

INFLUENCIA DE DIVERSOS FACTORES QUIMICOS Y FISICOS EN LA PROTEOLISIS DE LAS CASEINAS DEL QUESO.

(INFLUENCE OF SOME CHEMICAL AND PHYSICAL FACTORS ON THE
PROTEOLYSIS OF CHEESE CASEINS).

por

A. MARCOS, M.ª ASUNCION ESTEBAN y J. FERNANDEZ-SALGUERO

Introducción

Examinando electroforéticamente doce variedades de quesos europeos, Lindqvist y Storgards (1957) observaron que en las variedades duras y semiduras de pH bajo la β -caseína ofrecía mayor resistencia a la degradación proteolítica que la α -caseína, hecho comprobado posteriormente por Ledford *et al.* (1966) en los quesos Suizo, Brick y Cheddar, por Edward y Kosikowski (1969) y Fox y Walley (1971) en el queso Cheddar y por Creamer (1970) en el queso Gouda.

La mayor resistencia relativa de la β -caseína a la hidrólisis enzimática se observa también en todas las variedades de quesos españoles que hemos analizado, independientemente de la especie de que proceda la leche (oveja, vaca o cabra) y del coagulante (cuajo de ternera o vegetal) utilizados en la elaboración de los quesos, y pese al hecho de que la mayor parte de las bacterias proteolíticas aisladas de tales quesos poseen proteasas exocelulares que degradan preferentemente a la β -caseína (Marcos *et al.*, 1976 a; Muñoz, 1976). La α_s -caseína aparece bastante más degradada que la β -caseína en el queso de los Pedroches (Fernández-Salguero, 1975; Marcos, *et al.*, 1975), en el queso manchego y de tipo manchego (Marcos, *et al.*, 1976 b) y en los quesos Idiazábal, Cabrales, gallego de vaca, San Simón, Tetilla, Roncal y queso fresco de cabra de Cádiz (Millán, 1976).

(*) Cátedra de Tecnología y bioquímica de los alimentos. Facultad de veterinaria. Universidad de Córdoba (España).

Recibido para publicación el 8-11-1975.

La resistencia a la proteólisis de la β -caseína del queso ha sido atribuida por diferentes investigadores a factores tales como el escaso contenido en agua del producto, a su reducida actividad del agua (a_w), al pH, al alto contenido en proteínas y al elevado contenido en minerales (cenizas), sobre todo en sal, en calcio y en fósforo.

El objetivo del presente trabajo es hallar las correlaciones existentes entre los citados factores químicos y físicos y el estado de degradación proteolítica de las caseínas del queso.

Material y métodos

Muestras de queso. Se prepararon de acuerdo con la norma 34 105 hl de la UNE (1969) a partir de un lote heterogéneo de 16 quesos, de dos a tres meses de maduración, adquiridos en el Valle de los Pedroches (provincia de Córdoba, España) a otros tantos productores diferentes. En todas las muestras se determinó la composición química, el pH y la a_w (Fernández-Salguero *et al.*, 1975), diversas fracciones nitrogenadas y contenido en aminoácidos libres (Fernández-Salguero y Marcos, 1975) y, en seis de ellas, el estado de degradación proteolítica de las caseínas (Marcos *et al.*, 1975). Al objeto de que las diferencias en la degradación proteolítica de la β -caseína fueran más aparentes, las muestras se mantuvieron a $2 \pm 2^\circ \text{C}$ durante 6 meses en frascos cerrados herméticamente, antes de proceder a su examen electroforético.

Electroforesis de disco en gel de poliacrilamida. Muestras de 20 g de cada uno de los quesos se homogeneizaron con 100 ml de H_2O a 5.000 rpm/2 min. Los homogeneizados se calentaron a $35\text{-}40^\circ \text{C}$, centrifugaron a 2.000 rpm/30 min. y enfriaron a $0^\circ \text{C}/30 \text{ min.}$ para eliminar con espátula la grasa separada. Al extracto frío se añadió, bajo agitación, CIN 1 N hasta ajustar el pH a 4,6. Pasados 30 min. se calentó a $30^\circ \text{C}/30 \text{ min.}$ y centrifugó a 2.000 rpm./30 min. El precipitado obtenido se lavó dos veces resuspendiéndolo en tampón diluido de pH 4,6 (10 ml de CH_3COOH al 10 p.100 y 10 ml de CH_3COONa 1 M diluidos a 1 litro con H_2O) y centrifugando (2.000 rpm/30 min.) tras cada lavado. El sedimento final se resuspendió en 50 ml de H_2O y disolvió ajustando el pH a 6,8 con NaOH 1 N. Inmediatamente antes de la electroforesis, a una alícuota de la solución anterior se añadió un volumen igual de urea 7 M recién preparada.

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

En la preparación del gel se utilizó un tampón de pH 8,9 que contenía 36,3 g de Tris, 0,46 ml de Temed, 48 ml de ClH 1 N y H₂O hasta 100 ml. El gel de separación 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 dos columnas de gel, 15 µl.

En la separación electroforética, que se hizo con tampón de pH 8,4 conteniendo 0,60 g de Tris, 2,88 g de glicina y H₂O hasta 1 litro, y en la tinción de los geles con negro amido, se siguieron las instrucciones del manual Canalco (Anónimo, 1969).

La movilidad relativa (R_m) de los componentes separados se calculó siguiendo el sistema de referencias de zonas de Wake y Baldwin (1961), utilizando como referencia una banda tenue, pero bien definida, situada entre la β- y la α_s-caseína.

El perfil densitométrico de los geles teñidos se registró con densitómetro Chromoscan 200 y las planimetrías se hicieron con planímetro de Ott.

Resultados

Por examen visual de los geles teñidos se han detectado en total 21 componentes de distinta movilidad electroforética en las muestras de queso mantenidas en refrigeración, número igual al hallado en los seis quesos maduros examinados electroforéticamente antes de refrigerar las muestras (Marcos *et al.*, 1975). La movilidad relativa de las diferentes zonas (tabla I) concuerda, en general, con la observada previamente en los quesos maduros.

Estudiando comparativamente los ferogramas de las muestras analizadas electroforéticamente antes y después del almacenamiento en refrigeración, se observa un debilitamiento general en la intensidad tintorial tanto de la β-caseína y α_s-caseína como de sus respectivos productos de escisión, que indica un estado más avanzado de degradación proteolítica;

CUADRO I. Movilidad relativa media de las zonas detectadas en las diversas regiones electroforéticas.

Región	k- y γ -caseína	β caseína	α_s -caseína	pre- α_s
Rm	0,15	0,74	1,11	1,20
»	0,17	0,81	1,15	1,26
»	0,24	0,85	1,18	1,37
»	0,31	0,89		1,40
»	0,41			
»	0,48			
»	0,56			

no se observan, sin embargo, cambios notables en las proporciones relativas de los cuatro grupos de componentes citados, que serían de esperarse dada la mayor susceptibilidad relativa a la proteólisis de la β -caseína a baja temperatura (Fox, 1969, 1970).

En la fig 3.^a puede verse la variación en las imágenes electroforéticas de las 16 muestras de queso analizadas. En todas ellas se observa, no obstante, una mayor intensidad tintorial en la región de la β -caseína (entre cuyas cuatro zonas se encuentran la de la β_1 - y β_2 -caseína) que en la región de la α_s -caseína (cuyas tres zonas corresponden a la α_{s1} -, α_{s2} - y α_{s3} -caseína), lo que confirma la mayor resistencia de la β -caseína a la hidrólisis enzimática en esta variedad de queso (Marcos *et al.*, 1975), ya que al comienzo de la maduración la α_s - y la β -caseína se encuentran en proporciones aproximadamente iguales (Fernández-Salguero, 1975).

En los primeros productos de degradación de la α_s -caseína (principalmente de la α_{s2} - y α_{s3} -) —que por su mayor movilidad se sitúan en la región pre- α_s — también se notan claras diferencias tanto de tipo cuantitativo como cualitativo. Mientras en unos ferogramas aparecen los cuatro productos de degradación, en otros sólo se han detectado dos de dichos productos.

Las diferencias más notorias son las que se observan en las proporciones relativas de los siete polipéptidos de alto peso molecular y escasa movilidad electroforética, situados en la región correspondiente a la k-

CUADRO II. Proporciones relativas de los grupos de componentes detectados en las diversas regiones electroforéticas

Queso	p. 100 del total				β/α_s
	k- y γ -caseína	β -caseína	α_s -caseína	pre- α_s	
A	14,95	33,96	16,15	34,91	2,10
B	14,19	35,35	17,99	32,46	1,96
C	14,11	38,56	21,31	26,01	1,81
D	18,15	50,89	19,85	11,11	2,56
E	30,40	43,68	9,32	16,59	4,69
F	35,95	32,34	19,59	12,12	1,65
G	22,87	47,09	11,95	18,08	3,94
H	12,04	47,85	14,11	25,98	3,39
I	19,77	61,50	9,62	9,10	6,39
J	30,43	33,65	20,43	15,48	1,65
K	24,52	48,02	8,46	18,98	5,68
L	20,77	48,97	13,44	16,79	3,64
M	24,20	28,17	6,70	40,91	4,20
N	13,61	48,48	14,94	22,95	3,24
O	14,48	39,29	22,40	23,80	1,75
P	29,63	43,97	13,52	22,87	3,25
\bar{X}	21,25	42,61	14,99	21,76	3,24
$S_{\bar{x}}$	1,85	2,17	1,24	2,21	0,37
S	7,38	8,68	4,94	8,85	1,47
CV	34,74	20,36	32,98	40,69	45,23

Los datos se han calculado midiendo las superficies relativas delimitadas por los perfiles densitométricos de dos ferogramas de cada queso.

y γ -caseína, que proceden de la escisión enzimática de la β -caseína (Fernández-Salguero, 1975). Tres de tales péptidos de alto peso molecular y baja movilidad que se forman en los quesos maduros Gouda y Cheddar han sido recientemente identificados como la γ -, TS- y R-caseína (Creamer, 1975). Mientras que en los ferogramas de algunas muestras apenas se insinúan los productos de la escisión de la β caseína, en otros son muy evidentes y exhiben amplias y chocantes diferencias (Véase figura 1.^a y 3.^a).

Midiendo planimétricamente la superficie delimitada por el perfil densitométrico correspondiente a cada una de las cuatro regiones (k - y γ -, β , α_s , y pre- α_s) y la línea base, se han determinado las proporciones relativas de los cuatro grupos de componentes y calculado los datos del cuadro II, que ponen igualmente de manifiesto que la β -caseína es más resistente a la proteolisis que la fracción α_s ($\beta/\alpha_s > 3$), así como la amplia variabilidad en las proporciones relativas de los cuatro grupos de componentes, de unas muestras a otras.

Entre las muestras de queso también existe amplia variabilidad composicional (cuadro III) debida a las diferencias individuales introducidas en el proceso de elaboración por cada uno de los fabricantes.

Para comprobar si las variaciones observadas en las muestras de queso, en algunos factores composicionales (contenido en agua, proteínas, cenizas, sal, calcio y fósforo) y en ciertos factores físicos (a_w y pH), se reflejan en el estado de degradación proteolítica de las dos principales caseínas del queso (particularmente en la proteolisis de la fracción β), se determinaron las correlaciones existentes entre las proporciones relativas de β - y α_s -caseína no degradadas, de cada una de las muestras (cuyos datos figuran en el cuadro II) y los valores correspondientes a los precisados factores composicionales y físicos (cuadro III).

Los resultados del análisis estadístico (cuadro IV) indican que no existe correlación significativa alguna entre los factores composicionales y físicos objeto de estudio y el estado de degradación proteolítica de la β -caseína y que entre la cantidad relativa de α_s -caseína residual y el contenido en cenizas de los quesos existe una correlación positiva altamente significativa ($r=0,7479^{***}$), siendo muy significativa la existente con el contenido en sal ($r=0,6451^{**}$) y en calcio ($r=0,6311^{**}$) y significativa la

CUADRO III. Composición química, a_w y pH de los quesos objeto de estudio

Queso	Agua (p. 100)	a_w	pH	p. 100 g de H ₂ O						
				Proteína	Grasa	Ac. láctico	Cenizas	ClNa	Ca	P
A	33,92	0,90	5,55	91,04	81,81	3,92	19,63	9,26	3,07	2,39
B	32,75	0,91	5,55	96,37	86,26	4,58	18,81	8,46	2,96	2,44
C	29,08	0,84	5,45	120,46	95,43	5,19	25,69	12,86	4,06	3,30
D	39,83	0,89	5,50	86,54	54,61	2,91	17,88	10,37	2,31	1,88
E	38,71	0,97	5,33	89,36	53,60	3,93	15,81	5,63	2,92	2,30
F	31,81	0,92	5,70	112,17	83,31	3,33	18,96	8,05	3,33	2,58
G	34,88	0,95	5,55	77,52	90,31	4,07	15,94	7,83	2,64	1,95
H	34,46	0,95	5,55	83,52	84,15	3,95	17,06	8,79	2,78	1,74
I	38,89	0,93	5,40	91,18	54,00	3,96	12,93	4,37	3,03	2,16
J	37,78	0,91	5,55	88,25	54,26	4,21	17,31	8,28	3,07	2,49
K	37,38	0,90	5,25	85,02	65,54	3,53	15,81	7,60	2,25	1,63
L	35,75	0,90	5,30	91,50	65,74	6,24	19,72	9,90	2,38	1,93
M	40,23	0,90	5,30	78,55	52,82	5,49	14,29	6,71	1,84	1,74
N	29,67	0,87	5,40	95,08	117,96	5,76	20,56	12,27	2,43	2,36
O	26,94	0,80	5,35	97,88	132,70	5,34	28,21	20,86	3,38	2,49
P	30,04	0,88	5,45	100,07	110,68	5,36	19,24	11,32	3,06	2,73
\bar{X}	34,50	0,90	5,45	92,78	80,20	4,48	18,62	9,54	2,84	2,26
S_x	1,04	0,01	0,03	2,81	6,26	0,24	0,97	0,94	0,13	0,11
S	4,17	0,04	0,12	11,25	25,04	0,96	3,89	3,77	0,53	0,44
CV	12,07	4,65	2,27	12,13	31,22	21,45	20,91	39,51	18,79	19,38

Valores calculados a partir de los datos de Fernández-Salguero *et al.* (1975)

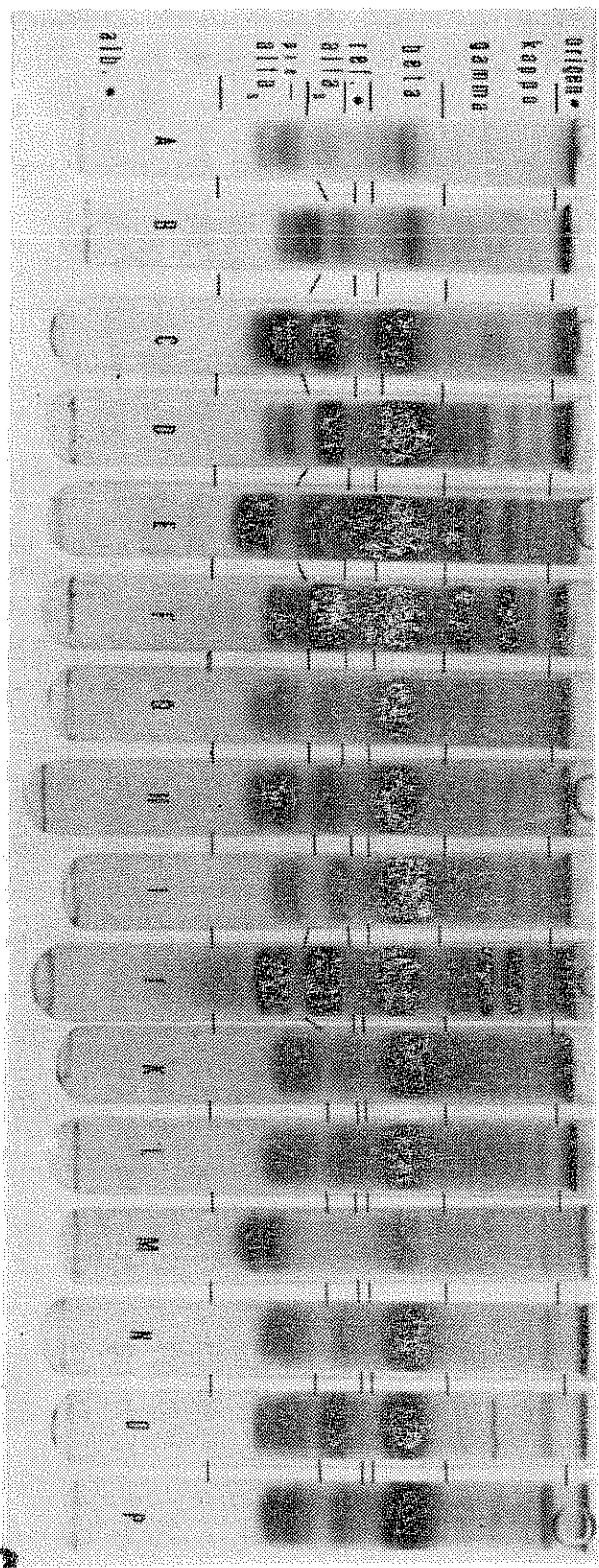


Figura 1.ª. Ferogramas de disco en gel de poliacrilamida de las muestras de queso.

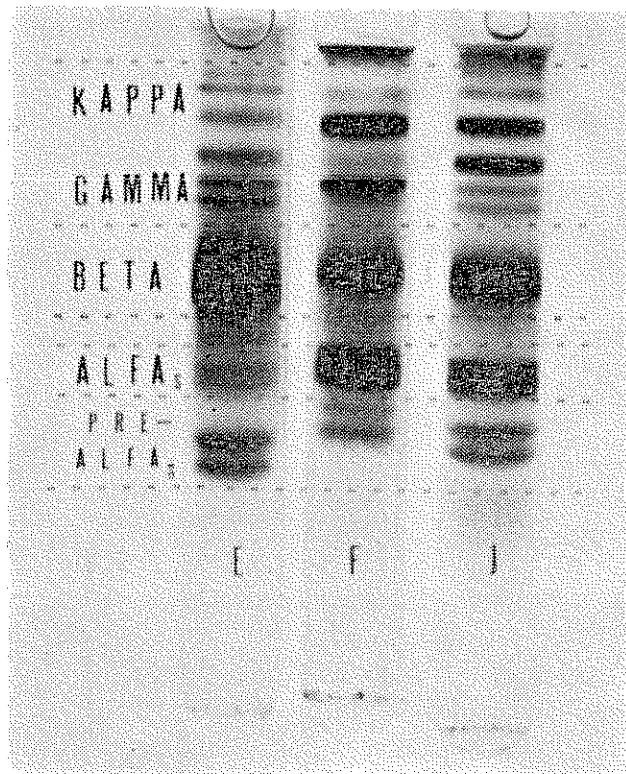


Figura 2.^a Ferogramas de disco en gel de poli-acrilamida en los que se observan notables diferencias cuanti y cualitativas en los productos de degradación de la β -caseína.

TABLA IV. Correlaciones de diversos factores composicionales y físicos con las cantidades de β - y α_s -caseína presentes en los quesos

Factor	Cantidad relativa de β -caseína resid.	Cantidad relativa de α_s -caseína resid.	β/α_s
Agua (p. 100)	0,1895	-0,5677*	0,5524*
a_w	0,1921	-0,5517*	0,4543
pH	-0,2841	0,5402*	-0,5959*
Proteínas(g/100 g H ₂ O)	-0,2200	0,5969*	-0,5018*
Cenizas (»)	-0,2617	0,7479***	-0,6819**
Sal (»)	-0,1419	0,6451**	-0,5626*
Calcio (»)	-0,1782	0,6311**	-0,4902
Fósforo (»)	-0,3283	0,6104*	-0,5756*

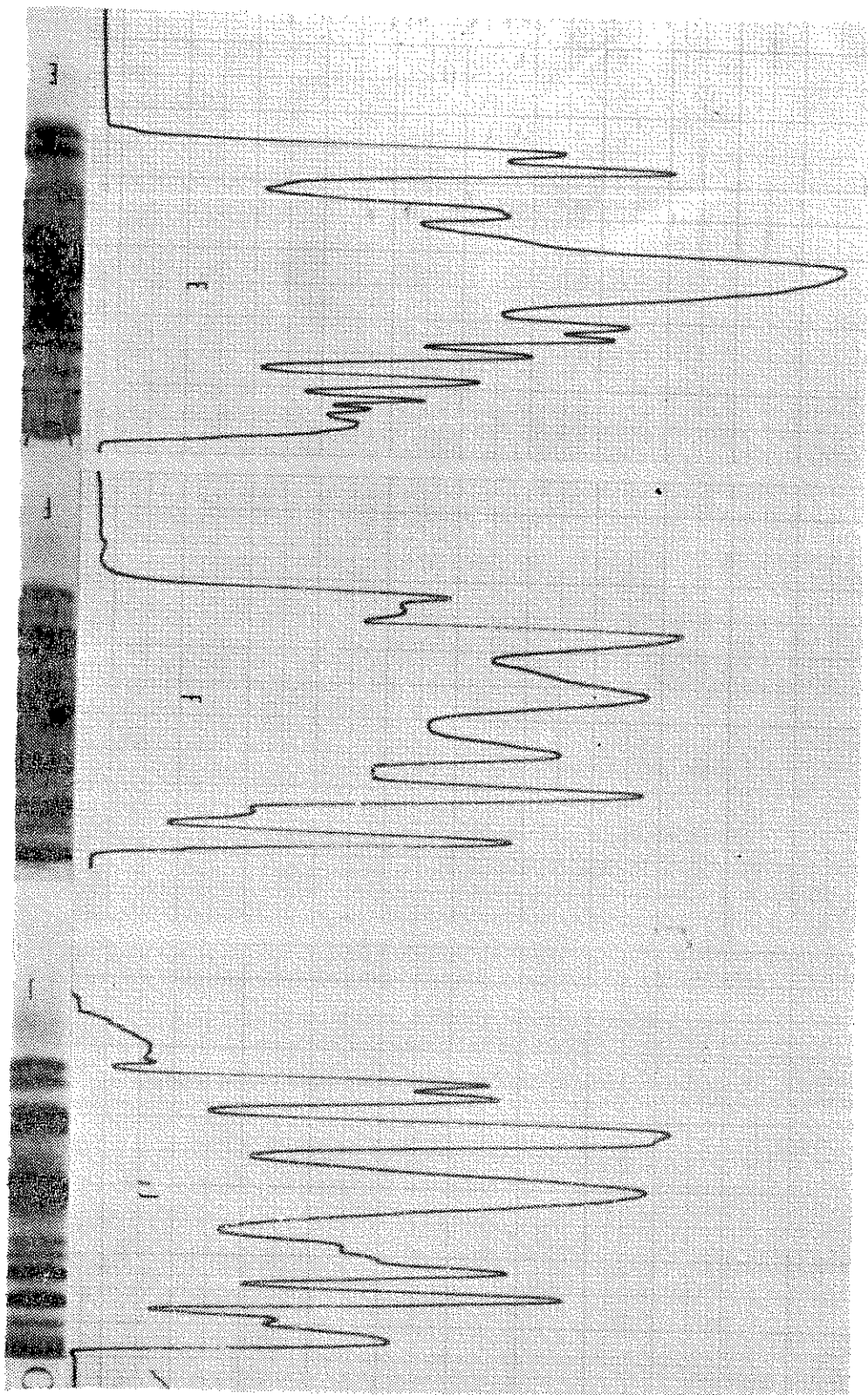


Fig. 3.ª Perfiles densitométricos de los ferogramas de la figura 2.ª.

correlación positiva con el fósforo ($r=0,6104^*$), contenido en proteínas ($r=0,5969^*$) y pH ($r=0,5402^*$) y la correlación negativa con el contenido en agua ($r=-0,5677^*$) y con la a_w ($r=-0,5517^*$).

Discusión

Cuando la caseína se encuentra en solución relativamente diluida, el cuajo de ternera degrada aproximadamente a la misma velocidad tanto a la α_{s1} - como a la β -caseína (Ledford *et al.*, 1966; Fox, 1969; Creamer, 1970), estando influida por la temperatura la susceptibilidad relativa de la α_{s1} - y β -caseína a la hidrólisis enzimática, de modo tal que a baja temperatura se favorece la proteólisis de la fracción β (Fox, 1969) incluso en forma micelar (Fox, 1970).

Tanto la α_{s1} - como la β -caseína son más refractarias a la proteólisis en forma micelar que en forma soluble (Ledford *et al.*, 1968), habiéndose demostrado que alterando la estructura de la micela por supresión del fosfato cálcico micelar aumenta la susceptibilidad de la α_{s1} -caseína a la degradación proteolítica (Fox, 1970).

Fox y Walley (1971) han comprobado que en soluciones de caseinato sódico la hidrólisis de la β -caseína por la acción de la renina o de la pepsina disminuye considerablemente en presencia de un 5 p. 100 de ClNa y que se inhibe totalmente en presencia de una concentración salina del 10 p. 100. Este efecto fue atribuido por Creamer (1971) no específicamente a la sal *per se*, sino a la a_w reducida por la presencia del soluto, ya que ante otros solutos como la sacarosa también disminuye la velocidad de hidrólisis de la β -caseína. En solución de caseinato de pH 6,0 contenido un 30 p. 100 (p/v) de sacarosa ($a_w = 0,983$) la hidrólisis de la β -caseína resultó ser cinco veces más lenta que la de la α -caseína y en presencia de un 60 p. 100 de sacarosa ($a_w = 0,963$) la fracción β apenas se hidrolizó.

Phelan *et al.* (1973), utilizando soluciones de caseinato sódico al 2,5 p. 100, 5 p. 100, 10 p. 100 y 20 p. 100, han comprobado que la susceptibilidad relativa de la α_{s1} - y β -caseína a la degradación por la acción de la renina no se modificaba a las concentraciones de proteína inferiores al 20 p. 100, pero que a la última concentración, sin embargo, se reducía significativamente la proteólisis de la β -caseína, mientras que la de la

α_{s1} -caseína permanecía inalterada. Los efectos inhibidores de la concentración proteica y del cloruro sódico parecen ser aditivos (Guiney, 1972).

Phelan *et al.* (1973) han comprobado también que en el queso Cheddar la resistencia de la β -caseína a la proteólisis disminuye, tanto al reducir la concentración de ClNa del producto, como al incrementar la cantidad de agua añadida, y que el secuestro de los cationes Ca^{++} con EDTA no afecta significativamente a la hidrólisis de la β -caseína.

Analizando estadísticamente las correlaciones existentes entre el estado de degradación proteolítica de las caseínas de 16 muestras de queso y los factores composicionales y físicos a que se atribuye la mayor resistencia relativa de la β -caseína a la proteólisis, observada en múltiples variedades de queso, no hemos encontrado correlación significativa entre los mencionados factores y la degradación de la β -caseína. En la hidrólisis enzimática de la α_s -caseína, por el contrario, el contenido en cenizas del queso influye en un grado altamente significativo, el contenido en sal y en calcio tienen una influencia muy significativa y las concentraciones de fósforo, proteínas y agua, así como la a_w y el pH, influyen significativamente.

Resumen

En numerosas variedades de queso la β -caseína es más resistente a la proteólisis que la α_s -caseína. La mayor resistencia relativa a la hidrólisis enzimática ha sido atribuida a factores tales como el contenido en agua del producto, la a_w , el pH y la concentración de proteínas, minerales totales, sal, calcio y fósforo en el queso. En un estudio realizado sobre 16 muestras de queso no hemos encontrado correlación estadísticamente significativa entre los citados factores químicos y físicos y el estado de degradación proteolítica de la β -caseína. En la hidrólisis de la α_s -caseína del queso, en cambio, el contenido en cenizas tiene una influencia altamente significativa, el contenido en sal y en calcio tienen una influencia muy significativa y el contenido en fósforo, proteínas y agua, a_w y pH, influyen también significativamente.

Summary

In most cheese varieties β -casein is more resistant to proteolysis than α_s -casein. This greater relative resistance has been ascribed to such fac-

tors as cheese moisture content, a_w , pH and proteins, minerals, calcium and phosphate concentrations. In a study carried out on 16 cheese samples correlations has been found to be no statistically significant between the above mentioned chemical and physical factors and the proteolytic breakdown of β_s -casein. On the other hand, it has been found, that, on the hydrolysis of cheese α_s -casein, the ash content has a highly significant influence, the salt and calcium content show a very significant influence, and the phosphate, protein and water concentrations, like a_w and pH, exert a significant influence.

Agradecimientos

Al Dr. L. K. Creamer, del New Zealand Dairy Research Institute, Palmerston North (Nueva Zelanda), por sus valiosas orientaciones en la identificación tentativa de las zonas electroforéticas.

Al Dr. Antonio Rodero y a don José María Rodero por el análisis estadístico de los resultados, realizados en el Centro de cálculo electrónico de la Universidad de Córdoba, patrocinado por la Caja provincial de ahorros de Córdoba.

Bibliografía

- Anónimo, 1969.—Research Disc Electrophoresis Instructions. Canalco. Rockville, Maryland, USA.
- Creamer, L. K. 1970.—N. Z. J. Dairy Sci. & Technol., 5, 152.
- 1971.—N. Z. J. Dairy Sci. & Technol., 6, 91.
- 1975.—J. Dairy Sci., 58, 287.
- Edwards, J. L. Jr. y F. V. Kosikowski, 1969.—J. Dairy Sci., 52, 1675.
- Fernández-Salguero, J. 1975.—Tesis doctoral, Universidad de Córdoba (España).
- Fernández-Salguero, J., M.^a Asunción Esteban, y A. Marcos, 1975.—Anal. Univ. Córdoba (España), en prensa.
- Fernández-Salguero, J. y A. Marcos, 1975.—Anal. Univ. Córdoba (España), en prensa.
- Fox, P. F. 1969.—J. Dairy Sci., 52, 1214.
- 1970.—J. Dairy Res., 37, 173.
- y B. F. Walley 1971.—J. Dairy Res., 38, 165.

- Guiney, J. 1972.—M. Sc. Thesis, University College, Cork.
- Ledford, R. A., J. H. Chen, y K. R. Nath, 1968.—*J. Dairy Sci.*, 51, 792.
- Lindqvist, B. y T. Storgards, 1957.—*Milchwissenschaft*, 12, 462.
- Marcos, A., M.^a Asunción Esteban, J. Espejo y M.^a Pilar Martínez y M.^a Teresa Muñoz 1976a.—Datos no publicados.
- Marcos, A., J. Fernández-Salguero y M.^a Asunción Esteban, 1975.—*Anal. Univ. Córdoba (España)*, en prensa.
- Marcos, A., M.^a Asunción Esteban, J. Fernández-Salguero y M.^a Teresa Mora y R. Millán, 1976.—Datos no publicados.
- Millán, R. 1976.—Datos no publicados.
- Muñoz, M.^a Teresa, 1976.—Datos no publicados.
- Ornstein, L. y B. J. Davis, 1964.—*Ann. Acad. Sci., N. Y.*, 121, 321 y 404.
- Phelan, J. A., J. Guiney y P. F. Fox, 1973.—*J. Dairy Res.*, 40, 105.
- Smith, I., 1968.—*Chromatographic and Electrophoretic Techniques* (ed.), II, 399, Heinemann.
- Wake, R. G. y Baldwin, R. L. 1961.—*Biochim. Biophys. Acta*, 47, 225.
- Ledford, R. A., C. O'Sullivan y K. R. Nath, 1966.—*J. Dairy Sci.*, 49, 1098.