



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

**DETERMINACIÓN DE AUTENTICIDAD DE QUESOS COMERCIALES
MEDIANTE LA COMPARACIÓN CON ELECTROFOREGRAMAS DE
QUESOS CERTIFICADOS**

**TESIS QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO DE ALIMENTOS**

PRESENTA
ELI JACOB ALFARO RIVERA



Ciudad Universitaria, CDMX

2019



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesor: Francisco Rojo Callejas**
VOCAL: **Profesora: Sandra Pérez Munguía**
SECRETARIO: **Profesor: Juan Carlos Ramírez Orejel**
1er. SUPLENTE: **Profesora: Tania Rojo Portillo**
2° SUPLENTE: **Profesora: Amelia Farrés González Sarabia**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA

Este trabajo se desarrolló en el laboratorio 300 del Departamento de Alimentos y Biotecnología del Conjunto E de la Facultad de Química de la UNAM. Circuito de la investigación Científica s/n Ciudad Universitaria.

ASESOR DEL TEMA:

M. en C. Sandra Pérez Munguía

SUPERVISOR TÉCNICO:

Dra. Amelia Farrés González Sarabia

SUSTENTANTE:

Eli Jacob Alfaro Rivera

Índice

Lista de abreviaturas, acrónimos y símbolos	i
Índice de figuras y tablas	ii
Resumen	iv
Introducción	v
Planteamiento del problema	vi
Objetivo general	vii
Objetivos específicos	vii
Hipótesis	vii
1. Marco teórico	1
1.1 Leche	1
1.1.1 Química de las proteínas lácteas	1
1.2 Quesos	3
1.2.1 Breve historia de la elaboración de los quesos	3
1.2.2 Definición y denominación comercial	6
1.2.3 Proceso de elaboración	7
1.2.3.1 Selección de la leche	7
1.2.3.2 Estandarización de la leche	7
1.2.3.3 Tratamiento térmico	9
1.2.3.4 Acidificación	9
1.2.3.5 Coagulación	9
1.2.3.6 Operaciones posteriores a la coagulación	10
1.2.3.7 Salado	10
1.2.3.8 Cheddarización	11
1.2.3.9 Maduración	11
1.3 Clasificación de los quesos	11
1.4 Proteólisis	12
1.4.1 Proteólisis de la leche	12
1.4.2 Coagulación enzimática de la leche	15
1.4.2.1 Enzimas del cuajo	16
1.4.3 Proteólisis en la maduración	17
1.4.3.1 Actividad de la quimosina	17
1.4.3.2 Actividad de la plasmina	18
1.4.3.3 Cultivos iniciadores y secundarios	19
1.5 Caracterización de la proteólisis en quesos	20
1.5.1 Métodos electroforéticos	21
1.5.1.1 Electroforesis en gel de poliacrilamida	22
1.5.1.2 Electroforesis capilar	24
1.6 Producción y consumo de quesos	27
1.7 Legislación y normatividad de quesos en México	27
2 Metodología	30
2.1 Muestreo y muestras lácteas	31
2.2 Análisis por ultrasonido de la leche	31
2.3 Toma de la porción de muestra de quesos	31

2.4	Preparación de disoluciones amortiguadoras	32
2.5	Preparación del Material de Referencia Certificado	32
2.6	Determinación de pH	32
2.7	Preparación de muestras para el ensayo de solubilidad, determinación de proteína soluble y separación electroforética	33
2.8	Determinación de proteína soluble por el método de Lowry	33
2.9	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE)	34
2.10	Electroforesis en gel de poliacrilamida con urea (urea-PAGE)	34
2.11	Electroforesis capilar de zona (ECZ)	35
3	Resultados y análisis de resultados	36
3.1	Evaluación de etiquetado y contenido neto	36
3.2	Análisis físicoquímico de la leche por ultrasonido	37
3.3	Prueba de solubilidad y cuantificación de proteína soluble por el método de Lowry	38
3.4	Valores de pH de las muestras de quesos	41
3.5	Perfiles proteínicos obtenidos mediante SDS-PAGE	42
3.6	Perfiles proteínicos obtenidos mediante urea-PAGE	48
3.7	Perfiles electroforéticos mediante ECZ	55
4	Conclusiones	65
5	Bibliografía	68
6	Apéndices	78
6.1	Apéndice A. Análisis de leche por ultrasonido	78
6.2	Apéndice B. Denominación de quesos y toma de la porción de muestra	79
6.3	Apéndice C. Composición química de disoluciones amortiguadoras y reactivos	82
6.4	Apéndice D. Formulación de gel concentrador y gel separador urea-PAGE	83
6.5	Apéndice E. Diagramas de flujo y especificaciones de las variedades de queso analizadas	84

Lista de abreviaturas, acrónimos y símbolos

AAPM	agregados de alto peso molecular	Leu	leucina
α_{S0} -CN	alfa-caseína-s ₀	Lys	lisina
α_{S0} -I-CN	alfa-caseína-I-s ₀	M	molar
α_{S1} -CN	alfa-caseína-s ₁	Met	metionina
α_{S1} -I-CN	alfa-caseína-I-s ₁	mg	miligramo
α_{S2} -CN	alfa-caseína-s ₂	mL	mililitro
Ala	alanina	min	minuto
AP	activadores de plasmina	mm	milímetro
APS	persulfato de amonio (por sus siglas en inglés)	MOPS	ácido 3-morfolinopropanosulfónico
Arg	arginina	MRC	material de referencia certificado
Asp	ácido aspártico	MPa	megapascal
BSA	albúmina sérica bovina (por sus siglas en inglés)	M Ω	megaohm
β -CN	beta-caseína	NaCl	cloruro de sodio
β -LG	beta-lactoglobulina	NMX	Norma Mexicana
Bis	N,N'-metilbisacrilamida	nm	nanómetro
CaCl ₂	cloruro de calcio	NOM	Norma Oficial Mexicana
cm	centímetro	μ g	microgramo
CN	caseínas	μ L	microlitro
Cr	concentración relativa	PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida (por sus siglas en inglés)
C.V.	coeficiente de variación	Phe	fenilalanina
°C	grado Celsius	pH	potencial de hidrógeno
Da	dalton	Pro	prolina
D.E.	desviación estándar	PS	proteínas del suero
d.i.	diámetro interno	psi	libra-fuerza por pulgada cuadrada (por sus siglas en inglés)
DTT	ditiotreitol	PVDF	polifluoruro de vinilideno
EC	comisión de enzimas (por sus siglas en inglés)	r.c.f.	fuerza centrífuga relativa (por sus siglas en inglés)
ECZ	electroforesis capilar de zona	r.p.m	revoluciones por minuto
EDTA	sal disódica del ácido etilendiamino tretracético (por sus siglas en inglés)	s	segundo
g	gramo	SDS	dodecil sulfato de sodio (por sus siglas en inglés)
Glu	ácido glutámico	Ser	serina
Gln	glutamina	SiOH	silanol
Gly	glicina	tm	tiempo de migración
GMP	glicomacropéptido	tmr	tiempo de migración relativo
h	hora	Thr	treonina
His	histidina	Tyr	tirosina
HPMC	hidroxipropilmetilcelulosa	UFC	unidades formadoras de colonias
Hz	hertz	UV	ultravioleta
Ig	inmunoglobulina	V	volt
Ile	isoleucina	Val	valina
κ -CN	kappa-caseína		
kDa	kilodalton		
kV	kilovolt		

Índice de figuras, tablas y ecuaciones

Figura 1.1.	Proceso general de elaboración de quesos	8
Figura 1.2.	Criterios de clasificación de los quesos	12
Figura 1.3.	Esquema del sistema plasmina en leche de bovino	14
Figura 1.4.	Principales productos formados de β -CN por plasmina	15
Figura 1.5.	Representación de la coagulación enzimática de la leche	16
Figura 1.6.	Representación esquemática de los procesos de fermentación y maduración en quesos	20
Figura 1.7.	Separación electroforética de las proteínas	21
Figura 1.8.	Diagrama esquemático de la separación de las caseínas mediante urea-PAGE	24
Figura 1.9.	Instrumentación empleada en electroforesis capilar	25
Figura 1.10.	Representación de la migración electroforética de especies iónicas en un capilar de sílice fundida (pH > 3)	26
Figura 1.11.	Línea de tiempo de la legislación y normatividad mexicana aplicable a quesos	29
Figura 2.1.	Diagrama de bloques de la estrategia experimental	30
Figura 2.2.	Cinturones de confianza y predicción de la curva de calibración de la albúmina sérica bovina	33
Figura 3.1.	Perfiles electroforéticos de las muestras de leche y quesos certificados	43
Figura 3.2.	Perfiles electroforéticos de las muestras de leche y quesos comerciales	45
Figura 3.3.	Perfiles electroforéticos de quesos certificados correspondientes al lote de inspección	47
Figura 3.4.	Perfiles electroforéticos de las muestras de quesos en condiciones alcalinas	49
Figura 3.5.	Perfiles electroforéticos de las muestras de quesos certificados en condiciones alcalinas	53
Figura 3.6.	Electroforegramas de las muestras de leche	57
Figura 3.7.	Electroforegramas de las muestras de quesos certificados	59
Figura 3.8.	Electroforegramas de las muestras de quesos comerciales	62
Figura E1.	Diagrama de flujo de la elaboración del Queso Panela	84
Figura E2.	Diagrama de flujo de la elaboración del Queso Adobera para fundir	85
Figura E3.	Diagrama de flujo de la elaboración del Queso Cheddar	86
Figura E4.	Diagrama de flujo de la elaboración del Queso Chihuahua	87
Figura E5.	Diagrama de flujo de la elaboración del Queso Chester	88
Tabla 1.1.	Propiedades de las principales proteínas de la leche	1
Tabla 3.1.	Análisis fisicoquímico de las muestras de leche por ultrasonido (<i>LactiCheck</i> TM)	37
Tabla 3.2.	Valor promedio del contenido de proteína en muestras de leche, quesos certificados y MRC	39
Tabla 3.3.	Valor promedio del contenido de proteína en muestras de quesos comerciales	40

Tabla 3.4.	Relación carga/masa de las principales proteínas lácteas en medio alcalino	48
Tabla 3.5.	Relación carga/masa de las proteínas lácteas y productos de hidrólisis en medio ácido	56
Tabla 3.6.	Tiempo de migración relativo y concentración relativa de las principales proteínas lácteas en las muestras de leche	58
Tabla 3.7.	Tiempo de migración relativo y concentración relativa de las proteínas y péptidos de las muestras de quesos certificados	60
Tabla 3.8.	Tiempo de migración relativo y concentración relativa de las proteínas y péptidos de las muestras de quesos comerciales	63
Tabla 3.9.	Denominación y periodo de maduración de las muestras analizadas	64
Tabla A1.	Verificación de calibración del equipo <i>LactiCheckTM</i>	78
Tabla E1.	Especificaciones fisicoquímicas y resultados de la inspección de Queso Panela	84
Tabla E2.	Especificaciones fisicoquímicas y resultados de la inspección de Queso Adobera	85
Tabla E3.	Especificaciones fisicoquímicas y resultados de la inspección de Queso Cheddar	86
Tabla E4.	Especificaciones fisicoquímicas del Queso Chihuahua	87
Tabla E5.	Especificaciones fisicoquímicas del Queso Chester	88
Ecuación 1	Cálculo del tiempo de migración relativo a α_{s1} -CN	35
Ecuación 2	Cálculo de la concentración relativa de cada pico electroforético	35
Ecuación 3	Cálculo de la relación carga/masa en medio alcalino	48
Ecuación 4	Cálculo de la relación carga/masa en medio ácido	55

Resumen

En el mercado mexicano se pueden encontrar productos con la denominación “queso”, elaborados a partir de leche fresca, leche descremada rehidratada o reconstituida, y/o con extensiones o reemplazos de los componentes de la misma. La falta de identificación y normatividad de los quesos de imitación genera una competencia desleal entre los productores de quesos auténticos y un posible engaño a los consumidores, afectando a todo el Sector Lácteo. En ese sentido, se analizaron quesos elaborados por una de las dos empresas mexicanas que cuenta con productos certificados por un Organismo de Tercera Parte acreditado: queso Panela, queso Adobera, queso Cheddar y queso Cheddar con una maduración extendida a 6 meses. Se caracterizó la fracción proteínica de las tres variedades de quesos certificados y dos muestras comerciales importadas de queso Parmesano. Las pruebas realizadas para ello fueron determinación de la solubilidad y concentración de proteína, así como obtención de sus perfiles proteínico/peptídico empleando tres técnicas electroforéticas: electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio, electroforesis en gel de poliacrilamida con urea en medio alcalino y electroforesis capilar de zona. Se detectaron, identificaron y cuantificaron las principales proteínas lácteas, así como los principales productos de proteólisis tanto en los quesos frescos como en los madurados, encontrando que las tres técnicas electroforéticas son complementarias. El análisis conjunto de la caracterización de la fracción proteínica y los resultados del proceso de inspección, realizado al mismo lote de productos certificados, permitió establecer su autenticidad. Los perfiles electroforéticos obtenidos se emplearon como referencia para establecer la autenticidad de tres muestras comerciales de queso Chihuahua. Los resultados de este trabajo contribuyeron con el desarrollo del método de prueba para la determinación de la composición de las principales proteínas y péptidos en queso por electroforesis capilar de zona, y eventualmente, en los procesos de certificación y evaluación de la conformidad de los productos con esta denominación.

Introducción

La leche y los productos lácteos son componentes importantes de la dieta. A nivel mundial, estos alimentos contribuyen, en promedio, con el 4% del requerimiento energético total (Fox *et al.*, 2004). Las proteínas de la leche proporcionan todos los aminoácidos esenciales para una adecuada nutrición, así mismo, se sabe que la fracción caseínica y las proteínas del suero contribuyen en la absorción de diferentes minerales y vitaminas, respectivamente (Borad *et al.*, 2017). El queso es esencialmente un concentrado de caseínas, su composición química depende de la leche empleada para su elaboración, el proceso de manufactura y, en menor proporción, el grado de maduración (Fox *et al.*, 2004). Además, los quesos son productos de gran diversidad sensorial que satisfacen las necesidades gustativas de todo tipo de consumidores (Cervantes *et al.*, 2008).

Resulta sorprendente la gran diversidad de variedades de quesos que se pueden obtener a partir de la misma materia prima y manufactura similar. Probablemente no hay dos variedades de queso que sean idénticas (Fox *et al.*, 2017).

En la primera mitad del siglo XX hubo una mejora en el desarrollo tecnológico para la manufactura de quesos, incluyendo procesos automatizados para el descremado y pasteurización de la leche, el uso de cadena de frío para la conservación de la leche y maduración de los quesos, así como la adición de cultivos lácticos seleccionados e ingredientes permitidos: cloruro de calcio, colorante natural y cuajo líquido estandarizado.

En ese contexto de innovación nacen los primeros “quesos” de imitación que hacen uso de leche descremada en polvo y grasa vegetal como insumos acompañantes de la leche fluida (Villegas de Gante *et al.*, 2015). En contraparte, los quesos genuinos, que forman parte de la tradición y la cultura de México, continúan siendo elaborados únicamente a partir de leche fresca, principalmente de bovino, con el empleo mínimo de aditivos, no sustituyen la grasa butírica y utilizan derivados proteínicos exclusivamente para estandarizar la relación del contenido de grasa contra el de proteína (Villegas de Gante y de la Huerta, 2015).

Planteamiento del problema

En México el queso es el producto lácteo más importante debido a tres aspectos fundamentales: el número de variedades existentes, los niveles de producción y su participación monetaria en el mercado nacional e internacional (Villegas de Gante *et al.*, 2015).

De acuerdo con datos del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos, la producción y consumo de quesos se ha incrementado 7% en los últimos tres años (USDA, 2019). En México, la producción masiva de quesos industrializados elaborados a partir de materias primas que ofrecen un mayor margen de ganancia, y favorecidos por la falta de normatividad de los productos análogos, ha impactado negativamente la producción de quesos auténticos con el consecuente engaño a los consumidores (Villegas de Gante y Cervantes, 2011).

Debido a la presión competitiva que ejercen los productos de imitación, los quesos mexicanos genuinos se están extinguiendo, lo que repercute en una pérdida gradual de nuestras tradiciones alimentarias (Villegas de Gante y de la Huerta, 2015).

Muchos de los quesos mexicanos genuinos elaborados a nivel artesanal tienen el potencial para ser protegidos, pero la mayoría carece de un estándar de identidad. De ahí la importancia para que sean estudiados con un enfoque multidisciplinario: desde su caracterización fisicoquímica, incluyendo la evaluación de su inocuidad y calidad sensorial, hasta de rentabilidad e impacto social, cultural y gastronómico (Villegas de Gante *et al.*, 2015).

En este sentido, y hasta donde se tiene conocimiento, este es el primer trabajo en el que se presenta la caracterización de la fracción proteínica de tres variedades de quesos certificados con diferente grado de maduración, mediante tres diferentes métodos electroforéticos, a fin de encontrar los índices de autenticidad de estos productos lácteos.

Objetivo general

Realizar la caracterización fisicoquímica y electroforética de la fracción proteínica de quesos Panela, Adobera y Cheddar certificados a fin de establecer sus índices de autenticidad.

Objetivos específicos

Obtener la fracción proteínica de quesos frescos y madurados para caracterizar sus perfiles proteínicos/peptídicos empleando tres técnicas electroforéticas.

Identificar y cuantificar las principales proteínas lácteas y los productos de proteólisis de las caseínas.

Establecer los índices de autenticidad de quesos mexicanos con diferente grado de maduración tomando en cuenta el proceso general de elaboración de queso y el marco normativo aplicable.

Comparar los perfiles electroforéticos de quesos certificados y los de quesos comerciales a fin de concluir sobre su denominación comercial, genuinidad y autenticidad.

Hipótesis

La certificación de un producto establece que cumple con los requerimientos normativos vigentes. Entonces, si los perfiles proteínicos de quesos certificados corresponden a los de productos genuinos, se podrán emplear como referencia para el análisis de variedades de quesos similares.

1. Marco teórico

1.1 Leche

1.1.1 Química de las proteínas lácteas

Químicamente la leche es una mezcla heterogénea compleja constituida principalmente por agua, proteínas en dispersión, glóbulos de grasa y lactosa, además de otros componentes menores como minerales y vitaminas formando una disolución acuosa verdadera. Las propiedades de la leche se ven afectadas por las proteínas que contiene, más que por cualquier otro componente (O'Mahony y Fox, 2014).

Aproximadamente el 95% del nitrógeno total forma parte de las proteínas lácteas que representan una de las grandes contribuciones de la leche a la nutrición humana. La fracción proteínica está constituida por las caseínas (CN) que, por definición, precipitan por acidificación de la leche a pH 4.6 a 20°C, y las proteínas del suero (PS), que se mantienen en disolución bajo estas condiciones. El contenido de caseínas y proteínas del suero guardan una relación conservada de aproximadamente 80:20, respectivamente (Fox *et al.*, 2015). Las principales propiedades de las proteínas lácteas se muestran en la Tabla 1.1.

Tabla 1.1 Propiedades de las principales proteínas de la leche

Proteína	Contenido promedio (%)	Masa molecular (Da)	residuos por molécula			pI
			aminoácidos	fosfoserinas	cisteínas	
α_{S1} -CN	1.1	23,614	199	7 – 9	0	4.5
α_{S2} -CN	0.3	25,230	207	10 – 13	2	5.0
β -CN	0.9	23,983	209	5	0	4.8
κ -CN	0.3	19,023	169	1	2	5.6
β -LG	0.32	18,283	162	0	5	5.2
α -LA	0.12	14,176	123	0	8	4.3

Abreviaturas: α_S -CN: alfa-caseína; β -CN: beta caseína; kappa caseína: κ -CN; β -LG: beta lactoglobulina, α -LA; alfa lactoalbúmina y pI: punto isoelectrico. Adaptado de Fox *et al.*, 2015.

Las caseínas están constituidas por cuatro familias de fosfoproteínas agrupadas por la homología de sus estructuras primarias: α_{S1} -CN, α_{S2} -CN, β -CN y κ -CN, que representan aproximadamente el 40%, 10%, 35% y 15% del total de la fracción caseínica, respectivamente. Todas presentan modificaciones postraduccionales y polimorfismo genético, que involucra la sustitución de 1 o 2 residuos de aminoácidos y, en menor medida, la eliminación de un fragmento (Farrell *et al.*, 2004; Fox *et al.*, 2017).

La especie predominante de la familia de α_{S1} -CN, contiene ocho grupos fosfato, aunque también se presenta una variante menos abundante, denominada α_{S0} -CN, que tiene un fosfato extra en el residuo de Ser₅₆ (Manson *et al.*, 1977). La proteína de referencia para α_{S1} -CN es α_{S1} -CN B-8P, donde: α_{S1} -CN significa el producto genético, B la variante genética y 8P refiere el número de grupos fosfato. La familia de α_{S2} -CN presenta una mezcla de polimorfismos de 10 a 13 grupos fosfato, la proteína de referencia es la α_{S2} -CN A-11P, constituida por 207 residuos de aminoácidos, presenta una pronunciada estructura dipolar con grupos aniónicos en el extremo amino y grupos catiónicos en el carboxilo terminal (Farrell *et al.*, 2004).

La proteína de referencia de la familia de β -CN presenta cinco grupos fosfato: β -CN A²-5P. Es la caseína más hidrofóbica y contiene 35 residuos de prolina (Pro). La mayoría de los grupos ionizables de la molécula se localizan en las posiciones 1 – 40 y, en el extremo opuesto, entre las posiciones 136 – 209, se localizan los grupos hidrofóbicos. Por su naturaleza anfipática forma micelas en solución (Farrell *et al.*, 2004; Holland y Boland, 2014). La caseína kappa, contiene una serina fosforilada, dos residuos de cisteína y es la única caseína glicosilada en determinados residuos de treonina (Thr₁₃₁, Thr₁₃₃ y Thr₁₃₅ o Thr₁₃₆) y no precipita en presencia de iones de calcio. La proteína de referencia es la κ -CN A 1P (Farrell *et al.*, 2004; Holland y Boland, 2014).

Las caseínas no son proteínas globulares y se asocian entre sí formando estructuras supramoleculares denominadas micelas de caseína. La micela de caseína, constituida por cientos de moléculas, agrupadas mediante interacciones no covalentes, es una partícula de tamaño coloidal. Los residuos de las serinas fosforiladas y del ácido glutámico (Glu) forman

complejos con el calcio generando zonas de alta densidad electrónica denominadas *nanoclusters* de fosfato de calcio (McMahon y Oommen, 2007). Aunque aún existe controversia sobre la organización y el modo de ensamblaje de las caseínas, los modelos propuestos coinciden en que predominantemente β -CN se localiza en el interior, α_S -CN se encuentra distribuida en toda la estructura, y en la superficie, κ -CN le otorga estabilidad estérica a la micela de caseína (Dalglish y Corredig, 2012; O'Mahony y Fox, 2014; Fox *et al.*, 2015).

Las proteínas del suero se componen principalmente de β -lactoglobulina (β -LG), α -lactoalbúmina (α -LA) y en menor proporción: albúmina sérico bovina (BSA), lactoferrina (LF) e inmunoglobulinas (Ig), que no están directamente involucradas en la elaboración de las principales variedades de quesos (Fox *et al.*, 2017).

Además de las caseínas y las proteínas del suero, la leche contiene numerosas proteínas. Se conocen más de 200, que incluyen enzimas, inhibidores de enzimas, factores de crecimiento, entre otras (Fox *et al.*, 2017). Algunas de las enzimas endógenas de la leche se mantienen activas durante la elaboración de los quesos, principalmente la plasmina (Fox *et al.*, 2015).

1.2 Quesos

1.2.1 Breve historia de la elaboración de los quesos

Queso es el nombre genérico para un grupo de alimentos a base de leche que se caracterizan por su gran diversidad de aromas, texturas y formas, elaborados en todo el mundo (Fox *et al.*, 2017). La palabra queso proviene del latín *caseus*, que significa carente de suero. Sus orígenes se remontan al inicio de la agricultura, y se sabe que se han producido desde las primeras civilizaciones (McSweeney, 1993; Fox *et al.*, 2017; Greco *et al.*, 2018). El análisis de cerámica perforada, hallada en la región de Kuyavia, Polonia, con una datación de entre 7150 a 6750 años a.C., es la evidencia más antigua relacionada con la transformación de leche en queso (Salque *et al.*, 2013).

Probablemente la elaboración de queso se originó por accidente: la acción de las enzimas gástricas, presentes en las bolsas hechas a partir de los estómagos de pequeños rumiantes, que pudieron ser convenientes para almacenar la leche, resultaba en su coagulación. Eventualmente el queso se convirtió en una manera de conservar la leche, facilitando su transporte, almacenamiento y distribución (Salque *et al.*, 2013; Donnelly, 2014).

Se tiene registro de numerosas referencias de quesos y otros productos lácteos a lo largo de la historia. Homero menciona a Polifemo elaborando quesos en la Odisea; durante el imperio Romano, los quesos se establecieron como un alimento importante, tanto que se incluía en las raciones para los soldados. Se explica detalladamente el proceso de elaboración de quesos en el tratado de agricultura *De Re Rustica* de *Columella*. Con la caída del imperio Romano y el surgimiento de la Edad Media, las cruzadas y peregrinaciones culminaron en la formación de grandes estados feudales, comunidades autónomas, donde los quesos representaban uno de los productos más importantes, junto con la cerveza y el vino. Además de los estados feudales, los contribuidores más importantes al desarrollo de tecnologías en la producción de quesos y la evolución de las variedades durante la Edad Media fueron los monasterios que, además de divulgar y preservar el conocimiento, fueron grandes contribuyentes en el avance de la agricultura en Europa. Muchas de las variedades de quesos, ahora bien definidas, fueron desarrolladas en dichos monasterios, teniendo los registros más antiguos para el queso Gorgonzola en 879, Roquefort en 1070, Cheddar en 1500, Parmesano en 1579, Camembert en 1791, entre otros (McSweeney, 1993; Fox *et al.*, 2015, 2017; Gobbetti *et al.*, 2018).

Posteriormente, los estados feudales evolucionaron en villas y comunidades donde las diferentes variedades de quesos eran producidas tradicionalmente en regiones geográficas limitadas, especialmente áreas montañosas donde las comunidades eran aisladas. Muchas variedades evolucionaron por accidente debido a circunstancias del lugar de elaboración. Por ejemplo, el suministro de leche con respecto a la composición química o a la microbiota y accidentes durante el almacenamiento de los quesos que resultaron en el desarrollo de hongos u otros microorganismos que, presumiblemente, llevaron a cambios deseables en la calidad de los quesos y fueron incorporándose al protocolo de manufactura. Así, la producción fue evolucionando y, durante los siglos XVII y XVIII, se extendió el conocimiento en la

elaboración de quesos con la migración de los europeos y la colonización de América (McSweeney, 1993; Fox *et al.*, 2015, 2017; Gobbetti *et al.*, 2018).

En México, el queso fue el resultado del aporte cultural de los españoles. Ellos introdujeron los primeros hatos de cabras y ovejas y, posteriormente, de ganado vacuno. Los quesos mexicanos, desde el comienzo de la Colonia han experimentado una evolución; al principio, estuvieron inspirados en los españoles, luego, paulatinamente transitaron por un proceso de mestizaje alimentario que incorporó elementos culturales y productivos nativos como el desmenuzamiento de la cuajada y su molido fino (a mano o con metate), el salado en masa, el moldeado en cestos de palma o mimbre y en moldes de madera o cortezas; también el prensado opcional con lajas, piedras o mecanismos rústicos. Un hito en la “mexicanización” de los quesos fue la incorporación de chile en la pasta, o untado en la superficie de las piezas de quesos (Villegas de Gante y de la Huerta, 2015).

Los quesos comenzaron a elaborarse para manejar los excedentes de leche, consumiéndose queso fresco en el periodo de lluvias y, en los meses siguientes, su almacenamiento favoreció el proceso de maduración, enriqueciendo sus propiedades sensoriales y asegurando su inocuidad (Villegas de Gante *et al.*, 2015). En poco tiempo se desarrollaron zonas de importante actividad ganadera, como los Altos de Jalisco, que desde hace más de 100 años ha estado vinculada con la actividad lechera y en donde, debido a las dificultades de transporte por la orografía de la zona, se comenzaron a elaborar diferentes variedades de quesos, como el Adobera. A principios del siglo XX, la leche y los productos lácteos ya eran del consumo generalizado en el país: quesos frescos y algunos añejos, requesón, jocoque, nata, crema, mantequilla y dulces de leche (Cervantes *et al.*, 2008; Villegas de Gante *et al.*, 2014, 2015). Los primeros quesos mexicanos pudieron ser los rancheros de pasta molida, frescos de aro, de pasta molida oreados y los de pasta hilada como el quesillo de Oaxaca. Uno de los casos más destacados es el del queso Chihuahua, que tiene sus orígenes con el arribo de los menonitas a México en 1922 (Villegas de Gante *et al.*, 2014).

Originalmente el queso se elaboró únicamente con métodos tradicionales, a partir de leche fluida (bronca) y únicamente con insumos permitidos (cuajo y sal). En la década de los

cuarenta y hasta fines de la década de los sesenta del siglo pasado, empezó a modernizarse la industria quesera nacional, utilizando tecnología innovadora (pasteurizador lento, descremadora y tinas metálicas de cuajado). En ese contexto de cambio tecnológico-industrial, se comenzó a emplear crecientemente leche descremada en polvo y grasa vegetal en la elaboración de “quesos” industriales, así es como nacen los primeros quesos de imitación en el país (Villegas de Gante y de la Huerta, 2015).

1.2.2 Definición y denominación comercial

Desde el punto de vista lactológico, el queso es el nombre genérico para el producto resultante de la coagulación de la leche, la subsiguiente deshidratación del gel y su ulterior moldeado. Así, un queso es esencialmente un gel concentrado de proteínas que retiene grasa y agua (McSweeney y O’Mahony, 2016).

En la NOM-223-SCFI/SAGARPA-2018, recientemente publicada, se denomina al queso como el producto blando, semiduro, duro y extraduro, madurado o no madurado, y que puede estar recubierto, obtenido mediante coagulación total o parcial de la proteína de la leche y/o productos obtenidos de la leche, por acción del cuajo u otros coagulantes idóneos, y por escurrimiento parcial del suero que se desprende como consecuencia de dicha coagulación, respetando el principio de que la elaboración del queso resulta en una concentración de proteína láctea, especialmente la porción de caseína.

La Norma A-6 del *Codex Alimentarius* establece que el queso es el producto fresco o madurado, con una consistencia semisólida o sólida, en el cual el cociente proteína de suero/caseína no exceda al cociente de esas proteínas en la leche, y que es obtenido por coagulación parcial o total de las siguientes materia primas: leche, leche parcialmente descremada, leche descremada, crema, suero de crema o de mantequilla (*buttermilk*), como tales o como parte de una combinación, por medio de la acción de cuajo u otros agentes coagulantes apropiados y por medio del drenado parcial del suero resultante.

En resumen, el queso debe contener los principales y más valiosos componentes de la leche: las caseínas y la grasa butírica de forma concentrada. Queda claro que el queso auténtico debe de ser elaborado con leche fluida, o con fluidos que de ella deriven, y contengan sus mismos componentes (Villegas de Gante y de la Huerta, 2015).

1.2.3 Proceso de elaboración

La elaboración de la mayoría de las variedades de queso involucra un protocolo similar: estandarización de la leche, coagulación, deshidratación (corte del coágulo, cocción, agitación, prensado, salado y otras operaciones que promuevan la sinéresis del gel), moldeado, prensado y salado (Figura 1.1) (Fox *et al.*, 2004; McSweeney y O'Mahony, 2016). Esencialmente consiste en un proceso de concentración de la grasa butírica y las caseínas, de seis a doce veces, mientras las proteínas del suero, la lactosa y sales son removidas en el suero (Fox *et al.*, 2015; Gobbetti *et al.*, 2018).

1.2.3.1 Selección de la leche

La leche que se emplea en la elaboración de quesos debe ser de alta calidad microbiológica y química, pues todas las propiedades de un queso se ven afectadas por su composición, especialmente la concentración de caseína, calcio y el pH (Gobbetti *et al.*, 2018). Además, la leche debe estar libre de contaminantes químicos y ácidos grasos libres, los cuales provocan sabores y aromas indeseables en el producto final, así como de antibióticos que inhiben a los cultivos bacterianos (Fox *et al.*, 2017).

1.2.3.2 Estandarización de la leche

La composición de la leche es ajustada al contenido deseado de proteína y grasa, que finalmente repercuten en las propiedades del queso y en el rendimiento quesero. Anteriormente, la relación entre la grasa y las proteínas era modificada mediante la separación de la grasa o por la adición de crema o leche descremada. En la actualidad es posible realizar el ajuste mediante ultrafiltración (Gobbetti *et al.*, 2018).

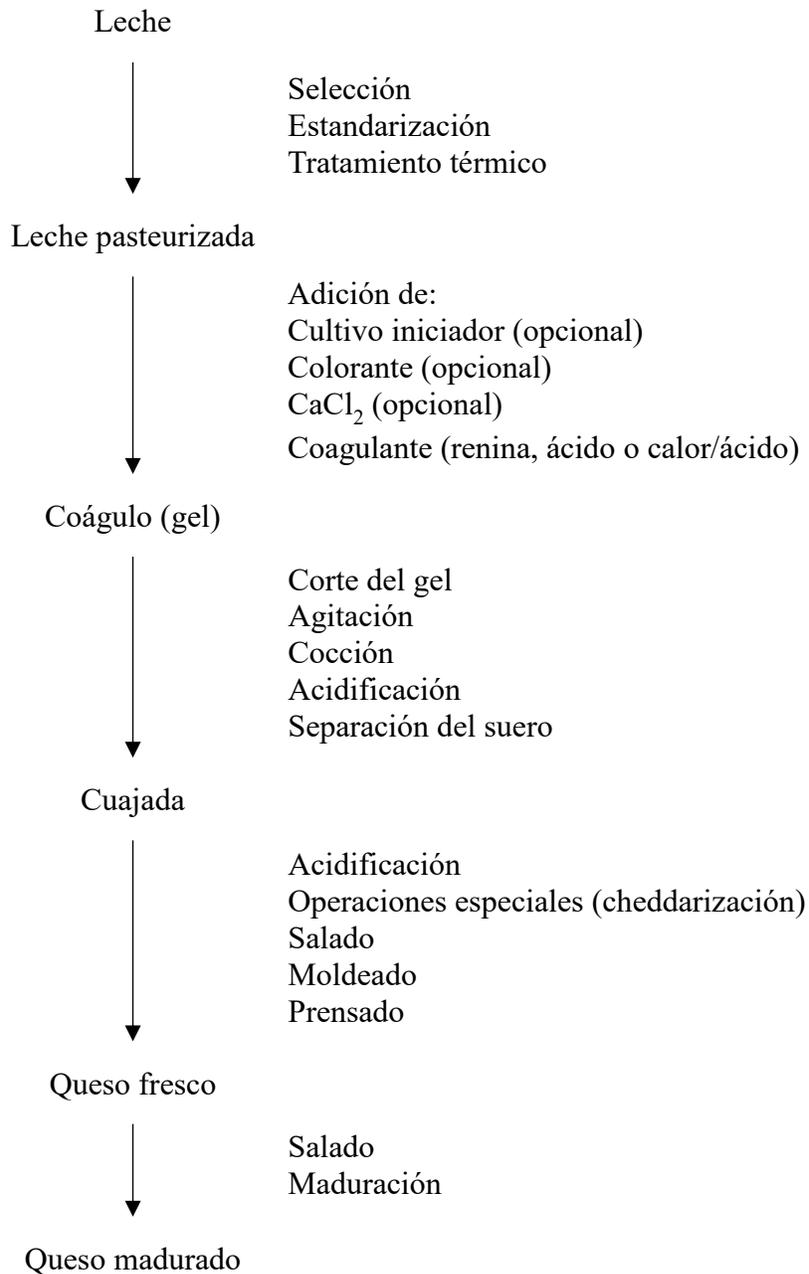


Figura 1.1. Protocolo general para la elaboración de quesos. Adaptado de Fox *et al.*, 2017.

En la incorporación de aditivos se considera la inclusión de cloruro de calcio, pues tiene un papel importante en la coagulación enzimática de la leche que ha sido pasteurizada, además de colorantes naturales como achiote (extracto de annato) para impartir un atractivo color naranja en los quesos madurados (Villegas de Gante *et al.*, 2015).

1.2.3.3 Tratamiento térmico

Por ley, la leche empleada para la elaboración de quesos debe ser pasteurizada, usualmente inmediatamente antes de su uso. La pasteurización, aunque altera la microbiota endógena de la leche, elimina la presencia de patógenos y de otros microorganismos que pueden causar defectos o variabilidad en el sabor y/o textura del producto, además de que facilita la manufactura, produciendo quesos de una calidad más uniforme (Fox *et al.*, 2017; Gobbetti *et al.*, 2018).

1.2.3.4 Acidificación

La acidificación es normalmente alcanzada por la producción *in situ* del ácido láctico, aunque también puede añadirse ácido cítrico o acidógenos directamente a la leche. En variedades artesanales, la microbiota autóctona de la leche es empleada para la producción de ácido, aunque, de esta manera, el nivel de acidez producido es impredecible pudiendo favorecer el desarrollo de bacterias indeseables o de deterioro (Fox *et al.*, 2004).

Actualmente, en la elaboración industrial de quesos, se añade un cultivo iniciador de bacterias ácido lácticas a la leche cruda o pasteurizada para lograr un determinado nivel de acidez (Gobbetti *et al.*, 2018).

1.2.3.5 Coagulación

Después de que la leche ha sido estandarizada y pasteurizada, es transferida a tinas que varían en formas y tamaños, en donde se obtendrá la cuajada. La elaboración de quesos involucra la desestabilización controlada de las micelas de caseína en la leche por hidrólisis enzimática de κ -CN, precipitación isoelectrica de las caseínas o una combinación de la disminución del pH (~ 5.6) a temperaturas altas ($\sim 90^\circ\text{C}$) (McSweeney y O'Mahony, 2016).

Cerca del 75% de los quesos se producen mediante la coagulación enzimática de la leche, y el 25% restante es producido por la coagulación inducida por acidificación de la leche, con un bajo porcentaje elaborado por la combinación de ácido y calor (Fox *et al.*, 2004).

1.2.3.6 Operaciones posteriores a la coagulación

El gel formado por la coagulación de la leche es bastante estable bajo condiciones de reposo. Una de las operaciones posteriores a la coagulación es el corte de la cuajada, donde el tamaño del corte influye directamente en el nivel y extensión de la sinéresis (Gobbetti *et al.*, 2018). Cuando se ha alcanzado el nivel de sinéresis deseado, y en algunos casos el pH necesario, la cuajada se separa del suero por diferentes métodos: transfiriéndola a moldes perforados permitiendo la remoción del suero restante, como en el caso de la elaboración del queso Camembert, o retirando la cuajada de las tinas utilizando mantas y colocándola en moldes, en el caso del queso Parmesano, o por decantación, colado y autoprensado en el caso del queso Cheddar (Fox *et al.*, 2017).

Muchos quesos son moldeados en formas tradicionales y características de cada variedad: cilíndricas, esféricas, rectangulares, etc., en diversos casos, la forma y el tamaño son simplemente debido a la preferencia y tradición de consumo, pero la forma de un queso tiene importantes consecuencias en la maduración de las diferentes variedades, por ejemplo, en variedades que conllevan el desarrollo de ojos, como el Emmental, deben ser lo suficientemente grandes para retener el CO₂ producido durante la fermentación del ácido propiónico. Finalmente, la cuajada de quesos con bajo contenido de humedad es prensada para consolidar la masa de la cuajada y remover el suero remanente (Fox *et al.*, 2017).

1.2.3.7 Salado

La última operación en el proceso de elaboración de quesos es el salado que, en la mayoría de las variedades, se efectúa por inmersión en salmuera y, con menor frecuencia, añadiendo directamente la sal en la superficie del queso o mezclando la sal con el grano de la cuajada antes del prensado (Fox *et al.*, 2004; Gobbetti *et al.*, 2018).

1.2.3.8 Cheddarización

La cheddarización es una operación adicional en algunas variedades de quesos. Consiste en el corte de la cuajada en bloques, que se apilan, cambiando el orden cada cierto tiempo, continuando este procedimiento a 35°C por aproximadamente dos horas, hasta que el pH desciende de 6.1 a aproximadamente 5.2 como resultado del desarrollo del cultivo iniciador (Fox *et al.*, 2004). La disminución del pH permite la solubilización del fosfato de calcio coloidal que actúa como agente de cementación entre las micelas de caseínas, además se promueve el desuerado por apilar los bloques de cuajada entre ellos (autoprensado), resultando en que la textura cambia de suave y friable a dura y flexible (McSweeney y O'Mahony, 2016).

1.2.3.9 Maduración

La cuajada moldeada puede ser consumida fresca o conservada bajo ciertas condiciones de temperatura y humedad, por periodos de dos semanas hasta dos años (Fox *et al.*, 2004; McSweeney y O'Mahony, 2016).

En la maduración se desarrollan las características únicas que identifican a un queso, resultado de complejas reacciones bioquímicas que ocurren a través de la acción catalítica de diferentes enzimas sobre los macrocomponentes presentes en el queso fresco.

1.3 Clasificación de quesos

La NOM-223-SCFI/SAGARPA-2018 establece la clasificación de quesos según el grado de maduración: los quesos frescos que se caracterizan por su alto contenido de humedad y los quesos madurados, que se caracterizan por ser de pasta dura, semidura o blanda y puede tener o no corteza.

Aunque es una clasificación acertada, se tienen otros criterios como la relación entre la textura y el contenido de humedad (muy duros, duros, semiduros y suaves). Una de las

clasificaciones más empleadas es la conformada por “superfamilias”, catalogadas con el método de coagulación empleado: con cuajo o enzimático en la mayoría de las variedades, mediante ácido y la combinación ácido y calor (Figura 1.2) (Fox *et al.*, 2004).

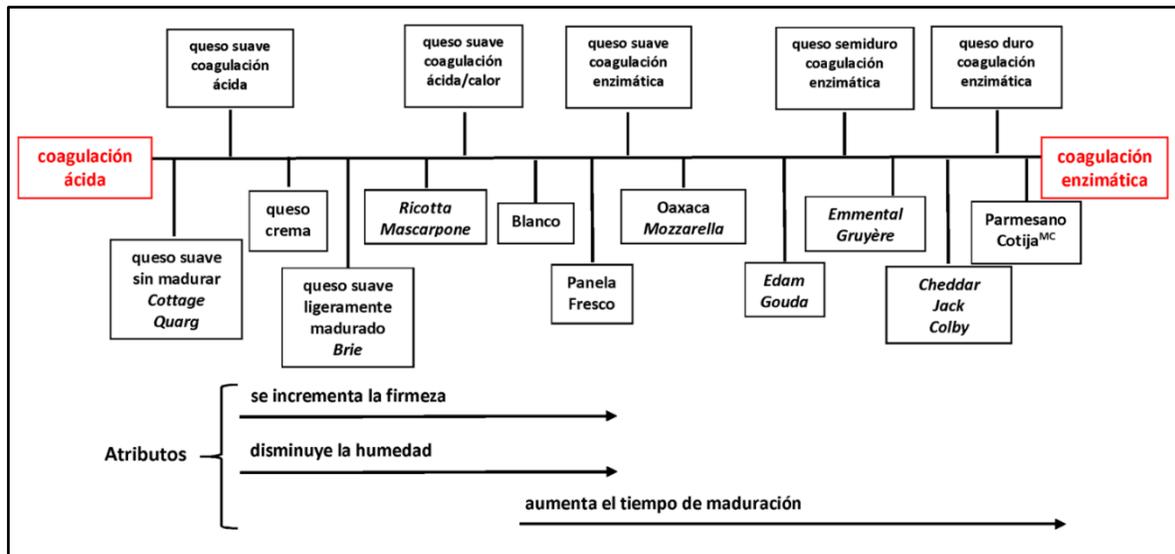


Figura 1.2. Criterios de clasificación de los quesos. Adaptado de Farkye (2004).

1.4 Proteólisis

A lo largo del proceso de elaboración del queso, se presentan diferentes reacciones bioquímicas que le otorgan las propiedades únicas a cada variedad. La más importante, por ser la que más influye en el sabor, aroma y textura del producto, es la proteólisis, la cual puede dividirse en tres fases: la proteólisis en la leche antes de la elaboración del queso, la coagulación enzimática de la leche y la proteólisis durante la maduración (Fox, 1989).

1.4.1 Proteólisis en la leche

Hay dos agentes responsables de la proteólisis en la leche: las proteasas extracelulares termorresistentes producidas por microorganismos psicrótrofos y proteasas endógenas de la leche.

Una vez que la leche ha sido recolectada, se refrigera para prevenir el crecimiento microbiano, pero, bajo estas condiciones, predomina la actividad de microorganismos psicrótrofos, que repercute en la hidrólisis de las caseínas, generando sabores amargos y la coagulación de la leche cuando las cuentas son del orden 10^6 UFC/mL (Fox, 1989).

Por otra parte, la leche contiene diferentes proteasas, siendo la plasmina la principal (Sousa y McSweeney, 2001; Fox y Kelly, 2006). Su función fisiológica es disolver coágulos sanguíneos, y su actividad en leche incrementa en situaciones donde se presenta un aumento del flujo de los constituyentes de la sangre a la leche, como en la mastitis y en periodos tardíos de la lactación (Anema, 2019).

La plasmina es una serin proteasa altamente específica para reconocer enlaces peptídicos con los residuos básicos lisina (Lys) o arginina (Arg) en el extremo amino (Bastian y Brown, 1996). Presenta actividad óptima a pH 7.5 a 37°C y es termoestable, por lo que resiste la pasteurización (Crudden *et al.*, 2005) e incluso es responsable de la gelación de la leche ultrapasteurizada (Bastian y Brown, 1996; Datta y Deeth, 2001, Anema, 2019).

Asociado a las micelas de caseína se localiza el sistema completo de plasmina: la plasmina, el plasminógeno, activadores de plasmina (AP) e inhibidores tanto de los activadores de plasmina como del plasminógeno (Figura 1.3). El plasminógeno bovino es una glicoproteína termoestable de 786 residuos de aminoácidos (88 kDa), y es convertido a plasmina por la hidrólisis del enlace Arg₅₅₇-Ile₅₅₈ por los activadores del plasminógeno. El plasminógeno y la plasmina se concentran en la cuajada de quesos elaborados enzimáticamente, mientras que los inhibidores se solubilizan en el suero (Grufferty y Fox, 1988; Whitaker *et al.*, 2002; McSweeney y O'Mahony, 2016; Anema, 2019).

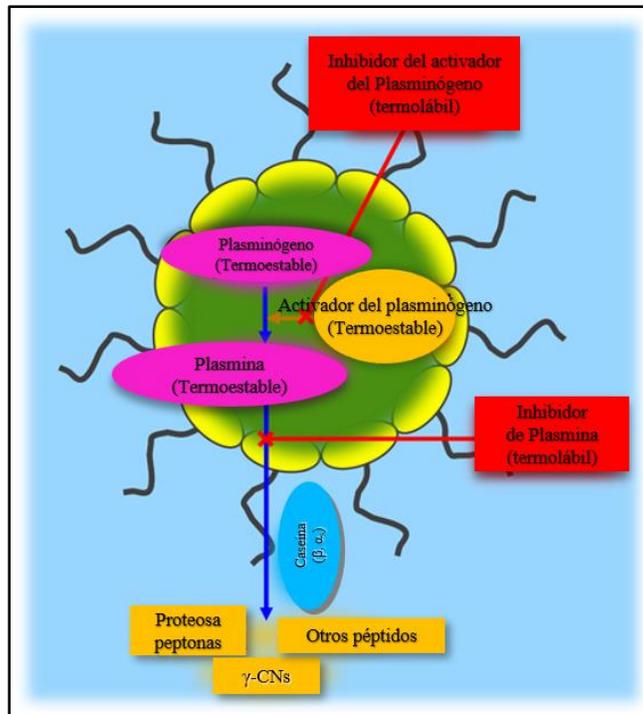


Figura 1.3. Esquema del sistema de plasmina en leche de bovino. Adaptado de Anema, 2019.

La plasmina hidroliza específicamente los enlaces $\text{Lys}_{28}\text{-Lys}_{29}$, $\text{Lys}_{105}\text{-His}_{106}$, y $\text{Lys}_{107}\text{-Glu}_{108}$ de $\beta\text{-CN}$ para formar las proteosa peptona (PP), que conservan el extremo amino, y gamma caseínas ($\gamma\text{-CNs}$), que conservan el extremo carboxilo: PP8 rápida ($\beta\text{-CN f1-28}$) y $\gamma_1\text{-CN}$ ($\beta\text{-CN f29-209}$), PP8 lenta ($\beta\text{-CN f29-105}$) y $\gamma_2\text{-CN}$ ($\beta\text{-CN f106-209}$) y PP8 lenta ($\beta\text{-CN f29-107}$) y $\gamma_3\text{-CN}$ ($\beta\text{-CN f108-209}$), respectivamente (Figura 1.4) (Whitaker *et al.*, 2002; McSweeney y O'Mahony, 2016). Además, presenta actividad proteolítica, en menor proporción, sobre $\alpha_{S1}\text{-CN}$ y $\alpha_{S2}\text{-CN}$, siendo $\kappa\text{-CN}$ la más resistente de las caseínas a la proteólisis por plasmina (Anema, 2019).

La actividad de la plasmina se incrementa después de la pasteurización de la leche debido a la inactivación de los inhibidores de plasmina, además de que el plasminógeno no es totalmente desactivado durante la pasteurización (Datta y Deeth, 2001, Whitaker *et al.*, 2002; Gazi *et al.*, 2014; Anema, 2019). Un incremento en la actividad de plasmina resulta en la disminución del rendimiento quesero (Whitaker *et al.*, 2002).

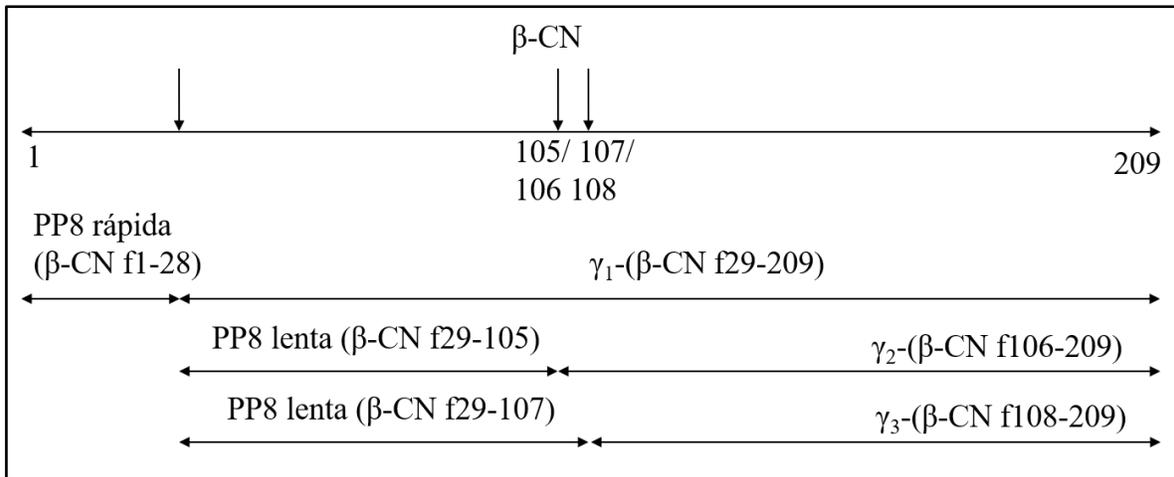


Figura 1.4. Principales productos formados de β -CN por plasmina. Adaptado de Fox *et al.*, 2015.

1.4.2 Coagulación enzimática de la leche

La coagulación enzimática de la leche se divide en dos etapas: la primera involucra la modificación de las micelas de caseína mediante la proteólisis limitada de κ -CN por acción de la quimosina, y la segunda consta en la agregación de las proteínas sensibles al calcio (Fox *et al.*, 2015).

La primera etapa de la coagulación enzimática consiste en la hidrólisis específica del enlace Phe₁₀₅-Met₁₀₆ de κ -CN, resultando en la formación de para- κ -CN (κ -CN f1-105) y la liberación glicomacropéptido (GMP; κ -CN f106-169) (Figura 1.5). El GMP se pierde en el suero, dadas sus características hidrofílicas, mientras que para- κ -CN se mantiene unida a la micela de caseína (Fox *et al.*, 2017; Gobetti *et al.*, 2018).

La segunda fase de la coagulación, referida como el proceso de gelación, tiene lugar cuando disminuye la repulsión de las micelas de caseína al hidrolizarse cerca del 85% de κ -CN, hasta el punto de que, cuando colisionan, se mantienen unidas formando una red referida como coágulo o gel, en la que queda retenida la mayor parte de la grasa (Fox *et al.*, 2015, 2017).

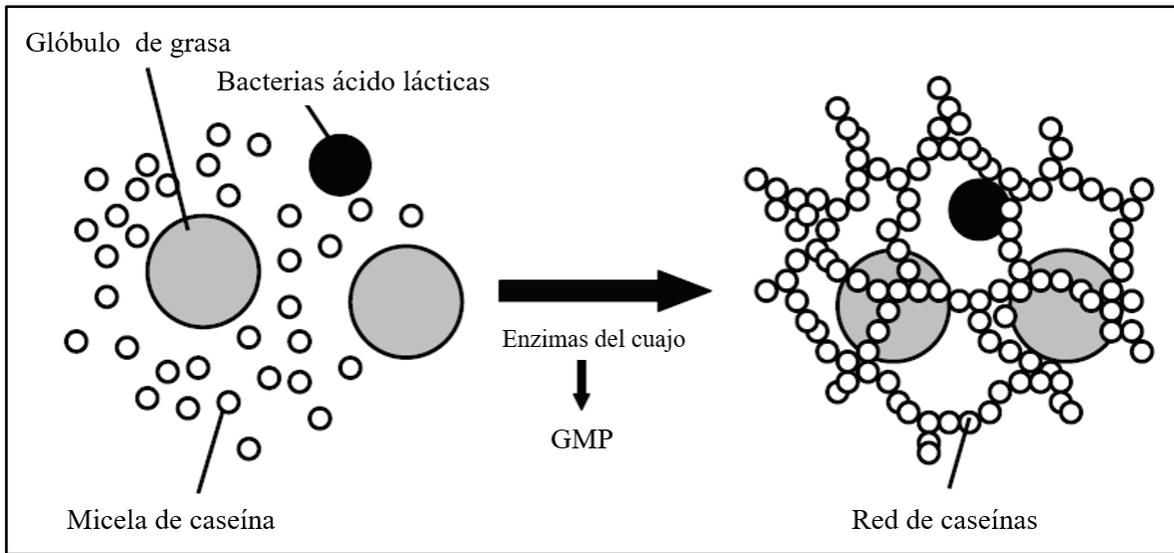


Figura 1.5. Representación de la coagulación enzimática de la leche. Adaptado de Donnelly, 2014.

1.4.2.1 Enzimas del cuajo

Los cuajos tradicionales son preparados de los estómagos de terneros mediante la extracción con salmuera conteniendo NaCl al 15%. El extracto de cuajo de animales está compuesto por tres enzimas que pertenecen a la familia de proteasas aspárticas: quimosina (EC 3.4.23.4), pepsina A (EC 3.4.23.1) y gastricina (EC 3.4.23.3) (McSweeney y O'Mahony, 2016). La quimosina, el coagulante específico de la leche, está constituido por una cadena polipeptídica de 323 residuos de aminoácidos (35.6 kDa) y presenta un pH óptimo de 5.8 (De Jong *et al.*, 1977). Su actividad representa más del 90% de la actividad proteolítica de las enzimas presentes en el cuajo (Fox *et al.*, 2017), mientras que la pepsina A y la gastricina son proteasas de menor actividad específica (McSweeney y O'Mahony, 2016). En conjunto, las enzimas del cuajo son desnaturalizadas a temperaturas mayores a 55°C (Fox *et al.*, 2015).

El cuajo obtenido de bovinos adultos contiene una mayor proporción de pepsina y, por lo tanto, una mayor actividad proteolítica que puede resultar en la generación de sabores y aromas indeseables (Fox *et al.*, 2004).

1.4.3 Proteólisis en la maduración

La tercera y última fase de la proteólisis en la elaboración de quesos es la maduración. Durante esta etapa, ocurren una serie de reacciones bioquímicas complejas, a través de las cuales se producen los compuestos que otorgan las características de sabor y aroma al queso madurado.

La proteólisis contribuye a la maduración del queso en la formación de compuestos sápidos, cambios en el pH por la liberación de amoníaco, cambios en la textura por la ruptura de la red de proteínas, entre otros. En variedades de quesos como el Cheddar, se considera que la proteólisis es el cambio bioquímico que más repercute durante la maduración (Fox, 1988).

Hay cuatro agentes involucrados en la maduración del queso: las enzimas del cuajo, enzimas endógenas de la leche, enzimas del cultivo iniciador y las enzimas del cultivo secundario.

1.4.3.1 Actividad de la quimosina

Actualmente, la mayoría de la quimosina empleada en la elaboración de quesos es producida por fermentación de microorganismos recombinantes: *Escherichia coli*, *Kluyveromyces lactis* y *Aspergillus niger* var *Awamori* (Jaros *et al.*, 2008), pues presenta como ventajas mayor productividad y rendimiento, además de que tiene una menor actividad proteolítica general (Fox *et al.*, 2015).

En todas las variedades de queso, α_{S1} -CN es el principal sustrato de proteólisis por la acción de la quimosina, específicamente en el enlace peptídico Phe₂₃-Phe₂₄. Su hidrólisis resulta en la formación del macropéptido α_{S1} -I-CN (α_{S1} -CN f24-199), responsable de una disminución de la firmeza del queso durante los primeros siete a catorce días de maduración. La hidrólisis de aproximadamente 20% de α_{S1} -CN, provoca que la red de caseína se debilite y que el queso cambie a una textura más suave (Lawrence *et al.*, 1987; McGoldrick y Fox, 1999).

La retención del coagulante en la cuajada es dependiente del pH, por lo que, a menor pH de la cuajada en el desuerado, mayor será la cantidad de cuajo retenido y, por lo tanto, una mayor proporción de α_{S1} -CN será hidrolizada por la quimosina (Lawrence *et al.*, 1987).

Aunque se ha considerado la formación del macropéptido α_{S1} -I-CN para caracterizar la maduración de los quesos, dado que su presencia aumenta conforme se incrementa el tiempo de maduración, con un concomitante descenso de la concentración de α_{S1} -CN, la relación entre sus concentraciones con respecto al tiempo de maduración es débil, pues α_{S1} -CN puede ser hidrolizada en otros productos de bajo peso molecular y también porque α_{S1} -I-CN se degrada ulteriormente por la quimosina u otras proteasas (Grappin *et al.*, 1985).

En variedades con mayor contenido de humedad y que llevan una cocción a bajas temperaturas, como quesos tipo Cheddar, la proteólisis inicial es principalmente debido a la quimosina (Fox *et al.*, 2017), mientras que en algunas variedades de quesos donde se aplica una cocción a alta temperatura, desnaturalizando al coagulante empleado, como en el queso *Mozzarella* y el Parmesano, la plasmina es el agente que más contribuye a la proteólisis primaria (Sousa *et al.*, 2001; Whitaker *et al.*, 2002; McSweeney y O'Mahony, 2016).

1.4.3.2 Actividad de la plasmina

Durante los primeros meses de maduración β -CN es hidrolizada por la plasmina, desapareciendo después de aproximadamente un año. Consecuentemente, γ_2 -CN y γ_3 -CN continúan incrementando, y γ_1 -CN tiende a disminuir (Mayer *et al.*, 1998).

La proporción de plasmina retenida en el queso también está determinada por el pH de la cuajada en el desuerado, ya que, a medida que el pH desciende, la plasmina se disocia de las micelas de caseína (Lawrence *et al.*, 1987).

En el queso la actividad de plasmina es mayor que en la leche debido a la inactivación de los inhibidores de plasmina y, aunque el pH de la mayoría de las variedades de quesos no es el óptimo para su actividad (~ 7.5), el pH de los quesos tiende a incrementar conforme al tiempo

de maduración, por lo que, a tiempos prolongados de maduración, puede presentarse una mayor actividad proteolítica por plasmina (Bastian y Brown 1996; Fox *et al.*, 2017).

1.4.3.3 Cultivos iniciadores y secundarios

La microbiota involucrada en el proceso de elaboración de quesos se clasifica en dos grupos: bacterias ácido lácticas del cultivo iniciador (SLAB, por sus siglas en inglés), predominantemente cepas de *Lactococcus lactis*, para quesos tipo Cheddar, y bacterias ácido lácticas no pertenecientes al cultivo iniciador (NSLAB, por sus siglas en inglés), principalmente cepas de *Lactobacillus* (Blaya *et al.*, 2018).

Las SLAB tienen como principal función la fermentación durante la elaboración de quesos, dando lugar a la producción de ácido láctico (Fox *et al.*, 2004). Predominan al inicio de la maduración, pero la mayoría muere por autólisis, lo cual repercute en la liberación de enzimas intracelulares, particularmente peptidasas, cuya actividad culmina con la liberación de aminoácidos, que son los precursores de algunos de los compuestos que otorgan sabores y aromas al queso (Fox *et al.*, 2017) (Figura 1.6).

En general, las SLAB y NSLAB contribuyen poco en la proteólisis primaria en quesos tipo Cheddar (Lynch *et al.*, 1997). El papel principal de las proteasas y peptidasas de las SLAB en la maduración del queso es la degradación de péptidos de tamaño largo a intermedio, producidos principalmente por la quimosina y en menor proporción por plasmina (Pagthinathan y Nafees, 2015; Fox *et al.*, 2017).

En términos generales, a los tres meses de maduración, disminuye la viabilidad del cultivo iniciador, llevando a un declive en la supervivencia y a un incremento de la autólisis. Las NSLAB se encuentran en bajas concentraciones al inicio de la maduración, y dependiendo de la velocidad de muerte del cultivo iniciador, las NSLAB pueden dominar la microbiota viable del queso, especialmente en variedades como quesos Cheddar (Blaya *et al.*, 2018).

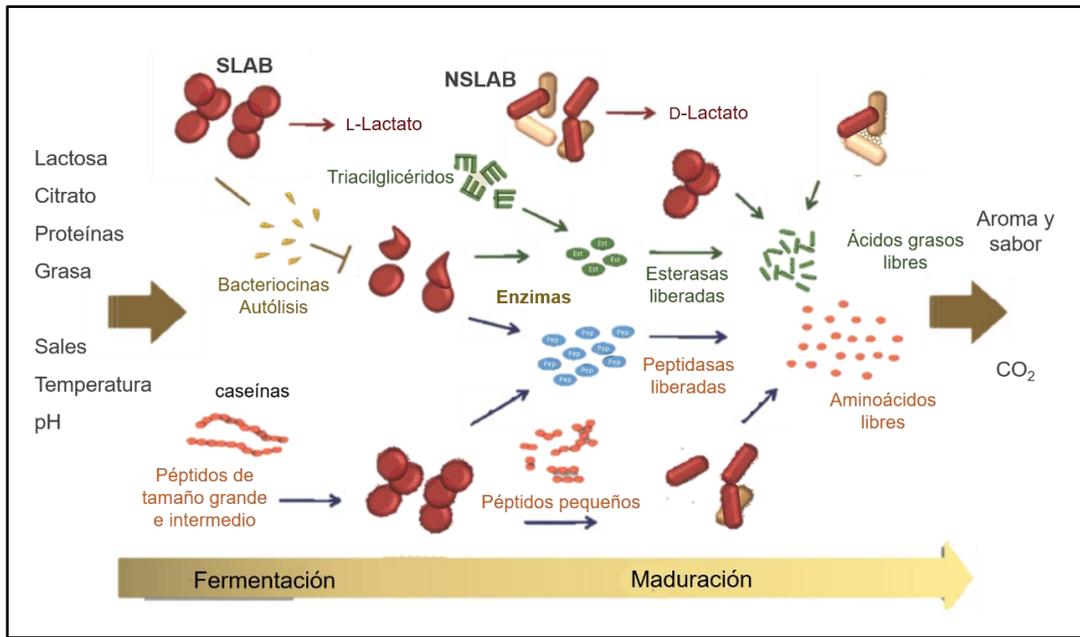


Figura 1.6. Representación esquemática de los procesos de fermentación y maduración en quesos. Adaptado de Blaya *et al.*, 2018.

Las NSLAB complementan la actividad proteolítica del cultivo iniciador produciendo péptidos de bajo peso molecular y aminoácidos que contribuyen directamente al sabor y aroma del queso, impartiendo sabor dulce (Gly, Ser, Ala, Pro), ácido (His, Gln, Asp) o amargo (Arg, Met, Val, Leu, Phe, Tyr, Ile) (McSweeney y Sousa, 2000; Fox *et al.*, 2015).

Sin embargo, la producción de aminoácidos no es el último paso en el desarrollo del sabor y aroma del queso, pues los aminoácidos son los precursores de diferentes compuestos volátiles presentes en el producto terminado (Fox *et al.*, 2004).

1.5 Caracterización de la proteólisis en quesos

Los quesos son sometidos a análisis químicos por diferentes razones, entre ellas, conocer su composición para propósitos nutricionales, verificar el cumplimiento de normas de calidad, evaluar la eficiencia de producción o como un índice de calidad (McSweeney, 1993).

Con base en las diferencias en el proceso de elaboración de las distintas variedades, se ha sugerido la posibilidad de clasificar e identificar a los quesos de acuerdo con el grado de

modificación química durante la maduración, es decir, mediante la obtención de su “huella química”, principalmente mediante la caracterización de la fracción proteínica (Fox *et al.*, 2004), empleando métodos electroforéticos (McSweeney, 1993).

1.5.1 Métodos electroforéticos

La electroforesis se refiere al movimiento de especies con carga en un determinado medio bajo la influencia de un campo eléctrico. Los analitos migrarán hacia el electrodo con carga opuesta a diferente velocidad debido a las inherentes diferencias de su carga y masa. Así, diferentes moléculas en una misma mezcla pueden separarse (Figura 1.7) (Westermier *et al.*, 2016).

Ya que las proteínas son moléculas anfotéricas, pueden adquirir cargas netas que dependen del pH del medio. En la práctica, comúnmente se emplean disoluciones amortiguadoras alcalinas para la separación de proteínas, ya que, bajo estas condiciones, la mayoría se repelen, no se agregan, y, por estar cargadas negativamente, migrarán al ánodo (Janson, 2011).

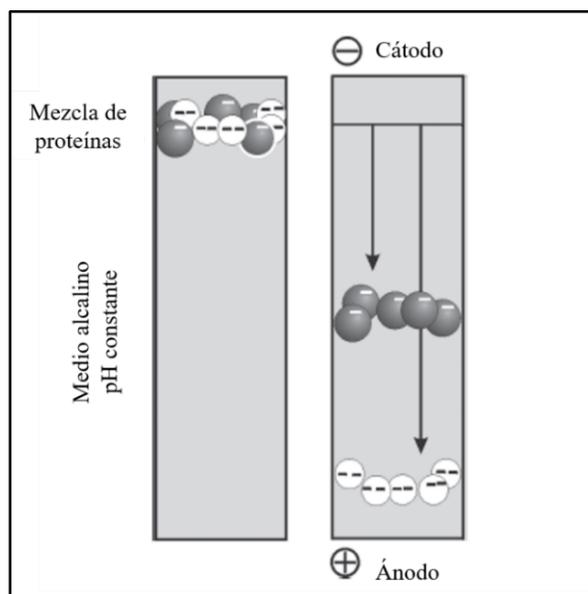


Figura 1.7. Separación electroforética de las proteínas. Adaptado de Janson, 2011.

1.5.1.1 Electroforesis en gel de poliacrilamida

La separación electroforética de las proteínas se realiza, frecuentemente, mediante la electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE, por sus siglas en inglés). En esta metodología, la matriz en la que se realiza la separación está compuesta por polímeros de acrilamida que forma enlaces cruzados con N,N'-metilenbisacrilamida (Bis) por copolimerización con los monómeros de acrilamida generando un tamiz molecular poroso por el que las proteínas migran hacia el electrodo de carga opuesta como consecuencia del campo eléctrico aplicado (Karp, 2005).

El tamaño del poro es controlado mediante la concentración de acrilamida y el contenido del agente entrecruzante: un aumento en la concentración de acrilamida provocará una disminución en el tamaño del poro (Westermier *et al.*, 2016).

Una de las variantes más utilizadas en la separación de proteínas es la electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE, por sus siglas en inglés). El SDS es un detergente aniónico que forma complejos con las proteínas. Su interacción con las proteínas provoca la pérdida de sus estructuras secundaria y terciaria, y enmascara su carga. Consecuentemente, la movilidad aniónica del complejo SDS-proteína en un gel de poliacrilamida es dependiente únicamente de su masa molecular. Así, a menor masa molecular, mayor será la migración de la proteína en el gel (Westermier *et al.*, 2016).

Adicionalmente, los puentes disulfuro intramoleculares e intermoleculares pueden ser hidrolizados por agentes reductores como β -mercaptoetanol o ditriotreitól (DTT), a fin de que la masa molecular corresponda al monómero polipeptídico (Janson, 2011).

Al término de la electroforesis, las moléculas pueden revelarse mediante la adición de colorantes específicos, como la tinción con azul de *Coomassie* para la detección de proteínas (Smejkal, 2006).

La electroforesis en gel de poliacrilamida es frecuentemente utilizada en el monitoreo de la proteólisis primaria en quesos. Mediante esta técnica se puede definir el tipo de coagulación, así como el establecimiento del nivel de proteólisis general en quesos madurados, empleando el nivel de α_{S1} -CN residual como indicador (McSweeney, 1993).

Se ha demostrado que los índices obtenidos mediante electroforesis exponen las diferencias entre cada variedad de queso, así, el perfil proteínico puede emplearse como índice de maduración y de calidad (Fox *et al.*, 2017). Sin embargo, la electroforesis en gel está limitada al análisis de la degradación de las caseínas y la formación de los subsecuentes productos de hidrólisis por acción de la quimosina y plasmina, debido a que péptidos de bajo peso molecular no pueden ser detectados con esta metodología (O’Keeffe *et al.*, 1976; McSweeney, 1993).

Diferentes métodos se han reportado para la identificación y detección de adulteración de quesos, basados en el análisis de la fracción de caseínas, principalmente técnicas electroforéticas utilizando geles de poliacrilamida con urea (urea-PAGE) para la resolución e identificación de los péptidos generados durante la maduración (Shalabi y Fox, 1987; Fox *et al.*, 2004; Veloso *et al.*, 2004), o en presencia de SDS para la caracterización cualitativa de la fracción proteínica, aunque se prefiere urea-PAGE en el análisis de quesos (McSweeney, 1993).

Urea-PAGE es el método más empleado para la resolución de caseínas (Figura 1.8). La migración electroforética resulta en función de la relación carga-masa de las caseínas en condiciones alcalinas. Además, la incorporación de urea es empleada para disociar interacciones hidrofóbicas intermoleculares (Fox *et al.*, 2015).

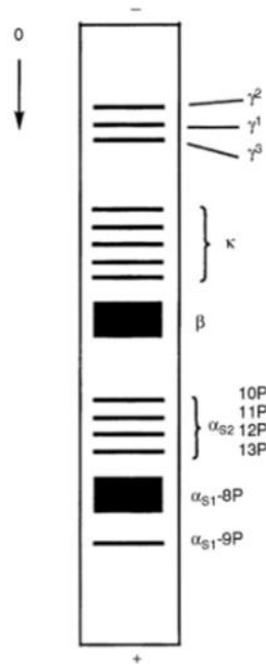


Figura 1.8. Diagrama esquemático de la separación de las caseínas mediante urea-PAGE. 0: punto de aplicación. Migración anódica: γ^2 -CN, γ^3 -CN, γ^1 -CN, κ -CN, β -CN, α_{S2} -CN 10P, α_{S2} -CN 11P, α_{S2} -CN 12P, α_{S2} -CN 13P, α_{S1} -CN 8P y α_{S1} -CN 9P (Fox *et al.*, 2015).

1.5.1.2 Electroforesis capilar

La electroforesis capilar (EC) es un método instrumental empleado en el análisis de polinucleótidos, proteínas, polisacáridos, iones, entre otros. Es considerada complementaria a otras técnicas de separación, incluidas las técnicas cromatográficas y la electroforesis en gel. Presenta como ventajas una alta resolución, eficiencia, sensibilidad, automatización, rapidez de la metodología y el uso de pequeñas cantidades de muestra (Otte *et al.*, 1997; Marina *et al.*, 2005; Westermier *et al.*, 2016).

En la EC, la separación de las moléculas se basa en su relación carga-masa, mecanismo de separación análogo al de electroforesis en gel, pero la separación, detección y cuantificación se realiza de forma continua (Otte *et al.*, 1997).

La separación se lleva a cabo en un tubo capilar de sílice fundida de 20 cm a 30 cm de largo y un diámetro interno de 10 μm a 100 μm . Ambos extremos del capilar son inmersos en un

recipiente que contiene la disolución amortiguadora y los electrodos (Figura 1.9). La muestra se aplica mediante inyección electrocinética o hidrodinámica por un extremo del capilar y al aplicar un campo eléctrico, las especies cargadas migrarán al electrodo con carga opuesta (Marina *et al.*, 2005; Westermier *et al.*, 2016).

La detección de las especies con carga se realiza en continuo mediante, por ejemplo, en la región ultravioleta del espectro (Frazier *et al.*, 1999). En el caso de las proteínas, la detección se realiza, regularmente, a longitudes de onda de entre 200 nm a 220 nm, en donde la absorción es proporcional al número de enlaces peptídicos (Westermier *et al.*, 2016).

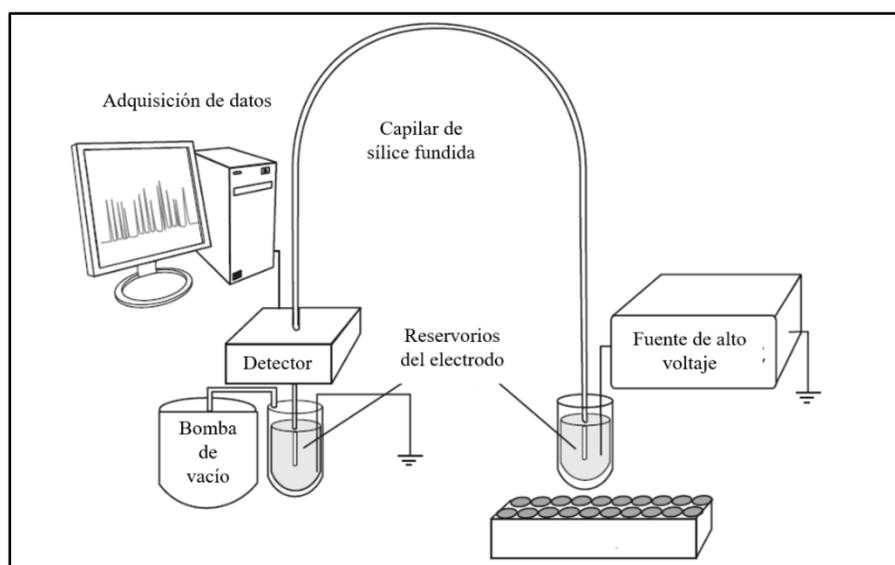


Figura 1.9. Instrumentación empleada en electroforesis capilar. Adaptado de Westermier *et al.*, 2016.

La migración de las moléculas depende de la movilidad electroforética y el flujo electrosmótico. La movilidad electroforética es función de la carga y tamaño de cada molécula, así como de la naturaleza de la disolución amortiguadora, la temperatura y la intensidad del campo eléctrico aplicado (Marina *et al.*, 2005).

Por otra parte, el flujo electrosmótico se refiere al flujo que se origina en la presencia de un campo eléctrico cuando una solución ionizada entra en contacto con una superficie sólida con carga. En el caso de capilares de sílice fundida, la superficie tiene un exceso de cargas

negativas por la ionización de los grupos silanoles (SiOH). Un elevado número de cationes que se sitúan en la interfase entre la pared del capilar y la solución, dan lugar a la formación de una capa fija, seguida de una capa móvil. Los cationes en la capa móvil migran al cátodo y al ser solvatados, arrastran la solución con ellos creando el flujo electrosmótico (Figura 1.10.) (Marina *et al.*, 2005; Jimidar, 2008).

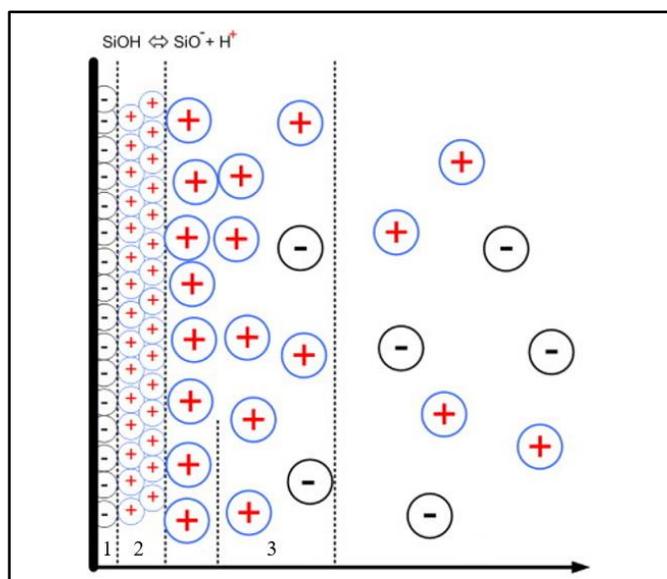


Figura 1.10. Representación de la migración electroforética en un capilar de sílice fundida ($\text{pH} > 3$). 1: pared del capilar, 2: capa fija, 3: capa móvil. Adaptado de Jimidar, 2008.

Además de la separación de proteínas, la EC permite el análisis simultáneo de péptidos de diferente tamaño y solubilidad. Por lo tanto, la EC ha sido empleada para el estudio de la proteólisis de las proteínas lácteas en la maduración de quesos (Strickland *et al.*, 1996; Otte *et al.*, 1997; Molina *et al.*, 1998; Frazier *et al.*, 1999; Miralles *et al.*, 2000).

Se ha demostrado que la EC es superior que urea-PAGE y SDS-PAGE, sin embargo, debe emplearse como complemento para la caracterización de la proteólisis en quesos (Otte *et al.*, 1997). En conjunto, las técnicas electroforéticas mencionadas, tienen el poder para caracterizar la fracción proteínica de diferentes variedades de quesos, con las que se puede obtener la huella química que permita definir y catalogar la identidad y calidad de los quesos.

1.6 Producción y consumo de quesos

En el año 2018 se tuvo una producción mundial de 20 millones 586 mil toneladas de queso. La Unión Europea encabezó la producción con una participación del 49%, seguida de Estados Unidos de América con un 29% (USDA, 2019).

En México, según datos del Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP), en el 2018 se elaboraron 418 mil 650 toneladas de queso con un valor en el mercado de 21 mil 293 millones de pesos. Las principales variedades producidas fueron: queso fresco (19%), queso doble crema (16%), queso Panela (11%), queso amarillo (11%), queso crema (10%), queso Chihuahua (9%), queso Manchego (9%) y queso Oaxaca (6%). Resalta la importancia que tiene en el país la producción de quesos frescos (SIAP, 2018).

En los últimos cinco años, el consumo de quesos en México se ha incrementado 26%. En el año 2018 se consumieron 525 mil toneladas, con los niveles de producción nacional no hay abasto suficiente para su consumo. Hay diferentes razones para el incremento en el consumo de quesos, incluyendo una imagen nutricional positiva, conveniencia y flexibilidad en el uso y la gran diversidad de sabores, aromas y texturas (Fox *et al.*, 2017).

Actualmente se identifican unas 40 diferentes variedades de quesos mexicanos genuinos, entre las que destacan: Cotija, Oaxaca, Adobera, Panela, Chihuahua, queso crema de Chiapas, entre otros (Villegas de Gante *et al.*, 2016).

1.7 Legislación y normatividad de quesos en México

La historia de la legislación mexicana aplicable a quesos es peculiarmente corta (Figura 1.11). La primera referencia se remonta a la quinta edición de la Ley General de Salud en 1989. En ella se definía a un queso genuino como el producto hecho de la cuajada obtenida de la leche entera, pasteurizada (a excepción de la dedicada a la elaboración de quesos añejos), semidescremada o descremada, de vaca o de otros animales, con adición de crema, o sin ella, por la coagulación de la caseína con cuajo, gérmenes lácticos u otra enzima

agregada y con o sin tratamiento posterior de la propia cuajada (Secretaría de Salud, 1989). Además, en esta edición se definía a los quesos de imitación como los productos en los que se sustituía parcial o totalmente la grasa butírica por grasa vegetal, y era únicamente permitido en quesos frescos (Villegas de Gante y de la Huerta, 2015).

Después, con la publicación de la NOM-121-SSA1-1994 en el año de 1996, se estableció específicamente, el uso de leche estandarizada y pasteurizada para la elaboración de todas las variedades de quesos. Se permitía el uso –opcional– de aditivos como sales fundentes, colorantes y conservadores en quesos madurados, así como el uso de caseinatos a un nivel máximo del 3% para quesos procesados, haciendo menos relevante los procesos tradicionales de elaboración.

Posteriormente, en el año 2002, fue publicada la 17ª edición de la Ley General de Salud. En comparación a la quinta edición, se hacen las adiciones mencionadas en la NOM-121-SSA1-1994. Además, el apartado de la clasificación de quesos de imitación es removido, eliminando la relevancia de la denominación para la industria y la normatividad (Villegas de Gante y de la Huerta, 2015). En ese mismo año, el Consejo para el Fomento de la Calidad de la Leche y sus Derivados (COFOCALEC) obtuvo su certificación como Organismo Nacional de Normalización (ONN), lo cual le acreditó para elaborar, actualizar, expedir y cancelar Normas Mexicanas en el área de productos, equipos, servicios y métodos de prueba de leche, sus productos y derivados.

En el año 2010 fue publicada la NOM-243-SSA1-2010, que, con base en la denominación que establece para quesos, queda claro que un queso auténtico debe provenir de leche estandarizada y pasteurizada. No importa tanto que el producto no sea genuino y auténtico, sino que sea estandarizado e inocuo (Villegas de Gante y de la Huerta, 2015).

Cinco años después se publicó la NMX-F-713-COFOCALEC-2014. En términos generales, conserva la denominación de la NOM-243-SSA1-2010, sin embargo, la complementa estableciendo que un queso no debe contener grasa y proteínas de origen diferente al de la leche, ni almidones ni féculas. Dicha especificación se conservó en la NOM-223-

SCFI/SAGARPA-2018, publicada este año, que, además, permite la adición de hasta un máximo de 2% de concentrados de proteína de leche (caseína o caseinatos) en los quesos comerciales.

La legislación mexicana refleja el desinterés en definir y proteger a los quesos mexicanos genuinos con el paso del tiempo. Si bien en sus orígenes se estableció la diferencia entre quesos genuinos contra los de imitación, la normatividad reciente repercute en algunos procesos tradicionales de elaboración de diferentes variedades de quesos, que emplean leche cruda, cuajo, así como el uso mínimo de aditivos (Villegas de Gante y de la Huerta, 2015).



Figura 1.11. Línea de tiempo de la legislación y normatividad mexicana aplicable a quesos.

2 Metodología

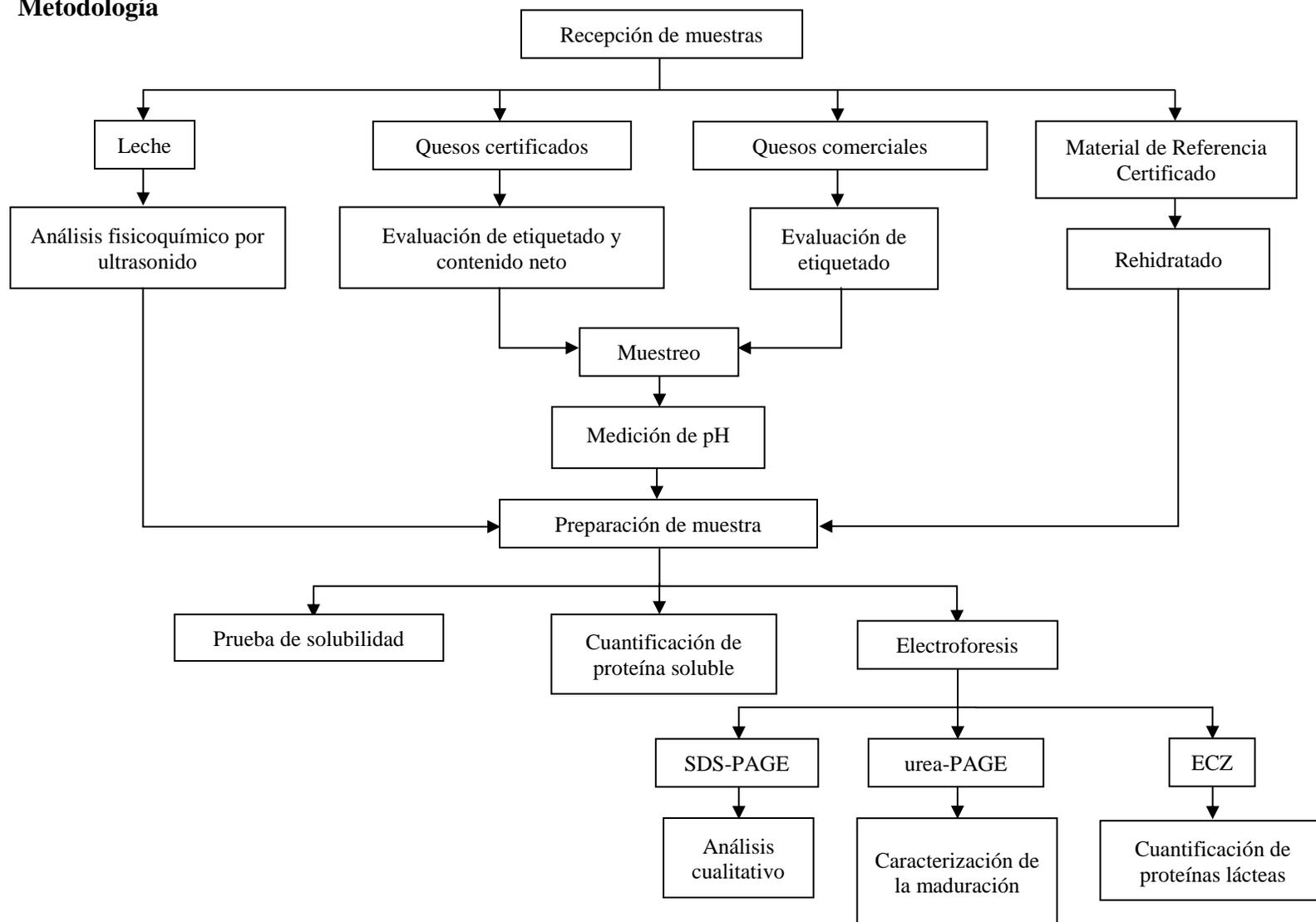


Figura 2.1. Diagrama de bloques de la estrategia experimental

2.1 Muestreo y muestras lácteas

La toma de muestras fue llevada a cabo por personal calificado de COFOCALEC, directamente en la planta industrial, y se realizó en dos etapas. El primer lote de quesos se recibió con la materia prima y, el segundo lote, que correspondió a la inspección del proceso de certificación, se analizó de forma paralela e independiente de los requisitos fisicoquímicos, microbiológicos y sanitarios aplicables a la denominación de cada variedad de queso comercial.

Se analizaron tres muestras de leche (**L**) y tres piezas, de 200 g cada una, de quesos comerciales certificados: Queso Panela (**QP**), Queso Adobera (**QA**), Queso Cheddar (**QC**) y Queso Cheddar con una maduración extendida a 6 meses (**QCm**).

Se analizaron tres piezas comerciales de queso con diferente denominación: queso Menonita (**QN**), queso Chester (**QT**) y queso Chihuahua (**QH**) de diferentes marcas, adquiridas directamente en una distribuidora ubicada en Chihuahua, Chihuahua; además de una muestra comercial importada de queso Parmesano (**QR**) y queso Parmesano con denominación de origen (**QR^{DO}**).

2.2 Análisis fisicoquímico de la leche por ultrasonido

La leche se analizó, por triplicado, el mismo día de recepción de las muestras, mediante ultrasonido (*LactiCheck*TM) (Apéndice A).

2.3 Toma de la porción de muestra de quesos

Se revisó tanto el contenido neto (NOM-002-SCFI-2011) como la etiqueta (NOM-051-SCFI/SSA1-2010) de cada muestra de queso. Se obtuvo la porción de muestra, de acuerdo con lo indicado en la Guía de muestreo (NMX-F-718-COFOCALEC-2017) (Apéndice B).

Se redujo el tamaño de partícula y se pesó la cantidad necesaria de las muestras de leche y de las diferentes variedades de queso en viales tipo *Eppendorf* de 2 mL de capacidad, de acuerdo con lo declarado en la etiqueta del producto (o el valor certificado para el MRC), para obtener una concentración final de proteína de aproximadamente 10 mg/mL, concentración referida para la identificación y cuantificación de las principales proteínas de la leche por electroforesis capilar (NMX-736/1-COFOCALEC-2012). Los viales se almacenaron hasta su análisis a - 70°C (*Nuair*, *Revco Technologies*, NC, USA).

2.4 Preparación de disoluciones amortiguadoras

Para la elaboración de las disoluciones amortiguadoras, cuya composición se indica en el apéndice C, se empleó agua Tipo I (18.2 MΩ/cm a 25 °C) filtrada a través de una membrana de Nylon con tamaño de poro de 0.45 μm (*Sistema Simplicity UV*, *Millipore*, MA, USA), reactivos de la más alta pureza y material desechable.

2.5 Preparación del Material de Referencia Certificado

Leche fluida liofilizada (DMR-411b), material de referencia para el control de calidad y validación de métodos analíticos para la medición de proteína (3.57%), grasa (3.52%), cenizas (0.73%), humedad (87.89%) y lactosa (4.82%), se hidrató de acuerdo a las indicaciones del Centro Nacional de Metrología (CENAM), adicionando 44.78 g de agua Tipo 1 y manteniendo a una temperatura de 50°C durante 1 min, con agitación constante.

2.6 Determinación de pH

Se determinó el pH (pH Meter, Mo. Φ 390, *Beckman-Coulter*, USA) de cada muestra de queso, por triplicado, manteniendo la porción de ensayo y agua destilada, recientemente hervida y fría, en una relación 1:2.5 (Wehr y Frank, 2004).

2.7 Preparación de muestras para el ensayo de solubilidad, determinación de proteína soluble y separación electroforética

El procedimiento para la evaluación de la solubilidad, cuantificación y caracterización electroforética de la fracción proteínica fue similar. Las muestras se descongelaron y se extrajo la proteína en la disolución amortiguadora de boratos-EDTA para evaluar la presencia o no de material insoluble, en la disolución amortiguadora de muestra para la cuantificación de proteína soluble, en la disolución amortiguadora de muestra con DTT (17 mM) para su análisis por SDS-PAGE y EC y en la disolución amortiguadora de corrida para su análisis por urea-PAGE. La mezcla permaneció a 800 rpm por 30 min a 40°C (*Thermomixer Comfort, Eppendorf, Germany*). Posteriormente, se separó la grasa por centrifugación a 18 000 r.c.f. por 30 min a 4°C (centrífuga, 5430 R, *Eppendorf*).

2.8 Determinación de proteína soluble por el método de Lowry

Se recuperó una alícuota de la fracción soluble en la disolución amortiguadora de muestra para cuantificar la proteína soluble por espectrofotometría (*BioSpectrometer Kinetic, Eppendorf*), mediante el método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951; Peterson, 1977). Se generó el cinturón de confianza para la curva de calibración de BSA, con un total de 50 datos y un riesgo del 5%, para la obtención del cinturón de predicción (Figura 2.2).

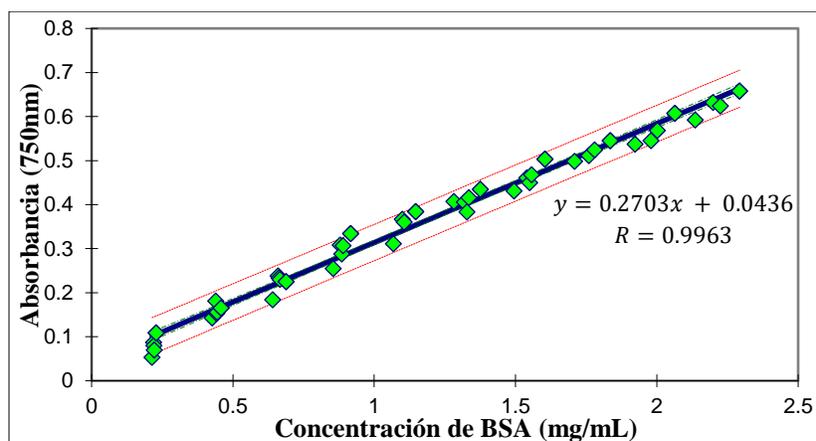


Figura 2.2. Cinturones de confianza (azul) y predicción (rojo) de la curva de calibración de la albúmina sérica bovina. $n = 50$. $\alpha = 0.05$. Plantilla elaborada por M en C Francisco Rojo Callejas.

2.9 Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE)

Se recuperó la fracción soluble de la disolución amortiguadora de muestra. Se diluyó con la disolución amortiguadora de corrida (1:1) y se calentó la mezcla a 85°C por 10 min. Se aplicaron aproximadamente 40 µg de proteína por pozo del gel concentrador.

Se realizó la electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes y reductoras para la obtención de los perfiles proteínicos (Laemmli, 1970). Se aplicó una diferencia de potencial de 100 V para la concentración (4% T, 2.6% C) y separación de las proteínas (12.5 %T y 15% T, 2.6% C) en la disolución amortiguadora Tris-Glicina-SDS (pH 8.3) en una cámara de electroforesis (*Mini-PROTEANTM, Tetra Cell, Bio-Rad*).

El material de referencia certificado por el CENAM (MRC), concentrado de proteína de suero (LAQPRODAN 80, *Latin Foods International*) y caseína calidad *Hammarsten (Research Organics)* se emplearon como referencia de la separación electroforética, además del estándar de peso molecular (*Bio Rad*).

Al término de la electroforesis los geles se tiñeron empleando azul de *Coomassie R-250 (Bio-Rad)* y azul de *Coomassie G-250 (PageBlue Protein Staining Solution, Thermo Scientific)*, mismos que se destiñeron en una disolución de ácido acético:metanol:agua (1:5:4) y agua, respectivamente. Los geles se analizaron con un fotodocumentador (*Gel DocTM XR + Imaging System, software ImageLabTM, Bio-Rad*).

2.10 Electroforesis en gel de poliacrilamida con urea (urea-PAGE)

Se realizó la electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones alcalinas con urea de acuerdo con el método de Andrews (1983), con algunas modificaciones, empleando las mismas condiciones electroforéticas anteriormente descritas, en la disolución amortiguadora Tris-Glicina sin SDS.

2.11 Electroforesis capilar de zona (ECZ)

Para el análisis mediante ECZ se recuperó la fracción soluble de las muestras de leche y queso en la disolución amortiguadora de muestra con DTT, empleado una jeringa de 1 mL (*Norm-Ject*, HSW, Tuttingen, Germany) y se filtró a través de una membrana de PVDF de 13 mm de diámetro y 0.45 μm de tamaño de poro (*Genesee Scientific*, USA).

Se realizó la electromigración de las proteínas de acuerdo al método de prueba de la NMX-F-736/1-COFOCALEC-2012, que establece la identificación y cuantificación de las proteínas propias de la leche, utilizando la disolución amortiguadora de separación (pH 3.0) y un capilar hidrofílico de poliacrilamida de 60 cm de longitud total, 50 cm de longitud efectiva, 50 μm de diámetro interno, con la ventana prefabricada y apertura óptica de (100 x 200) μm (*eCAPTM Beckman-Coulter*) bajo las siguientes condiciones de separación: campo eléctrico de 416 V/cm a 40°C, detección de la señal a 214 nm con una adquisición de datos a una velocidad de 4 Hz, introducción hidrodinámica de la muestra a 0.7 psi durante 5 s, controlado por el software 32 *KaratTM* (*PACE MDQ, Glycoprotein System, Beckman-Coulter, Inc.*).

Se registró el tiempo de migración (tm_i) y área (A_i) de cada pico electroforético. Finalmente, se realizó el cálculo de tiempo de migración relativo (tmr_i) a α_{s1} -CN y de la concentración relativa (Cr_i) de cada proteína y péptidos formados, como se expresa en las Ecuaciones 1 y 2.

$$tmr_i = \frac{tm_i}{tm_{\alpha_{s1}-CN}}$$

Ecuación 1. Cálculo del tiempo de migración relativo a α_{s1} -CN

$$Cr_i = \frac{A_i / tm_i}{\sum_{i=1}^n (A_i / tm_i)}$$

Ecuación 2. Cálculo de la concentración relativa de cada pico electroforético

3 Resultados y análisis de resultados

3.1 Evaluación de etiquetado y contenido neto

Se verificó la información del etiquetado de los quesos certificados, evaluando que se incluyera la palabra “queso”, seguida de la leche empleada en su elaboración; contenido mínimo de grasa, proteína y contenido máximo de humedad; contenido neto, denominación, marca, razón social, nombre y domicilio del fabricante; lista de ingredientes, información nutrimental, lote y fecha de consumo preferente. Los quesos con certificación de producto cumplieron con las especificaciones de etiquetado.

Para productos con contenido neto declarado de 100 g hasta 200 g, se especifica una tolerancia de 4.5% (NOM-002-SCFI-2011). En ambos lotes, la máxima diferencia encontrada fue de 3.0% para la muestra de QC, por lo que cumplieron con la especificación. Con un contenido neto superior (de 200 g hasta 300 g), se especifica una tolerancia de 9 g. La muestra de QCm (del segundo lote), no cumplió la especificación ya que se encontró una diferencia contra lo indicado en la etiqueta de 29 g (11.6%).

Se seleccionó el queso Chihuahua por sus similitudes al queso Cheddar, ya que comparte varios pasos del proceso y cierto grado de cheddarización de la pasta, además de ser considerado un queso mexicano genuino (Cervantes *et al.*, 2008) y al queso Parmesano por su mayor grado de maduración.

Respecto a la denominación, los menonitas, principales productores de esta variedad de queso, no lo identifican como Chihuahua o Menonita, sino como “tipo Chester”, y así lo establecen en sus etiquetas (Villegas de Gante *et al.*, 2014). Por otra parte, la NMX-F-738-COFOCALEC-2017 establece que no hay diferencia entre la denominación de queso Menonita y la denominación queso Chihuahua.

Las muestras de QR, QR^{DO} y QH cumplieron con las especificaciones de etiquetado, mientras que en las etiquetas de los quesos QN y QT no mostraba el contenido mínimo de grasa,

proteína y el contenido máximo de humedad, pero por ser productos a granel no aplica la Norma de etiquetado.

3.2 Análisis fisicoquímico de la leche por ultrasonido

Los valores promedio, desviación estándar (DE) y coeficiente de variación (CV), del contenido de grasa, sólidos no grasos (SNG) y proteína, así como la densidad y punto crioscópico (PC), obtenidos mediante análisis rápido por ultrasonido, de las muestras de leche utilizada como materia prima para la elaboración de quesos se muestran en la Tabla 3.1. Cumple satisfactoriamente los requisitos fisicoquímicos aplicables a la leche cruda Clase A (NMX-F-700-COFOCALEC-2012).

El valor promedio del contenido de proteína soluble fue de 3.2% (C.V. < 0.5%) y la relación caseína/grasa de 0.69.

Tabla 3.1. Análisis fisicoquímico de las muestras de leche por ultrasonido (*LactiCheck*™).

Muestra ¹	grasa (%)	SNG (%)	proteína (%)	densidad (g/mL)	PC (- °H)	caseína/grasa
L _I	3.67	8.51	3.19	1.0295	0.559	0.70
L _{II}	3.72	8.54	3.20	1.0296	0.561	0.69
L _{III}	3.70	8.58	3.22	1.0298	0.563	0.70
promedio	3.70	8.54	3.20	1.0296	0.561	0.69
DE	0.03	0.04	0.02	0.0002	0.002	0.00
CV (%)	0.68	0.41	0.48	0.01	0.36	0.64

1: réplicas independientes (I, II, III).

Abreviaturas: SNG: sólidos no grasos; PC: punto crioscópico; °H: grados Horvet.

El análisis por ultrasonido es una herramienta analítica accesible para la caracterización de la leche. Además de evaluar la calidad y autenticidad de la leche en función de la densidad, punto crioscópico y adición de agua, permite calcular rápidamente el rendimiento quesero a partir de la relación caseína/grasa.

3.3 Prueba de solubilidad y cuantificación de proteína soluble por el método de Lowry

El amortiguador de borato-EDTA presenta una solubilidad selectiva para las proteínas de la leche, por lo que es empleado para la detección de proteínas de soya, chícharo, arroz y otras proteínas de diferente origen (Scholl *et al.*, 2014).

Todas las muestras de leche, el MRC, las correspondientes al QP y las muestras comerciales fueron solubles en la disolución amortiguadora de borato-EDTA, mientras que las muestras de QA, QC y QCm presentaron una fracción insoluble.

Mediante la comparación de las medias experimentales del contenido de proteína en las muestras de leche, determinadas por ultrasonido y espectrofotometría, aplicando el estadístico *t*, a un nivel de significancia del 5%, se estableció que no hay diferencia significativa entre ambos métodos.

La concentración promedio de proteína soluble fue de 3.11% y de 3.44% para la leche y el MRC, respectivamente. El contenido de proteína del MRC cuantificado mediante espectrofotometría, resultó ser equivalente al valor certificado por el CENAM (3.55% \pm 0.11%) obtenido mediante el método de referencia (Kjeldahl). Por lo anterior, los resultados obtenidos por espectrofotometría son confiables.

Los valores del contenido de proteína de las muestras de quesos certificados determinados por el método modificado de Lowry, junto con los resultados del análisis de la inspección y especificación de las Normas Mexicanas correspondientes se muestran en la Tabla 3.2.

El contenido de proteína determinado en las muestras de QC y QCm del primer lote fue menor a la especificación. Para el QA del primer y segundo lote se cuantificó 33% y 11% más de proteína, respecto a la especificación.

Tabla 3.2. Valor promedio del contenido de proteína en las muestras de quesos certificados

Muestra	Proteína (%)			
	Especificación ¹	Lote ²		Inspección ³
		1	2	
QP	17	17	15	17
QA	18	24	20	21
QC	24	22	25	23
QCm	24	23	25	-

1: valor mínimo conforme a las Normas Mexicanas correspondientes; 2: determinado por el método de Lowry; 3: resultado conforme con la incertidumbre del método de prueba (± 1.90). Abreviaturas. L: leche; MRC (material de referencia certificado, leche liofilizada rehidratada); QP: queso Panela; QA: queso Adobera; QC: queso Cheddar; QCm: queso Cheddar con una maduración extendida a 6 meses.

La diferencia entre los valores del contenido de proteína de estos quesos fue debido, a la fracción insoluble que se detectó, en ambos amortiguadores, y no se cuantificó, pero que al analizarse por SDS-PAGE, correspondió a proteínas lácteas como se muestra más adelante (Figura 3.1B).

Los resultados de inspección establecen que las muestras analizadas cumplen con la especificación del contenido mínimo de proteína. Cabe resaltar que el resultado para QC es conforme con la especificación considerando la incertidumbre del método de prueba. En la muestra QP del segundo lote se observó sinéresis, por lo que posiblemente una fracción de proteína pudo separarse junto con el suero por lo que fue cuantificada por espectrofotometría.

Las muestras de quesos madurados, en general, presentan un mayor contenido de proteína por diferentes razones, como una mayor extensión de la sinéresis durante su elaboración, dada por factores como el tamaño del corte de la cuajada, cocción, desarrollo de la acidez, entre otros. Además, durante la maduración se promueve la pérdida de humedad, por lo que hay una concentración de la fracción proteínica (Fox *et al.*, 2017).

Las diferencias en el contenido de proteína entre lotes de las muestras de queso Cheddar pueden atribuirse al diferente periodo de lactación de los hatos de los que proviene la leche para su elaboración, que repercute en el contenido de proteína, y, si se estandarizó la leche mediante la adición de derivados lácteos en polvo, esta fracción no fue cuantificada mediante la metodología descrita.

En la Tabla 3.3 se presenta el contenido de proteína soluble de los quesos comerciales. Todos los valores obtenidos son mayores a la especificación correspondiente. Las muestras QN y QT presentaron el mismo contenido de proteína, mientras que se obtuvo un mayor contenido en la muestra QH. La diferencia del contenido de proteína radica en los procesos de elaboración, así como el periodo de maduración.

Tabla 3.3. Valor promedio del contenido de proteína en muestras de quesos comerciales

Abreviatura	Proteína (%)	
	Especificación ¹	Resultado
QH	23	28
QT	23	26
QN	23	26
QR	SE	33
QR ^{DO}	SE	29

1: Valor mínimo conforme a las Normas Mexicanas correspondientes.

Abreviaturas. QH: queso Chihuahua; QT: queso Chester; QN: queso Menonita; QR: queso Parmesano; QR^{DO}: queso Parmesano con denominación de origen; SE: sin especificación.

En el QR se encontró el mayor contenido de proteína. En comparación, en la muestra de QR^{DO}, el contenido cuantificado, respecto a la información de la etiqueta (33%), resultó menor debido a que con el método de Lowry no se cuantifican aminoácidos libres y productos de maduración prolongada, que sí son cuantificados como nitrógeno total por el método de Kjeldahl. La absorbancia depende de la concentración de Tyr, Trp, Cys, Asp e His y también de la cantidad de enlaces de tetrapéptidos que son responsables de la reducción del reactivo de Folin-Ciocalteu (Kamizake *et al.*, 2003).

3.4 Valores de pH de las muestras de quesos

En cuanto a la medición del pH, en la muestra del QP, al tratarse de un queso fresco cuajado enzimáticamente (Apéndice B), se obtuvo un valor de 6.5, cercano al valor de la leche empleada en su elaboración. Este valor de pH le da la característica de ser tajable y prevenir el fundido debido a la presencia de fosfato cálcico en las micelas de caseína como componente estructural (Guerra-Martínez *et al.*, 2012).

En el caso del QA, durante su proceso de elaboración, se presenta un paso importante que le otorga la propiedad de fundir fácilmente al aplicarle calor: la cheddarización (Apéndice B). Por el valor de pH obtenido de 5.4 y la evaluación de las propiedades fundentes al aplicarle calor a una porción de la muestra, se evidenció que se aplicó un proceso de cheddarización al QA analizado.

La muestra de QC presentó un valor de pH de 5.5, mientras que en las muestras QH, QT y QN se obtuvo el valor de pH 5.3, debido al cheddarizado (Apéndice B). Las diferencias sensoriales entre los quesos son, entre otros factores, debido al grado de cheddarización y, por tanto, diferencias en el contenido de calcio y humedad (Kalab *et al.*, 1982; Fox *et al.*, 2004). En el caso del queso Chihuahua, la cheddarización debe llevarse hasta un pH de 5.3 a 5.5 para lograr la textura adecuada e influir correctamente en el proceso de maduración (Cervantes *et al.*, 2008). La muestra de QCm presentó un valor de pH de 5.8, más alto en comparación a la muestra con menor periodo de maduración (QC), por un mayor grado de proteólisis, donde se liberan péptidos y amoníaco, que elevan el valor de pH (Lawrence *et al.*, 1983). En el QR y QR^{DO} el valor de pH obtenido fue de 5.4, debido a que, en el proceso de elaboración de esta variedad, se fermenta la leche antes de la coagulación enzimática (Fox *et al.*, 2017).

Respecto a la normatividad, solamente para el queso Cheddar, queso Chester y queso Chihuahua se especifica el intervalo de pH de 5.0 a 5.5, por lo que las muestras analizadas correspondientes cumplieron con la especificación.

3.5 Perfiles proteínicos obtenidos mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE)

En la Figura 3.1A se presenta la migración de las caseínas (CN; carril 9) y las proteínas de suero (S; carril 10) como referencia de la separación anódica que, bajo condiciones desnaturalizantes y reductoras, es función de su peso molecular. Las caseínas alfa (α -CN; 34 kDa), seguidas de β -CN (30 kDa) y κ -CN (28 kDa). La migración de β -lactoglobulina (β -LG, 18 kDa) y α -lactoalbúmina (α -LA, 11 kDa) es mayor debido a su menor peso molecular. La lactoferrina (LF, 86 kDa), la albúmina sérica bovina (BSA, 66 kDa) y la inmunoglobulina G (IgG, 59 kDa) se aprecian como tres bandas tenues en la parte superior del gel.

En la muestra de leche se aprecian las bandas de las caseínas seguidas de las de las proteínas del suero (carriles 2, 3 y 4, réplicas independientes). El número de bandas detectado, así como su abundancia, dada por la intensidad, corresponden a su composición proteínica y a las muestras de referencias utilizadas. Por esta técnica las caseínas alfa no se separan, porque su masa molecular es muy similar y, debido a su alta hidrofobicidad, β -CN interacciona con más moléculas de SDS en comparación a α_{s1} -CN y, por lo tanto, presenta una mayor movilidad, aunque tenga una mayor masa molecular (Fox *et al.*, 2015).

El perfil proteínico de las diferentes variedades de queso, QP, QA, QC, y QCm se muestra en los carriles 5, 6, 7 y 8, respectivamente. Claramente se aprecia la disminución de la intensidad de las bandas de κ -CN y de las proteínas del suero con respecto a la leche, además se detectó una nueva banda (15 kDa) ubicada entre las bandas de β -LG y α -LA, que no está presente en la leche ni en las muestras de referencia, que corresponde al mayor macropéptido formado por la quimosina: para- κ -CN (κ -CN f1-105). Lo anterior demuestra los quesos fueron elaborados vía enzimática.

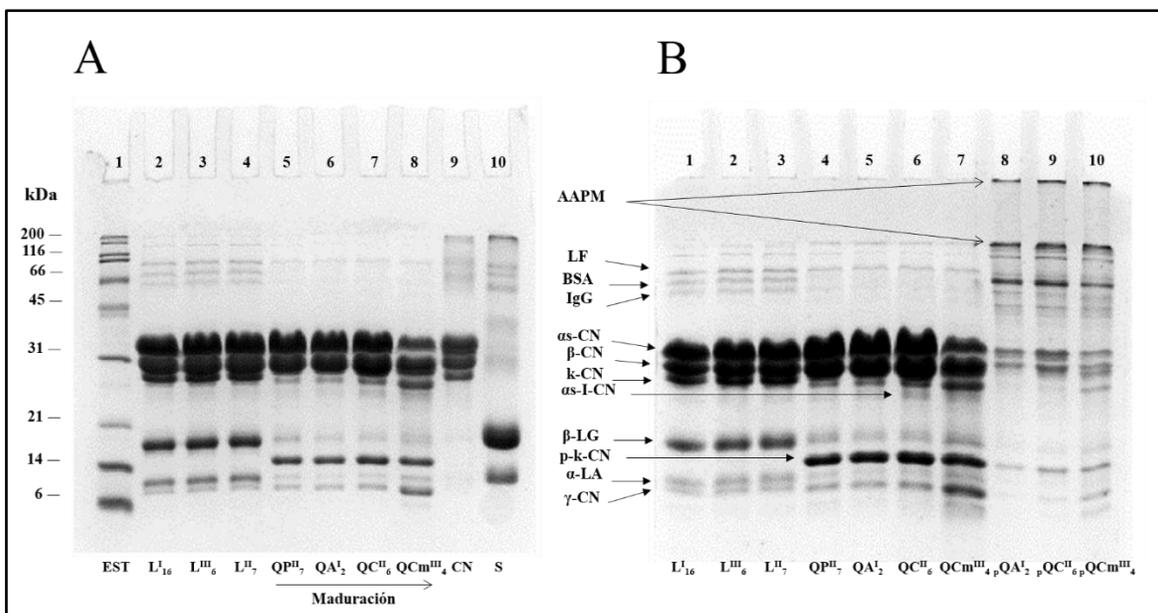


Figura 3.1. Perfiles electroforéticos de las muestras de leche y quesos certificados. (SDS-PAGE, 15% T). **A:** Referencia de la separación. Estándares de peso molecular (EST; *Bio-Rad*); caseína calidad *Hammarsten* (*Research Organics*) (CN, carril 9) y concentrado de proteína de suero (LAQPRODAN 80, *Latin Foods International*) (S, carril 10). Tinción con azul de *Coomassie R-250* (*Bio-Rad*). Muestras lácteas (en ambos geles; corrida simultánea): leche (L, carriles 2-4); queso Panela (QP, carril 5); queso Adobera (QA, carril 6); queso Cheddar (QC, carril 7) y queso Cheddar Madurado (QCm, carril 8). **B:** fracción insoluble del queso Adobera (pQA, carril 8); fracción insoluble del queso Cheddar (pQC, carril 9) y fracción insoluble del queso Cheddar madurado (pQCm, carril 9). Tinción con azul de *Coomassie G-250* (*PageBlue Protein Staining Solution, Thermo Scientific*). *Gel DocTM XR+ Imaging System* (*Bio Rad*).

Nomenclatura: superíndice: número de réplica; subíndice: número de vial.

Abreviaturas: LF: lactoferrina; BSA: albúmina sérica bovina; IgG: inmunoglobulina G; α -CN: alfa-caseína; β -CN: beta-caseína; κ -CN: kappa-caseína; β -LG: beta-lactoglobulina; p- κ -CN: para-kappa-caseína; α -LA: alfa-lactoalbúmina y γ -CN: gamma caseína.

El perfil electroforético obtenido bajo condiciones desnaturalizantes y reductoras resulta muy similar entre los quesos frescos: QP (carril 5) y QA (carril, 6), a pesar de que se realicen diferentes pasos en sus procesos de elaboración. En todas las muestras se detectó una banda de 9 kDa que se puede asociar a la presencia de γ_2 -CN y γ_3 -CN, que comigran, por la actividad de plasmina en β -CN.

La proteólisis de α -CN resultó evidente al comparar la misma variedad de queso con diferente grado de maduración: 35 días (QC, carril 7) y 6 meses (QCm, carril 8), por la disminución en la intensidad de la banda de proteína y la generación del macropéptido α_{S1} -I-CN (α_{S1} -CN

f24–199) (26 kDa) cuya banda migra después de κ -CN y es más intensa que la banda γ_{2-3} -CN, debido a que la proteólisis de α_{s1} -CN sobrepasa la de β -CN en esta variedad de queso, sin importar el coagulante utilizado (Farkye y Fox, 1990).

Las bandas detectadas en las fracciones insolubles de QA, QC y QCm (Fig. 3.1B, pQA, pQC y pQCm, carriles 8, 9 y 10, respectivamente) corresponden a α -CN, β -CN y p- κ -CN, por comparación de su patrón de migración con las muestras de referencia. En la parte superior del gel se observan agregados de alto peso molecular (**AAPM**), de menor solubilidad, resultado de la interacción entre κ -CN y β -LG y/o α -LA durante la aplicación de tratamientos térmicos a la leche (Fox *et al.*, 2017). En el proceso de elaboración de los quesos analizados, únicamente en el queso Cheddar se realiza el cocimiento del grano de la cuajada, a temperaturas de entre 32°C a 40°C por aproximadamente 30 min (Apéndice E), para facilitar la sinéresis y control en el desarrollo de la acidez (Fox *et al.*, 2004).

Debido a lo anterior, se facilita la formación de complejos, intermoleculares o intramoleculares, mediados por puentes disulfuro. Por lo tanto, ya que el tratamiento aplicado con β -mercaptoetanol reduce específicamente los enlaces disulfuro (Sawyer, 1969), se evidenció el entrecruzamiento de las proteínas lácteas mediante la formación de enlaces covalentes diferentes a los enlaces disulfuro. En el caso del QA, la detección de AAPM puede ser indicador de la utilización de productos o derivados lácteos en polvo para su estandarización y/o incremento del rendimiento quesero.

En la Figura 3.2 se presenta la corrida electroforética de las proteínas de los quesos comerciales incluyendo las muestras de leche, quesos certificados y caseínas para fines de comparación.

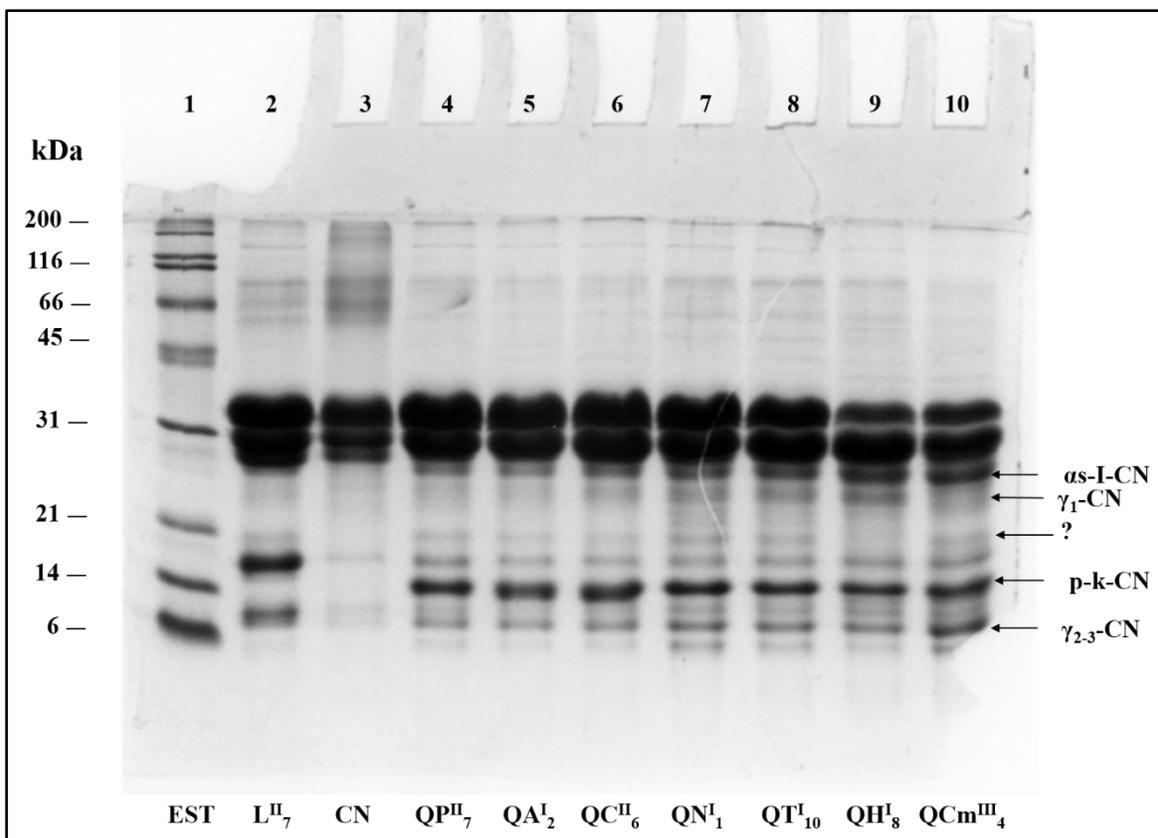


Figura 3.2. Perfiles electroforéticos de las muestras de leche y quesos comerciales (SDS-PAGE 12.5 % T). Estándares de peso molecular (EST; *Bio-Rad*); Leche (L, carril 2); caseína calidad *Hammarsten* (*Research Organics*) (CN; carril 3); queso Panela (QP, carril 4); queso Adobera (QA, carril 5); queso Cheddar (QC, carril 6); queso Menonita (QN, carril 7); queso Chester (QT, carril 8); queso Chihuahua (QH, carril 9) y queso Cheddar Madurado (QCM, carril 10). Tinción con azul de *Coomassie G-250* (*PageBlue Protein Staining Solution, Thermo Scientific*). *Gel DocTM XR+ Imaging System* (*Bio Rad*). Nomenclatura: Superíndice: número de réplica; Subíndice: número de vial. Abreviaturas: p-κ-CN: para-kappa-caseína y γ-CN: gamma caseína.

El perfil proteínico de las muestras comerciales de queso QN, QT y QH se muestra en los carriles 7, 8 y 9, respectivamente. Se aprecia la banda del macropéptido α_1 -I-CN, además de una banda de aproximadamente 24 kDa. Gaiaschi y colaboradores (2001) identificaron esta banda como γ_1 -CN en muestras de caseína hidrolizada por esta técnica. En todas las muestras se aprecia la banda de un producto sin identificar (19 kDa), que también se encuentra en la leche.

En los perfiles de las muestras QN (carril 7) y QT (carril 8), la presencia e intensidad de las bandas es muy similar, por lo que puede presumirse que se trata de dos muestras, aunque de

diferente marca y denominación, con un similar proceso de elaboración. En contraste, el perfil del QH (carril 9), es notoriamente diferente, la intensidad de la banda de α -CN es menor, relacionado a una intensidad mayor en la banda del macropéptido α _{s1}-I-CN, atribuible a un mayor periodo de maduración.

Empleando los perfiles de los quesos certificados como referencia de la maduración y, con base en que la normatividad especifica un periodo mínimo de maduración de siete días para el queso Chihuahua y 15 días para el queso Chester (Apéndice B), puede referirse a las muestras QN y QT como queso Chihuahua y la muestra QH como queso Chester. Esta identificación, aunque se sustenta en la normatividad y los procesos de elaboración, se complementó con la metodología de urea-PAGE y ECZ.

El perfil electroforético de las proteínas de las muestras de quesos certificados correspondientes al lote de inspección y del QR^{DO}, en función de su peso molecular, se muestra en la Figura 3.3. Como referencia, se incluyó la separación de las proteínas de leche genuina (MRC, carril 2), las proteínas del suero (carril 3) y las caseínas (carril 4). Se detectó la presencia de γ ₁-CN y γ ₂₋₃-CN en el MRC y en los quesos. Además, se encontró la banda del macropéptido α _{s1}-I-CN en todas las muestras de queso, incluyendo al QP.

Aunque anteriormente se mencionó que la presencia del macropéptido α _{s1}-I-CN es característica de la proteólisis inicial en la maduración, en un estudio previo, realizado a diferentes productos con la denominación queso Panela, se detectó α _{s1}-I-CN y γ -CN en 7 de 16 muestras comerciales.

Con base en la diferencia en la intensidad y número de bandas con respecto al perfil del QP del primer lote analizado, en la muestra de QP correspondiente al lote de inspección, se favoreció la actividad proteolítica general. Fue el único producto que se adquirió en un punto de venta, por así requerirlo el proceso de inspección, por lo que es posible que se haya perdido la cadena de frío. En contraste, no se aprecia una diferencia entre las muestras de los dos lotes de las demás variedades de quesos.

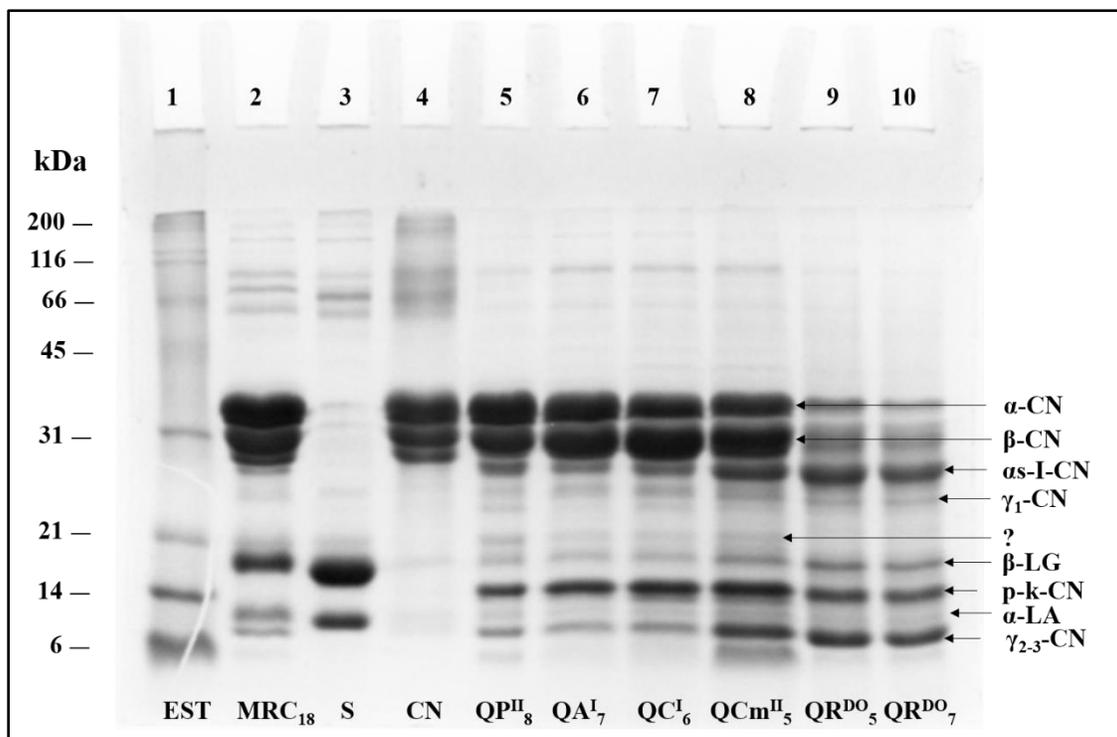


Figura 3.3. Perfiles electroforéticos de quesos certificados correspondientes al lote de inspección (SDS-PAGE, 12.5% T). Estándares de peso molecular (EST; *Bio-Rad*); Material de referencia certificado (MRC, carril 2); suero de quesería dializado (S, carril 3); caseína calidad *Hammarsten* (*Research Organics*) (CN, carril 4); queso Panela (QP, carril 5); queso Adobera (QA, carril 6); queso Cheddar (QC, carril 7); queso Cheddar Madurado (QCm, carril 8); queso Parmesano Denominación de Origen (QR^{DO}, carril 9 y 10). Tinción con azul de *Coomassie G-250* (*PageBlue Protein Staining Solution, Thermo Scientific*). *Gel DocTM XR+ Imaging System* (*Bio Rad*).

Nomenclatura: Superíndice: número de réplica; Subíndice: número de vial.

Abreviaturas: α -CN: alfa-caseína; β -CN: beta-caseína; β -LG: beta-lactoglobulina; p- κ -CN: para-kappa-caseína; α -LA: alfa-lactoalbúmina y γ -CN: gamma caseína.

Por otra parte, la mayor proteólisis se detectó en el perfil proteínico del QR^{DO}. Las bandas de las caseínas se aprecian tenues y hay un aumento en la intensidad de las bandas de γ -CN. Además, se detectó la presencia de β -LG y α -LA debido a que, en el proceso tradicional de elaboración, una fracción de las proteínas del suero se retiene por efecto del tratamiento térmico aplicado a la cuajada (Gobbetti *et al.*, 2018).

3.6 Perfiles proteínicos obtenidos mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con urea (Urea-PAGE)

Bajo condiciones alcalinas las proteínas de la leche adquieren una carga neta negativa, su migración electroforética depende directamente de la relación carga/masa (Ecuación 3). El valor numérico del cociente, para cada proteína y péptido lácteo, se presenta en la Tabla 3.4. (Fox *et al.*, 2015).

$$carga/masa = \frac{Residuos\ ácidos + Residuos\ fosforilados}{Masa\ molecular}$$

Ecuación 3. Cálculo de la relación carga masa en medio alcalino

Tabla 3.4. Relación carga/masa de las principales proteínas lácteas en medio alcalino

proteína	masa molecular (Da)	residuos		carga/masa (10 ⁻³)
		ácidos	fosforilados	
para-κ-CN	11,374	6	0	0.53
γ ₂ -CN	11,822	6	0	0.51
γ ₃ -CN	11,557	6	0	0.52
γ ₁ -CN	20,520	15	1	0.78
κ-CN	19,005	16	1	0.89
α-LA	14,174	17	0	1.20
β-CN	23,980	24	5	1.21
β-LG	18,362	27	0	1.47
α _{S2} -CN	25,228	28	11	1.55
α _{S1} -CN	23,612	32	8	1.70
α _{S1} -I-CN	20,463	30	8	1.86

En la Figura 3.4 se presenta la migración electroforética de las proteínas en presencia de urea y condiciones alcalinas de las muestras de leche (L), referencia (CN y S), y quesos certificados del primer lote y quesos comerciales. En la muestra de caseína se detectan cuatro bandas que coinciden con el orden de migración y abundancia esperado: κ-CN, β-CN, α_{S2}-CN y α_{S1}-CN (carril 2, CN); κ-CN aparece como un barrido, debido a su grado de glicosilación y fosforilación (Van Hekken y Thompson, 1992; Veloso *et al.*, 2002; Baruzzi *et al.*, 2012).

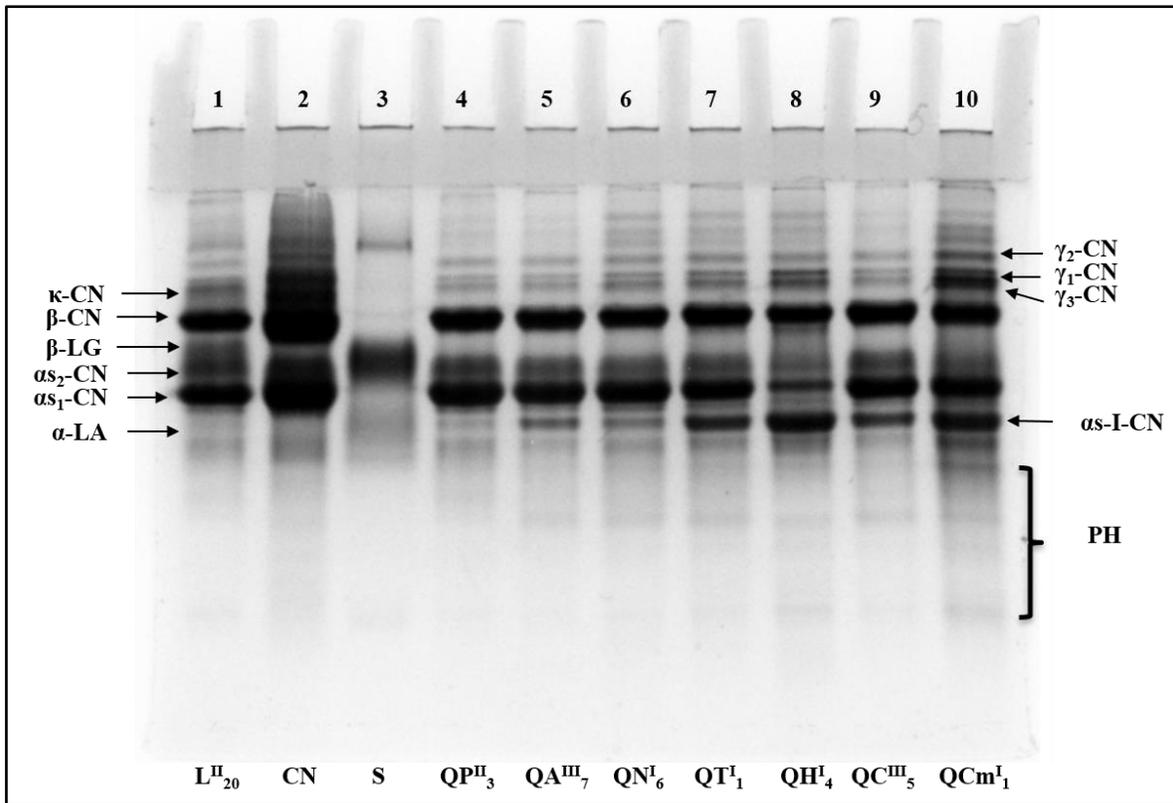


Figura 3.4. Perfiles electroforéticos de las muestras de quesos en condiciones alcalinas (urea-PAGE, 12.5% T). A: Leche (L, carril 1), caseína calidad *Hammarsten* (*Research Organics*) (CN, carril 2), suero de quesería (S, carril 3), queso Panela (QP, carril 4); queso Adobera (QA, carril 5); queso menonita (QN, carril 6); queso Chester (QT, carril 7); queso Chihuahua (QH, carril 8); queso Cheddar (QC, carril 9) y queso Cheddar Madurado (QCm, carril 10). Tinción con azul de *Coomassie G-250* (*PageBlue Protein Staining Solution, Thermo Scientific*).

Nomenclatura: Superíndice: número de réplica; Subíndice: número de vial.

Abreviaturas: γ -CN: gamma caseína; κ -CN: kappa-caseína; β -CN: beta-caseína; β -LG: beta-lactoglobulina; α s-CN: alfa-caseína; α -LA: alfa-lactoalbúmina y PH: productos de hidrólisis.

En el carril 3 se presenta el perfil de las proteínas de suero: β -LG seguida de α -LA. Su migración no coincide con lo esperado.

En el carril 1 se presenta el perfil electroforético de las proteínas de la muestra de leche. Se conserva el patrón de migración mencionado de las caseínas y las proteínas del suero, sin embargo, en condiciones alcalinas con urea, hay una deficiente resolución de α -LA con α s₁-CN y de β -LG con β -CN (Peterson, 1963; Van Hekken y Thompson, 1992).

Bajo las condiciones de trabajo, para- κ -CN migra en dirección contraria a las otras caseínas, y por lo tanto es frecuentemente ignorada en el estudio de maduración de quesos (Grappin *et al.*, 1985; Van Hekken, y Thompson, 1992; McSweeney, 1993) pero que se distingue claramente en SDS-PAGE, por lo que ambas metodologías son complementarias.

El perfil de las muestras de quesos se presenta en los carriles 4 a 10. En la parte superior del gel se aprecian tres bandas que corresponden a las variantes de γ -CN. El orden de migración resulta diferente al teórico, pues corresponde a γ_2 -CN seguida de γ_1 -CN y γ_3 -CN (Fox *et al.*, 2015). En los perfiles de los quesos, respecto al perfil de la leche, es evidente la pérdida de κ -CN además de un incremento en la intensidad y número de bandas y, por lo tanto, en la concentración de productos de proteólisis conforme incrementa el tiempo de maduración. En el QP (carril 4), al tratarse de un queso fresco, no hay productos resultantes de la hidrólisis de α_1 -CN, sin embargo, se tiene la presencia de las bandas de γ -CN, debido a la actividad de plasmina.

En los perfiles de los demás quesos se observa una banda adicional después de α_1 -CN, que corresponde al macropéptido α_1 -I-CN (McSweeney, 1993; Fenelon *et al.*, 2000; Veloso *et al.*, 2002) seguido de diferentes productos de la proteólisis de α -CN (Rynne *et al.*, 2004; Veloso *et al.*, 2004) y péptidos productos de la hidrólisis de α_1 -I-CN (PH) de mayor movilidad electroforética (Grappin *et al.*, 1985).

En comparación a los perfiles por SDS-PAGE, los obtenidos mediante urea-PAGE evidencian la diferencia entre las muestras QP y QA. Los perfiles de QP pueden establecerse como índices de autenticidad de esta variedad de queso, que, en principio, debe encontrarse sin la presencia del macropéptido α_1 -I-CN.

En el QA la presencia del macropéptido α_1 -I-CN puede asociarse a la retención de la quimosina por el efecto de la cheddarización (como se mencionó anteriormente, la quimosina se retiene en la cuajada y es más activa a ese valor de pH). De igual manera que para el QP, los perfiles electroforéticos del QA pueden utilizarse como índices de autenticidad para este

tipo de queso, considerando la presencia del macropéptido α_{S1} -I-CN, pero de menor intensidad que en un queso madurado (QC).

Se ha reportado que más del 40% de α_{S1} -CN es hidrolizada en un intervalo de pH de entre 5.8 a 4.9 después de 14 días de maduración (Grappin *et al.*, 1985). En el perfil del QCm, las bandas de α_{S1} -CN y α_{S2} -CN se observan más tenues que en el de QC, aunado a un mayor periodo de maduración.

Los perfiles de las muestras de QC (carril 9) y QCm (carril 10) se establecieron como estándares en la caracterización de la maduración, pues en el QC se tuvo la presencia del macropéptido α_{S1} -I-CN en mayor intensidad que en un queso fresco cheddarizado (QA). Por otra parte, con una maduración extendida a seis meses (QCm), es evidente un incremento en los diferentes productos de proteólisis por un aumento en la intensidad de sus bandas correspondientes, además de la formación de más PH.

En el QCm (carril 10), tras la desaparición de α_{S1} -CN y al incremento de la intensidad en las bandas correspondientes a las γ -CN, se favoreció la hidrólisis de β -CN, presumiblemente a un incremento en la actividad de plasmina favorecida por un mayor pH de la matriz.

Respecto a las muestras comerciales, para el QN y QT (carriles 6 y 7), los perfiles obtenidos difieren en la intensidad y, por lo tanto, en el contenido del macropéptido α_{S1} -I-CN, debido a un periodo de maduración diferente. Aunque pueda tratarse de quesos que tengan como única diferencia el tiempo de maduración, es un factor importante por el que estrictamente no se puede hablar de un queso Chihuahua plenamente tipificado y estandarizado (Cervantes *et al.*, 2008), además de que en la actualidad se está disminuyendo el tiempo de maduración para agilizar su comercialización, perdiendo su proceso tradicional de elaboración (Villegas de Gante *et al.*, 2014).

Empleando los perfiles del QC como referencia, al tratarse de un queso certificado y auténtico con un procedimiento de elaboración similar al QT, y ya que sus perfiles resultaron muy similares, se consideró a la muestra QT como un queso Chihuahua auténtico, además de que,

según la información en su etiqueta, fue elaborado en Cuauhtémoc, Chihuahua, principal municipio productor de esta variedad de queso por la comunidad menonita (Villegas de Gante *et al.*, 2014). La muestra QN también puede considerarse como un queso Chihuahua, pero con un perfil similar al de la muestra QA, puede ser indicativo de un periodo de maduración insuficiente.

Cabe destacar que se encontró discrepancia con la denominación y el proceso tradicional de la elaboración del queso Chihuahua. Los menonitas lo comercializan como “Queso tipo Chester”, sin embargo, la normatividad discierne en la denominación de queso Chihuahua con la de queso Chester (Apéndice B), donde la diferencia radica en que el periodo de maduración del primero es menor al segundo, además de que en la elaboración del queso Chihuahua se realiza un molido del grano, mientras que en el queso Chester se cortan los bloques de pasta en pequeños cubos uniformes similar al proceso de elaboración del queso Cheddar.

Con base en el perfil electroforético obtenido por SDS-PAGE, se consideró que el QH era, de las muestras comerciales, el de mayor periodo de maduración. Comparando con el perfil de la muestra de QCM, se aprecia que la maduración en el QH es menor, ya que hay una menor cantidad de bandas correspondientes a los productos de hidrólisis. Por lo tanto, la muestra de QH puede establecerse como un queso Chester auténtico.

Con los perfiles electroforéticos obtenidos y con base en la normatividad correspondiente, puede aseverarse que un queso Chester tiene un periodo de maduración mayor al de un queso Chihuahua pero menor a un queso Cheddar madurado por seis meses.

Como complemento del estudio, se presenta la migración electroforética de las proteínas del MRC, quesos certificados correspondientes al lote de inspección y QR^{DO} (Figura 3.5A) y con la finalidad de evaluar la repetibilidad de la metodología empleada, se realizó la comparación del patrón de migración de la fracción proteínica de los quesos certificados del primer lote (L1) con los correspondientes al lote de inspección (L2) junto con las muestras QR y QR^{DO} con corteza (carriles 9 y 10, respectivamente) (Figura 3.5B).

En el perfil del MRC (Figura 3.5A, carril 1) se aprecia el corrimiento electroforético característico de las proteínas de la leche lo que validó la separación.

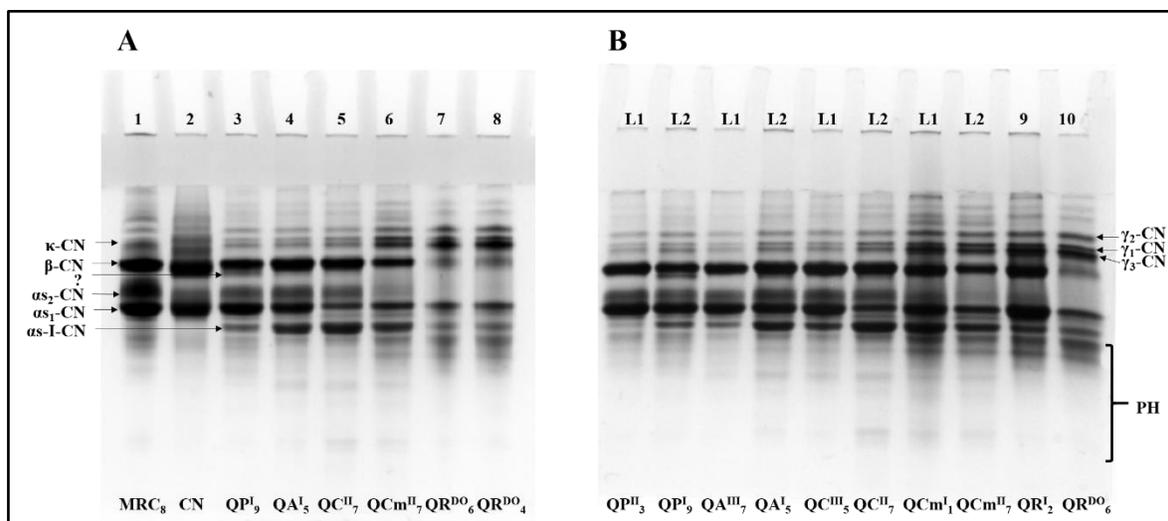


Figura 3.5. Perfiles electroforéticos de las muestras de quesos certificados en condiciones alcalinas (urea-PAGE, 12.5% T). **A:** Material de referencia certificado (MRC, carril 1), caseína calidad *Hammarsten* (*Research Organics*) (CN, carril 2); muestras de quesos correspondientes al lote de inspección: queso Panela (QP, carril 3); queso Adobera (QA, carril 4); queso Cheddar (QC, carril 5); queso Cheddar Madurado (QCm, carril 6); queso Parmesano con Denominación de Origen sin corteza y con corteza (QR^{DO}, carriles 7 y 8, respectivamente). **B:** Comparación entre los dos lotes de quesos (indicado en la parte superior). Tinción con azul de *Coomassie G-250* (*PageBlue Protein Staining Solution, Thermo Scientific*).

Abreviaturas: γ -CN: gamma caseína; κ -CN: kappa-caseína; β -CN: beta-caseína; α s-CN: alfa-caseína y PH: productos de hidrólisis.

En el perfil de la muestra QP del lote de inspección (Figura 3.5A, carril 3), se aprecia la banda del macropéptido α s₁-I-CN, coincidiendo con lo encontrado por SDS-PAGE. Además, en los perfiles de las muestras QP, QA y QC (carriles 3, 4 y 5, respectivamente), se observó una banda adicional después de la de β -CN, más intensa en QP, que puede asociarse a la formación de productos de similar movilidad electroforética por la hidrólisis de β -CN debido a la actividad de catepsina y elastasa (McSweeney, 1993; Considine *et al.*, 1999), proteasas endógenas de la leche, cuya actividad incrementa en leche proveniente de hatos en periodos tardíos de lactación, donde hay un aumento en la cuenta de células somáticas (CSS) (Wiggans y Shook, 1987).

No hubo diferencia aparente con la ausencia (carril 7) y presencia de corteza (carril 8) en los perfiles de las muestras de QR^{DO}. Las bandas de γ -CN son más intensas que en los quesos certificados. La hidrólisis de β -CN, en esta variedad de queso, ocurre rápidamente durante los primeros 12 meses de maduración, resultando en un aumento en la concentración de γ -CN (Mayer *et al.*, 1998). No se aprecia un incremento en la presencia de otros productos con mayor movilidad electroforética debido al mayor periodo de maduración (20 meses). La liberación de aminoácidos libres, que se acumulan hasta los 15 meses de maduración, puede llegar a corresponder hasta el 23% del contenido total de proteína (Gobbetti *et al.*, 2018).

En la muestra del QP del primer lote no se detecta la presencia del macropéptido α _{s1}-I-CN y, en general, en los perfiles de los quesos del primer lote analizado, no se aprecia una diferencia en el número de bandas con respecto a los presentados en la Figura 3.4, infiriendo una correcta repetibilidad de la metodología; así como la justificación planteada sobre la presencia del macropéptido α _{s1}-I-CN y más bandas en el QP del lote de inspección por la pérdida de cadena de frío, así como un aumento en la actividad de las proteasas endógenas de la leche.

Si bien, con los perfiles proteínicos obtenidos del primer lote analizado, se propuso como índice de autenticidad en el QP la ausencia del macropéptido α _{s1}-I-CN, considerando que se realizó el análisis simultáneo de la leche empleada como materia prima, resulta importante que las condiciones de almacenamiento aseguren la temperatura correcta durante su distribución y comercialización. Destaca la pertinencia de incluir el análisis de la materia prima en el proceso de certificación.

Comparando las muestras QR y QR^{DO}, la primera muestra más PH (Figura 3.5b, carriles 9 y 10), que, en principio, puede considerarse como resultado de un mayor periodo de maduración, además de la presencia de α -LA que migra en el área del macropéptido α _{s1}-I-CN, sin embargo, la muestra QR^{DO} demuestra una hidrólisis prácticamente total de β -CN. Además, la banda observada en el área correspondiente a β -CN, puede pertenecer a productos de hidrólisis con la misma movilidad electroforética, que son producidos en periodos de maduración mayores a 12 meses (Mayer *et al.*, 1998).

Por otra parte, la muestra QR^{DO}, al tener el sello de *Denominazione D'Origine Protetta*, establece que fue elaborado con el protocolo tradicional en el área de la Llanura Padana, Italia, con un periodo de maduración de mínimo 18 meses para los quesos comercializados fuera de Europa (Gobbetti *et al.*, 2018).

3.7 Obtención de los perfiles electroforéticos mediante electroforesis capilar (EC)

Las proteínas de la leche permanecen en disolución al desestabilizar el sistema micelar bajo la acción conjunta de urea y EDTA en condiciones alcalinas y reductoras (De Jong *et al.*, 1993). En medio ácido, la separación electroforética de las proteínas es posible debido a que cada molécula adquiere carga formal positiva y a inherentes diferencias de su masa molecular, así a menor relación carga/masa, menor velocidad electroforética. El cálculo de la relación carga/masa se realizó con la Ecuación 4 y los resultados se indican en la Tabla 3.5.

$$carga/masa = \frac{Residuos\ basicos - Residuos\ fosforilados}{Masa\ molecular}$$

Ecuación 4. Cálculo de la relación carga masa en medio ácido

Bajo las condiciones empleadas, el flujo electrosmótico está reprimido tanto por el recubrimiento de la pared interna del capilar con poliacrilamida, como por la adición de la hidroxipropilmetilcelulosa, que actúa como recubrimiento dinámico y al aplicar un campo eléctrico continuo, las moléculas neutras no migran mientras que las proteínas de la leche, con carga neta positiva, migran hacia el cátodo.

En la Figura 3.6 se presenta la separación electroforética de las proteínas de las muestras de la leche utilizada como materia prima para la elaboración de los quesos. La concentración relativa (Cr) y el tiempo de migración relativo (t_{mr}) de cada señal se muestran en la Tabla 3.6.

Los tiempos de migración relativos, la abundancia relativa de las caseínas y la relación promedio entre las principales fracciones, 82.95:17.05 (CN:S), corresponden a una leche genuina (NMX-736/1-COFOCAEC-2012).

Tabla 3.5. Relación carga/masa de las proteínas lácteas y productos de hidrólisis en medio ácido.

Proteína	Masa molecular (Da)	Residuos		carga/masa (10 ⁻³)
		básicos	fosforilados	
α -LA	14,174	16	0	1.13
β -LG	18,362	20	0	1.10
para- κ -CN	11,374	13	0	1.12
α _{S2} -CN	25,228	33	11	0.87
γ ₂ -CN	11,822	10	0	0.85
γ ₁ -CN A ¹	20,560	18	1	0.83
α _{S1} -CN	23,612	25	8	0.72
γ ₁ -CN A ²	20,520	17	1	0.78
α _{S0} -CN	23,583	25	9	0.67
γ ₃ -CN	11,557	8	0	0.69
κ -CN	19,005	17	1	0.84
β -CN B	24,089	23	4	0.79
β -CN A ¹	24,020	20	5	0.63
β -CN A ²	23,980	21	5	0.67
α _{S1} -I-CN	20,463	19	8	0.54
α _{S0} -I-CN	20,434	19	9	0.49

La identificación de las proteínas obedece tanto a su abundancia como a su relación carga/masa: α -LA (pico 1), β -LG (pico 2), α _{S2}-CN (pico 3), α _{S1}-CN (pico 4) y α _{S0}-CN (pico 5), seguidas de κ -CN (pico 6), β -CN B (pico 7), (pico 8) y β -CN A² (pico 9). α _{S0}-CN se separa, como pico minoritario de α _{S1}-CN, por una serina fosforilada adicional. La separación de las variantes genéticas de β -CN es posible debido a que la variante B difiere de la proteína de referencia (β -CN A²) en dos residuos de aminoácidos básicos His₆₇ y Arg₁₂₂, por lo que migra primero y a continuación A¹, por la sustitución de Pro por His en la posición 67 (Farrell *et al.*, 2004).

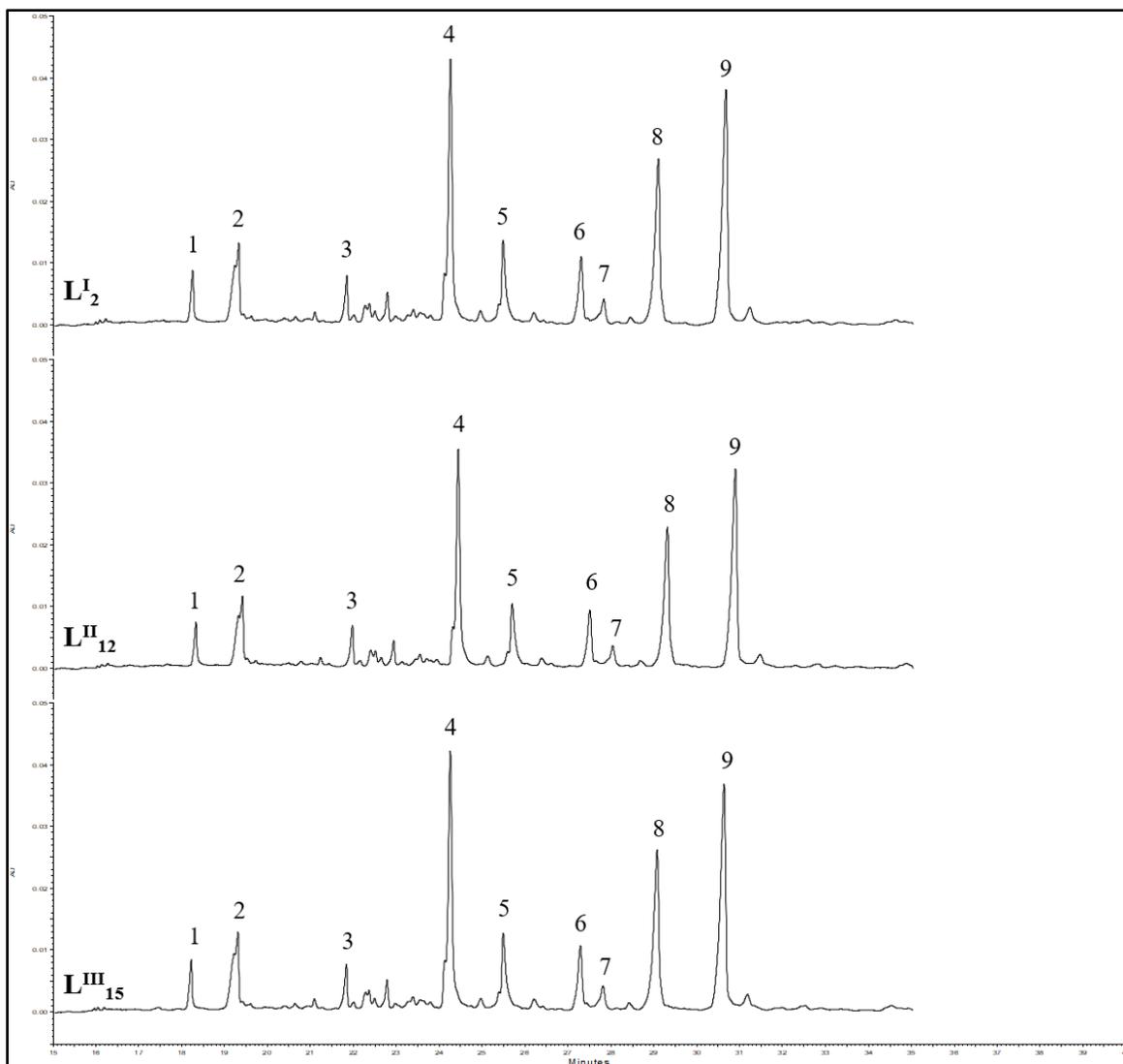


Figura 3.6. Electroforegramas de las muestras de leche (réplicas independientes). Detección a 214 nm. Capilar hidrofílico de poliacrilamida (*eCAP™*, Beckman-Coulter, Inc. CA, USA) de 50 cm de longitud efectiva, 50 μ m de d.i., inyección hidrodinámica (0.7 psi por 5 s). Misma escala. *P/ACE™ MDQ Glycoprotein System 32 Karat™* ver 8.0 (Beckman-Coulter, Inc.). Identificación de las proteínas lácteas: 1: α -LA; 2: β -LG; 3: αs_2 -CN; 4: αs_1 -CN; 5: αs_0 -CN; 6: κ -CN; 7: β -CN B; 8: β -CN A¹; 9: β -CN A².

Tabla 3.6. Tiempo de migración relativo y concentración relativa de las principales proteínas lácteas en las muestras de leche

Principales proteínas de la leche		LI2		LII12		LIII15	
		tmr (min)	Cr (%)	tmr (min)	Cr (%)	tmr (min)	Cr (%)
Proteínas del suero	α -LA	0.752	4.42	0.750	4.59	0.751	4.40
	β -LG	0.797	12.23	0.794	13.19	0.796	12.32
Σ		16.65		17.78		16.72	
Caseínas	α_{s2} -CN	0.900	3.36	0.899	3.16	0.900	3.19
	α_{s1} -CN	1.000	25.65	1.000	24.08	1.000	25.59
	α_{s0} -CN	1.050	7.24	1.052	6.61	1.051	7.22
	κ -CN	1.126	5.82	1.125	5.76	1.125	5.50
	β -CN B	1.147	1.55	1.147	1.62	1.147	2.32
	β -CN A ¹	1.200	15.21	1.199	16.41	1.199	15.43
	β -CN A ²	1.265	24.52	1.264	24.58	1.263	24.20
Σ		83.35		82.22		83.45	

En la Figura 3.7 se presentan los electroforegramas de las muestras de los quesos certificados. Respecto al perfil de las muestras de leche, en el perfil del QP (Figura 3.7A) es evidente la pérdida de los picos correspondientes a las proteínas del suero (picos 1 y 2), además de la formación del pico de para- κ -CN y la desaparición del pico de κ -CN (pico 6). En contraste, en el perfil del QA (Figura 3.7B), la diferencia radica en la formación del pico del macropéptido α_{s1} -I-CN, confirmando lo establecido mediante SDS-PAGE y urea-PAGE; en el perfil electroforético del QP no se detectó α_{s1} -I-CN.

Con los resultados obtenidos de la cuantificación de las principales proteínas lácteas y péptidos producidos durante la maduración de las muestras de quesos certificados (Tabla 3.7), es evidente la similitud de las concentraciones relativas de las caseínas entre las muestras de quesos frescos (QP y QA), a excepción de la de α_{s1} -I-CN debido a la formación del macropéptido α_{s1} -I-CN.

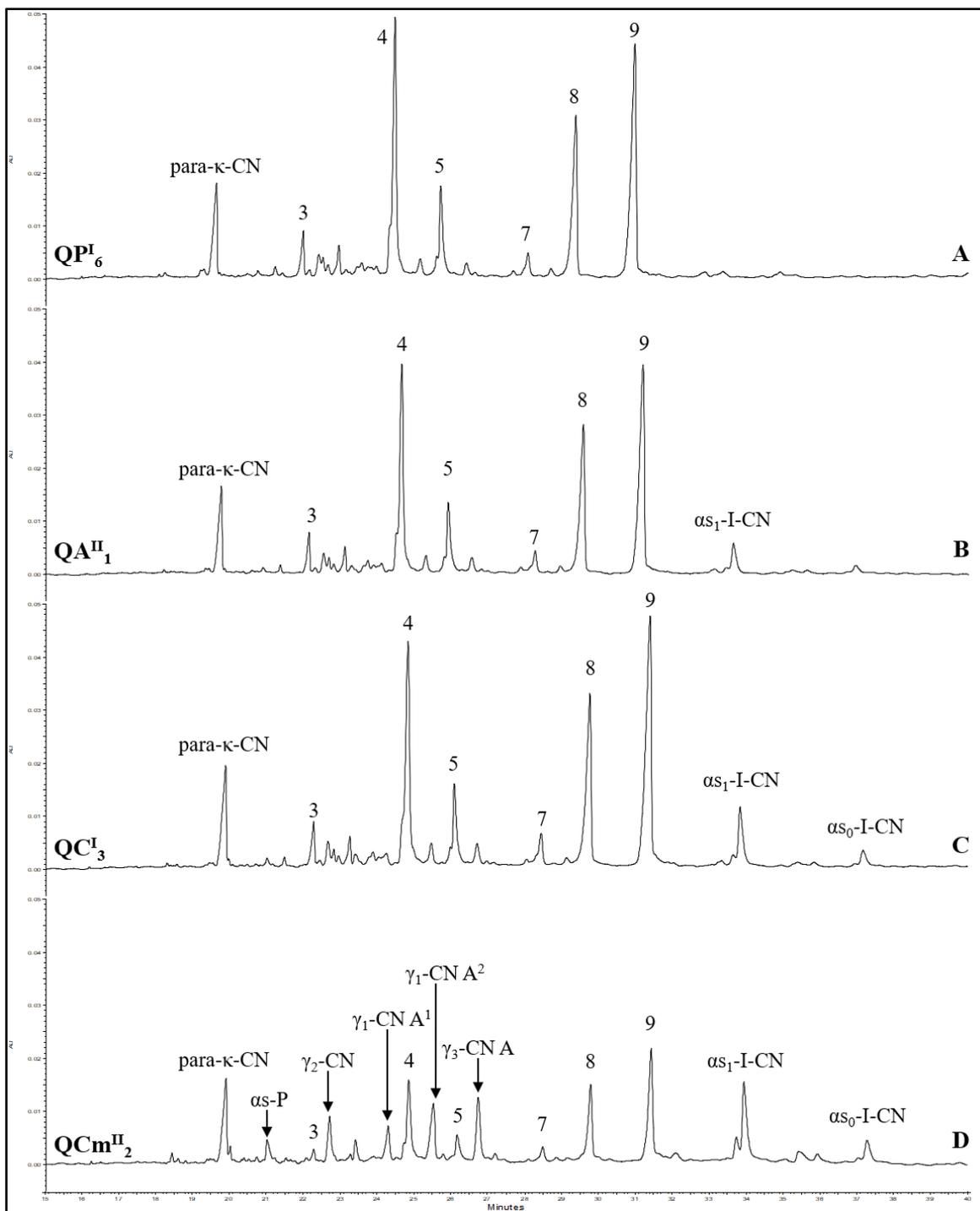


Figura 3.7. Electroforegramas de las muestras de quesos certificados. Detección a 214 nm. Mismas condiciones de la Figura 3.6. Identificación de las proteínas lácteas: 3: α_2 -CN; 4: α_1 -CN; 5: α_0 -CN; 7: β -CN B; 8: β -CN A¹; 9: β -CN A². Los productos de proteólisis se señalan con su respectiva identificación.

Tabla 3.7. Tiempo de migración relativo y concentración relativa promedios de las proteínas y péptidos principales de las muestras de quesos certificados

Proteína/ péptido	tmr (min)				Cr (%)			
	QP	QA	QC	QCm	QP	QA	QC	QCm
p-κ-CN	0.804	0.801	0.801	0.801	12.68	12.48	12.19	14.14
α _S -P	-	-	-	0.845	-	-	-	2.28
α _{S2} -CN	0.899	0.898	0.897	0.896	3.96	3.83	3.53	1.15
γ ₂ -CN A	-	-	-	0.914	-	-	-	5.73
γ ₁ -CN A ¹	-	-	-	0.978	-	-	-	4.74
α _{S1} -CN	1.000	1.000	1.000	1.000	29.99	27.05	23.72	12.57
γ ₁ -CN A ²	-	-	-	1.027	-	-	-	8.91
α _{S0} -CN	1.050	1.051	1.051	1.053	8.20	7.29	6.33	3.06
γ ₃ -CN A	-	-	-	1.076	-	-	-	7.92
β-CN B	1.147	1.146	1.146	1.146	1.67	1.81	2.55	1.77
β-CN A ¹	1.200	1.199	1.199	1.198	17.33	18.32	17.38	9.24
β-CN A ²	1.265	1.265	1.265	1.264	26.18	26.21	27.01	14.07
α _{S1} -I-CN	-	1.364	1.364	1.365	-	3.01	5.64	11.46
α _{S0} -I-CN	-	-	1.426	1.500	-	-	1.66	2.96

En el QC, respecto al QA, se tiene un incremento en la concentración relativa del macropéptido α_{S1}-I-CN, además de la formación de un pico de un mayor tiempo de migración, correspondiente al macropéptido α_{S0}-I-CN, producto de hidrólisis por la acción de la quimosina sobre α_{S0}-CN (Otte *et al.*,1997).

Por otro lado, en el perfil del QCm (Figura 3.7D), referencia de la maduración, se aprecian más picos que corresponden a diferentes productos de proteólisis, como un derivado de α_S-CN formado por la actividad de plasmina, sin identificar, denominado α_S-P, (Recio *et al.*, 1997); además de los productos de hidrólisis de β-CN: γ₂-CN, seguido de γ₁-CN A¹, γ₁-CN A², y γ₃-CN (Otte *et al.*,1997; Recio *et al.*, 1997; Miralles *et al.*, 1999; Molina *et al.*, 2000; Taivosalo *et al.*, 2018) y que corresponden a lo calculado en este trabajo.

En general, en la muestra QCm, las concentraciones relativas de las caseínas disminuyen aproximadamente 50% con respecto a la misma variedad con una extensión menor de

maduración (QC), así mismo, se duplica la concentración relativa del macropéptido α_1 -I-CN.

En la Figura 3.8 se presentan los electroforegramas de los quesos comerciales. Los perfiles obtenidos para las muestras QN (Figura 3.8A) y QT (Figura 3.8B), así como los valores calculados de concentraciones relativas (Tabla 3.8), confirman lo establecido mediante SDS-PAGE y urea-PAGE, es decir, no hay una diferencia apreciable entre estas muestras y, por tanto, se puede inferir, con base en la normatividad, que se tratan de dos muestras de queso Chihuahua genuinos y auténticos. Sin embargo, cabe destacar que las concentraciones relativas de los productos de proteólisis detectables son menores que en la muestra de QC, por lo que se concluyó que tuvieron un periodo de maduración menor a los 35 días referidos para el QC.

Para el QH (Figura 3.8C) se encontró de forma abundante el macropéptido α_1 -I-CN, lo cual coincide a lo establecido con urea-PAGE, además de una notable disminución en la intensidad de la señal de α_1 -CN (pico 4), concordando con que se puede denominar como un queso Chester. Aunque la concentración relativa del macropéptido α_1 -I-CN es mayor en el QH que en el QCm (Tabla 3.7), las concentraciones relativas de los demás productos de proteólisis son claramente inferiores, debido a que, en el QCm, como se aprecia en la electroforesis en gel, el macropéptido α_1 -I-CN se hidroliza dando lugar a diferentes productos de menor peso molecular.

En el perfil del QR (Figura 3.8D), se confirma que la hidrólisis principal en esta variedad de queso es la de β -CN, debido a la disminución en la intensidad y concentraciones relativas de las señales correspondientes a β -CN B, β -CN A¹ y β -CN A²; así como un subsecuente incremento de γ_2 -CN, γ_1 -CN A¹, γ_1 -CN A², y γ_3 -CN. En esta variedad se corroboró la presencia de las proteínas de suero: α -LA y β -LG, que comigra con para- κ -CN.

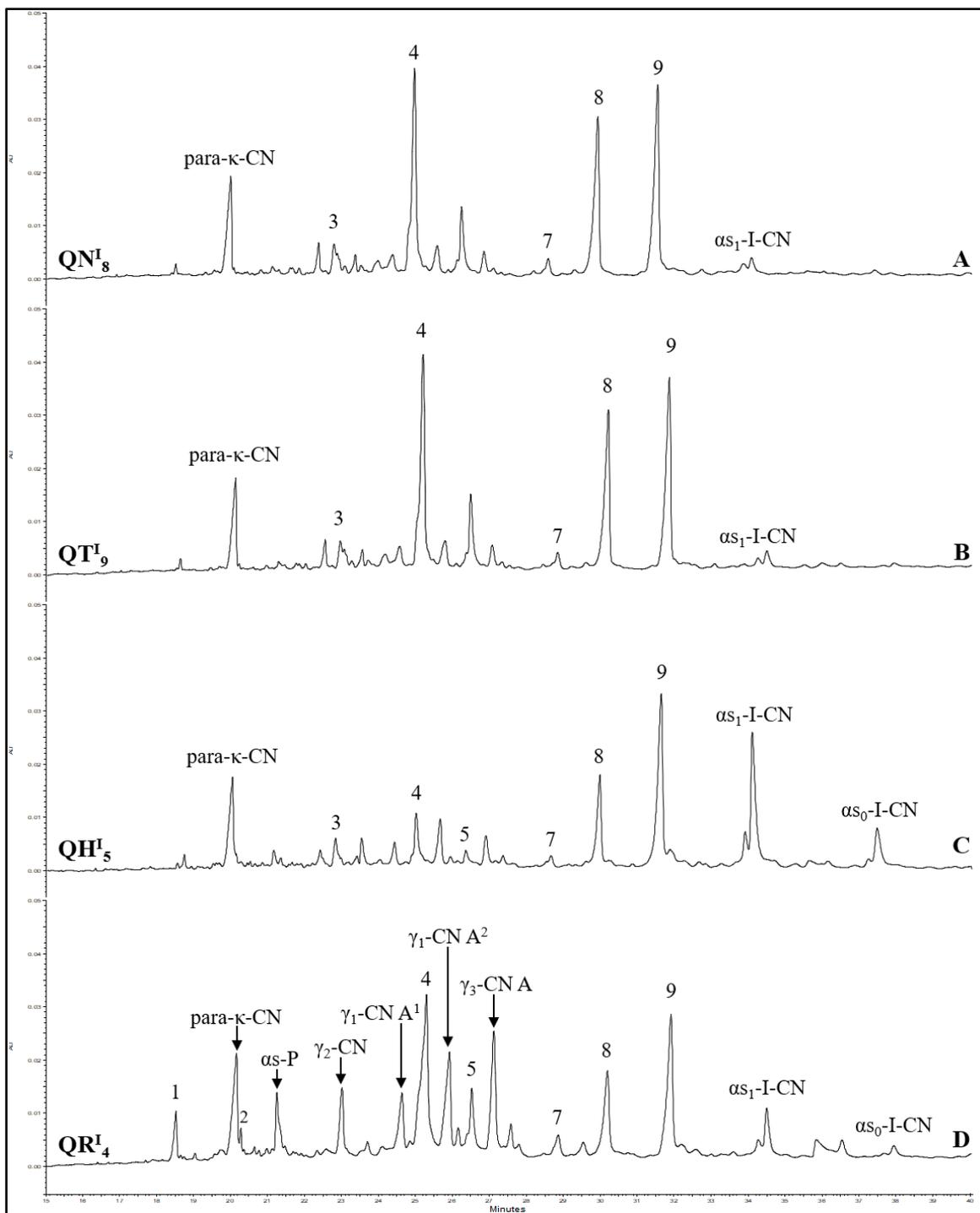


Figura 3.8. Electroforegramas de las muestras de quesos comerciales. Detección a 214 nm. Mismas condiciones de la Figura 3.6. Identificación de las proteínas lácteas: 1: α -LA; 2: β -LG; 3: α ₂-CN; 4: α ₁-CN; 5: α ₀-CN; 6: κ -CN; 7: β -CN B; 8: β -CN A¹; 9: β -CN A². Los productos de proteólisis se señalan con su respectiva identificación.

Tabla 3.8. Tiempo de migración relativo y concentración relativa de las proteínas y péptidos principales de las muestras de quesos comerciales

Proteína/péptido	tmr (min)				Cr (%)			
	QN	QT	QH	QR	QN	QT	QH	QR
α -LA	-	-	-	0.732	-	-	-	3.29
p- κ -CN	0.803	0.799	0.801	0.797	15.18	13.83	15.42	11.60
α _S -P	-	-	0.846	0.840	-	-	1.67	5.73
α _{S2} -CN	0.909	0.895	0.896	0.893	2.71	2.54	1.31	1.35
γ ₂ -CN A	-	-	0.912	0.910	-	-	2.65	4.76
γ ₁ -CN A ¹	-	-	0.977	0.974	-	-	2.39	6.10
α _{S1} -CN	1.000	1.000	1.000	1.000	28.83	30.92	6.14	19.99
γ ₁ -CN A ²	-	-	1.026	1.024	-	-	5.19	9.66
α _{S0} -CN	1.066	1.051	1.054	1.048	7.15	7.60	1.27	6.26
γ ₃ -CN A	-	-	1.075	1.072	-	-	3.10	9.42
β -CN B	1.161	1.144	1.146	1.141	1.30	1.28	1.08	1.05
β -CN A ¹	1.216	1.199	1.199	1.194	19.75	19.52	11.91	6.04
β -CN A ²	1.281	1.264	1.265	1.262	22.51	21.94	25.25	10.76
α _{S1} -I-CN	1.384	1.369	1.363	1.364	2.57	2.36	17.39	3.35
α _{S0} -I-CN	-	-	1.499	1.500	-	-	5.22	0.66

La concentración relativa de para- κ -CN es apreciablemente constante en los quesos certificados y comerciales, a excepción del QR debido a la comigración con β -LG. Ya que para- κ -CN es poco susceptible a la proteólisis durante la maduración, su cuantificación, junto con la de las caseínas residuales, podría ser considerada como un índice para determinar el grado de proteólisis (Miralles *et al.*, 2001). Sin embargo, el cálculo de las concentraciones es relativo a α _{S1}-CN, por lo que para establecer alguna relación entre la concentración de para- κ -CN y la extensión de la proteólisis, debe considerarse la formación del macropéptido α _{S1}-I-CN hasta cierto tiempo de maduración, por la limitante sobre su ulterior proteólisis correspondiente a periodos prolongados de maduración.

Los perfiles obtenidos mediante ECZ confirman lo establecido por SDS-PAGE y urea-PAGE: las muestras QCM, QR y QR^{DO} fueron las que tuvieron un periodo mayor de maduración.

Los perfiles obtenidos por las tres metodologías resultaron ser complementarios y se emplearon, en conjunto, para establecer los índices de autenticidad de quesos con la misma denominación, tales como la evidencia de la operación del cheddarizado en relación al pH del producto, la presencia de para- κ -CN en quesos elaborados enzimáticamente, la proteólisis de las caseínas durante la maduración y los subsecuentes productos: el macropéptido α -I-CN, γ -CN y la aparición de más productos de hidrólisis; que otorgan las propiedades sensoriales, de calidad y de autenticidad de cada producto.

Mediante la evaluación de la solubilidad y concentración de las proteínas lácteas, la caracterización electroforética de la fracción proteínica y el cumplimiento de los requisitos fisicoquímicos, nutrimentales, microbiológicos y sanitarios aplicables a cada variedad, destacando que la fracción lipídica corresponde a la grasa propia de la leche y ausencia de almidón, según los resultados de la inspección (Apéndice E), los quesos certificados evaluados son auténticos.

Con base en los perfiles electroforéticos obtenidos se pudo establecer el periodo de maduración de las muestras comerciales de queso Chihuahua, así como la denominación sugerida (Tabla 3.9). Dicha denominación no solo se basa en la comprobación de la presencia de proteínas de origen lácteo, sino también en aspectos como la normatividad (Apéndice B), procedencia, elaboración, e ingredientes descritos en la etiqueta, aseverando su autenticidad y genuinidad.

Tabla 3.9. Denominación sugerida y periodo de maduración de las muestras analizadas

Muestra	Denominación		Periodo de maduración
	Etiqueta	Sugerida	
QN	Queso Menonita	Queso Chihuahua	Menor de 35 días
QT	Queso Chester	Queso Chihuahua	Menor de 35 días
QH	Queso Chihuahua	Queso Chester	Mayor a 35 días, menor a 6 meses

4 Conclusiones

Se caracterizó la fracción proteínica de queso Panela, queso Adobera, queso Cheddar y queso Cheddar con una maduración extendida a 6 meses, mediante la determinación de la solubilidad y concentración de proteína.

Se obtuvieron los perfiles proteínicos/peptídicos, empleando electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio, electroforesis en gel de poliacrilamida con urea en medio alcalino y electroforesis capilar de zona, de la materia prima, quesos certificados y quesos comerciales.

La electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio permitió identificar a las principales proteínas lácteas. Los perfiles proteínicos fueron complementarios a los obtenidos con la electroforesis en gel de poliacrilamida con urea en medio alcalino, ya que se detectaron e identificaron a los productos de proteólisis. Ambos resultados corresponden con la identificación y cuantificación de las principales proteínas y péptidos formados, por electroforesis capilar de zona.

En los perfiles proteínicos de las muestras de quesos, respecto al perfil de una muestra de leche genuina, es evidente la pérdida de κ -CN y las proteínas del suero. En la electroforesis en gel, la intensidad y el número de bandas de los péptidos formados aumenta conforme se incrementa el tiempo de maduración.

La detección y cuantificación de para- κ -CN, indica que los quesos certificados y los quesos comerciales fueron elaborados utilizando quimosina. Su concentración relativa es apreciablemente constante debido a que es poco susceptible a la proteólisis durante la maduración.

El análisis conjunto de la caracterización de la fracción proteínica y los resultados del proceso de inspección, realizado al mismo lote de quesos certificados, permitió establecer su autenticidad.

Se evidenció la cheddarización de la cuajada en los quesos Adobera, Cheddar y Chihuahua por la relación entre el pH y sus propiedades fundentes.

Mediante la evaluación de la solubilidad y concentración de las proteínas lácteas, la caracterización electroforética de la fracción proteínica y el cumplimiento de la normatividad, destacando que la fracción lipídica corresponde a la grasa propia de la leche y ausencia de almidón, según los resultados de la inspección, los quesos certificados evaluados son auténticos.

Los productos de proteólisis identificados fueron: α_{S0} -I-CN, α_{S1} -I-CN, α_S -P, γ_1 -CN A¹, γ_1 -CN A², γ_2 -CN y γ_3 -CN. Su abundancia se consideró como referencia del grado de maduración de las muestras analizadas: QP < QA < QN \approx QT < QC < QH < QCm < QR < QR^{DO}.

El perfil proteínico de un queso Panela debe encontrarse libre de la presencia del macropéptido α_{S1} -I-CN. En el queso Adobera la presencia del macropéptido α_{S1} -I-CN puede asociarse a la retención de la quimosina por el efecto de la cheddarización y debe encontrarse en menor concentración que en un queso madurado por 35 días (queso Cheddar).

Se evidenció que la proteólisis predominante en el queso Cheddar, y variedades de este tipo, es por la acción de la quimosina, dado por la disminución en la intensidad de la banda de α -CN y un incremento al doble en la concentración del macropéptido α_{S1} -I-CN después de seis meses de maduración.

El queso Parmesano con el sello *Denominazione D'Origine Protetta* demuestra la proteólisis total de β -CN y con esto, un mayor periodo de maduración en comparación a la muestra comercial de queso Parmesano, evidenciando que en esta variedad la proteólisis es predominantemente por la acción de la plasmina.

Con base en la normatividad, la caracterización electroforética de las principales proteínas y péptidos resultantes de la maduración, así como su concentración relativa, rasgos de tipicidad

y conocimiento del proceso de elaboración del queso Chihuahua, permitió establecer dos de las tres muestras analizadas como quesos Chihuahua auténticos y genuinos.

Es evidente que hay diferencias entre lo indicado en la normatividad con respecto a la tradición en la denominación y el proceso de elaboración de variedades muy cercanas, así el queso Chester debe tener un periodo de maduración mayor a 35 días, pero menor a seis meses.

Las tres metodologías electroforéticas pueden emplearse, en conjunto, como estándares para el estudio de autenticidad en quesos comerciales con la misma denominación.

El presente estudio demostró que la metodología analítica empleada para el análisis de la leche de bovino por electroforesis capilar de zona, descrito en la NMX-F-736/1-COFOCALEC-2012, es repetible y reproducible para el análisis de quesos frescos y madurados.

5 Bibliografía

1. Analizador de leche por ultrasonido *LactiCheck*. Guía de usuario (Rev. 1.2). *Page and Pedersen International, Ltd.*
2. Andrews, A. T. (1983). Proteinases in normal bovine milk and their action on caseins. *Journal of Dairy Research*, 50 (1), 45-55.
3. Anema, S. G. (2019). Age gelation, sedimentation, and creaming in UHT Milk: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 18(1), 140-166.
4. Baruzzi, F., Lagonigro, R., Quintieri, L., Morea, M., y Caputo, L. (2012). Occurrence of non-lactic acid bacteria populations involved in protein hydrolysis of cold-stored high moisture Mozzarella cheese. *Food Microbiology*, 30(1), 37-44.
5. Bastian, E. D., y Brown, R. J. (1996). Plasmin in milk and dairy products: an update. *International Dairy Journal*, 6(5), 435–457.
6. Blaya, J., Barzideh, Z., y LaPointe, G. (2017). Interaction of starter cultures and nonstarter lactic acid bacteria in the cheese environment. *Journal of Dairy Science*. 101, 1-19
7. Borad, S. G., Kumar, A., y Singh, A. K. (2017). Effect of processing on nutritive values of milk protein. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(17), 3690-3702.
8. Cervantes, F., Villegas de Gante, A., Cesín, A., y Espinoza, A. (2008). *Los quesos mexicanos genuinos: patrimonio cultural que debe rescatarse*. Editorial Mundi-Prensa México, UAEM y UACH. México.
9. Chaudhari, C. B., Prajapati, J. P., y Pinto, S. V. (2015). Ultrasound technology for dairy industry. *In Proceedings of the National Seminar on Indian Dairy Industry – Opportunities and Challenges* (pp. 151-155).
10. CODEX STAN 283-1978. Norma general del Codex para el queso. Revisión 1999. Enmienda 2006, 2008, 2010, 2013.
11. Considine, T., Healy, A. L. Kelly., y P. L. H. McSweeney. (1999). Proteolytic specificity of elastase on bovine β -casein. *Food Chemistry*, 66(4), 463-470
12. Crudden, A., Patrick, Fox, F., y Kelly, A. L. (2005). Factors affecting the hydrolytic action of plasmin in milk. *International Dairy Journal*, 15(4), 305–313.

13. Dalgleish, D. G., y Corredig, M. (2012). The structure of the casein micelle of milk and its changes during processing. *Annual Review of Food Science and Technology*, 3, 449–467.
14. Datta, N., y Deeth, H.C. (2001). Ag gelation of UHT milk – A review, *Institution of Chemical Engineers*. 79:197-210.
15. De Jong, L., y de Groot-Mostert, A. E. A. (1977). The proteolytic action of rennet on different casein substrates under various conditions. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 31, 296-313.
16. De Jong, N., Visser, S., y Olieman, C. (1993). Determination of milk proteins by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, 652(1), 207-213.
17. Donnelly, C. W. (2014). *Cheese and microbes*. Washington, DC : ASM Press, 2014.
18. Farkye, N. (2004). Cheese Technology. *International Journal of Dairy Technology*. 57; 91-98.
19. Farkye, N., y Fox, P.F. (1990). Objective indices of cheese ripening. *Trends in Food Science and Technology*. 1, 37-40.
20. Farrell J., H. M., Jimenez-Flores, R., Bleck, G. T., Brown, E. M., Butler, J. E., Creamer, L. K., y Swaisgood, H. E. (2004). Nomenclature of the proteins of cows' milk—Sixth revision. *Journal of Dairy Science*, 87(6), 1641-1674.
21. Fenelon, M. A., Guinee, T. P., Delahunty, C., Murray, J., y Crowe, F. (2000). Composition and sensory attributes of retail Cheddar cheese with different fat contents. *Journal of Food Composition and Analysis*, 13(1), 13-26.
22. Fox, P. F. (1989). Proteolysis during cheese manufacture and ripening. *Journal of Dairy Science*, 72(6), 1379-1400.
23. Fox, P. F., Guinee, T. P., Cogan, T. M., y McSweeney, P. L. H. 2017. *Fundamentals of cheese science*. 2nd Edition. Boston, Maryland: Springer.
24. Fox, P. F., McSweeney, P. L. H., Cogan, T. M., y Guinee, T. P. 2004. *Cheese: chemistry, physics, and microbiology*. 3rd Edition. Amsterdam: Academic Press.
25. Fox, P. F., McSweeney, P. L., y Paul, L. H. 2015. *Dairy chemistry and biochemistry*. 2nd Edition. London: Blackie Academic and Professional.
26. Fox, P. F., y Kelly, A. L. (2006). Indigenous enzymes in milk: Overview and historical aspects—Part 1. *International Dairy Journal*, 16(6), 500–516

27. Frazier, R. A., Ames, J. M., y Nursten, H. E. (1999). The development and application of capillary electrophoresis methods for food analysis. *Electrophoresis: An International Journal*, 20 (15-16), 3156-3180.
28. Gaiaschi, A., Beretta, B., Poiesi, C., Conti, A., Giuffrida, M. G., Galli, C. L., y Restani, P. (2001). Proteolysis of β -casein as a marker of Gradana Padano cheese ripening. *Journal of Dairy Science*, 84(1), 60-65
29. Gazi, I., Vilalva, I. C., y Huppertz, T. (2014). Plasmin activity and proteolysis in milk protein ingredients. *International Dairy Journal*, 38(2), 208–212.
30. Gobbetti, M., Neviani, E., y Fox, P. (2018). *The Cheeses of Italy: Science and Technology*. Springer International Publishing Imprint: Springer, 2018.
31. Grappin, R., Rank, T. C., y Olson, N. (1985). Primary proteolysis of cheese proteins during ripening. A review. *Journal of Dairy Science*, 68(3), 531-540.
32. Greco, E., El-Aguizy, O., Ali, M. F., Foti, S., Cunsolo, V., Saletti, R., y Ciliberto, E. (2018). Proteomic analyses on an ancient Egyptian cheese and biomolecular evidence of brucellosis. *Analytical Chemistry*, 90(16), 9673–9676.
33. Grufferty, M. B., y Fox, P. F. (1988). Milk alkaline proteinase. *Journal of Dairy Research*, 55(4), 609-630.
34. Guerra-Martínez, J. A., Montejano, J. G., y Martín-del-Campo, S. T. (2012). Evaluation of proteolytic and physicochemical changes during storage of fresh Panela cheese from Querétaro, México and its impact in texture. *CyTA-Journal of Food*, 10(4), 296-305.
35. Holland, J. W., y Boland, M. J. (2014). Post-translational Modifications of Caseins. En M. Boland, H. Singh, y A. Thompson. Eds. *Milk Proteins. From expression to food*. Segunda edición. Palmerston North: Academic Press, 141-168.
36. Janson, J.C. (2011). *Protein purification: principles, high resolution methods, and applications*. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, 2011.
37. Jaros, D., Seitler, K., y Rohm, H. (2008). Enzymatic coagulation of milk: animal rennets and microbial coagulants differ in their gelation behaviour as affected by pH and temperature. *International Journal of Food Science and Technology*, 43(9), 1721-1727.

38. Jimidar, M. I. (2008). Theoretical considerations in performance of various modes of CE. *Separation Science and Technology*, 9, 9-530.
39. Kalab, M., Lowrie, R. J., y Nichols, D. (1982). Detection of curd granule and milled curd junctions in Cheddar cheese. *Journal of Dairy Science*, 65(7), 1117-1121.
40. Kamizake, N. K., Gonçalves, M. M., Zaia, C. T. B. y Zaia, D. A. (2003). Determination of total proteins in cow milk powder samples: a comparative study between the Kjeldahl method and spectrophotometric methods. *Journal of Food Composition and Analysis*, 16(4), 507–516.
41. Karp, G. (2005). *Biología celular y molecular: conceptos y experimentos*. 4a. Edición. Colombia. McGraw Hill.
42. Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
43. Lawrence, R. C., Creamer, L. K., y Gilles, J. (1987). Texture development during cheese ripening. *Journal of Dairy Science*, 70(8), 1748-1760.
44. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., y Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193, 265-275.
45. Lynch, C. M., McSweeney, P. L. H., Fox, P. F., Cogan, T. M., y Drinan, F. D. (1997). Contribution of starter lactococci and non-starter lactobacilli to proteolysis in Cheddar cheese with a controlled microflora. *Le Lait*, 77(4), 441-459.
46. Manson, W., Carolant, T., y Annan, W. D. (1977). Bovine α so casein; a phosphorylated homologue of α s1 casein. *European Journal of Biochemistry*, 78(2), 411-417
47. Marina, M., Ríos, A. y Valcárcel, M. 2005. Fundamentals of capillary electrophoresis. En: M. Marina, A. Ríos y M. Valcárcel. Eds. *Comprehensive analytical chemistry. Analysis and detection by capillary electrophoresis*. Volumen 40. Elsevier Inc, 814-839.
48. Mayer, H. K., Rockenbauer, C., y Mlcak, H. (1998). Evaluation of proteolysis in Parmesan cheese using electrophoresis and HPLC. *Le Lait*, 78(4), 425-438.
49. McGoldrick, M., y Fox, P.F. (1999). Intervarietal comparison of proteolysis in commercial cheese. *European Food Research and Technology*. 208 (2), 90-99.

50. McMahon, D. J., Y Oomen, B. S. (2008). Supramolecular structure of the casein micelle. *Journal of Dairy Science*. 91:1709-1721.
51. McSweeney, P. L. H., (1993), *Primary Proteolysis of caseins in Cheddar Cheese*, Ph. D. Thesis, The National University of Ireland, Cork.
52. McSweeney, P. L., y O'Mahony, J. A. (2016). *Advanced Dairy Chemistry: Volume 1B: Proteins: Applied Aspects*. New York: Springer
53. McSweeney, P. L., y Sousa, M. J. (2000). Biochemical pathways for the production of flavour compounds in cheeses during ripening: A review. *Le Lait*, 80(3), 293-324.
54. Miralles, B., Ramos, M., y Amigo, L. (2000). Application of capillary electrophoresis to the characterization of processed cheeses. *Journal of Dairy Research*, 67(1), 91-100.
55. Miralles, B., Rothbauer, V., Manso, M. A., Amigo, L., Krause, I., y Ramos, M. 2001. Improved method for the simultaneous determination of whey proteins, caseins and para-k-casein in milk and dairy products by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, 915, 225-230.
56. Molina, E., De Frutos, M., y Ramos, M. (2000). Capillary electrophoresis characterization of the casein fraction of cheeses made from cows', ewes' and goats' milk. *Journal of Dairy Research*, 67(2), 209-216.
57. Molina, E., Ramos, M., Cifuentes, A., y Lopez-Fandino, R. (1998). Characterization of cheese proteolysis by capillary electrophoresis and reverse-phase HPLC analyses of peptides. *European Food Research and Technology*, 206(4), 259-263.
58. Nielsen, S., (2017) *Food analysis*. 5ª Edición. New York: Springer.
59. Norma Mexicana NMX-F-700-COFOCALEC-2012. Sistema producto leche – Alimento Lácteo – Leche cruda de vaca – Especificaciones fisicoquímicas, sanitarias y métodos de prueba. Publicada en el Diario Oficial de la Federación el 20 de marzo de 2014.
60. Norma Mexicana NMX-F-713-COFOCALEC-2014. - Sistema Producto Leche – Alimentos – Lácteos – Queso y queso de suero – Denominaciones, especificaciones y métodos de prueba. Publicada en el Diario Oficial de la Federación el 6 de abril de 2015.

61. Norma Mexicana NMX-F-718-COFOCALEC-2017 - Sistema Producto Leche – Alimentos – Lácteos – Leche y productos de leche – Guía de muestreo. Publicada en el Diario Oficial de la Federación el 22 de agosto de 2018.
62. Norma Mexicana NMX-F-736/1-COFOCALEC-2012 - Sistema Producto Leche – Alimentos – Lácteos Identificación de proteínas en leche - Parte 1: Determinación de la composición de las proteínas propias de la leche por electroforesis capilar de zona - Método de prueba. Publicada en el Diario Oficial de la Federación el 19 de julio de 2012.
63. Norma Mexicana NMX-F-738-COFOCALEC-2017 - Sistema producto leche – Alimento – Lácteo – Queso Chihuahua – Denominación, especificaciones y métodos de prueba. Publicada en el Diario Oficial de la Federación el 14 de agosto de 2018.
64. Norma Mexicana NMX-F-742-COFOCALEC-2012. Sistema producto leche – Alimentos – Lácteos – Queso Panela – Denominación, especificaciones y métodos de prueba. Publicada en el Diario Oficial de la Federación el 20 de marzo de 2014.
65. Norma Mexicana NMX-F-745-COFOCALEC-2011. Sistema producto leche – Alimentos – Lácteos – Queso Cheddar – Denominación, especificaciones y métodos de prueba. Publicada en el Diario Oficial de la Federación el 26 de enero de 2012.
66. Norma Mexicana NMX-F-746-COFOCALEC-2013. Sistema producto leche – Alimentos – Lácteos – Queso Chester – Denominación, especificaciones y métodos de prueba. Publicada en el Diario Oficial de la Federación el 20 de marzo de 2014.
67. Norma Mexicana NMX-F-755-COFOCALEC-2015 – Sistema producto leche – Alimentos – Lácteos – Queso Adobera – Denominación, especificaciones y métodos de prueba. Publicada en el Diario Oficial de la Federación el 25 de abril de 2017.
68. Norma Oficial Mexicana, NOM-121-SSA1-1994. Bienes y servicios. Quesos: frescos, madurados y procesados. Especificaciones sanitarias. Publicada en el Diario Oficial de la Federación el 23 de febrero de 1996
69. Norma Oficial Mexicana, NOM-002-SCFI-2011, Productos preenvasados - Contenido neto - Tolerancias y métodos de verificación. Publicada en el Diario Oficial de la Federación el 24 de mayo de 2012.
70. Norma Oficial Mexicana, NOM-051-SCFI/SSA1-2010, Especificaciones generales de etiquetado para alimentos y bebidas no alcohólicas preenvasados-Información

comercial y sanitaria. Publicada en el Diario Oficial de la Federación el 18 de febrero de 2010.

71. Norma Oficial Mexicana, NOM-155-SCFI-2012, Leche-Denominaciones, especificaciones fisicoquímicas, información comercial y métodos de prueba. Publicada en el Diario Oficial de la Federación el 15 de marzo de 2012.
72. Norma Oficial Mexicana, NOM-223-SCFI/SAGARPA-2018, Queso-Denominación, especificaciones, información comercial y métodos de prueba. Publicada en el Diario Oficial de la Federación el 31 de enero de 2019.
73. Norma Oficial Mexicana, NOM-243-SSA1-2010. Productos y servicio. Leche, formula láctea, producto lácteo combinado y derivados lácteos. Disposiciones y especificaciones sanitarias. Métodos de Prueba. Publicada en el Diario Oficial de la Federación el 25 de junio de 2010
74. O’Keeffe, R. B., Fox, P. F., y Daly, C. (1976). Contribution of rennet and starter proteases to proteolysis in Cheddar cheese. *Journal of Dairy Research*, 43(1), 97.
75. O’Mahony, J., y Fox, P. (2014). Milk: An Overview. En: M. Boland, H. Singh, y A. Thompson. Eds. *Milk Proteins. From expression to food*. Segunda edición. Palmerston North: Academic Press, 19-73.
76. O’Mahony, J., Fox, P.F., y Kelly, A. L. (2016). Indigenous enzymes of milk. En: McSweeney, P. L., y O’Mahony, J. A. *Advanced Dairy Chemistry: Volume 1B: Proteins: Applied Aspects*. New York: Springer
77. Otte, J., Zakora, M., Kristiansen, K. R., y Qvist, K. B. (1997). Analysis of bovine caseins and primary hydrolysis products in cheese by capillary zone electrophoresis. *Le Lait*, 77(2), 241-257.
78. Pagthinathan, M., y Nafees, M. S. M. (2015). Biochemistry of cheese ripening. *Journal of Agricultural Sciences*. 10, 16-26.
79. Peterson, G. (1977). A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Analytical Biochemistry*, 83, 346-356.
80. Peterson, R. F. (1963). High resolution of milk proteins obtained by gel electrophoresis. *Journal of Dairy Science*, 46(10), 1136-1139.
81. Phelan, J. A., Guiney, J., y Fox, P. F. (1973). Proteolysis of β -casein in Cheddar cheese. *Journal of Dairy Research*, 40(1), 105-112.

82. Recio, I., Amigo, L., Ramos, M., y Lopez-Fandiño, R. (1997). Application of capillary electrophoresis to the study of proteolysis of caseins. *Journal of Dairy Research*, 64(2), 221-230.
83. Rynne, N. M., Beresford, T. P., Kelly, A. L., y Guinee, T. P. (2004). Effect of milk pasteurization temperature and in situ whey protein denaturation on the composition, texture and heat-induced functionality of half-fat Cheddar cheese. *International Dairy Journal*, 14(11), 989-1001.
84. Salque, M., Bogucki, P. I., Pyzel, J., Sobkowiak-Tabaka, I., Grygiel, R., Szmyt, M., y Evershed, R. P. (2013). Earliest evidence for cheese making in the sixth millennium BC in northern Europe. *Nature*, 493(7433), 522.
85. Sawyer, W. H. (1969). Complex between β -lactoglobulin and κ -casein. A review. *Journal of Dairy Science*, 52(9), 1347-1355.
86. Scholl, P., Samantha, M., y Magdi M. (2014). Rapid Turbidimetric Detection of Milk Powder Adulteration with Plant Proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, (7).
87. Secretaria de Agricultura y Desarrollo Rural. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera, 2018. *Panorama de la leche en México* [En línea]. Disponible en: <http://infosiap.siap.gob.mx/opt/boletlech/Panorama%20de%20Leche%20octubre-diciembre%202018.pdf> [Último acceso el 23 de mayo de 2019]
88. Secretaria de Salud (1989) *Ley General de Salud*. México, quinta edición, Porrúa S. A.
89. Secretaria de Salud (2002) *Ley General de Salud*. 17a. edición, México, Porrúa S. A.
90. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera, 2018. *Boletín de leche*. [En línea]. Disponible en: <http://infosiap.siap.gob.mx/opt/boletlech/Bolet%20de%20Leche%20octubre-diciembre%202018.pdf> [Último acceso el 23 de mayo de 2019]
91. Shalabi, S. I., y Fox, P. F. (1987). Electrophoretic analysis of cheese: comparison of methods. *Irish Journal of Food Science and Technology*, 11(3), 135-151.
92. Smejkal, G. B., 2006. Proteins staining in polyacrylamide gels. En G. B. Smejkal y A. Lazarev. Eds. *Separation Methods in Proteomics*. London: Taylor & Francis, 439-452.
93. Sousa, M., Ardö, Y., y McSweeney, P. L. (2001). Advances in the study of proteolysis during cheese ripening. *International Dairy Journal*, 11(4), 327-345.

94. Strickland, M., Weimer, B. C., y Broadbent, J. R. (1996). Capillary electrophoresis of Cheddar cheese. *Journal of Chromatography A*, 731(1-2), 305-313.
95. United States Department of Agriculture. USDA. 2019. *Dairy: world markets and trade*. Foreign Agricultural Service. [En línea] (Última actualización 18 de Julio de 2019). Disponible en:
<https://downloads.usda.library.cornell.edu/usdaesmis/files/5t34sj56t/3f462h141/p8419020t/dairy.pdf> [Último acceso el 20 de agosto de 2019]
96. Van Hekken, D. L. y Thompson, M. P. (1992). Application of PhastSystem® to the resolution of bovine milk proteins on urea-polyacrylamide gel electrophoresis. *Journal of Dairy Science*, 75(5), 1204-1210.
97. Veloso, A. C., Teixeira, N., Peres, A. M., Mendonça, Á., y Ferreira, I. M. (2004). Evaluation of cheese authenticity and proteolysis by HPLC and urea-polyacrylamide gel electrophoresis. *Food Chemistry*, 87(2), 289-295.
98. Veloso, A. C., Teixeira, N., y Ferreira, I. M. (2002). Separation and quantification of the major casein fractions by reverse-phase high-performance liquid chromatography and urea-polyacrylamide gel electrophoresis: Detection of milk adulterations. *Journal of Chromatography A*, 967(2), 209-218.
99. Villegas de Gante, A. y Cervantes, F., (2011). *La genuinidad y tipicidad en la revalorización de los quesos artesanales mexicanos*, Estudios Sociales: Hermosillo, 19(38), 146-163.
100. Villegas de Gante, A., Cervantes, F., Cesín, A., Espinoza, A., Hernández, A., Santos, A. y Martínez A.R., 2014. *Atlas de los quesos genuinos*. Guadalajara: Biblioteca Básica de Agricultura.
101. Villegas de Gante, A., Lozano, O. y Cervantes, F., 2015. *Valorización de los quesos mexicanos genuinos*. Guadalajara: Biblioteca Básica de Agricultura.
102. Villegas de Gante, A., Moreno, A. S., y Escoto, F. C. (2016). *Los quesos mexicanos tradicionales*. Universidad Autónoma Chapingo.
103. Villegas de Gante, A., Santos, A., y Cervantes, F., 2016. *Los quesos mexicanos tradicionales*. Universidad Autónoma de Chapingo: Juan Pablos Editor.

104. Villegas de Gante, A., y de la Huerta Benítez, R. (2015). Naturaleza, evolución, contrastes e implicaciones de las imitaciones de quesos mexicanos genuinos. *Estudios sociales*: Hermosillo, 23(45), 213-236.
105. Wehr, H., M., y Frank, J.F., (2004). *Standard Methods for the examination of dairy products*. 17th Edition. Washington: American Public Health Association.
106. Westermeier, R., Gronau, S., Becket, P., Büllers, J., Schickle, H., Thesseling, G., y Westermeier, R. (2016). *Electrophoresis in practice: a guide to methods and applications of DNA and protein separations*. Weinheim : Wiley-VCH, [2016].
107. Whitaker, J. R., Voragen, A. G., y Wong, D. W. (2002). *Handbook of food enzymology*. CRC Press.
108. Wiggans, G.R., y Shook, G. E. (1987). A lactation measure of somatic cell count. *Journal of Dairy Science*, 70 (12), 2666-2672.

6. Apéndices

6.1 Apéndice A. Análisis de leche por ultrasonido

El analizador de leche *LactiCheckTM* utiliza el ultrasonido como método de caracterización de las muestras de leche; proporciona el perfil de los componentes de la leche: porcentaje de grasa, porcentaje de sólidos no grasos, densidad, porcentaje de proteína y punto crioscópico, así como un indicativo de la adulteración de la leche por adición de agua.

El movimiento de las partículas relativo a la fase continua causa pérdidas visco-inerciales cuando la onda de sonido se propaga a través de la muestra. El arrastre entre el líquido y las partículas causa que la energía del sonido se pierda como calor. La velocidad del pulso ultrasónico y el cambio de la temperatura están directamente relacionadas con las partículas de la muestra (grasa y sólidos no grasos), los cuales son medidos con precisión. Otras características, como proteína, agua añadida y punto crioscópico, son calculados basados en el porcentaje de los componentes medidos utilizando una ecuación matemática.

Tabla A1. Verificación de calibración del equipo *LactiCheckTM* contra un estándar secundario

Parámetro	Especificaciones	Resultado	Promedio	Conclusión
Grasa (%)	0.5-9 ± 0.08	3 ± 0.08	3.03	Cumple especificación
Sólidos no grasos (%)	6-12 ± 0.2	8.5 ± 0.2	8.57	Cumple especificación
Densidad (g/mL)	0.5-1.0330 ± 0.0005	1.0300 ± 0.0005	1.0303	Cumple especificación
Proteína (%)	2-5 ± 0.2	3.2 ± 0.2	3.23	Cumple especificación
Agua agregada (%)	0-60 ± 5	0 ± 5	0	Cumple especificación

6.2 Apéndice B. Denominación de quesos y toma de la porción de muestra

Denominación	Descripción	Normatividad
Queso Adobera 	<p>Producto elaborado a partir de la cuajada proveniente de leche fresca sometida a un tratamiento térmico que garantice su inocuidad, a la cual se le puede adicionar cloruro de calcio, cuajo y/o cultivos de bacterias lácticas. Es un queso fresco, de pasta blanda, acidificada y prensada ligeramente, un tanto granulada, aunque fina y fácilmente tajable o rebanable, que funde fácilmente al aplicarle calor. De sabor y aroma suaves.</p> <p>El nombre adobera proviene de la forma de las piezas de este queso, similares a adobes rectangulares.</p> <p>Este queso no puede contener grasa y proteínas de origen diferente al de la leche, ni féculas.</p>	NMX-F-755- COFOCALEC- 2015
Queso Cheddar 	<p>Producto que se obtiene a partir de leche entera o estandarizada pasteurizada, sometida a procesos de coagulación, cortado, desuerado, cheddarizado, salado, prensado y madurado a temperatura y humedad controladas; sin que se hayan empleado en su elaboración grasas o proteínas no provenientes de la leche. Es un queso semiduro, cuyo cuerpo tiene un color que varía de casi blanco o marfil a amarillo claro o anaranjado y tiene una textura firme (al presionarse con el pulgar), suave y cerosa. Carece de agujeros ocasionados por el gas, aunque se aceptan algunas pocas aberturas y grietas. Este queso se elabora y comercializa con corteza o sin ella y puede tener revestimiento.</p>	NMX-F-745- COFOCALEC- 2011

Queso Panela



Producto elaborado a partir de la cuajada proveniente de leche fresca o en polvo, entera, parcialmente descremada o descremada, estandarizada o no, sometida a un tratamiento térmico que garantice su inocuidad, a la cual se le puede adicionar cloruro de calcio, cuajo y/o cultivos de bacterias lácticas. La cuajada obtenida, es cortada, salada y moldeada. Se trata de un queso fresco, de consistencia blanda y suave, con aroma agrídulce. Este queso no puede contener grasa y proteínas de origen diferente al de la leche, ni féculas.

NMX-F-742-
COFOCALEC-
2012

**Queso Menonita
(Chihuahua)**



Queso mexicano cuyo origen es el estado de Chihuahua, de textura blanda o semidura, obtenido por coagulación enzimática de leche pasteurizada entera o estandarizada en grasa butírica; de pasta texturizada, acidificada y prensada. Se rebana fácilmente, presenta capacidad de fundido a temperaturas altas, con color marfil a amarillo dorado.

NMX-F-738-
COFOCALEC-
2017

Queso Chester



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 15 días a temperatura y humedad controladas. De color blanco a ligeramente amarillo, textura semidura, tajable o rebanable.

NMX-F-746-
COFOCALEC-
2013

Para obtener la porción de ensayo de cada pieza, se realizó el corte de dos secciones en el queso Panela y en el queso Cheddar (Fig. B1); por corte de una sección en el queso Cheddar madurado y Queso Parmesano^{DO} (Fig. B2) y en forma de pan en forma de bloque para el caso del queso Adobera, queso Menonita, queso tipo Chester y queso Chihuahua (Fig. B3) de acuerdo a la guía de muestreo (NMX-F-718-COFOCALEC-2017).

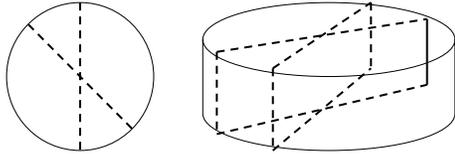


Figura B1. Muestreo por corte de dos secciones

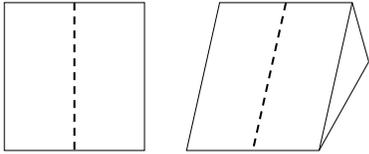


Figura B2. Muestreo por corte en una sección

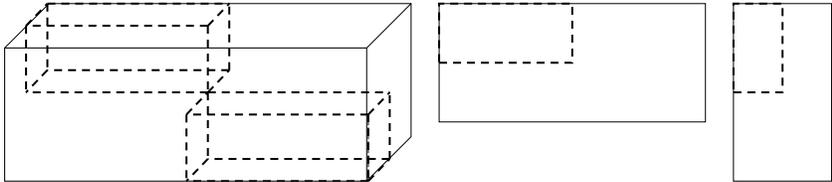


Figura B3. Muestreo en forma de pan en forma de bloque

6.3 Apéndice C. Composición química de disoluciones amortiguadoras y reactivos

Disolución amortiguadora de muestra, pH 8.5: Hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) (0.05 % m/v), urea (6 M), Tris (167 mM), ácido-3-morfolinopropanosulfónico (MOPS) (42 mM) y sal disódica del ácido etilendiamino tetracético (EDTA) (67 mM).

Disolución amortiguadora de separación, pH 3.0: HPMC (0.05 % m/v), urea (5 M), citrato trisódico dihidratado (20 mM) y ácido cítrico (0.185 M).

Disolución de amortiguadora de solubilidad, pH 8.3: EDTA (40 mM) y tetraborato de sodio (30 mM).

Disolución amortiguadora 4x (C), pH 6.8: Tris-base- HCl (0.5 M).

Disolución amortiguadora 4x (S), pH 8.8: Tris-base-HCl (1.5 M).

Disolución amortiguadora 2x: Tris-base (0.125 M), dodecil sulfato de sodio (SDS) (4% m/v), glicerol (20 % v/v), azul de bromofenol (0.05 m/v).

Disolución amortiguadora de corrida, pH 7.6: Tris (0.06 M) y urea (8 M).

Disolución amortiguadora C (DA C), pH 7.6: Tris (0.07 M), urea (5.2 M).

Disolución amortiguadora S (DA S), pH 8.9: Tris (0.7 M), urea (7.8 M).

Disolución amortiguadora con ditioneitol (DTT): DTT (17 mM)

Reactivo CTC: sulfato de cobre 0.1%, tartrato de sodio 0.2%, carbonato de sodio 10%.

Reactivo A: partes iguales el reactivo CTC, NaOH 0.8 N y agua destilada.

Reactivo B: reactivo de Folin Fenol-Ciocalteu, 2 N

6.4 Apéndice D. Formulación de gel concentrador y gel separador urea-PAGE

Urea-PAGE	Gel	
	Concentrador (4% T) (mL)	Separador (12.5% T) (mL)
DA C (pH 7.6)	8.6	-
DA S (pH 8.9)	-	5.8
Acrilamida (30% T, 2.6% C)	1.36	4.16
APS	0.05	0.05
TEMED	0.01	0.01
Volumen final	10	10

Abreviaturas: DA C: Disolución amortiguadora C; DA S: Disolución amortiguadora S; APS: Persulfato de amonio; TEMED: N, N, N', N' tetrametiletilendiamina.

6.5 Apéndice E. Diagramas de flujo y especificaciones de las variedades de queso analizadas

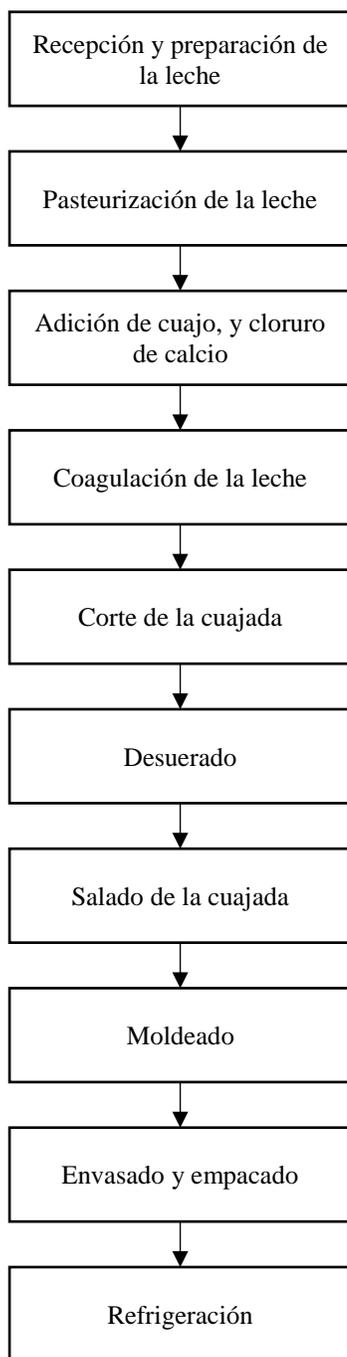


Figura E1. Diagrama de flujo de la elaboración del Queso Panela

Tabla E1. Especificaciones fisicoquímicas y resultados de inspección de Queso Panela

Parámetro	Especificación	Inspección
Proteínas % m/m	17 mín.	17
Grasa butírica % m/m	20 mín.	21
Perfil de ácidos grasos	Característico de grasa butírica	Característico de grasa butírica
Humedad % m/m	59 máx.	56
Almidón	Negativo	Negativo
Materia extraña	Ausencia	Ausencia
<i>Staphylococcus aureus</i>	1000 UFC/g	<100 UFC/g
<i>Salmonella spp</i>	Ausencia en 25 g	Ausencia en 25 g
<i>Listeria monocytogenes</i>	Ausencia en 25 g	Ausencia en 25 g
<i>Escherichia coli</i>	≤100 UFC/g	<3 NMP/g
Mohos	500 UFC/g	Valor estimado 60 UFC/g
Levaduras		420 UFC/g
Arsénico	0.2 mg/kg	<0.0497 mg/kg
Plomo	0.5 mg/kg	<0.4998 mg/kg

Normatividad: NMX-F-742-COFOCALEC-2012

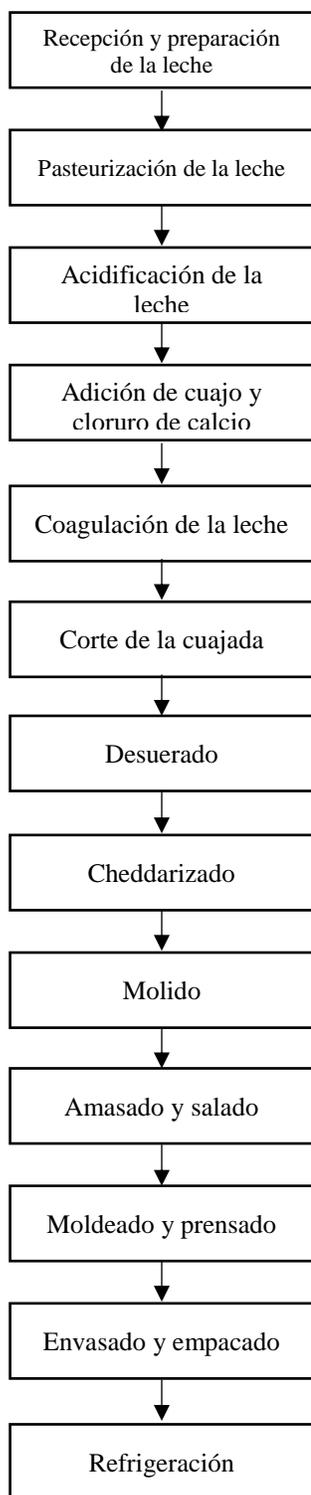


Figura E2. Diagrama de flujo de la elaboración del Queso Adobera para fundir

Tabla E2. Especificaciones fisicoquímicas y resultados de inspección de Queso Adobera

Parámetro	Especificación	Inspección
Proteínas % m/m	18 mín.	21
Grasa butírica % m/m	21 mín.	29
Perfil de ácidos grasos	Característico de grasa butírica	Característico de grasa butírica
Humedad % m/m	54 máx.	46
Almidón	Negativo	Negativo
Materia extraña	Ausencia	Ausencia
<i>Staphylococcus aureus</i>	1000 UFC/g	<100 UFC/g
<i>Salmonella spp</i>	Ausencia en 25 g	Ausencia en 25 g
<i>Listeria monocytogenes</i>	Ausencia en 25 g	Ausencia en 25 g
<i>Escherichia coli</i>	≤100 UFC/g	<3 NMP/g
Mohos	500 UFC/g	Menos de 10 UFC/g
Levaduras	0.2 mg/kg	<0.0497 mg/kg
Arsénico	0.5 mg/kg	<0.4998 mg/kg
Plomo		

Normatividad: NMX-F-755-COFOCALEC-2015

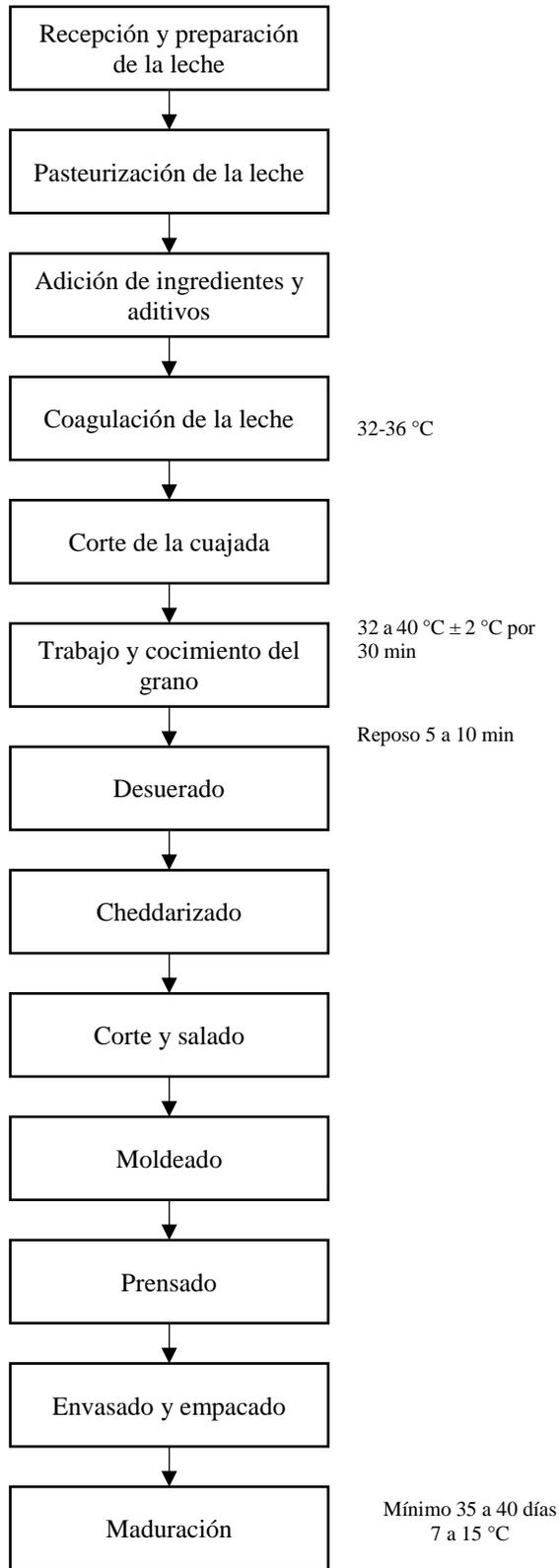


Figura E3. Diagrama de flujo de la elaboración del Queso Cheddar

Tabla E3. Especificaciones fisicoquímicas y resultados de inspección de Queso Cheddar

Parámetro	Especificación	Inspección
Proteínas % m/m	24 mín.	23
Grasa butírica % m/m	29 mín.	31
Perfil de ácidos grasos	Característico de grasa butírica	Característico de grasa butírica
Humedad % m/m	43 máx.	42
Almidón	Negativo	Negativo
Materia extraña	Ausencia	Ausencia
<i>Staphylococcus aureus</i>	1000 UFC/g	<100 UFC/g
<i>Salmonella spp</i>	Ausencia en 25 g	Ausencia en 25 g
<i>Listeria monocytogenes</i>	Ausencia en 25 g	Ausencia en 25 g
<i>Escherichia coli</i>	≤100 NMP/g	<3 NMP/g
Mohos	500 UFC/g	Menos de 10 UFC/g
Levaduras	0.2 mg/kg	<0.0497 mg/kg
Arsénico	0.5 mg/kg	<0.4998 mg/kg
Plomo		

Normatividad: NMX-F-745-COFOCALEC-2011

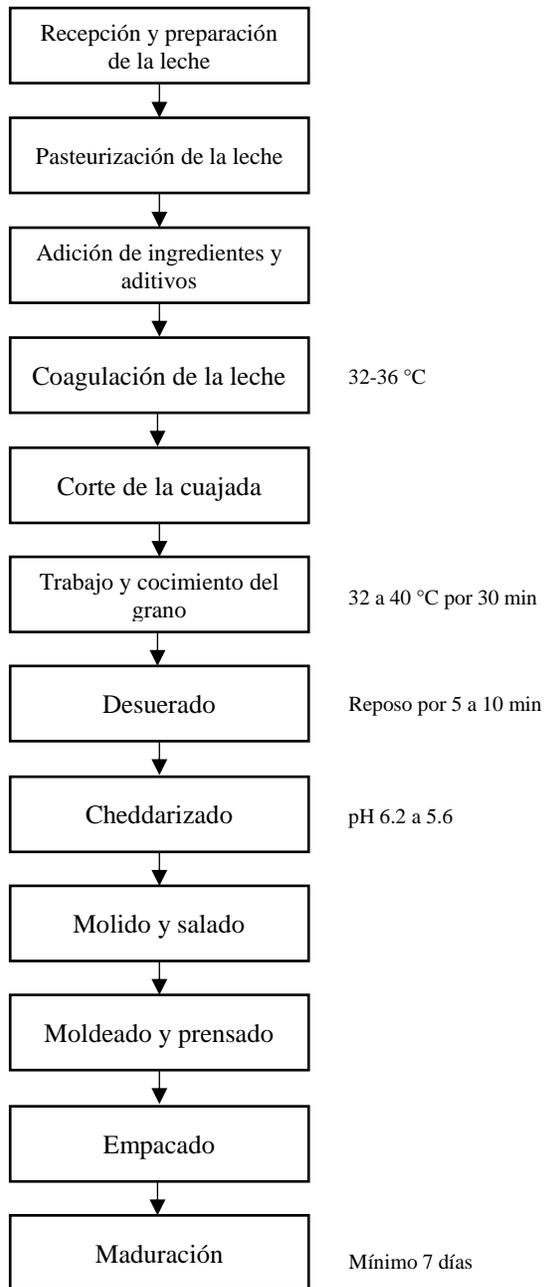


Tabla E4. Especificaciones fisicoquímicas de Queso Chihuahua

Parámetro	Especificación
Proteínas propias de la leche % m/m	23 mín.
Grasa butírica % m/m	28 mín.
Humedad % m/m	45 máx.
pH	5.0 - 5.5

Normatividad: NMX-F-738-COFOCALEC-2017

Figura E4. Diagrama de flujo de la elaboración del Queso Chihuahua

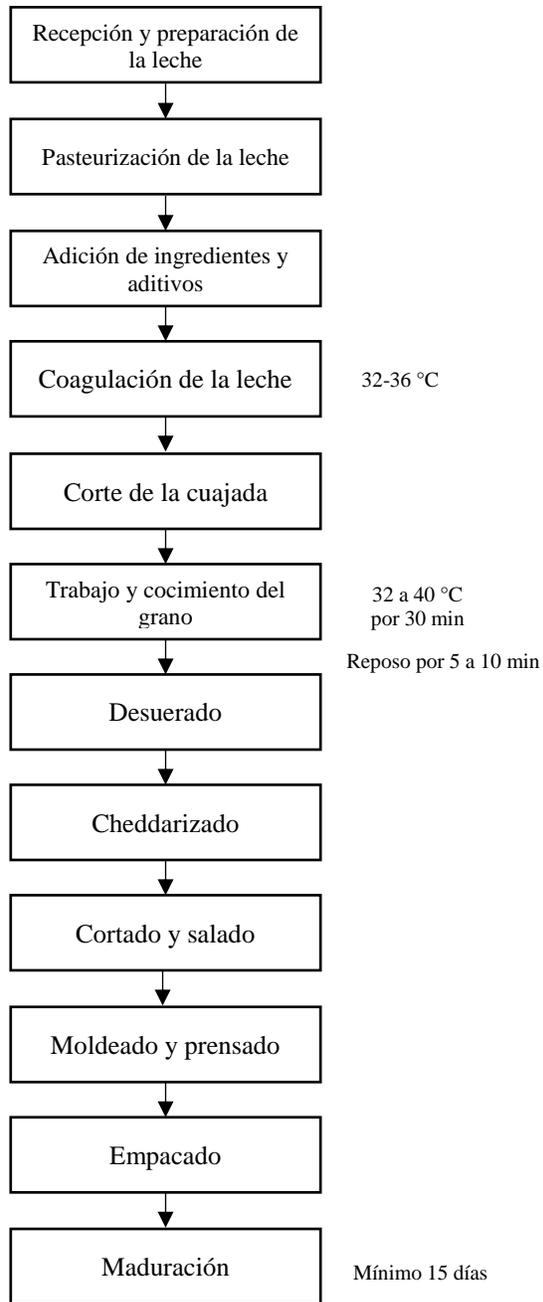


Tabla E5. Especificaciones fisicoquímicas de Queso Chester

Parámetro	Especificaciones
Proteínas propias de la leche % m/m	23.0 mín.
Grasa butírica % m/m	28.0 mín.
Humedad % m/m	43.0 máx.
Sólidos totales % m/m	57.0 mín.
pH	5.0 – 5.5
Cenizas totales % m/m	6.5 máx.
Cloruro de sodio % m/m	3.0 máx.

Normatividad: NMX-F-746-COFOCALEC-2013

Figura E5. Diagrama de flujo de la elaboración del Queso Chester