

## HIDROLISIS RELATIVA DE LAS CASEINAS DEL QUESO MANCHEGO MADURO Y PRIMEROS PRODUCTOS DE SU DEGRADACION PROTEOLITICA.

(RELATIVE HYDROLISIS OF RIPENED "MANCHEGO" CHEESE CASEINS AND THEIR FIRST DEGRADATIONS PRODUCTS).

por

A. MARCOS, J. FERNANDEZ-SALGUERO y M. A. ESTEBAN\*

Durante el proceso de maduración del queso, las paracaseínas de la cuajada son hidrolizadas catalíticamente por la proteasa de la leche (Creamer, 1975), las enzimas del cuajo empleado como coagulante (Green y Foster, 1974), las enzimas de los cultivos lácticos añadidos (Lowrie y Lawrence, 1972) y las de los microorganismos contaminantes de la leche original y del producto en fase de elaboración.

La proteolisis del queso influye notablemente en la calidad organoléptica del mismo y por ello ha sido profusamente investigada en muchas variedades de quesos. En el estudio de la hidrólisis enzimática de la  $\alpha_s$  y  $\beta$ -caseína y de sus primeros productos de degradación, la electroforesis de alta resolución, en gel de poliacrilamida, ha resultado particularmente útil como técnica cuantitativa (De Jong, 1975; El-Shibiny y Abd El-Salam, 1976).

La proteolisis de nuestro popular queso manchego apenas ha sido objeto de estudio mediante técnicas electroforéticas. Entre las pocas investigaciones realizadas figuran las de Wirotama *et al.* (1973), Marcos *et al.* (1976a), Ramos y Martínez-Castro (1976) y Ramos *et al.* (1977). La información cuantitativa obtenida sobre el estado de degradación de la  $\alpha_s$  y  $\beta$ -caseína y sobre sus primeros productos de degradación es aún deficiente.

En la actualidad se está llevando a cabo (Mora, 1979) una amplia y detallada investigación sobre el curso de la proteolisis en el queso manchego, utilizando entre otras técnicas la electroforética. Prosiguiendo el estudio del estado de degradación

---

\* Departamento de tecnología y bioquímica de los alimentos. Facultad de veterinaria. Universidad de Córdoba. (España).

Recibido para publicación el 7-2-78.

proteolítica del queso manchego maduro, hemos aplicado la técnica electroforética cuantitativa al examen de un lote de quesos manchegos adquiridos en el comercio.

### *Material y métodos.*

*Muestras de queso.* En grandes mercados y tiendas especializadas se adquirieron 15 muestras, de unos 250 g, de queso manchego y tipo manchego, lo más diversificadas posible. En el laboratorio las muestras fueron tratadas siguiendo la norma 34 105 hl de la U. N. E.

*Electroforesis.* Para la separación electroforética de las caseínas y sus primeros productos de degradación, 100 mg de cada una de las muestras de queso fueron disueltos en 0,5 ml de solución de urea 8 M (El-Shibiny y Abd El-Salam, 1976).

En la separación electroforética se siguió la modificación de Akroyd (Smith, 1968) de la técnica de Ornstein y Davis (1964), empleando un equipo de electroforesis de disco Canalco modelo 1.200.

En la preparación del gel separativo se utilizó un tampón de pH 8,9 que contenía 36,3 de Tris, 0,46 ml de Temed, 48 ml de ClH 1 N y agua hasta 100 ml. El gel separativo contenía un 7,5 p. 100 de acrilamida y un 0,2 p. 100 de bisacrilamida y se polimerizó añadiendo, por 20 ml de solución, 2,5 ml de persulfato amónico al 0,56 p. 100 y 12,2 ml de Temed. Los geles de apilamiento y de la muestra se prepararon como indica el manual de instrucciones Canalco (Anónimo, 1969). De cada muestra analítica se pusieron, en cada una de las columnas de gel, 10 y 15  $\mu$ l respectivamente.

Durante la electroforesis se utilizó tampón de pH 8,4 con 0,60 g de Tris, 2,88 g de glicina y agua hasta 1 litro. La tinción de los geles se hizo con negro amido B 10. En ambos casos se procedió como indican las instrucciones del manual Canalco (*loc. cit.*)

La decoloración de los geles teñidos se hizo con un decolorador rápido Canalco.

La movilidad relativa (Rm) de los componentes separados se calculó por el sistema de referencia de zonas de Wake y Baldwin (1961), utilizando como referencia una banda tenue, pero nítidamente definida, situada entre la  $\alpha_s$  y la  $\beta$ -caseína.

*Cuantificación fotométrica.* Para cuantificar las cantidades de  $\alpha_s$ -caseína,  $\beta$ -caseína, primeros productos de degradación de la  $\alpha_s$ -caseína y primeros productos de degradación de la  $\beta$ -caseína, cada gel se cortó en cuatro segmentos que incluían, respectivamente, la zona de las  $\alpha_s$ -caseínas, la de las  $\beta$ -caseínas, las bandas en situación pre- $\alpha_s$  y las bandas de menor migración que la  $\beta$ -caseína.

El colorante de cada segmento fue extraído cuantitativamente por separado, tras desintegrar el gel en un tubo de centrifuga, añadir 3 ml de solución de carbona-

to sódico al 2 p. 100 y calentar durante 2 minutos en baño de agua hirviendo; después de centrifugar los tubos para separar el gel, la absorbancia del sobrenadante se midió a 650 nm (El-Shibiny y Abd El-Salam, 1976) con un Spectronic 70.

La cantidad relativa de cada uno de los cuatro grupos de componentes se expresó en porcentaje de la densidad óptica total.

*Determinación de cenizas.* Método de la A.O.A.C. (1965).

### *Resultados y discusión.*

En los geles electroforéticos teñidos, de las caseínas del queso manchego, aparecen 10 bandas de *mayor* intensidad tintorial, que se presentan en casi todas las muestras con igual movilidad relativa. En las diferentes muestras de queso se observan variaciones en la intensidad tintorial de algunas bandas, debidas posiblemente al diferente grado de maduración. El cuadro electroforético es muy similar en aproximadamente la mitad de las muestras; por considerarlo representativo del queso manchego, de grado medio de maduración, se representa esquemáticamente en la figura 1, indicando la movilidad relativa de las diferentes bandas.

La banda de mayor movilidad electroforética ( $R_m = 1,40$ ) no se ha detectado en tres de las muestras (las de la izquierda de la lámina I) correspondientes a quesos posiblemente poco madurados, a juzgar por su pH comparativamente bajo y su alto contenido en  $\alpha_s$ -caseína no degradada. En otras muestras (derecha de la lámina I) aparecen, en adición a las 10 bandas principales, otros componentes de alta movilidad electroforética, que pueden deberse a un mayor grado de maduración, o a quesos elaborados con mezclas de leche de otras especies.

El par de bandas de menor movilidad y las otras tres equidistantes de movilidad algo mayor, corresponden a productos de degradación de la  $\beta$ -caseína. Tres de los polipéptidos de alto peso molecular y baja movilidad electroforética que se forman por degradación de la beta-caseína, durante la maduración de los quesos de vaca Gouda y Cheddar, han sido identificados por Creamer (1975) como la gamma ( $\gamma_1$ ), TS- ( $\gamma_2$ ) y R- ( $\gamma_3$ ) caseínas; éstas posiblemente puedan originarse por la acción hidrolítica de la proteasa alcalina de la leche, enzima también hallada en la leche de oveja (Carini y Todesco, 1974) y de otras especies investigadas (Carini *et al.* 1971).

La banda de mayor anchura y más intensamente teñida corresponde a la fracción beta-caseína. En la cuajada fresca de leche de oveja se detectan electroforéticamente dos betas-caseínas ( $\beta_1$  y  $\beta_2$ ) con valores  $R_m$  de 0,91 y 0,83, apareciendo la última más intensamente teñida. En la beta-caseína de vaca se han detectado tres componentes menos móviles que los de la oveja, estando el central más intensamente teñido, y en la beta-caseína de cabra se ha hallado banda única, de la misma amplitud y movilidad que la beta-caseína vacuna, en la que la semibanda anódica apa-

rece mucho más intensa que la catódica. En los ferogramas de los quesos, todos los componentes citados pueden aparecer confundidos en una banda o zona única.

En los ferogramas de los quesos la alfa<sub>5</sub>-caseína aparece en dos bandas intensas, correspondientes de mayor a menor movilidad a la alfa<sub>52</sub>-caseína y alfa<sub>53</sub>-caseína, que en algunos aparecen ligeramente precedidas por una tercera banda tenue de alfa<sub>51</sub>-caseína. Los valores Rm hallados para las alfa<sub>5</sub>-caseínas de cuajadas frescas de leche ovina han sido de 1,21, 1,15 y 1,09. Las alfa<sub>5</sub>-caseínas bovinas tienen similar movilidad que las ovinas, aunque cuantitativamente predomina la alfa<sub>52</sub>-caseína. La alfa<sub>5</sub>-caseína de cabra consta de tres componentes (el central de mayor intensidad) de menor movilidad relativa que las alfa<sub>5</sub>-caseínas de oveja y de vaca; hecho utilizado en la identificación de quesos fabricados con mezcla de leche de ambas especies (Portmann y Pierre, 1971).

En los ferogramas de una muestra de cuajada industrial de mezcla de leche de oveja, vaca y cabra, se observan cuatro bandas (Mora, 1979), correspondientes de mayor a menor movilidad, a las alfa<sub>5</sub>-caseínas ovinas y bovinas (Rm = 1,13), a la alfa<sub>5</sub>-caseína caprina (Rm = 0,96), a las beta-caseínas ovinas (Rm = 0,83) y a las beta-caseínas vacunas y caprinas (Rm = 0,75).

Las bandas que aparecen en los ferogramas de los quesos en situación pre-alfa corresponden a polipéptidos de peso molecular superior a unos 10.000 daltons, originados por la hidrólisis enzimática de la alfa<sub>5</sub>-caseína. En el queso Cheddar de 8 meses de edad aparece en gran cantidad un péptido (denominado alfa<sub>51</sub> I), primer producto que se forma por la acción exclusiva del cuajo de ternera sobre la alfa<sub>51</sub>-caseína, que ha sido identificado (Creamer y Richardson, 1974). En quesos manchegos fabricados con mezclas de leche de oveja y de vaca, Ramos *et al.* (1977) han observado una banda similar a la alfa<sub>51</sub>-I bovina, que les permite detectar en el queso manchego la adición de un 10 p. 100 de leche vacuna.

Determinando las absorbancias a 650 nm de las dos caseínas y de sus respectivos productos de degradación y expresándolas en porcentaje de la densidad óptica total del gel, se han calculado las proporciones relativas que se exponen en el cuadro I. Los porcentajes medios de alfa<sub>5</sub>-caseína y beta-caseína no degradadas son prácticamente iguales a los hallados en el queso de los Pedroches (Marcos *et al.*, 1976b), variedad similar elaborada con cuajo vegetal. En el queso manchego, sin embargo, predomina el porcentaje de productos de degradación de la beta-caseína respecto al de los primeros productos de hidrólisis de la alfa<sub>5</sub>-caseína, en los que se observa una gran variabilidad.

En las imágenes electroforéticas de los quesos estudiados (lámina I) la alfa<sub>5</sub>-caseína aparece mucho más degradada que la beta-caseína. Según los datos del cuadro I la relación beta/alfa<sub>5</sub> media es de aproximadamente 3, pero la relación real no es tan alta debido a que la beta-caseína tiene mayor capacidad para fijar colorante que la alfa<sub>5</sub>-caseína (El-Shibiny y Abd El-Salam, 1976). La resistencia relativa de la beta-caseína a la proteólisis ha sido observada por muchos investigadores en la mayor

parte de las variedades extranjeras de quesos duros y semiduros de pH bajo. También se ha observado en el queso manchego (Marcos *et al.* 1976a; Ramos Martínez-Castro, 1976; Ramos *et al.* 1977; Mora, 1979; Millán, 1979), en el de los Pedroches (Fernández-Salguero, 1975; Marcos *et al.* 1977), en el de la Serena (Marsilla, 1978) y en otros quesos españoles (Millán, 1979).

Se ha comprobado que la menor susceptibilidad relativa de la beta-caseína a la hidrólisis por la acción de la renina está relacionada con el contenido en agua, la actividad del agua, la concentración en proteínas, cenizas, sal, calcio y fósforo, así como con el pH (Creamer, 1970, 1971; Phelan *et al.* 1973). En los quesos de los Pedroches y de la Serena, fabricados con leche de oveja coagulada con cuajo vegetal, los factores antes mencionados están relacionados con la proteólisis relativa de las caseínas, pero al contrario de lo observado en los quesos de vaca Cheddar y Gouda, influyen en la hidrólisis de la alfa<sub>5</sub>-caseína sin afectar a la de la beta-caseína (Marcos *et al.* 1976b, 1978a y b).

El coeficiente de correlación encontrado entre las relaciones beta/alfa y la cantidad de cenizas (expresada por gramo de agua) de las muestras de queso manchego examinadas indica que la concentración mineral en la fase polar del queso influye significativamente ( $r=0,6188^*$ ) en la hidrólisis relativa de las caseínas. Las correlaciones existentes entre las concentraciones de las cenizas y las DD. OO. 650 de las bandas teñidas correspondientes a la alfa<sub>5</sub>- y beta-caseína, cuyos coeficientes de correlación fueron respectivamente  $r=0,1493$  y  $r=0,5497$ , sugieren que es afectada la proteólisis de la beta-caseína y no de fracción alfa<sub>5</sub>; efecto debido, posiblemente, a la naturaleza del cuajo.

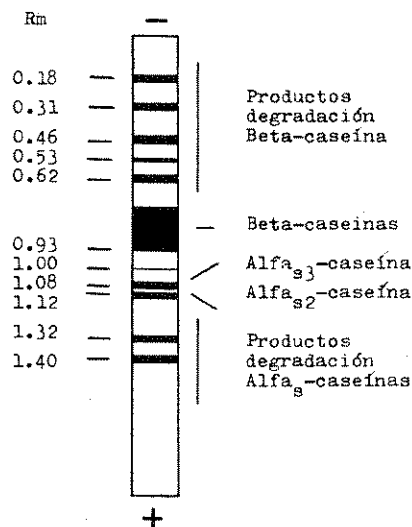
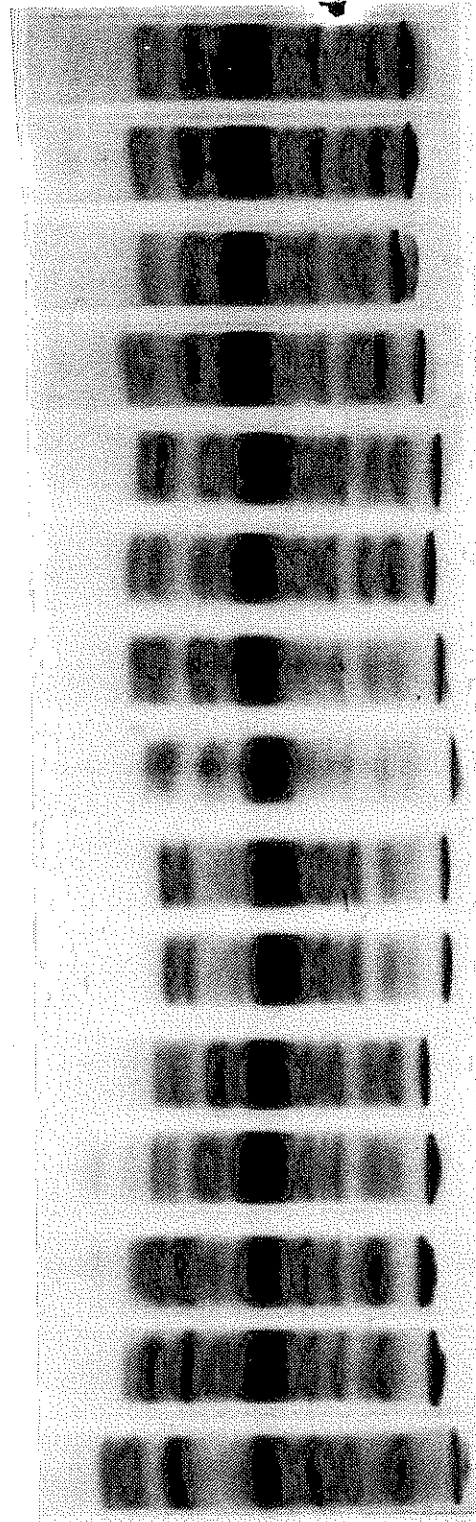


FIGURA 1. Diagrama representativo de las principales zonas electroforéticas (en gel de poliacrilamida, pH alcalino) de las caseínas y primeros productos de degradación del queso manchego maduro.



LAMINA I. Ferogramas en gel de poliacrilamida de las caseínas y primeros productos de degradación de quesos manchegos maduros.

CUADRO I. Proporciones relativas de alfa<sub>s</sub>- y beta-caseína y de sus respectivos productos de degradación, en los quesos manchegos maduros.

QUESO	PORCENTAJE DEL TOTAL			
	Productos degradación Alfa <sub>s</sub> -caseína	Alfa <sub>s</sub> -caseína	Beta-caseína	Productos degradación Beta-caseína
1	11,34	13,85	39,55	35,26
2	13,68	12,17	51,44	22,71
3	16,85	13,99	46,68	22,47
4	10,89	13,47	44,13	31,52
5	16,14	10,56	46,60	26,70
6	15,45	12,69	37,52	34,34
7	12,58	17,58	47,42	22,42
8	31,92	10,79	37,14	20,14
9	28,96	11,02	34,23	25,79
11	15,41	14,10	42,29	28,20
12	14,13	15,78	48,42	21,67
13	32,38	10,91	25,00	31,71
$\bar{X}$	18,31	13,08	41,70	26,91
S	7,95	2,17	7,42	5,25
CV	43,43	16,57	17,79	19,51

*Resumen.*

Los ferogramas en gel de poliacrilamida, de las caseínas del queso manchego maduro, muestran un mayor grado de proteólisis de la alfa<sub>s</sub>-caseína que de la beta-caseína. A partir de la alfa<sub>s</sub>-caseína se forman dos principales primeros productos de degradación, de mayor movilidad relativa, mientras que la hidrólisis de la beta-caseína origina cinco polipéptidos de alto peso molecular y baja movilidad electroforética. La cantidad de cenizas del queso influye significativamente en la hidrólisis relativa de las caseínas, disminuyendo el grado de hidrólisis de la beta-caseína al aumentar la concentración mineral en la fase polar, sin que resulte afectada la proteólisis de la alfa<sub>s</sub>-caseína.

*Summary.*

PAGE patterns of the ripened Manchego cheese caseins show that alfa<sub>s</sub>-casein is more extensively degraded than beta-casein. Hydrolysis of alfa<sub>s</sub>-casein gives rise to two first degradation main products of higher relative mobility, whereas five peptides of high molecular weight and low electrophoretic mobility arise from the beta-casein hydrolysis. The ash contents of the cheese influences significantly the relative hydrolysis of caseins, decreasing the extent of hydrolysis of beta-casein with the increase of mineral concentration in the polar phase, while that of alfa<sub>s</sub>-casein is unaffected.

*Bibliografía.*

- Anónimo, 1969.—Research Disc Electrophoresis Instructions. Canalco. Rockville, Maryland.
- A.O.A.C. 1965.—Official Methods of Analysis. 10th ed., C. R. C., Washington, D. C.
- Carini, S., R. Lodi y R. Todesco, 1971.—Sci. Tecn. Latt.-Cas., 22: 391.
- Carini, S. y R. Todesco, 1974.—Ind. Latte, 10: 13.
- Creamer, L. K. 1970.—N. Z. J. Dairy Sci. Technol., 5: 13.
- 1971.—N. Z. J. Dairy Sci. Technol., 6: 91.
- 1975.—J. Dairy Sci., 58: 257.
- Creamer, L. K. y B. C. Richardson, 1974.—N. Z. J. Dairy Sci. Technol., 9: 9.
- De Jong, L. 1975.—Neth. Milk Dairy J., 29: 162.
- El-Shibiny, F. y M. H. Abd El-Salam, 1976.—Milchwissenschaft, 31: 80.
- Fernández-Salguero, J. 1975.—Tesis doctoral. Univ. de Córdoba (España).



- Green, M. L. y P. M. D. Foster, 1974.—*J. Dairy Res.*, 41: 269.
- Lowrie, R. S. y R. C. Lawrence, 1972.—*N. Z. J. Dairy Sci., Technol.* 7: 51.
- Marcos, A. M. A. Esteban y J. Fernández-Salguero, 1976b.—*Arch. zootec.*, 25: 73.
- Marcos, A., M. A. Esteban y J. Fernández-Salguero, 1977.—*Trab. Cient. Univ. Córdoba (España)*, No. 15.
- Marcos, A., M. A. Esteban y J. Fernández-Salguero, 1978b.—*Arch. zootec.*, 27: 285.
- Marcos, A., A. Esteban, J. Fernández-Salguero, M. T. Mora y R. Millán, 1976a.—*Anal. Bromatol.*, 28: 69.
- Marcos, A., J. Fernández-Salguero y M. A. Esteban, 1978a.—*Anal. Bromatol.*, en prensa.
- Marsilla, B. A. 1978.—*Tesina de licenciatura. Fac. vet. Córdoba (España)*.
- Millán, R. 1979.—*Datos no publicados*.
- Mora, M. T. 1979.—*Tesis doctoral. En redacción*.
- Ornstein, L. y B. J. Davis, 1964.—*Ann. Acad. Sci., N. Y.*, 121, 404.
- Phelan, J. A., J. Guiney y P. F. Fox, 1973.—*J. Dairy Res.*, 40: 105.
- Portmann, A. y A. Pierre 1971.—*Ann. Fals. Exp. Chim.*, 696: 159.
- Ramos, M. e I. Martínez-Castro, 1976.—*Lait*, 56: 164.
- Ramos, M., I. Martínez-Castro y M. Juárez, 1977.—*J. Dairy Sci.*, 60: 870.
- Smith, I. 1968.—*Chromatographic and Electrophoretic Techniques. (ed.)*, II, 399: Heineman.
- U. N. E.—*Métodos de ensayo de queso: obtención de muestras*. 34: 105 hl.
- Wake, R. G. y R. L. Badwin, 1961.—*Biochim. Biophys. Acta*, 47: 225.
- Wirotama, I. P. G., K. H. Ney y W. G. Freytag, 1973.—*Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 153: 78.