.

1.4 ELECTROFORESIS

Electroforesis es un término que se refiere al movimiento de partículas cargadas (iones) en un campo eléctrico. Los métodos electroforéticos fueron desarrollados por primera vez hace 40 años por Arne Tiselius. Los avances, desde entonces, han resultado en la evolución de la electroforesis como uno de los métodos más efectivos de separación y caracterización. Los únicos requerimientos son: (a) que

Antecedentes

los componentes de la mezcla deben tener forma iónica, o ser convertidos a ella; (b) que cada componente tiene que poseer una carga neta distinta. En problemas bioquímicos, la electroforesis ha sido muy valiosa en el aislamiento y la separación de proteínas y en la determinación directa de la mezcla de proteínas. Hay dos razones principales para esto: (a) los métodos electroforéticos se pueden realizar en condiciones suaves, protegiendo así a las proteínas muy inestables de cualquier modificación estructural severa, y (b) algunos métodos tienen un alto poder de resolución, resultando una clara separación de moléculas proteicas similarmente cargadas.

Todos los métodos de electroforesis se pueden clasificar en zonales o de límite móvil. En el método de límite móvil, la electroforesis se realiza en solución, es decir, las partículas cargadas migran libremente a través de un canal abierto lleno de un medio líquido conductor, es decir, una solución salina. Una consecuencia natural de este tipo de separación, es que los solutos nunca llegan efectivamente a separarse unos de otros. Las partículas se desplazan hacia el electrodo de carga opuesta, formándose un borde que permite distinguir la presencia de cada componente. Una muestra pura se caracteriza por presentar un único límite entre las partículas de soluto que migran y la región del canal que contiene la solución; dos límites indicarán la presencia de dos solutos, y así sucesivamente. La única aplicación práctica del método de límite móvil es probar la pureza de una muestra y estimar las concentraciones relativas de los solutos.

Los métodos de electroforesis zonales han desplazado virtualmente al de límite móvil. La razón para esto es que, además de caracterizar pureza, las técnicas zonales son también efectivas para la separación, puesto que los solutos pueden resolverse en zonas discretas. La electroforesis zonal no se realiza en solución, sino que requiere un soporte sólido y, según el aparato, la migración puede ser horizontal o vertical.

Antecedentes

Existe en la actualidad una gran variedad de soportes sólidos, incluyendo tiras de papel filtro que fue el soporte primeramente usado. Un revolucionario avance en esta área fue establecido en 1955 por O. Smithies⁹, que desarrolló el uso de geles porosos de almidón como soporte sólido. El poder de resolución de gel de almidón fue muy superior a cualquier otra técnica.

Sin embargo, los resultados variables y las dificultades en la preparación del soporte sólido son desventajas definidas en el uso de geles de almidón. Ambas desventajas son eliminadas mediante el uso de geles de poliacrilamida descubiertos en 1959 por L. Ornstein y B.J. Davis⁹. Además de tener un poder de resolución comparable al de los geles de almidón, los geles de poliacrilamida poseen otras ventajas adicionales. Son termoestables, transparentes, durables, relativamente inertes químicamente, no iónicos y fáciles de preparar con una amplia variedad de tamaños de poros. Además, se pueden usar para caracterización en pequeña escala, o para trabajos preparatorios a gran escala⁹.

1.4.1 ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA

La electroforesis en gel de poliacrilamida es un método analítico de alto poder resolutivo que combina la migración en un campo eléctrico y el tamizado molecular a través de un gel de corrida^{10,11,12}.

El poro del gel desarrolla un papel fundamental. En el caso de los geles de poliacrilamida pueden conseguirse poros de diferentes diámetros según las condiciones de la polimerización; como consecuencia, para un gel de determinado poro el tamaño molecular y la carga neta serán los factores determinantes de la separación de las moléculas de una mezcla.

Los geles de poliacrilamida resultan de la polimerización en largas cadenas de la acrilamida monomérica ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$) y de su entrecruzamiento por intermedio de la N,N' - metilénbisacrilamida ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}-$

Antecedentes

CH=CH₂) llamada comúnmente bisacrilamida. El poro del gel formado dependerá de las concentraciones relativas de ambos reactivos durante la polimerización. La polimerización de la poli(acrilamida) necesita de un iniciador de proceso siendo los más comúnmente usados el persulfato de amonio y la riboflavina, se añade como acelerador N,N,N',N'-tetrametilendiamina (TEMED). En el sistema Persulfato de amonio - TEMED, este último cataliza la formación de radicales libres a partir del persulfato lo que en definitiva inicia la polimerización. Cuando se utiliza riboflavina se originan radicales libres al fotodescomponerse la riboflavina.

La electroforesis en gel de poli(acrilamida) puede efectuarse en tubos o en placa. En el primer caso se utiliza un cilindro de gel para cada muestra a analizar, mientras que cuando se emplean placas pueden correrse en forma simultánea, en una sola de ellas, varias muestras. Este procedimiento resulta útil para separar proteínas de una mezcla, las que pueden ser aisladas por simple cortado del gel y posterior elución.

La electroforesis en geles de poli(acrilamida) puede desarrollarse también usando soluciones amortiguadoras que contienen sustancias disociantes, en especial detergentes no iónicos (dodecil sulfato de sodio SDS). Las proteínas a analizar son tratadas térmicamente a 100°C en exceso de SDS y 2-mercaptoetanol. En esas condiciones el tiol rompe los puentes disulfuros que pudieran existir y el agente desnaturizante hace que las proteínas se desdoblén en sus polipéptidos constitutivos, los que fijan SDS en una relación constante (1.4 g de SDS por gramo de polipéptido) a causa de ello la carga intrínseca del péptido se hace insignificante ante el exceso de carga negativa del SDS; como consecuencia la carga de todas las moléculas será prácticamente idéntica. Su desplazamiento en un campo eléctrico en el que el soporte de corrida es un gel de determinada porosidad dependerá exclusivamente de su tamaño molecular. Este método permite por comparación con sustancias de peso molecular conocido que han sido corridas simultáneamente, determinar el peso molecular relativo de los productos

Antecedentes

en análisis. Se utiliza en forma rutinaria con tal finalidad y para ello son necesarias cantidades ínfimas de muestra^{13,14}.

La electroforesis en gel de poliacrilamida puede desarrollarse usando sistemas amortiguadores continuos o discontinuos. En el primer caso, los iones que constituyen el amortiguador durante todo el recorrido de la muestra (gel concentrador o reservorio) son los mismos y el pH es constante. En algunas situaciones sólo puede variar la concentración iónica en los pozos de contención o reservorios. Cuando se usan estos sistemas, las muestras a analizar se siembran directamente en gel de resolución. En los sistemas discontinuos el amortiguador de los geles y de los reservorios de los electrodos son diferentes. Normalmente los pH de ambas soluciones amortiguadoras son también distintos. Las muestras a analizar se colocan en un gel poro grueso (gel de paso rápido, apilamiento o stacking) en amortiguador Tris-HCl, pH 6.8, el que se ha hecho polimerizar por sobre el gel de corrida (pH 8.8). El amortiguador del recipiente que contiene el cátodo es Tris-glicina pH 8.3. Ello permite que volúmenes apreciables de muestras diluidas de proteínas puedan ser analizadas ya que al ser colocados en un gel de éste tipo en el que iones y el pH de los amortiguadores son diferentes, las moléculas se desplazarán a través del gel y se concentrarán en una zona estrecha, en el límite correspondiente al gel de corrida, previo a su separación de éste. El pH del gel de apilamiento y de la muestra es (pH 6.8). La glicina que forma parte del amortiguador del reservorio catódico está muy poco disociada ya que este es próximo a su pKa por lo que su movilidad en el campo eléctrico será reducida. Los iones cloruro, en cambio, a ese pH tendrán una movilidad mayor debido a su grado de disociación y la movilidad de las proteínas ocupará una posición intermedia. Cuando se aplique un voltaje los iones cloruro migran alejándose de la glicina dejando tras de ellos una zona de menor conductividad. Como es inversamente proporcional al campo de fuerza, esta zona genera un gradiente de voltaje que acelera la migración hacia ella de la glicina, la que se aproxima a los iones cloruro, creándose un estado de uniformidad en el que los productos de movilidad y gradiente de pH de ambos iones es igual. Estos

Antecedentes

se mueven a la misma velocidad, con un estrecho límite de separación entre ellos^{13,14,15}.

Cualquier proteína que se mueve por delante de la banda iónica es rápidamente atrapada ya que la movilidad de éstas es menor a la de los iones cloruro pero mayor que la de la glicina, como consecuencia es concentrada en una delgada banda. Las diferentes proteínas se irán apilando una sobre otra en una banda delgada por detrás de los iones cloruro y por delante de la glicina, acumulándose finalmente en el límite del gel de resolución^{10,11,12,13,14,15}.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Establecer la presencia de proteína de soya en quesos tipo manchego expendidos en la Ciudad de México.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Elaborar los quesos patrones tipo manchego para obtener la referencia de su perfil electroforético.
2. Determinar las condiciones óptimas de extracción de proteína de queso tipo manchego.
3. Establecer la concentración de gel separador de poliacrilamida para la adecuada obtención de los perfiles electroforéticos.
4. Obtener los patrones electroforéticos de queso referencia, quesos tipo manchego comerciales y quesos adicionados con proteína de soya con diferentes niveles de adición.
5. Determinar la composición de los quesos comerciales elegidos, a través de un análisis químico proximal para evaluar su calidad respecto a la Norma Oficial.
6. Contrastar los perfiles electroforéticos de los quesos comerciales con los de queso manchego y proteína de soya, y establecer las bandas electroforéticas diferenciales entre queso tipo manchego y el queso adicionado con soya.

CAPÍTULO II. DESARROLLO METODOLÓGICO

DESCRIPCIÓN DEL CUADRO METODOLÓGICO

El diagrama 3 muestra la metodología seguida en el presente estudio, con el fin de resolver el objetivo general "Establecer la presencia de proteína de soya en quesos tipo manchego expendidos en la Ciudad de México", se llevó a cabo una investigación bibliográfica sobre generalidades de queso, adulteración y electroforesis.

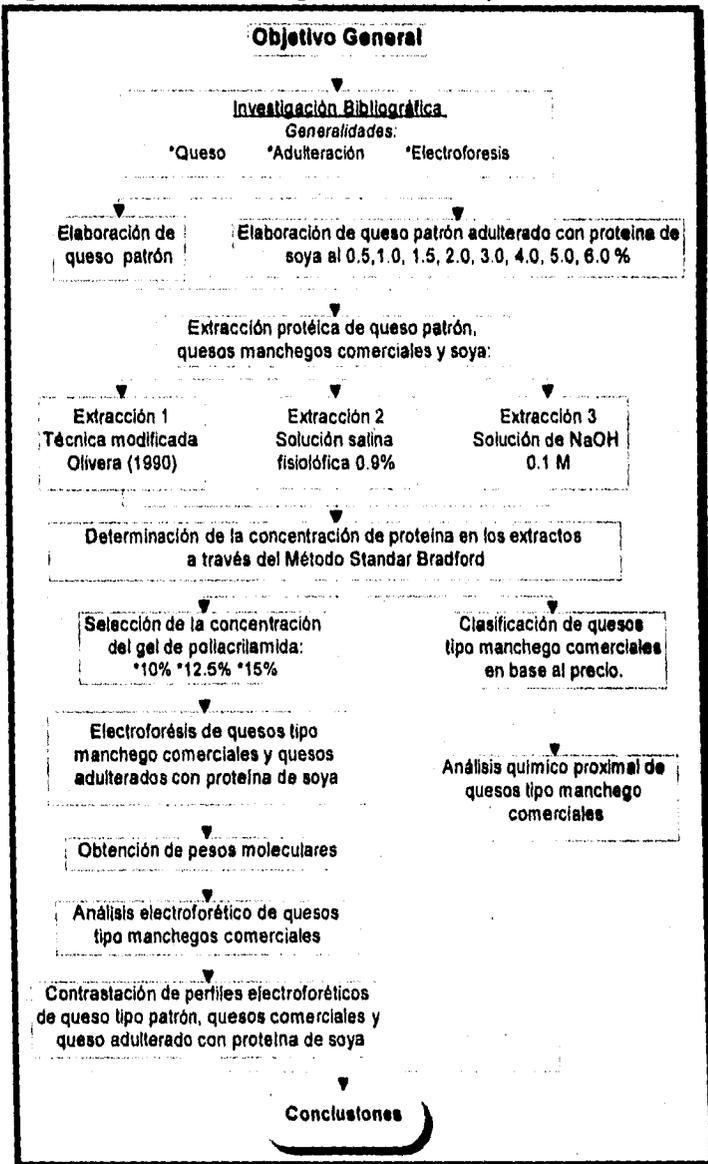
Se elaboraron queso patrón y queso adicionado con concentraciones conocidas de proteína de soya (0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0 % en peso), empleando el proceso tradicional de elaboración, la leche fué obtenida del Centro de Producción Agropecuaria de la FES-C, se seleccionó la técnica más adecuada para realizar la extracción de la proteína, probando las siguientes técnicas:

- a) uso de la técnica modificada de Olivera (1990)^{14,15}.
- b) el uso de solución salina fisiológica 0.9%^{17,18,19}.
- c) el uso de solución de hidróxido de sodio 0.1 M.^{17,18,19}.

Cuando se hubo seleccionado y estandarizado la técnica de extracción de proteína más adecuada (en la cual se obtuvo una mayor extracción de proteína), se determinó la concentración de proteína para cada uno de los extractos por medio del empleo del método standar Bradford. Se probaron diferentes concentraciones del gel separador de poliacrilamida (10, 12.5, 15%), con el fin de estandarizar los geles utilizados en la electroforesis, definiendo tiempos de corrida y amperaje a emplear.

Para la realización de las pruebas electroforéticas a quesos tipo manchego comerciales, se adquirieron en el supermercado en dos ocasiones, 15 marcas comerciales diferentes de queso manchego con registro y etiqueta y cuya apariencia era la indicada en la Norma Oficial Mexicana para queso tipo manchego, estos quesos se clasificaron en 3 grupos en base a su precio. A los quesos comerciales seleccionados se les realizó un análisis químico proximal

Diagrama 3. Cuadro Metodológico. Desarrollo experimental de la tesis.



Desarrollo Metodológico
para conocer la composición y ver si cumplían con lo establecido en la Norma Oficial para este producto.

Se les realizó la electroforesis a los patrones de aislado protéico de soya (supro 590), queso patrón y queso adicionado con proteína de soya, así como a los quesos comerciales. Después se obtuvieron los pesos moleculares correspondientes a las proteínas presentes en los perfiles electroforéticos.

Después de haber realizado las corridas se hizo una contrastación de perfiles electroforéticos de queso patrón, quesos comerciales y quesos adulterados con diferentes niveles de proteína de soya, buscando la presencia de las proteínas características de soya en quesos tipo manchego comerciales, para así poder evaluar posibles adulteraciones y el nivel de ésta en los quesos comerciales.

2.1 QUESO PATRÓN

2.1.1 ELABORACIÓN DE QUESO PATRÓN

El queso manchego patrón se elaboró en el Centro de Producción Agropecuaria de la Facultad por el método tradicional de procesamiento, y el proceso de elaboración se describe en el anexo IV y se muestra en el diagrama 4 (pág. 86).

2.2 QUESO PATRÓN ADULTERADO

2.2.1 ELABORACIÓN DE QUESO PATRÓN ADULTERADO CON PROTEÍNA DE SOYA

La elaboración de queso tipo Manchego adicionado con aislado proteico de soya, se llevó a cabo siguiendo el procedimiento que se describió anteriormente, con la diferencia de la adición de aislado proteico de soya, el cual se adicionó en 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0% en peso. El aislado proteico de soya se adicionó junto con el cuajo y colorante, inmediatamente después de la adición de cultivos lácticos y de reposo de 1 hora.

2.3 EXTRACCIÓN DE PROTEÍNA

Los métodos utilizados para realizar la extracción de proteína al queso patrón, queso adicionado con proteína de soya (0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0% en peso), soya y quesos manchego comerciales son los siguientes:

2.3.1 SOLUCIÓN SALINA FISIOLÓGICA

Solución salina fisiológica. Se tomaron 0.2 g de queso homogenizando en mortero con 12.5 ml de solución salina, posteriormente se sometió a agitación en un Vortex-Genie modelo K550-G durante 20 minutos a la velocidad máxima alcanzada por el aparato para después ser centrifugado a 3500 rpm durante 30 minutos. A continuación se tomó el sobrenadante con una pipeta Pasteur y la pastilla fue nuevamente resuspendida en 12.5 ml de solución salina sometiéndola

Desarrollo Metodológico

por segunda vez a agitación y centrifugada a las mismas condiciones. Se llevó a cabo la misma metodología para el caso de los aislados proteicos de soya ^{17,18,19}.

2.3.2 SOLUCIÓN DE HIDRÓXIDO DE SODIO

Solución de hidróxido de sodio 0.1M y se realizó la extracción siguiendo la secuencia señalada para el caso de solución salina fisiológica, tanto para queso patrón como para los aislados proteicos de soya ^{17,18,19}.

2.3.3 MÉTODO DE OLIVERA (1990)

El último método de extracción consistió en el uso del **método de Olivera (1990)**^{14,15} ligeramente modificada, la cual consistió en el empleo de una solución de amortiguadora Tris-HCl 0.006M/2% Mercaptoetanol pH 7.4. Se tomó 0.2 g de muestra y se diluyó en 12.5 ml de solución extractora sometiéndola a agitación en un Vortex-Genie modelo K550-G a la velocidad máxima alcanzada por el aparato durante 20 minutos. Posteriormente se llevó a cabo una centrifugación a 3500 rpm durante 30 minutos y después se tomó el sobrenadante volviendo a someter la pastilla residuo al mismo tratamiento juntando los sobrenadantes.

Las experimentaciones se realizaron por triplicado y se obtuvo un promedio de los resultados obtenidos.

2.4 MÉTODO STANDAR BRADFORD

La concentración de proteína para cada uno de los extractos se efectuó por medio del empleo de la técnica de Bradford ¹⁶ y se construyó una curva patrón con albúmina, el método standard se puede consultar en el anexo III.

2.5 CLASIFICACIÓN DE QUESOS TIPO MANCHEGO COMERCIALES

De los quesos tipo manchego comerciales expandidos en la Ciudad de México se realizó una selección de aquellos que cumplieran con las características que indica la Norma Oficial de Calidad de la SECOFI NOM-F-462-1984 en base a que en etiqueta cumplieran con estos requisitos y, estos se clasificaron en base al precio de venta al público.

2.6 ANÁLISIS QUÍMICO PROXIMAL DE QUESOS TIPO MANCHEGO COMERCIALES

El análisis químico proximal del queso patrón y los quesos manchegos comerciales se realizó empleando las técnicas oficiales del AOAC y a continuación se muestra en la Tabla 6.

Tabla 6. Técnicas del análisis químico proximal.

| DETERMINACIÓN | TÉCNICA |
|-----------------|--------------------------------|
| Proteína | Micro Kjeldahl ^a |
| Humedad | Secado por estufa ^b |
| Grasa | Gerber ^c |
| Ceniza | Método general ^d |
| Sólidos totales | Por diferencia |

A.O.A.C., (1990), Official Methods of Analysis, Ed. by Disney Williams Arlington Virginia, pag. 795, 841-844..

Las experimentaciones se realizaron por triplicado y se obtuvo un promedio de los resultados obtenidos.

Se realizó un análisis de rango múltiple por el método de Tukey al 95% de confianza para saber si existen diferencias significativas entre todas las marcas de queso tipo manchego analizadas y la Norma Oficial Mexicana.

2.7 ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA

El sistema de electroforesis elegido fue en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (DSS), ya que ofrece una excelente resolución proteica y es aplicable a proteínas desnaturalizadas, lo que permite su utilización en alimentos que hayan sufrido procesos de calentamiento, como leche, jamón y quesos ^{14,15}.

2.7.1 ELECTROFORESIS EN GELES DISCONTINUOS

El método utilizado fue básicamente el sistema de Laemmli (1970)¹², utilizando geles discontinuos. Para estudiar las mejores condiciones de separación de proteínas lácteas se probaron las siguientes condiciones de concentración de gel separador de acrilamida 10, 12.5, 15%.

El gel separador se obtuvo a partir de una solución madre de 30% en peso de acrilamida y de 0.8% en peso de N.N'-bis-metilenacrilamida en Tris-HCl 0.357 M, 0.1% de SDS pH 8.8. Los geles fueron polimerizados químicamente por la adición de 0.025% en volumen de tetrametiletilendiamina (TEMED) y persulfato de amonio. El gel concentrador se preparó de una solución madre de la misma concentración referida para el gel separador pero en Tris-HCl 0.125M, 0.1% SDS pH 6.8 y fué polimerizado químicamente en la misma forma que el gel separador. El amortiguador electrodo contenía Tris 0.025% M, Glicina 0.192M, 0.1% de SDS pH 8.3¹³.

Para cada uno de los sistemas se efectuó una precorrida a 13 mA de corriente constante durante 30 min. empleando amortiguador de electrodo pH 8.3, con el fin de efectuar una limpieza del gel eliminando posibles partículas extrañas que posteriormente obstruyan el paso de las proteínas, además de saturar el gel con el amortiguador y dejarlo cargado eléctricamente para facilitar la migración proteica posterior; al término de esto se realizó el cambio de amortiguador para

Desarrollo Metodológico

efectuar las pruebas de electroforesis correspondientes. Las corridas se realizaron a 13 mA de corriente constante durante 45 min. Las bandas fueron reveladas por tinción con azul de Coomassie¹⁶.

Se utilizaron como marcadores de peso molecular miosina (205kd), β -galactosidasa (116 kd), β -fosforilasa (97.4 kd), albúmina bovina (66 kd) y albúmina de huevo (45 kd), anhidrasa carbónica (29 kd). Todos los marcadores fueron marca SIGMA Chem. Co²⁰.

Se empleó una celda de electroforesis modelo SE 250 - Mighty Small II¹². Las composiciones finales de los geles a emplear, es decir del gel tapón, concentrador y separador se pueden consultar en el anexo II.

2.7.2 OBTENCIÓN DE PATRONES ELECTROFORÉTICOS APARENTES DE QUESO, PROTEÍNA DE SOYA Y QUESO ADULTERADO

Una vez que se hubo seleccionado el método de extracción proteica a utilizar, a los extractos de queso patrón, aislado proteico de soya y queso adicionado con proteína de soya (0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0% en peso) se les realizó el corrimiento electroforético con el fin de obtener el perfil proteico y conocer los pesos moleculares correspondientes a las bandas de proteína que se presentaron en los geles para ser tomados como estándares de referencia y poder compararlos con los perfiles obtenidos de los quesos tipo manchego comerciales. Todas las experimentaciones se realizaron por triplicado y se obtuvieron los perfiles promedios correspondientes.

2.7.3 CURVA DE CALIBRACIÓN DE PESOS MOLECULARES

Con el fin de establecer los pesos moleculares de las proteínas presentes en el queso fué necesario preparar una curva de calibración con los marcadores de

Desarrollo Metodológico

peso molecular empleados. Habiendo finalizado las corridas con sus respectivas tinciones se determinaron las distancias a las cuales se ubicaron las bandas de proteína en el gel midiéndose desde el borde superior del gel hasta la banda en cuestión. Posteriormente se realizó el cálculo de R_f , que es la relación entre la longitud total del gel y la distancia a la cuál se ubicó la banda de proteína al final de la corrida.

$$R_f = \frac{\text{Distancia de ubicación}}{\text{Longitud total de gel}}$$

Se construyó la curva de calibración para los pesos moleculares en el gráfico de log PM vs R_f .

2.8 OBTENCIÓN DE PERFILES ELECTROFORÉTICOS DE QUESOS TIPO MANCHEGO COMERCIALES

Una vez que se hubo establecido la solución extractora de proteínas y el gel más adecuado para realizar las corridas electroforéticas, se realizó electroforesis con el fin de obtener los perfiles proteicos de los quesos manchegos expendidos en la Ciudad de México y de esta forma poder comparar los resultados con los patrones de referencia de queso, proteína de soya, queso adicionado con proteína de soya, y así poder evaluar si existe o no la adulteración en los quesos comerciales estudiados. Las pruebas se realizaron por triplicado para cada uno de los lotes mencionados en la clasificación de quesos manchego comerciales.

CAPÍTULO III. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

3.1 SELECCIÓN DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN

Para conocer la concentración de proteína presente en los extractos de soya y quesos tipo manchego comerciales empleando los diferentes métodos de extracción, se aplicó el método standar Bradford, y se elaboró la curva patrón Macro utilizando una solución de albúmina de huevo pura como patrón.

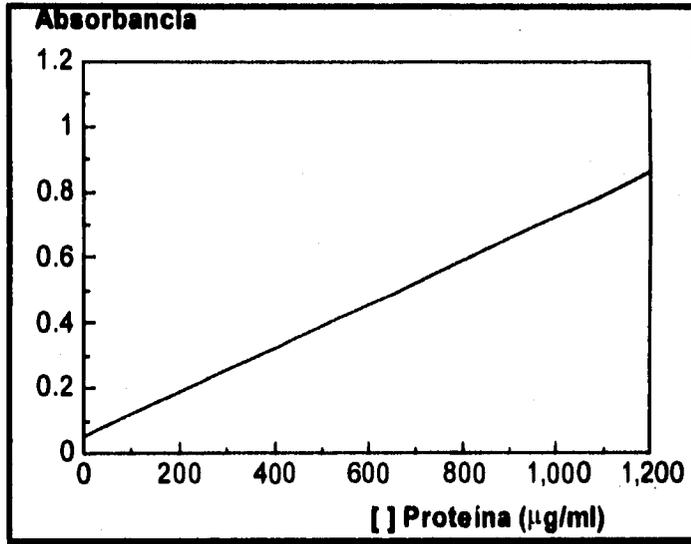
Para la elaboración de la curva Macro se colocaron en 10 tubos de 12 x 100 mm las siguientes concentraciones que se muestran en la Tabla 7 y se obtuvieron las lecturas correspondientes de absorbancia en el espectrofotómetro. Los resultados reportados son el promedio de la experimentación por triplicado.

Tabla 7. Método standar Macro.

| Concentración de albúmina $\mu\text{g/ml}$ | Absorbancia |
|--|-------------|
| 100 | 0.101 |
| 200 | 0.220 |
| 300 | 0.300 |
| 400 | 0.350 |
| 500 | 0.400 |
| 600 | 0.470 |
| 700 | 0.520 |
| 800 | 0.582 |
| 900 | 0.632 |
| 1000 | 0.719 |

La curva que se obtiene al graficar la concentración de proteína ($\mu\text{g/ml}$) vs absorbancia es la siguiente, y en ésta se puede conocer la concentración de proteína a través de una interpolación, en muestras que tengan valores de absorbancia en un rango de 0 a 0.719 $\mu\text{g/ml}$.

Gráfica 1. Curva Patrón Bradford Macro.



La fórmula de regresión es $y = A + Bx$; el término constante A (ordenada) es $A = 0.0555$, el coeficiente de regresión B (pendiente) es igual $B = 0.000669$, el coeficiente de correlación r es igual $r = 0.9918$.

Los datos obtenidos de la absorbancia de los diferentes extractos fueron interpolados de la curva patrón Macro para obtener la concentración de proteína en $\mu\text{g/ml}$, estos datos son los resultados promedios de tres determinaciones, se muestran en la tabla 8.

Tabla 8. Extracción de proteína de soya.

| Solución Extractora | Concentración de proteína µg/ml |
|---|--|
| Solución salina fisiológica 0.9 % | 224.1803 |
| Solución Tris HCl 0.006 M/2% Mercaptoetanol pH= 7.46 | 1358.7431 |
| Solución de Hidróxido de sodio 0.1M | * |

*La soya no se pudo disolver en la solución de Hidróxido de sodio.

Como puede observarse en esta tabla en cuanto a la evaluación de los 3 diferentes métodos de extracción sugeridos para la extracción de proteína, la concentración más baja de proteína fue la del extracto obtenido mediante el uso de solución salina fisiológica, la cual fué tan solo el 16.5% de la proteína extraída con solución Tris HCl 0.006 M/2% Mercaptoetanol, en el caso del uso de solución de hidróxido de sodio, la soya y el queso no pudieron ser disueltos perfectamente, por lo cual se decidió no utilizarla.

Bajo las mismas condiciones en las que se efectuó la extracción de proteína para soya, se realizó la extracción de proteína para quesos manchego comerciales, la concentración de proteína de estos extractos fué determinada por el método de Bradford para así poder estandarizar la concentración de proteína en los geles y los resultados obtenidos se muestran a continuación en la Tabla 9.

Tabla 9. Extracción de proteína de Quesos Comerciales y Patrón.

| Queso | Absorbancia Solución Salina fisiológica | Solución Salina fisiológica 0.9% Concentración de proteína $\mu\text{g/ml}$ | Absorbancia Solución Tris HCl 0.006M /2% Mercaptoetanol | Solución Tris HCl 0.006M/ 2% Mercaptoetanol Concentración de proteína $\mu\text{g/ml}$ |
|--------|--|---|--|--|
| 1 | 0.537 | 719.0088 | 0.720 | 992.3285 |
| 2 | 0.381 | 458.1439 | 0.528 | 705.5868 |
| 3 | 0.585 | 760.8282 | 0.730 | 1007.2640 |
| 4 | 0.465 | 611.4731 | 0.635 | 865.3767 |
| 5 | 0.412 | 532.3150 | 0.554 | 744.3991 |
| 6 | 0.381 | 486.0149 | 0.446 | 583.0957 |
| 7 | 0.502 | 666.7345 | 0.676 | 928.6123 |
| 8 | 0.182 | 158.9273 | 0.617 | 838.4828 |
| 9 | 0.483 | 608.4860 | 0.748 | 1034.1479 |
| 10 | 0.498 | 660.7603 | 0.616 | 836.9993 |
| 11 | 0.468 | 612.9667 | 0.571 | 769.7895 |
| 12 | 0.483 | 608.4860 | 0.584 | 789.2057 |
| 13 | 0.379 | 483.0278 | 0.411 | 530.8214 |
| 14 | 0.485 | 641.3441 | 0.621 | 1025.1866 |
| 15 | 0.512 | 524.8472 | 0.742 | 881.8058 |
| Patrón | 0.407 | 526.2295 | 0.646 | 885.3825 |

Análisis y Discusión de Resultados

Como puede verse en esta tabla se obtuvieron al igual que en el caso del aislado de soya, mayores concentraciones de proteína con la solución extractora Tris HCl 0.006 M/2% Mercaptoetanol, aunque en este caso la diferencia en % de extracción fueron mayores, se obtuvo en promedio el 72% más de proteína respecto al de la solución salina fisiológica, el cual pudo haber sido consecuencia de la baja capacidad de esta solución para solubilizar las proteínas de la leche, por tratarse de una solución de baja fuerza iónica. La mayor concentración proteica fue obtenida a partir del método de extracción de Olivera (1990)^{14,15} modificado (Solución Tris HCl 0.006 M/2% Mercaptoetanol), y este resultado se puede explicar por la composición de la solución, es decir, principalmente la capacidad del 2-mercaptoetanol de provocar el rompimiento de los enlaces disulfuro de las proteínas permitiendo con esto una mayor disgregación de los complejos proteicos.

Una vez conocida la concentración de proteína se pudo determinar el volumen (μ l) de cada muestra necesaria para tener una concentración constante de 8 μ g/ μ l de proteína en los geles a realizar, los resultados se encuentran en la Tabla 10.

Tabla 10. Volumen (μl) a emplear en los geles.

| Queso | Volumen (μl) Solución Salina | Volumen (μl) Solución Tris HCl 0.006 M 2% Mercaptoetanol |
|-------|---|--|
| 1 | 11 | 8 |
| 2 | 18 | 11 |
| 3 | 11 | 8 |
| 4 | 13 | 9 |
| 5 | 15 | 11 |
| 6 | 17 | 14 |
| 7 | 12 | 9 |
| 8 | 15 | 10 |
| 9 | 13 | 8 |
| 10 | 12 | 10 |
| 11 | 13 | 10 |
| 12 | 13 | 10 |
| 13 | 15 | 15 |
| 14 | 12 | 10 |
| 15 | 12 | 8 |
| 16 | 15 | 9 |

El volumen en μl de cada muestra nos asegura el colocar $8 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ de proteína en los pozos del gel, y así poder comparar bajo las mismas condiciones de concentración todas las muestras a estudiar. La máxima capacidad en volumen de los pozos en los geles es de $15 \mu\text{l}$.

3.2 CLASIFICACIÓN DE QUESOS TIPO MANCHEGO COMERCIALES

De la selección realizada a los quesos tipo manchego comerciales, conforme a las características que indica la Norma Oficial de Calidad de la SECOFI NOM-1984,

se obtuvieron tres lotes de queso manchego, y cada lote contiene cinco marcas comerciales de éste como se muestra en la Tabla 11.

Tabla 11. Clasificación de quesos tipo manchego comerciales.

| LOTE | PRECIO DE VENTA AL PÚBLICO (N\$) | QUESO MANCHEGO |
|------|----------------------------------|----------------|
| I | 27.85 | QUESO 1 |
| | 27.65 | QUESO 2 |
| | 36.50 | QUESO 3 |
| | 38.00 | QUESO 4 |
| | 38.50 | QUESO 5 |
| II | 39.50 | QUESO 6 |
| | 39.50 | QUESO 7 |
| | 39.70 | QUESO 8 |
| | 39.50 | QUESO 9 |
| | 39.90 | QUESO 10 |
| III | 40.00 | QUESO 11 |
| | 40.30 | QUESO 12 |
| | 40.80 | QUESO 13 |
| | 40.80 | QUESO 14 |
| | 48.00 | QUESO 15 |

3.3 ANÁLISIS QUÍMICO PROXIMAL DE QUESOS TIPO MANCHEGO COMERCIALES Y QUESO PATRÓN

En la siguiente Tabla 12 se muestran los resultados obtenidos de la composición proximal de queso patrón elaborado, de los quesos tipo manchego comerciales y los datos marcados en la Norma Oficial correspondiente.

Tabla 12. Composición Química de Quesos Manchegos Comerciales

| Queso | Humedad % | Grasa % | Proteínas % | Cenizas T. % | Sólidos Totales % | Precio de venta al público (N\$) |
|---------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|----------------------------|-------------------------|---|
| 1* | 35.68 ^a | 25.66 ^{c,d} | 23.96 ^d | 3.73 ^{c,d,e,f} | 64.32 | 27.85 |
| 2* | 37.87 ^b | 39.33 ^f | 18.57 ^{b,c} | 3.85 ^{f,g} | 62.13 | 27.65 |
| 3 | 38.22 ^b | 33.33 ^f | 24.46 ^d | 3.57 ^{c,d,e} | 61.78 | 36.50 |
| 4* | 48.28 ^b | 24.20 ^{c,b} | 22.24 ^f | 3.89 ^{f,g} | 51.72 | 38.00 |
| 5* | 40.5 ^c | 33.66 ^{d,f} | 21.63 ^{e,f} | 3.76 ^{e,f} | 59.5 | 38.50 |
| 6* | 53.62 ^h | 27.33 ^{d,e,f} | 15.16 ^a | 3.02 ^b | 46.38 | 39.50 |
| 7* | 45.91 ^d | 29 ^g | 21.37 ^{e,f} | 3.87 ^{f,g} | 54.09 | 39.50 |
| 8* | 50.93 ^d | 23.33 ^b | 20.72 ^b | 3.85 ^{e,f,g} | 49.07 | 39.70 |
| 9* | 52.99 ^h | 20.00 ^a | 22.19 ^f | 4.18 ^h | 47.01 | 39.50 |
| 10* | 48.8 ^{f,e} | 28.33 ^{e,f,g} | 18.88 ^{c,d} | 3.84 ^{e,f} | 51.2 | 39.90 |
| 11* | 49.81 ^{f,g} | 28.66 ^{e,f,g} | 17.86 ^b | 3.56 ^{c,d} | 50.19 | 40.00 |
| 12* | 50.77 ^g | 29.33 ^{g,h} | 15.52 ^a | 3.69 ^{c,d,e,f} | 49.23 | 40.30 |
| 13* | 46.27 ^d | 33.66 ^f | 14.69 ^a | 4.12 ^{g,h} | 53.73 | 40.80 |
| 14* | 45.37 ^d | 31.00 ^h | 19.64 ^d | 3.48 ^c | 54.83 | 40.80 |
| 15 | 44.99 ^d | 27 ^a | 23.73 ^g | 3.91 ^{f,g,h} | 55.01 | 48.00 |
| Patrón* | 50.09 ^g | 27.00 ^{d,e} | 18.83 ^{c,d} | 2.32 ^a | 49.91 | |
| Norma | Máximo 48.0 ^e | Mínimo 26.0 ^e | Mínimo 22.0 ^f | Máximo 6.5 ^f | Mínimo 52.0 | |

Superscriptos: grupos homogéneos del análisis estadístico.

*Fuera de Norma.

Como se observa se presentó una pequeña diferencia entre el queso patrón y lo establecido en la Norma Oficial, esto puede deberse a que en el Centro de Producción Agropecuaria no se cuenta con el equipo adecuado para la elaboración de este tipo de queso y el prensado no fué el más adecuado, lo cual repercutió en el contenido de humedad y el resto de los componentes. A pesar de

Análisis y Discusión de Resultados

ésto, se decidió utilizarlo como patrón por representar un modelo del queso tipo manchego sin ningún tipo de adulteración, ya que su elaboración fué hecha utilizando exclusivamente leche de vaca.

De acuerdo a los resultados obtenidos del análisis químico proximal realizado a 15 marcas comerciales, se observó que en términos generales no existe una relación directa entre la calidad del producto y el precio de venta al público.

Los quesos de mayor precio de venta al público (11-14) no cuentan con la composición que especifica la Norma Oficial Mexicana de queso manchego, en general presentan un bajo contenido de proteína. Por otro lado, el queso de más bajo precio de venta 1 (\$27.85) se encuentra muy cercano al cumplimiento de las especificaciones de composición de la Norma, el queso 3 (\$36.50) cumple con las especificaciones de composición establecidas y sin embargo la diferencia de precio con el queso 1 es de \$11.00 aproximadamente.

Se realizó un análisis de rango múltiple por el método de Tukey al 95% de confianza para saber si existen diferencias significativas entre todas las marcas de queso tipo manchego analizadas y la Norma Oficial Mexicana.

• Con respecto al contenido de humedad:

El rango de variación del porcentaje de humedad en los quesos comerciales fué de 35.03% - 54.27%, el porcentaje especificado de humedad por la Norma Oficial es de un máximo de 48%, sólo el 50% de los quesos analizados cumplen con lo establecido en ésta.

De acuerdo al análisis estadístico existen 8 grupos homogéneos, es decir, en cada grupo no existen diferencias significativas entre ellos. Los grupos son los siguientes: a,b,c,d,e,f,g,h que se muestran en la Tabla 12 (pag. 41).

Análisis y Discusión de Resultados

En el grupo e se encuentran aquellos quesos que no guardan diferencia con respecto al valor máximo de la Norma Oficial para humedad en quesos manchegos.

- Con respecto al contenido de grasa:

El rango de variación del porcentaje de grasa en los quesos comerciales fué de 19.15% - 40.17%, el porcentaje especificado de grasa por la Norma Oficial es de un mínimo de 26%, sólo el 68.75% de los quesos analizados cumplen con lo establecido en ésta.

De acuerdo al análisis estadístico existen 10 grupos homogéneos, es decir, en cada grupo no existen diferencias significativas entre ellos. Los grupos son los siguientes: a,b,c,d,e,f,g,h,i,j que se muestran en la Tabla 12 (pág. 41).

En el grupo d se encuentran aquellos quesos que no guardan diferencia con respecto al valor mínimo de la Norma Oficial para grasa en quesos manchegos.

- Con respecto al contenido de proteína:

El rango de variación del porcentaje de proteína en los quesos comerciales fué de 14.22% - 24.92%, el porcentaje especificado de proteína por la Norma Oficial es de un mínimo de 22%, sólo el 31.25% de los quesos analizados cumplen con lo establecido en ésta.

De acuerdo al análisis estadístico existen 7 grupos homogéneos, es decir, en cada grupo no existen diferencias significativas entre ellos. Los grupos son los siguientes: a,b,c,d,e,f,g que se muestran en la Tabla 12 (pág. 41).

En el grupo f se encuentran aquellos quesos que no guardan diferencia con respecto al valor mínimo de la Norma Oficial para proteína en quesos manchegos.

- Con respecto al contenido de cenizas:

El rango de variación del porcentaje de cenizas en los quesos comerciales fué de 2.18% - 4.31%, el porcentaje especificado de cenizas por la Norma Oficial es de

Análisis y Discusión de Resultados

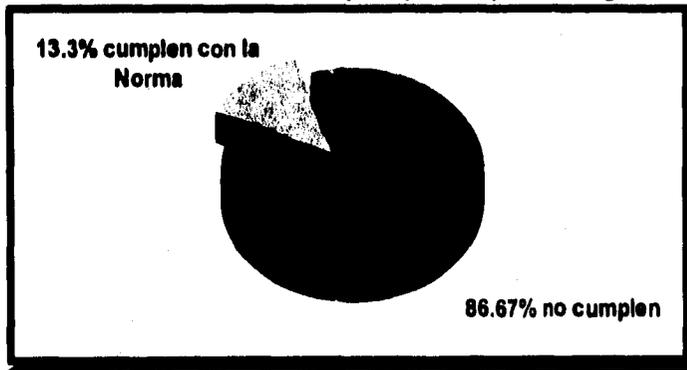
un máximo de 6.5%, en cuanto a este parámetro el 100% de los quesos analizados cumplen con lo establecido en ésta.

De acuerdo al análisis estadístico existen 9 grupos homogéneos, es decir, en cada grupo no existen diferencias significativas entre ellos. Los grupos son los siguientes: a,b,c,d,e,f,g,h,i que se muestran en la Tabla 12 (pág. 41).

Se observa que el valor mínimo de cenizas de los quesos comerciales se encuentra dentro de lo indicado en la Norma Oficial.

De los 15 quesos manchegos comerciales analizados, sólo 2 (3,15) cumplen con la composición establecida por la Norma Oficial Mexicana, lo que representa el 13.3% como se observa en la Fig. No. 1E.

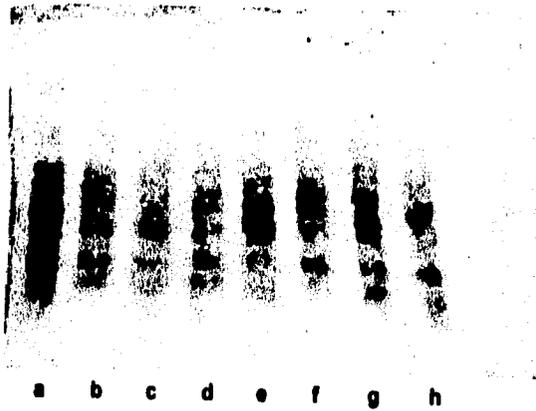
Figura 1E. Representación gráfica del cumplimiento de especificaciones de la Norma Oficial Mexicana para quesos tipo manchego.



3.4 ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA

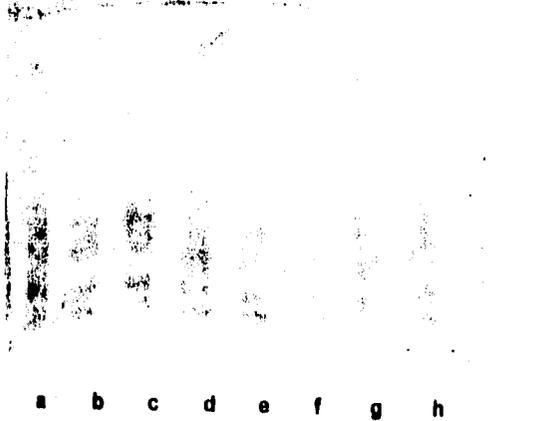
Con el fin de obtener una adecuada resolución de las proteínas en los geles de poliacrilamida, se utilizaron tres concentraciones del gel separador 10, 12.5 y 15% de concentración de acrilamida-bisacrilamida. Los resultados se observan en las figuras No. 1A, 2A y 3A respectivamente.

FIGURA 1A. 10 % Gel Separador



a) Queso 8, b) Queso 9, c) Queso 10, d) Queso 11
e) Queso 12, f) Queso 13, g) Queso 14, h) Queso 15

FIGURA 2A. 12.5 % Gel Separador



a) Queso 8, b) Queso 9, c) Queso 10, d) Queso 11
e) Queso 12, f) Queso 13, g) Queso 14, h) Queso 15

FIGURA 3A. 15 % Gel Separador



- a) Patrón, b) Queso 1, c) Queso 2, d) Queso 3
- e) Queso 4, f) Queso 5, g) Queso 6, h) Queso 7
- i) Queso 8

Análisis y Discusión de Resultados

En las pruebas realizadas a tres concentraciones diferentes del gel separador se colocaron las mismas muestras para poder compararlas y los resultados obtenidos fueron los siguientes:

- En el gel 10% acrilamida-bisacrilamida se observaron bandas de proteína muy bien definidas y se presentó la mayor cantidad de bandas de alto y bajo peso molecular sin perder definición, por lo que se obtuvo el perfil proteico aparente más completo.
- En el gel 12.5% acrilamida-bisacrilamida se encontraron bandas de proteína no bien definidas y las de bajo peso molecular no se observan claramente.
- En el gel 15% acrilamida-bisacrilamida se observa una pérdida de resolución por lo que no están bien definidas las bandas de proteína, sobre todo en el caso de las de bajo peso molecular.

Tomando en cuenta los resultados antes mencionados, la concentración del gel separador (acrilamida-bisacrilamida) que se utilizó para la adecuada obtención de perfiles proteicos fue la del 10%, por presentar una mayor resolución, definición de bandas y ofrecer el perfil proteico más completo.

Una vez determinada la concentración del gel separador más adecuada a emplear para la obtención de perfiles proteicos, se elaboraron los geles mediante el uso de la técnica modificada de Olivera (1990)^{14,15} (Tris HCl 0.006M/2% Mercaptoetanol pH= 7.46) y solución salina fisiológica 0.9%. Los resultados se observan en las figuras No. 1B y 2B respectivamente.

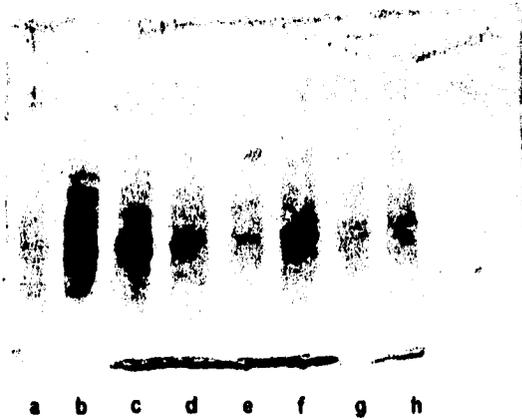
El perfil electroforético obtenido para los extractos de quesos comerciales mediante el uso de solución salina fisiológica 0.9%, presentó baja definición lo que repercute en una difícil identificación de bandas proteicas. En cambio el perfil proteico de los extractos de quesos comerciales obtenido mediante la técnica de Olivera modificada (1990)^{14,15}, fue el que presentó una mejor definición de las bandas proteicas tanto de alto como de bajo peso molecular.

FIGURA 1B. Solución Olivera (Tris HCl 0.006M/2% Mercaptoetanol)



- a) Queso 16, b) Queso 1, c) Queso 2, d) Queso 3
- e) Queso 4, f) Queso 5, g) Queso 6, h) Queso 7

FIGURA 2B. Solución Salina Fisiológica 0.9%



- a) Queso 8, b) Queso 9, c) Queso 10, d) Queso 11
- e) Queso 12, f) Queso 13, g) Queso 14, h) Queso 15

3.5 CURVA DE CALIBRACIÓN DE PESOS MOLECULARES

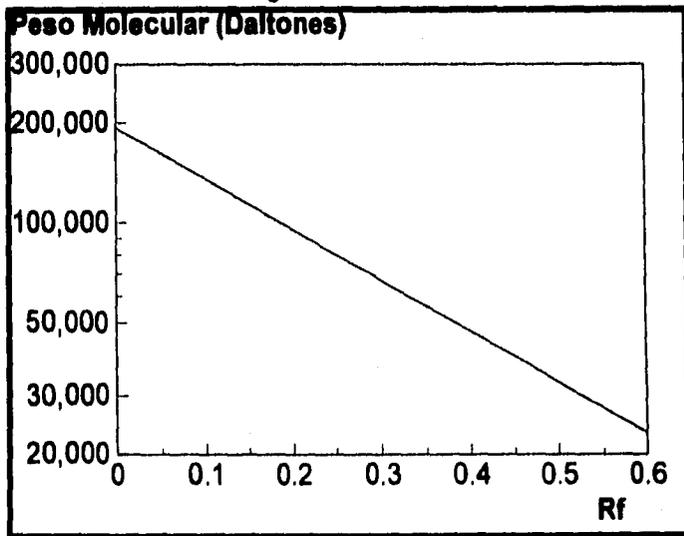
Una vez obtenidos los R_f para cada una de las proteínas del marcador de peso molecular (miosina, β -galactosidasa, β -fosforilasa, albúmina bovina, albúmina de huevo y anhidrasa carbónica, se observan en la Tabla 13), se construyó la curva de calibración para los pesos moleculares en el gráfico de log PM vs R_f , representado en la Gráfica 2.

Tabla 13. Proteínas del marcador de PM.

| Proteína | PM Aproximado (Daltones) |
|------------------------|--------------------------|
| Miosina | 205,000 |
| β -Galactosidasa | 116,000 |
| β -Fosforilasa | 97,400 |
| Albúmina bovina | 66,000 |
| Albúmina de huevo | 45,000 |
| Anhidrasa carbónica | 29,000 |

SIGMA, Biochemicals Organic Compounds for research and Diagnostic Reagents. SIGMA Chemical St. Louis.

Gráfica 2. Curva semilog de Calibración de Pesos Moleculares



Análisis y Discusión de Resultados

La fórmula de regresión es $y = A + Bx$; el término constante A (ordenada) es $A = 192885.68$, el coeficiente de regresión B (pendiente) es igual $B = -1.5354$, el coeficiente de correlación r es igual $r = 0.9811$.

3.6 OBTENCIÓN DE PATRONES ELECTROFORÉTICOS APARENTES DE QUESO, PROTEÍNA DE SOYA Y QUESO ADULTERADO

Con la concentración del gel separador a utilizar (10%) y habiendo establecido la solución extractora más adecuada para realizar las corridas, se procedió a la obtención de patrones electroforéticos de queso patrón, soya y queso adicionado con diferentes niveles de proteína de soya (0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0 % de soya en peso). De las corridas de estos geles se obtuvieron los resultados que se presentan en las Figuras No. 1C, 2C y 3C respectivamente.

El perfil electroforético del queso patrón se presenta en la Tabla 14, los pesos moleculares fueron obtenidos a partir de la interpolación de los R_f del gel correspondiente (Figura 1 C) en la curva semilog de calibración de pesos moleculares (Gráfica 2).

Tabla 14. Perfil electroforético de queso patrón

| Banda | Peso Molecular (Daltones) |
|-------|---------------------------|
| 1 | 43984 |
| 2 | 41247 |
| 3 | 34009 |
| 4 | 29908 |
| 5 | 28048 |
| 6 | 24660 |
| 7 | 23121 |
| 8 | 20338 |
| 9 | 15729 |
| 10 | 13829 |
| 11 | 11402 |

Análisis y Discusión de Resultados

El queso patrón presenta un perfil electroforético de 11 proteínas, en general son de bajo peso molecular.

El perfil proteico bibliográfico de la leche³⁰, así como sus pesos moleculares se presenta en la Tabla 15.

Tabla 15. Perfil proteico bibliográfico de la leche.

| Proteínas | Peso Molecular (Daltones) | Total de proteínas (%) |
|-------------------------|--------------------------------------|-------------------------------|
| Inmunoglobulinas | 150 000-1 x 10 ⁶ | 2 |
| Proteosa peptona | 4 000-200 000 | 4 |
| Seroalbúmina | 69 000 | 1 |
| Caseína- α_{s2} | 25 228 | 8 |
| Caseína- β | 23 980 | 25 |
| Caseína- α_{s1} | 23 612 | 34 |
| Caseína- κ | 19 005 | 9 |
| β -lactoglobulina | 18 263 | 9 |
| α -lactalbúmina | 14 174 | 4 |
| Proteínas del suero | | 20 |

Bauer-Dergai, Salvador Química de los alimentos. Facultad de Química. UNAM. América Mexicana. Pág. 690.

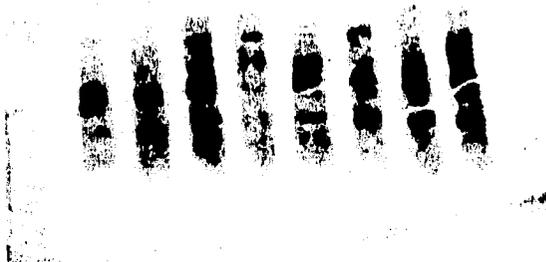
Se realizó una comparación de los pesos moleculares de las proteínas en el queso patrón y los pesos moleculares de las proteínas de la leche con el fin de identificar las proteínas que se encuentran presentes en el queso. Los resultados se indican en la siguiente Tabla 16.

Tabla 16. Identificación de proteínas de queso patrón.

| Peso Molecular (Daltones) Queso Patrón | Proteína |
|---|------------------------|
| 20338 | Caseína- κ |
| 24660 | Caseína- β |
| 23121 | Caseína- α_{s1} |
| 13829 | α -lactalbúmina |
| 11402 | Proteosa peptona |

En lo que respecta a las proteínas del queso patrón, se observó que las caseínas α , β , κ son las que se encuentran en mayor proporción, al igual que en la leche de vaca donde éstas representan el 68% del total de proteínas.

FIGURA 1C. Perfil Proteico de Queso Patrón



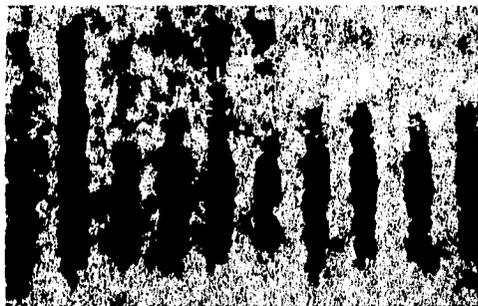
a
a) Patrón

FIGURA 2C. Perfil Proteico de Soya



a b c d e f g h i
**a) Patrón, b) Soya 0.5%, c) Soya 1.0%,
d) Soya 1.5%, e) Soya 2.0%, f) Soya 3.0%,
g) Soya 4.0%, h) Soya 5.0%, i) Soya 6.0%**

FIGURA 3C. Perfil Proteico de Queso Soya



a b c d e f g h i j

**a) Patrón, b) Queso Soya 0.5%, c) Queso Soya 1.0%,
d) Queso Soya 1.5%, e) Queso Soya 2.0%,
f) Queso Soya 3.0%, g) Queso Soya 4.0%,
h) Queso Soya 5.0%, i) Queso Soya 6.0%**

Análisis y Discusión de Resultados

El perfil electroforético de aislado de soya se presenta en la Tabla 17, los pesos moleculares fueron obtenidos a partir de la interpolación de los Rf del gel correspondiente (Figura 2 C) en la curva semilog de calibración de pesos moleculares (Gráfica 2).

Tabla 17. Perfil electroforético de aislado proteico de soya.

| Banda | Peso Molecular (Daltones) |
|--------------|----------------------------------|
| 1 | 152988 |
| 2 | 144373 |
| 3 | 121332 |
| 4 | 108052 |
| 5 | 96225 |
| 6 | 85694 |
| 7 | 80868 |
| 8 | 67962 |
| 9 | 64135 |
| 10 | 53899 |
| 11 | 45297 |
| 12 | 40339 |
| 13 | 21323 |
| 14 | 18989 |
| 15 | 15958 |
| 16 | 14211 |

El perfil proteico de la proteína soya reportado en la bibliografía, así como sus pesos moleculares se presentan en la Tabla 18.

Tabla 18. Perfil proteico bibliográfico de la soya.

| Fracción de Proteína | Peso Molecular(Daltones) | Total (%) |
|-------------------------|--------------------------|-----------|
| 2S | | 22 |
| Inhibidores de tripsina | 8 000 - 21 500 | |
| Citocromo C | 12 000 | |
| Globulina 23S | 18 200 | |
| Globulina 28S | 32 000 | |
| Alantoinasa | 50 000 | |
| 7S | | 37 |
| Hemaglutinina | 110 000 | |
| Lipoxigenasa | 108 000 | |
| β -amilasa | 61 700 | |
| Globulina 7S | $(186-210) \times 10^3$ | |
| 11S | | 31 |
| Globulina 11S (glicina) | 350 000 | |
| 15S | 600 000 | 11 |

Bocón-Delgado, Salvador. Química de los Alimentos. Facultad de Química, UNAM, América Mexicana, pag. 616.

Se realizó una comparación de los pesos moleculares de las proteínas de soya obtenidas en los geles y los pesos moleculares de las proteínas de la soya reportado en la bibliografía con el fin de identificar las proteínas presentes en el gel. Los resultados se encuentran en la Tabla 19.

Tabla 19. Identificación de proteínas de soya.

| Peso Molecular (Daltones) Soya | Proteína |
|---|-------------------------|
| 108052 | Lipoxigenasa |
| 64135 | β -amilasa |
| 53899 | Alantoinasa |
| 18989 | Globulina 23S |
| 21323 | Inhibidores de tripsina |

Las bandas de proteínas que se observaron más intensas en el gel fueron las correspondientes a β -amilasa (64135 D), alantoinasa (53899 D) y lipoxigenasa (108052 D), por lo tanto éstas son las que se encuentran en el aislado proteico de soya en mayor proporción.

El perfil electroforético del queso adicionado (0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0 % de soya en peso) y los pesos moleculares correspondientes se presentan en la Tabla 20, estos fueron obtenidos a partir de la interpolación de los Rf del gel correspondiente (Figura 3 C) en la curva semilog de calibración de pesos moleculares (Gráfica 2).

Tabla 20. Perfil electroforético de queso patrón adulterado con proteína de soya. (Pesos Moleculares (Daltones))

| Banda | % de soya en queso | | | | | | | |
|-------|--------------------|-------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | 0.5 | 1.0 | 1.5 | 2.0 | 3.0 | 4.0 | 5.0 | 6.0 |
| 1 | | | 121332 | 121332 | 121332 | 121332 | 121332 | 121332 |
| 2 | | | 108052 | 108052 | 108052 | 108052 | 108052 | 108052 |
| 3 | | | 85694 | 85694 | 85694 | 85694 | 85694 | 85694 |
| 4 | | | 80868 | 80868 | 80868 | 80868 | 80868 | 80868 |
| 5 | | | 57115 | 57115 | 57115 | 57115 | 57115 | 57115 |
| 6 | | | 50864 | 50864 | 50864 | 50864 | 50864 | 50864 |
| 7 | | | 45297 | 45297 | 45297 | 45297 | 45297 | 45297 |
| 8 | | 38067 | 38067 | 38067 | 38067 | 38067 | 38067 | 38067 |
| 9 | 35924 | 35924 | 35924 | 35924 | 35924 | 35924 | 35924 | 35924 |
| 10 | 33901 | 33901 | 33901 | 33901 | 33901 | 33901 | 33901 | 33901 |
| 11 | 28490 | 28490 | 28490 | 28490 | 28490 | 28490 | 28490 | 28490 |
| 12 | 26886 | 26886 | 26886 | 26886 | 26886 | 26886 | 26886 | 26886 |
| 13 | 20122 | 20122 | 20122 | 20122 | 20122 | 20122 | 20122 | 20122 |
| 14 | 18989 | 18989 | 18989 | 18989 | 18989 | 18989 | 18989 | 18989 |
| 15 | 15958 | 15958 | 15958 | 15958 | 15958 | 15958 | 15958 | 15958 |
| 16 | 14159 | 14159 | 14159 | 14159 | 14159 | 14159 | 14159 | 14159 |
| 17 | 11732 | 11732 | 11732 | 11732 | 11732 | 11732 | 11732 | 11732 |

Como se observa en el caso del queso adicionado con 0.5% de soya no aparecen las bandas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8; en el caso del queso con 1% de soya no se observan las siguientes bandas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 por ser muy baja la concentración de proteína de soya, el bandeo completo se observa a partir del queso que contiene 1.5% de soya, y es hasta este porcentaje que se hace evidente la adición esto se explica ya que el grosor y la intensidad del color de las bandas está directamente relacionado con la concentración de proteína, es decir, a mayor concentración de proteína es mayor el grosor y la intensidad de color.

Análisis y Discusión de Resultados

Con el fin de identificar las bandas que pertenecen exclusivamente al aislado proteico de soya, y que se llamaran "adulterantes" si están presentes en los quesos manchegos comerciales, se hizo una comparación del aislado proteico de soya, queso patrón y queso adulterado con soya y se presenta en la Tabla 21.

Tabla 21. Identificación de bandas "adulterantes".

| No. | Soya | Queso adulterado (0.5-6.0%) | Queso patrón | Bandas "adulterantes" |
|-----|--------|--------------------------------|--------------|--------------------------|
| 1 | 152988 | | | |
| 2 | 144373 | | | |
| 3 | 121332 | 121332 | | 121332 |
| 4 | 108052 | 108052 | | 108052 |
| 5 | 96225 | | | |
| 6 | 85694 | 85694 | | 85694 |
| 7 | 80868 | 80868 | | 80868 |
| 8 | 67962 | | | |
| 9 | 64153 | | | |
| 10 | | 57115 | | |
| 11 | 53899 | 50864 | | 53899 |
| 12 | 45297 | 45297 | | 45297 |
| 13 | 42746 | | 43984 | |
| 14 | 40339 | 38067 | 41247 | |
| 15 | | 35924 | 34009 | |
| 16 | | 33901 | 29908 | |
| 17 | | 28490 | 28048 | |
| 18 | | 26886 | 24660 | |
| 19 | | | 23121 | |
| 20 | 21323 | 20122 | 20338 | |
| 21 | 18989 | 18989 | | 18989 |
| 22 | 15958 | 15958 | 15729 | |
| 23 | 14211 | 14159 | 13829 | |
| 24 | | 11732 | 11402 | |

Análisis y Discusión de Resultados

Como se observa las proteínas de soya "adulterantes" son las que están marcadas con el área gris en la tabla anterior las cuales corresponden a proteínas de alto, medio y bajo peso molecular (121332, 108052, 85694, 80868, 53 899, 45 297 y 18 989 D), su presencia en un queso tipo manchego es considerado una adulteración, por lo tanto éstas proteínas no deben de estar presentes en un queso elaborado exclusivamente con leche de vaca.

Existe un fenómeno llamado bandeo aleatorio, es decir, que puede haber variaciones en la aparición de ciertas bandas en el patrón de leche, el cual depende de varios factores como la dieta, raza e incluso de la vaca. En el caso del queso patrón y el queso adulterado con proteína de soya se presenta un bandeo aleatorio debido a que fueron elaborados de diferentes lotes de leche de vaca, y se ve reflejado en la banda No. 13 que no aparece en el queso adulterado y si aparece en el queso patrón y en la soya, lo mismo sucede en la banda No. 19 que no aparece en el queso adulterado y si está presente en el queso patrón.

En el caso de las bandas 1, 2, 5, 8, 9 éstas se encuentran en la soya, sin embargo no están presentes en el queso adulterado con proteína de soya, ésto se puede explicar a través de la llamada emulsificación de las proteínas en la grasa del queso, lo que ocasiona que no todas las proteínas de soya en el queso adulterado sean extraídas por la Solución de Olivera. Otro factor importante que puede influir es que el punto isoeléctrico de las proteínas esté muy cercano al pH de la solución extractora y en ese caso la proteína de soya no sea tan soluble y por lo tanto no se extraiga completamente.

3.7 OBTENCIÓN DE PERFILES ELECTROFORÉTICOS APARENTES DE QUESOS TIPO MANCHEGO COMERCIALES

Bajo las mismas condiciones en las que se efectuó la electroforesis para la obtención de perfiles electroforéticos para soya, queso patrón, queso adulterado con diferentes niveles de proteína de soya, se realizó la electroforesis de los quesos tipo manchego comerciales. Los resultados obtenidos se observan en las Figuras 1D y 2D.

En la siguiente Tabla 22, se presentan los pesos moleculares de los quesos tipo manchego comerciales y se comparan con el perfil proteico del queso patrón y la soya.

FIGURA 1D. Perfil Proteico Queso Tipo Manchego Comerciales I



a) Queso 16, b) Queso 1, c) Queso 2, d) Queso 3
e) Queso 4, f) Queso 5, g) Queso 6, h) Queso 7

FIGURA 2D. Perfil Proteico Queso Tipo Manchego Comerciales II



a) Queso 8, b) Queso 9, c) Queso 10, d) Queso 11
e) Queso 12, f) Queso 13, g) Queso 14, h) Queso 15

Tabla 22. Perfil electroforético de quesos tipo manchego comerciales.

| Banda | Queso Patrón | Soya | Queso 1 | Queso 2 | Queso 3 | Queso 4 | Queso 5 | Queso 6 | Queso 7 | Queso 8 | Queso 9 | Queso 10 | Queso 11 | Queso 12 | Queso 13 | Queso 14 | Queso 15 |
|-------|--------------|--------------|--------------|---------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|---------|---------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| 1 | | 152988 | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2 | | 144373 | | | | | | | | | | | | | | | |
| 3 | | 121332 | | | | | | | | | | | | | | | |
| 4 | | 108052 | | | | | | | | | | | | | | | |
| 5 | | 96225 | | | | | | | | | | | | | | | |
| 6 | | 85694 | | | | | | | | | | | | | | | |
| 7 | | 80868 | | | | | | | | | | | | | | | |
| 8 | | 67962 | | | | | | | | | | | | | | | |
| 9 | | 64135 | | | | | | | | | | | | | | | |
| 10 | | 53899 | | | | | | | | | | | | | | | |
| 11 | | 46297 | 46892 | | 46892 | 46892 | 46892 | 46892 | 46892 | | | 44667 | 44667 | 44667 | 44667 | 44667 | 44667 |
| 12 | 43984 | | | 43984 | 43984 | 43984 | 43984 | 43984 | 43984 | | | | 42026 | 42026 | | | |
| 13 | 41247 | 40339 | | | 38680 | 38680 | 38680 | 38680 | 38680 | 39541 | 39541 | 39541 | 39541 | 39541 | 39541 | 39541 | 39541 |
| 14 | | | 36266 | 36266 | 36266 | | | 36266 | 36266 | 37202 | | 37202 | | | | | |
| 15 | 34009 | | 34009 | 34009 | | 34009 | 34009 | 34009 | | | | | 35002 | 35002 | 35002 | 35002 | 35002 |
| 16 | | | | | 31891 | | | | 31891 | 32933 | 32933 | 32933 | 32933 | | 32933 | 32933 | 32933 |
| 17 | 29908 | | | 29908 | | 29908 | | 29908 | | 30985 | 30985 | 30985 | | 30985 | | 30985 | 30985 |
| 18 | 28048 | | 28048 | 28048 | | 28048 | | 28048 | 28048 | 29153 | 29153 | 27429 | 29153 | 27429 | 29153 | | |
| 19 | | | | | 26301 | | 26301 | | 26301 | 25807 | | | 25807 | 25807 | 25807 | 25807 | 25807 |
| 20 | 24660 | | | 24660 | | | | | | 24281 | | | 24281 | 24281 | 24281 | 24281 | 24281 |
| 21 | 23121 | | 23121 | | 23125 | 23121 | 23125 | 23121 | | 22845 | 22845 | | | | | | |
| 22 | 20338 | 21323 | 21687 | 21687 | | | | 21687 | 21687 | 21494 | 21494 | 20223 | | 20223 | | | |
| 23 | | 18989 | | | 19072 | 19072 | | | 19072 | | | 19072 | 19072 | 19072 | 19072 | | |
| 24 | | | | | 17883 | 17883 | 17883 | 17883 | | | | | 17902 | | 17902 | 17902 | 17902 |
| 25 | | | 16769 | 16769 | 16769 | | 16769 | 16769 | 16769 | 16843 | 16843 | | | | | 16843 | 16843 |
| 26 | 15729 | 15729 | 15729 | 15729 | | | | | | 15847 | 15847 | 15847 | | | | | |
| 27 | 13829 | 14211 | 13829 | | 14749 | 14749 | 13829 | 14749 | | 13198 | | 14910 | 14028 | 14910 | 14910 | 14028 | 14028 |
| 28 | | | | | 12965 | 12965 | 12160 | 12965 | | 12418 | 12418 | | | | | 13198 | 12418 |
| 29 | 11402 | | | 11402 | | | | | | | | 11684 | | | | | 11684 |

Análisis y Discusión de Resultados

Las bandas sombreadas de color gris oscuro, pertenecen a las llamadas "bandas adulterantes" de soya, y si están presentes en los quesos comerciales se considera que estos se encuentran adulterados con proteína de soya.

Se puede observar que los quesos adulterados que son el No.1, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 11, 12 y 13, 14, 15 por contener las "bandas adulterantes" encontradas en la Tabla No. 16.

En el caso particular de los quesos adulterados 1, 5, 6, 14 y 15, se puede ver que únicamente cuentan con la banda de proteína número 11 correspondiente a 45297 D, a diferencia de los demás quesos adulterados no aparece la banda número 23 correspondiente a 18 989 D (globulina 23 S), esto se puede explicar muy probablemente debido a la baja concentración de la proteína globulina 23 S en estos quesos.

Las bandas de proteína que están en los quesos comerciales y no se encuentran en el queso patrón y la soya, pueden provenir de otro tipo de proteína que se esté utilizando como adulterante. De las proteínas antes mencionadas como las comúnmente utilizadas en la elaboración de queso, el huevo en polvo podría ser uno de los posibles adulterantes que se encuentran en los quesos comerciales, también hay que considerar que la grasa del queso puede ser adulterada e incluso es factible el uso de gomas en la elaboración de queso con el fin de disminuir costos y aumentar rendimientos, éstos dos factores también pueden modificar el perfil electroforético de las proteínas en los quesos comerciales analizados.

No está permitido el empleo de ningún otro tipo de proteína vegetal o animal que no provenga de la leche en la elaboración de queso tipo manchego, es por eso que los quesos comerciales deben considerarse adulterados por la adición de la proteína de soya. La adición de la soya se hace con la finalidad de incrementar su peso, reduciendo su calidad y haciéndolos más valiosos de lo que realmente son.

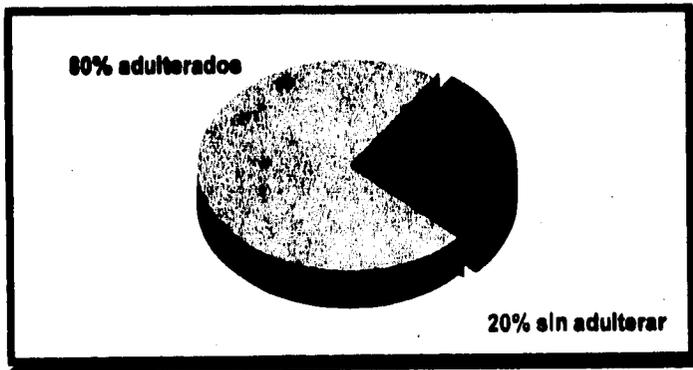
Análisis y Discusión de Resultados

Las proteínas de soya que se encuentran presentes en los quesos comerciales son: Globulina 23 S e Inhibidores de tripsina.

Se puede observar que de las 15 marcas comerciales analizadas, 12 se encuentran adulteradas con proteína de soya, lo que representa el 80% de las marcas analizadas como se observa en la Figura No. 1 F. Realizando una comparación del perfil electroforético de quesos tipo manchego comerciales y el de queso adicionado con proteína de soya a diferentes niveles, se puede decir que aproximadamente los quesos tipo manchego comerciales que están adulterados

(1, 3, 4, 5, 6, 7, 10,11, 12, 13, 14, 15) cuentan desde un 1.5 hasta 3.0% aproximadamente de soya en peso, lo cual se puede observar en la intensidad de color de las llamadas "bandas adulterantes" presentes en los quesos manchego comerciales.

Figura 1F. Representación gráfica del porcentaje de Adulteración en quesos comerciales.



Análisis y Discusión de Resultados

Cabe mencionar que existen en el mercado muchos otros quesos tipo manchegos, los cuales no se encuentran registrados y por lo general no cumplen con las especificaciones que marca la Norma Oficial Mexicana y que también es muy posible suponer que éstas se encuentren adulteradas con proteína de soya.

CAPÍTULO IV. CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

Al término del desarrollo experimental del presente trabajo, se llegó a las siguientes conclusiones:

Las mejores condiciones para efectuar la extracción de proteína de las muestras, es utilizando la solución de Olivera (Solución Tris HCl 0.006M/2% Mercaptoetanol), ya que esta es la que proporciona una mayor concentración de proteína.

De acuerdo a los resultados del análisis químico proximal se observó, que en términos generales no existe una relación directa entre calidad del producto y precio de venta al público.

De los 15 quesos manchegos analizados, sólo 2 (3,15) cumplen con la especificación de composición total establecida por la Norma Oficial Mexicana lo que representa el 13.3%, y estos 2 quesos que cumplen las especificaciones se encuentran adulterados con proteína de soya.

En lo que respecta al contenido de proteína sólo 5 quesos comerciales cumplen con las especificaciones de la Norma Oficial Mexicana (mínimo 22%), de este grupo el 40% se encuentra adulterado con soya.

En base a la evaluación de calidad efectuada a los quesos tipo manchego comerciales, se encontró en general con una mala calidad en los productos, ya que por un lado no cumplen con las especificaciones de composición total y por el otro se ve generalizado el uso de la proteína de soya para aumentar el rendimiento y disminuir costos, ambas cuestiones están en contradicción respecto a los lineamientos de la Norma Oficial para este producto, sin tomar en cuenta que no se evaluaron parámetros como carga bacteriana por no ser del interés del presente estudio.

Conclusiones

Se decidió seleccionar la concentración del 10% del gel separador (acrilamida-bisacrilamida), por proporcionar una mayor resolución y definición de bandas en los geles de electroforesis, realizar las corridas electroforeticas durante 30 min., asimismo elaborar todos los geles mediante el uso de solución de Olivera (Tris HCl 0.006M/2% Mercaptoetanol) por ofrecer el perfil proteico completo de las muestras y presentar una mejor definición de bandas proteicas.

A partir de la obtención de los patrones electroforéticos de queso adulterado con proteína de soya, se observó que una adulteración de queso tipo manchego con proteína de soya se hace evidente a partir de una concentración de 1.5% de soya en peso.

En base a los perfiles electroforéticos del queso patrón, queso adulterado y soya fué posible hacer una identificación de las proteínas de la soya y que no comparten características con las proteínas del queso patrón, de esta forma se pudo evaluar la adulteración en quesos tipo manchego comerciales a través de la presencia de estas proteínas llamadas anteriormente "adulterantes".

Al realizar la evaluación de los quesos tipo manchego comerciales, se observó que en 12 de las 15 marcas estaban presentes proteínas exclusivas de la soya, por lo que se considera que se encuentran adulterados. Por lo tanto esta adulteración representa el 80% de las marcas analizadas.

Cabe mencionar que existen en el mercado muchos otros quesos tipo manchegos, los cuales no fueron analizados por no cumplir con las especificaciones de la Norma Oficial Mexicana para este producto; y posiblemente también se encuentren adulterados en su composición, por lo que el porcentaje de quesos adulterados del 80% se podría ver incrementado.

Conclusiones

En base a lo anterior se puede decir que la técnica estandarizada para queso tipo manchego es una herramienta útil que puede detectar adulteraciones con aislado proteico de soya o presencia de proteínas no lácticas en el queso. Cabe mencionar que para realizar esta técnica, el analista debe contar con la experiencia suficiente para la correcta identificación de las proteínas en los geles a fin de obtener resultados representativos que definan correctamente las adulteraciones.

RECOMENDACIONES

Es a partir del 1.5% de adición de soya en peso cuando se observa el bandeo completo de la soya en los quesos manchegos, es por eso que se mencionó que los quesos que se encontraron adulterados cuentan desde 1.5 hasta 3.0% aproximadamente de soya.

De acuerdo a los resultados se encontró que el 20% de los quesos analizados no se encuentran adulterados, sin embargo no se puede garantizar que no tengan soya adicionada a concentraciones menores de 1.5%. Con el fin de verificar y cuantificar la presencia de soya a concentraciones menores de 1.5% sería recomendable el uso de un densitómetro.

Anexos

ANEXOS

ANEXO I

NORMA OFICIAL MEXICANA

NOM-F-462-1984

ALIMENTOS LÁCTEOS - QUESO TIPO MANCHEGO

FOOD - LACTEOUS - MANCHEGO TYPE CHEESE

DIRECCIÓN GENERAL DE NORMAS

0 INTRODUCCIÓN

Las especificaciones que se establecen en esta norma, sólo podrán satisfacerse cuando en la elaboración del producto se utilicen materias primas e ingredientes de calidad sanitaria, se apliquen buenas técnicas de elaboración, se realicen en locales e instalaciones bajo condiciones higiénicas, que aseguren que el producto es apto para el consumo humano.

1 OBJETIVO Y CAMPO DE APLICACIÓN

Esta Norma Oficial Mexicana establece las especificaciones que debe cumplir el producto denominado "Queso tipo manchego".

2 REFERENCIAS

Esta norma se complementa con las siguientes Normas Oficiales Mexicanas vigentes:

| | |
|--------------------|---|
| NOM-F-83 | Determinación de humedad en productos alimenticios |
| NOM-F-94 | Método de prueba para la determinación de cenizas en quesos procesados. |
| NOM-F-98 | Determinación de proteínas en quesos. |
| NOM-F-99 | Método de prueba para la determinación de pH en quesos procesados. |
| NOM-F-111 | Método de prueba para la determinación de sólidos totales en quesos procesados. |
| NOM-F-254 | Cuenta de organismos coliformes. |
| NOM-F-304 | Método general de investigación de Salmonella. |
| NOM-F-308 | Cuenta de organismos coliformes fecales. |
| NOM-F-310-S | Determinación de cuenta de estafilococos aureo, cuagulasa positiva en alimentos. |
| NOM-F-360-S | Alimentos para humanos - Determinación de cloruros como cloruro de sodio (método de Volhard). |
| NOM-F-387-S | Alimentos - Leche fluida - Determinación de grasa butírica por medio de Gerber. |

3 DEFINICIÓN

Para los efectos de esta norma se establece la siguiente definición:

Queso tipo manchego. Es el producto que se obtiene a partir de leche pasteurizada entera de vaca, sometida a procesos de coagulación, cortado, desuerado, fermentado, salado, prensado y madurado, durante un periodo mínimo de 7 días a temperatura y humedad controladas; sin que se hayan empleado en su elaboración grasas o proteínas no provenientes de la leche.

4 CLASIFICACIÓN Y DESIGNACIÓN DEL PRODUCTO

El producto objeto de esta norma se clasifica en un sólo tipo con un sólo grado de calidad, designándose como queso tipo manchego.

5 ESPECIFICACIONES

El queso tipo manchego en su único tipo y grado de calidad debe cumplir con las siguientes especificaciones.

5.1 Sensoriales

- Color:** ligeramente amarillo.
Olor: Característico, libre de olores extraños.
Sabor: Característico, libre de sabores extraños.
Consistencia: Semidura y rebanable.

5.2 Físicas y Químicas

El queso tipo manchego debe cumplir con las especificaciones físicas y químicas anotadas en la Tabla 1.

Tabla 1

| ESPECIFICACIONES | MÍNIMO | MÁXIMO |
|-----------------------------------|--------|--------|
| Humedad, en % | | 48.0 |
| Grasa (butírica), en % | 26.0 | |
| Proteínas, de origen láctico en % | 22.0 | |
| Sólidos totales, en % | 52.0 | |
| pH | 5.0 | 6.0 |
| Cenizas totales, en % | | 6.5 |
| Cloruro de sodio, en % | | 3.0 |

5.3 Microbiológicas

5.3.1 El producto de esta norma no debe contener microorganismos patógenos, toxinas microbianas e inhibidores microbianos, ni otras sustancias tóxicas que puedan afectar a la salud del consumidor o provocar deterioro del producto.

5.3.2 El queso tipo manchego debe cumplir con las especificaciones microbiológicas anotadas en la Tabla 2.

Tabla 2

| ESPECIFICACIONES | Col/g Máximo |
|------------------------------|--------------|
| Coliformes | 10,000 |
| <u>Staphylococcus aureus</u> | 100 |
| <u>Echerichia coli</u> | 1,000 |
| Salmonella en 25 g. | Negativo |

5.4 Materia extraña objetable

El producto objeto de esta norma debe estar libre de: fragmentos de insectos, pelos y excretas de roedores, así como de cualquier otra materia extraña.

5.5 Contaminantes químicos

El producto objeto de esta norma no debe contener ningún contaminante químico en cantidades que puedan representar un riesgo para la salud. Los límites máximos para estos contaminantes quedan sujetos a lo que establezca la Secretaría de Salubridad y Asistencia.

5.6 Aditivos para alimentos

Los permitidos por la Secretaría de Salubridad y Asistencia

- Cultivo Láctico
- Cloruro de Sodio
- Cuaajo Vegetal o Animal
- Anatto (semilla de achiote y caroteno en proporción no mayor de 0.06%).
- Cloruro de Calcio (CaCl_2) en una proporción no mayor de 0.02%.
- Ácido Sórbico o sus sales de sodio o potasio 1 g/kg.

6 MUESTREO

6.1 Cuando se requiera el muestreo de producto, éste podrá ser establecido de común acuerdo entre productor y comprador, recomendándose el uso de la Norma Oficial Mexicana NOM-Z-12.

6.2 Muestreo Oficial

El muestreo para efectos oficiales estará sujeto a la legislación y disposiciones de la Dependencia Oficial correspondiente, recomendándose el uso de la Norma Oficial Mexicana NOM-Z-12.

7 MÉTODOS DE PRUEBA

Para la verificación de las especificaciones físicas, químicas y microbiológicas que se establecen en esta norma se deben aplicar las Normas Oficiales Mexicanas que se indican en el capítulo de Referencias (véase 2).

8 MARCADO, ETIQUETADO, ENVASE Y EMBALAJE**8.1 Marcado y etiquetado**

8.1.1 Cada envase del producto debe llevar una etiqueta o impresión permanente, visible e indeleble con los siguientes datos:

- Denominación del producto, conforme a la clasificación de esta norma.
- Nombre o marca comercial registrada, pudiendo aparecer el símbolo del fabricante.
- El "Contenido Neto" de acuerdo con las disposiciones vigentes (véase A.1.).
- Lista completa de ingredientes en orden porcentual decreciente, mencionando los aditivos, porcentaje y su función.
- Texto de las siglas Reg. S.S.A. No. _____ "A", debiendo figurar en el espacio en blanco el número del registro correspondiente.
- Nombre o razón social y domicilio del fabricante.
- Número de lote y/o fecha de fabricación.
- Las leyendas "HECHO EN MÉXICO" Y "CONSERVESE EN REFRIGERACIÓN".
- Otros datos que exija el reglamento respectivo o disposiciones de la Secretaría de Salubridad y Asistencia.

8.2 Envase

El producto objeto de esta norma se debe envasar en recipientes de un material resistente o inocuo, que garanticen la estabilidad del mismo, que evite su contaminación no altere su calidad ni sus especificaciones sensoriales.

8.3 Embalaje

Para el embalaje del producto objeto de esta norma, se deben usar cajas de cartón u otro material apropiado que tengan la debida resistencia y que ofrezcan la protección adecuada a los envases para impedir su deterioro exterior, a la vez faciliten su manejo en el almacenamiento y distribución de los mismos, sin exponer a las personas que los manipulen.

9 ALMACENAMIENTO

El producto terminado debe almacenarse en refrigeración y en locales que reúnan los requisitos sanitarios para que no se altera la calidad del mismo.

APÉNDICE A

A.1 La leyenda "Contenido Neto" debe ir seguida del dato cuantitativo y del símbolo de la unidad correspondiente, de acuerdo con el sistema general de unidades de medida, expresado en minúsculas sin pluralizar y sin punto abreviatorio debiendo aparecer en el ángulo inferior derecho o centrado en la parte inferior de la superficie principal de exhibición, que es aquella a la que se le da mayor importancia para ostentar el nombre y la marca comercial del producto; debiendo aparecer libre de cualquier otra información que le reste importancia y en el tamaño que corresponda según la tabla de dimensiones siguientes:

TABLA DE DIMENSIONES

| Superficie principal (Área de etiqueta) | Milímetros (Altura mínima del dato cuantitativo) |
|---|---|
| Menor de 30 cm ² | 3 mm |
| de 31 a 50 cm ² | 4 mm |
| de 51 a 100 cm ² | 5 mm |
| Por cada 50 cm ² que aumente el área | Aumentará 1 mm |

10 BIBLIOGRAFÍA

NOM-Z-13 Guía para la Redacción, Estructuración y Presentación de las Normas Oficiales Mexicanas.

México, D.F., a 30 Jul. 1984.

EL DIRECTOR GENERAL DE NORMAS.

LIC. HECTOR VICENTE BAYARDO MORENO.

ANEXO II

Montaje y preparación de geles en la celda para electroforesis

Migthy Small II SE 250.

La celda para electroforesis Migthy Small II es una unidad miniatura de placas verticales para la realización de electroforesis rápidas de proteínas o ácidos nucleicos en muestras de volúmenes pequeños. Puede correr simultáneamente dos "sandwiches" de geles, tanto de agarosa como de poliacrilamida de 7x 8 cm. Los geles de poliacrilamida son corridos usando los platos de cristal y alumina provistos en la unidad.

Las partes constituyentes son las siguientes:

- Cámara superior de amortiguador
- Cámara inferior de amortiguador
- Corazón central
- Tapa de montaje con cables
- Platos de alumina con muesca
- Platos rectangulares de cristal
- Espaciadores
- Abrazaderas
- Silicón para sellar
- Peines para pozos de muestra
- Acetatos indicadores de pozos

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

El montaje de la celda se realiza de la siguiente forma:

1. Colocar silicón a lo largo del empaque o banana que se encuentra en la ranura en forma de U en los lados y parte inferior del corazón central, eliminando el exceso con un papel de limpieza.

2. Colocar el plato de alumina sobre el corazón central encima de la banana en forma de U. Colocar los espaciadores encima del plato de alumina (con un poco de silicón) uno en cada borde lateral del mismo.
3. Tomar este ensamblaje (corazón, plato de alumina, espaciadores de cristal) con una mano manteniéndolos juntos y colocar las abrazaderas a cada lado del ensamblado. Colocar una capa de diurex en la parte inferior del ensamblado que abarque todos sus constituyentes para evitar la salida de los geles.
4. Voltar la cámara y repetir las operaciones de 1 a 3 en el otro lado de la misma en el caso de que se vayan a correr dos geles simultáneamente.

Preparación de los geles.

Una vez montada la celda se procede a la preparación de los geles de poliácridamida según las concentraciones deseadas.

Gel tapón

1. En un tubo de ensayo colocar:
 - *1.0 mL de acrilamida-bisacrilamida 30% pH 8.8
 - *4.0 μ l de persulfato de amonio 90%
 - *8.0 μ l de TEMED (N'N'N' tetrametiletilendiamina).
2. Inmediatamente agregar a la celda de electroforesis (espacio entre el plato de alumina y plato de cristal) 400 μ l de la solución contenida en el tubo de ensayo, dejar polimerizar.

Gel separador

1. En un matraz quitasatos colocar las cantidades descritas de acrilamida-bisacrilamida y amortiguadores de Tris-HCl según la concentración deseada del gel.
2. Tapar el matraz y someterlo a vacío durante 2 min. aproximadamente con el fin de eliminar la mayor cantidad posible de oxígeno contenido en la solución.
3. Agregar 20 μ l de TEMED y 40 μ l de Persulfato de amonio 90% y agitar suavemente.

4. Agregar 6 mL a la celda arriba del gel tapón ya polimerizado.
5. Adicionar 200-300µl de alcohol etílico para asegurar que los geles queden derechos en la parte superior, dejar polimerizar.
6. Escurrir el alcohol etílico sobrante y enjuagar con agua destilada.
7. Secar con un papel filtro el exceso de agua.

Gel concentrador

1. Colocar en un matraz quitasatos:
 - *800µl de acrilamida-bisacrilamida pH 6.8 30%
 - *5.2 mL de amortiguador Tris-HCl pH 6.8
2. Tapar el matraz y someter a vacío durante 2 min. aproximadamente.
3. Agregar 20µl de TEMED y 40µl de Persulfato de amonio 90% y agitar suavemente.
4. Adicionar a la celda de electroforesis arriba del gel separador.
5. Colocar los peines formadores de pozos y dejar polimerizar.
6. Una vez polimerizado el gel extraer el peine.
7. Eliminar el diurex de la parte inferior del ensamblado en donde han sido montados los geles.

Precorrida electroforética

Una vez que han sido formados los geles para la electroforesis se monta la cámara en la celda contenedora de amortiguador de electrodo.

Posteriormente llenar la celda con amortiguador de electrodo pH 8.3(0.025M tris y 0.192M glicina con 0.1% SDS), así como el espacio entre el corazón y el plato de alumina, colocar la tapa y conectar a la fuente de poder a 13 mA por gel durante 30 min. Terminado el tiempo de la precorrida retirar el amortiguador de electrodo de ambos sitios de la celda de electroforesis.

Colocación de muestras

1. Renovar el amortiguador de electrodo en los mismos sitios de la celda en los que se colocó para la precorrida.

2. Colocar el acetato indicador de pozos en la parte externa de los platos de cristal.
3. Colocar los μl de muestra necesarios en cada uno de los pozos mediante el empleo de una microjeringa de $10\mu\text{l}$.
4. Colocar la tapa y conectar a la fuente de poder a 13 mA por gel durante 45 min. aproximadamente.
5. Terminado el tiempo necesario para la electroforesis desmontar la celda y separar los geles para colocarlos en Isopropanol 25%/Ac. acético 7% aqu. para fijar las proteínas al gel separador durante un tiempo aproximado de 2 h.

Tinción con azul de Coomassie.

1. Retirar los geles de la solución de isopropanol y someterlos a una solución de azul de coomassie al 0.125% en metanol: acético:agua. (62.5 mL sin azul de coomassie R250, 250 mL metanol absoluto, 50 mL Ac. acético glacial, 137.5 mL Agua destilada) con agitación a 50 r.p.m. durante 1 h.
 2. Retirar el colorante y agregar 150 mL de solución desteñidora I (500 mL Metanol absoluto, 100 mL de Ac. acético glacial y 400 mL de agua destilada) con agitación a 50 r.p.m. durante 1h.
 3. Retirar la solución desteñidora I y agregar 150 mL de solución desteñidora II (70 mL metanol absoluto, 50 mL Ac. acético glacial, 880 mL agua destilada) con agitación a 50 r.p.m. durante 1 h.
 4. Retirar la solución desteñidora II y colocar los geles en agua destilada.
- Almacenar los geles en un recipiente con agua destilada, herméticamente cerrado y en refrigeración.

Composiciones finales de los geles a emplear:

*** Gel tapón**

Acrilamida - Bisacrilamida pH 8.8 1 mL.

TEMED 4.0 μ l

Persulfato de amonio 98% 8.0 μ l

*** Gel concentrador**

Acrilamida - Bisacrilamida pH 6.8 800 μ l

Amortiguador Tris HCl pH 6.8 5.2 mL

TEMED 20 μ l

Persulfato de amonio 98% 40 μ l

I Gel separador 10%

Acrilamida - Bisacrilamida pH 8.8 3.36 mL

Amortiguador Tris HCl pH 8.8 6.73 mL

TEMED 20 μ l

Persulfato de amonio 98% 40 μ l

II Gel separador 15%

Acrilamida - Bisacrilamida pH 8.8 5.0 mL

Amortiguador Tris HCl pH 8.8 5.0 mL

TEMED 20 μ l

Persulfato de amonio 98% 40 μ l

III Gel separador 12.5%

Acrilamida - Bisacrilamida pH 8.8 4.2 mL

Amortiguador Tris HCl pH 8.8 5.9 mL

TEMED 20 μ l

Persulfato de amonio 98% 40 μ l

ANEXO III

MÉTODO STANDAR BRADFORD

La concentración de proteína para cada uno de los extractos se efectuó por medio del empleo de la técnica de Bradford¹⁶ y el método standard es el siguiente:

1. Pipetear en un tubo de ensayo de 12 x 100 mm 0.1 mL de la solución de proteína conteniendo entre 10 y 100 µg.
2. Agregar 5 mL de reactivo de azul de Coomassie y mezclar por inversión o vortex.
3. Medir la absorbancia a 595 nm después de 2 minutos y antes de una hora. El blanco deberá contener 0.1 mL de buffer adecuado y 5 mL de reactivo de Coomassie.
4. Calcular la concentración en curva patrón.

CURVA PATRÓN BRADFORD

La curva patrón macro se utilizó para conocer la concentración de proteína de cada uno de los extractos, para la elaboración de la curva se usó una solución de albúmina pura (huevo) como patrón.

La curva macro se elaboró de la siguiente manera:

- Se pipeteo en tubos de ensayo de 12 x 100 mm 0.1 mL de la solución de proteína de albúmina conteniendo entre 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 y 1000 µg/µl.
- Se agregó 5 mL de reactivo de azul de Coomassie y se mezcló por vortex.
- Se midió la absorbancia a 595 nm después de 2 minutos y antes de una hora. El blanco contenía 0.1 mL de buffer adecuado y 5 mL de reactivo de Coomassie.

Anexos

La curva patrón macro se obtiene al graficar los resultados obtenidos de las lecturas de absorbancia correspondientes a las concentraciones de proteína antes mencionadas

ANEXO IV

ELABORACIÓN DE QUESO PATRÓN

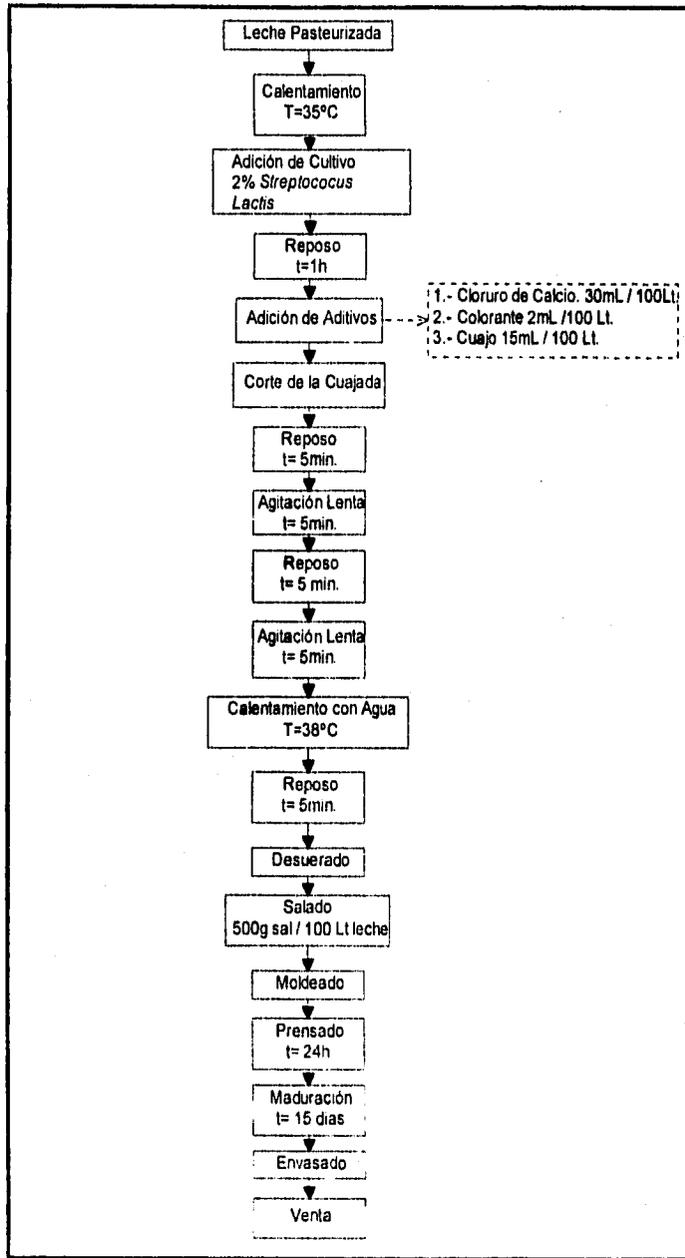
El queso manchego patrón se elaboró en el Centro de Producción Agropecuaria de la Facultad por el método tradicional de procesamiento, se describe el proceso de elaboración y se muestra en el diagrama 4.

- **PASTEURIZACIÓN.** La pasteurización se realizó en un pasteurizador de placas Alfa Laval a una temperatura de 72°C durante 15 a 20 segundos.
- **ADICIÓN DE CULTIVO.** Con el uso de la pasteurización se volvió necesario sustituir las floras naturales en la leche por floras seleccionadas y controladas a través de cultivos que aseguran la formación del ácido, entre las bacterias lácticas se usó el 2% *Streptococcus lactis* y *Streptococcus cremoris* y se dejó reposar 1 hora.
- **ADICIÓN DE ADITIVOS.** El primer aditivo utilizado es el cloruro de calcio el cual se adiciona en la siguiente proporción de 30 mL de cloruro de calcio en 100 L. de leche. El segundo aditivo es el cuajo, se adicionan 15 mL de cuajo en 100 Lt. de leche. El último es el colorante para dar un aspecto más atractivo a la masa del queso, se utiliza un colorante a base de semilla de anatto o achiote (*Bixaorellana*), se adicionan 2 mL de colorante en 100 Lt. de leche.
- **CORTE DE LA CUAJADA.** La cuajada se cortó con la finalidad provocar y acelerar la salida del suero, una vez que se ha realizado el corte se procede a un reposo de 5 minutos.
- **TRABAJO Y CALENTAMIENTO.** El grano individualizado se mantuvo en constante movimiento por medio de agitación lenta, y durante 5 minutos, para aumentar la

sinéresis y acelerar la salida del suero se elevó la temperatura con agua a temperatura de 38°C durante el trabajo del grano.

- **DESUERADO.** Al terminar el calentamiento y el trabajo adecuado de la cuajada, y cuando el grano presentó la consistencia y las características apropiadas del queso manchego, se interrumpió la agitación y se dejó al grano bajar al fondo de la tina para enseguida empezar el desuerado.
- **SALADO.** El salado del queso se efectuó adicionando 500 g. de sal por 100 Lt. de leche.
- **MOLDEADO.** El queso se moldeó en moldes esféricos de 15 cm. de diámetro.
- **PRENSADO.** Los quesos moldeados fueron prensados para compactar la masa uniendo el grano e imprimir al queso el formato deseado, durante 24 h.
- **MADURACIÓN.** El queso fué madurado en cámaras de refrigeración a temperatura y humedad controlada.
- **ENVASADO.** Los quesos fueron envasados al vacío

**Diagrama 4. Elaboración de queso tipo manchego
(Método Tradicional de procesamiento)**



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Valdés Martínez, Sara E. (1993). **Análisis de leche y productos lácteos.** Tecnología Alimentaria Vol. 28, No. 3., p .21-36.
2. Badui, Salvador y Viniegra, Gustavo. (1993). **Breve análisis de la producción de leche en México.** Tecnología Alimentaria Vol. 24 No. 3, p.12-20.
3. Alfa Laval. **Manual de Industrias Lácteas.** AMV Ediciones Madrid, España. p. 229-254.
4. SECOFI. (1984). **Norma Oficial Mexicana. NOM-F- 462-1984.** Secretaría de Comercio y Fomento Industrial. p. 1-7.
5. Fennema, Owen R. (1985). **Introducción a la ciencia de los alimentos.** Editorial Reverté, S.A. p. 724-742.
6. Potter, Norman N., (1973). **La ciencia de los alimentos.** AVI Publishing Company, INC. Westport, Connecticut. p. 379-380.
7. Cenzano, I. **Los Quesos.** AMV Ediciones España, p. 11-18,25-27,44-55.
8. Rakosky, Joseph. (1989). **Protein Additives in foodservice preparations.** AVI Publishing New York, p. 71-92,10-12.
9. Bohinski, Robert C. (1978). **Bioquímica.** Fondo Educativo Interamericano, S.A.
10. Gaylen, R.D. and Cotterill, O.J. (1979). **Chromatography and electrophoresis native and spray-dried egg white F.S.** Vol (44): 1345-1351.

Bibliografía

11. Greiner, S.P., Kellen G.J. and Carpenter D. **A rapid immunoturbidimetric Method for whey proteins in nonfat dry milk and buttermilk** J.F.S. Vol (50): 1106-1109.
12. Hoeffler Scientific Instruments. (1992). **Instructions SE 250-Mighty Small II Slab Gel Electrophoresis Unit**. San Francisco, California E.U. p. 25.
13. Laemli, V.K. (1970). **Cleavage of structural proteins the assembly of the head of bacteriophage T4**. Nature Vol (227): 680-685.
14. Olivera Carrión, M. y Valencia, M.E. (1990). **Detección y cuantificación de soja en productos cárnicos por electroforesis I**. Estudio en sistemas modelo. Rev. Agroquímica de los alimentos Vol (30/4): 509-517.
15. Olivera Carrión, M. y Valencia, M.E. (1990). **Detección y cuantificación de soja en productos cárnicos por electroforesis II**. Identificación e interferencia de otras proteínas diferentes a la de soja. Rev Agroquímica de los alimentos Vol (39/4): 518-527.
16. Gonzalez, M.S. y Peñalosa, C.I. **Técnicas bioquímicas y químicas para determinación de compuestos**. E.N.E.P. Iztacala. UNAM . p. 429.
17. Forrest, J.M. (1979). **Fundamentos de la ciencia de la carne**. Acribia, Zaragoza, España.
18. Lawrie, R.A. (1977). **La ciencia de la carne**. Edición española, Zaragoza, España. p. 462-490.
19. Amo, Visier. (1980). **Industria de la carne, salazones y chalcinerías**. A.E.D.O.S. Barcelona España. p. 23-36.

20. Sigma Chemical Company. (1994). Biochemicals Organic Compounds for research and Diagnostic Reagents. Sigma Chemical St. Louis.
21. A.O.A.C. (1990). Official Methods of analysis / of the association of official analytical chemist. Ed by Sidney Williams Arlington Virginia: Association of Official Analytical Chemist. Edición 15. p. 841-842, 844, 795.
22. Lerche, Martin. (1969). Inspección Veterinaria de la Leche. Acibia Zaragoza, España. p. 307-310, 355-356.
23. Sipos, Endre F. (1994). Usos comestibles de la proteína de soya. Asociación Americana de Soya. México, p. 1-18.
24. Burke, Daniel J. (Enero-marzo 1995). Variedades de soya para procesadores de Alimentos. Soya Noticias No. 240 ISSN- 0187-3970, p. 1-2.
25. Wolf, W.J. (marzo 1992). Proteínas comestibles de la soya y sus usos. Asociación Americana de Soya, 2a. Reimpresión. México p.1-12.
26. Erdman, John W. y Fordyce, Elizabeth J. Los productos de soya y la dieta humana. Asociación Americana de Soya, México. p. 1-15.
27. Eagan, Harold, Ronal, S.K. y Ronal S. (1991). Análisis químico de alimentos de Pearson. Ed. CECSA México, D.F.
28. Asociación Americana de Soya. (1978). Terminos usados en combinación con el procesamiento de la soya y la utilización de productos de soya. ASA. México.
29. ASA, (enero-marzo 1995). Cambio en el método de referencia para la determinación de proteínas. Soya Noticias, No. 240 ISSN-0187-3970.

Bibliografía

30. Badui, D. Salvador. **Química de los alimentos**. Facultad de Química. UNAM. Alhambra Mexicana.