

ESTUDIO ELECTROFORETICO COMPARATIVO DE ALGUNOS QUESOS ESPAÑOLES.

(ELECTROPHORETIC PATTERNS OF SOME SPANISH CHEESES. A COMPARATIVE STUDY).

por

A. MARCOS, F. LEON, J. FERNANDEZ-SALGUERO y M.^a A. ESTEBAN*

Aunque se ha investigado el aspecto bioquímico de la proteólisis y el estado de degradación proteolítica de diversos quesos españoles, como el queso manchego (Ramos y Martínez Castro, 1976, Marcos *et al.* 1978b; Mora, 1978), de Ulloa (Ordóñez, 1974), de los Pedroches (Fernández-Salguero y Marcos, 1977), de la Serena (Marsilla, 1978) y de Fuerteventura (Barreto, 1978; Fernández-Salguero, *et al.* 1978), no se han realizado estudios comparativos por electroforesis cuantitativa. Ello nos ha inducido a examinar en condiciones electroforéticas cuasi idénticas doce variedades muy diferentes, entre las que figuran quesos de tipo blando, semiblando y duro, frescos y madurados, elaborados con leche de diferentes especies. La mayor parte de estas variedades, así como otras diferentes, está siendo actualmente objeto de una investigación más extensa y detallada (Millán, 1978).

Material y métodos.

Muestras de queso.

Muestras de 12 quesos en estado de consumo, de otras tantas variedades diferentes se adquirieron en el comercio o se consiguieron directamente de las zonas locales de producción. Después de descortezar las muestras la porción comestible fue picada.

Electroforesis.

Se hizo con un aparato de electroforesis de disco en gel de poliacrilamida (Carnalco mod. 1200) con capacidad para 12 separaciones simultáneas. Para la separación, 100 mg de cada muestra fueron disueltos en 0'5 ml de solución 8 M de urea

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

(El Shibiny y Abd El-Salam, 1976) y de la solución clara se aplicaron a los tubos de gel alícuotas de 10μ l. Los detalles de la preparación de los geles de poliacrilamida y de la separación electroforética ya se han descrito anteriormente (Marcos *et al.*, 1976).

Después de la separación y tinción de los geles, el colorante de fondo se eliminó con un decolorador rápido (Canalco).

Las bandas teñidas incluidas en las diferentes regiones electroforéticas, indicadas en la figura 1, se cortaron por separado y se desintegraron en tubos de centrifuga y, tras extraer cuantitativamente el colorante con 3 ml de solución al 2 p. 100 de carbonato sódico y centrifugar, se midió la absorbancia del extracto a 650 nm (El-Shibiny y Abd El-Salam, 1976).

Determinación de tirosina y triptófano solubles.

Para calcular las concentraciones de tirosina y triptófano solubles en un extracto de queso que contiene la fracción hidrolizada de proteínas solubles a pH 4,4, se siguió el procedimiento espectrofotométrico de Vakaleris y Price (1959), leyendo la extinción del extracto a 270 y 290 nm, con espectrofotómetro Beckman mod. DB-G, y aplicando las ecuaciones:

$$C_{\text{tyr}} = (0,95 E_{270} - 1,31 E_{290}) 10^{-3}$$
$$C_{\text{trp}} = (0,307 E_{290} - 0,02 E_{270}) 10^{-3}$$

en la que *C* indica la concentración en moles por litro de extracto.

Resultados y discusión.

Tirosina y triptófano solubles.

En el cuadro I se indica la cantidad de tirosina y de triptófano en la porción hidrolizada de la proteína soluble a pH 4,4, de los diferentes quesos analizados. Las concentraciones de tirosina y triptófano solubles medidas espectrofotométricamente se han propuesto como índice del grado de proteolisis o extensión de la maduración del queso, al comprobar en el queso Cheddar la existencia de relaciones lineales, altamente significativas, con el porcentaje de nitrógeno soluble estimado por el método de Kjeldahl (Vakaleris y Price, 1959).

Tanto la cantidad de tirosina como la de triptófano soluble son muy elevadas en el queso de Cabrales. En la muestra examinada, que carecía de componentes electroforéticamente detectables (en el ferograma de la lámina I) se aplicó doble volumen), tanto las caseínas como sus primeros productos de degradación habían sido

casi totalmente hidrolizados a compuestos solubles, por la acción de las enzimas fúngicas. En otros quesos de vena azul (Danablauf, Edelplizkäse y Roquefort) también hemos observado que ambos valores son más elevados que en los quesos madurados por hongos superficiales o por bacterias (Marcos *et al.*, 1978a).

En los quesos frescos de Burgos y Villalón la cantidad de triptófano soluble es muy baja pero en cambio la de tirosina es tan elevada como en el queso de Cabrales intensamente madurado.

El queso de Almería se singulariza por su bajísimo nivel de tirosina y su relativamente alta proporción de triptófano. En las restantes variedades examinadas las concentraciones de tirosina y triptófano solubles son intermedias con respecto a las de los quesos citados.

En todas las muestras, a excepción de la del queso de Almería, la tirosina es más abundante que el triptófano, al igual que ocurre en las caseínas mayoritarias. La α_1 -caseína bovina contiene por molécula 10 residuos de tirosina y 2 de triptófano, y la molécula de beta-caseína posee 4 restos de tirosina y sólo uno de triptófano. Mayores concentraciones de tirosina que de triptófano han sido hallados en muestras de queso Cheddar de diferentes edades (Vakaleris y Price, 1959), así como en los quesos maduros de los Pedroches (Fernández-Salguero y Marcos, 1977), de la Serena (Marsilla, 1978; Fernández-Salguero *et al.*, 1978), queso de bola (León *et al.*, 1978) y en prácticamente todas las variedades de quesos europeos examinadas (Marcos *et al.*, 1978a).

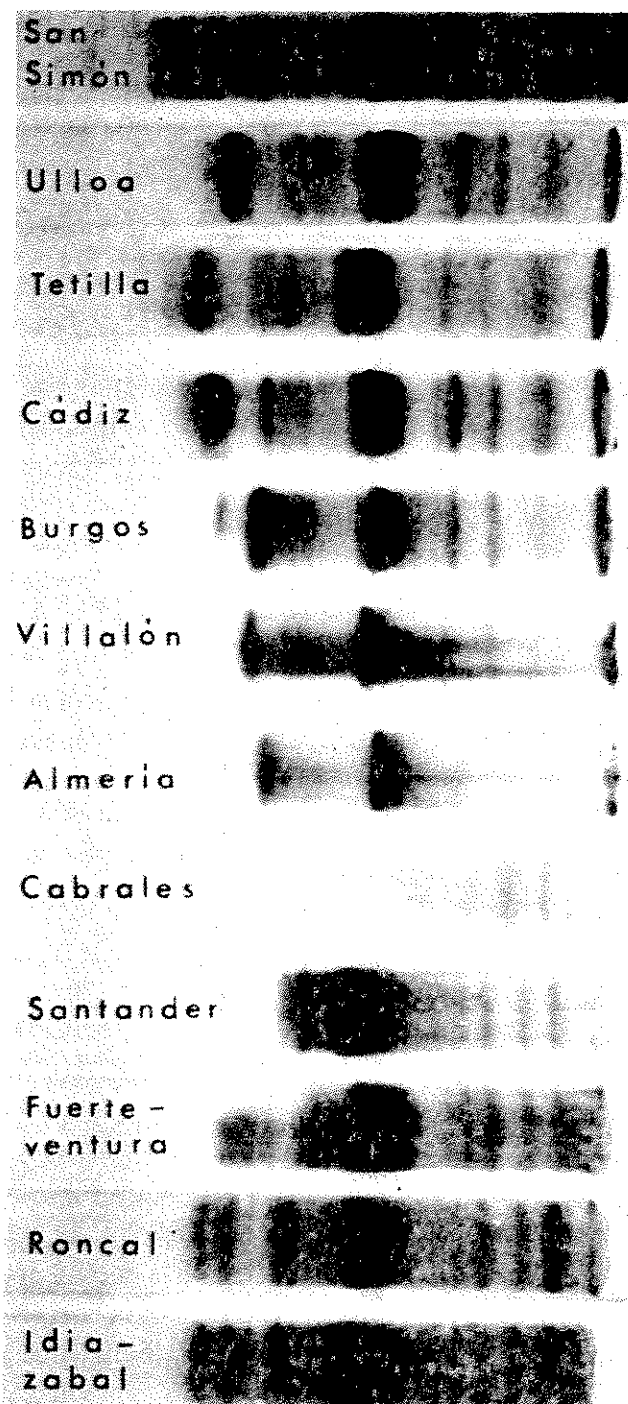
También se ha observado el predominio de la tirosina sobre el triptófano en el curso de la maduración del queso de los Pedroches (Fernández-Salguero, 1975) y de algunas partidas de queso manchego (Mora, 1978). La relación tirosina/triptófano hallada en los quesos es sin embargo inferior a la existente en las principales caseínas. En el curso de la maduración de un lote de queso manchego elaborado con leche mezclada (vaca, oveja y cabra) la citada relación frecuentemente se invierte y el triptófano predomina en general sobre la tirosina (Mora, 1978). En el curso de la maduración del queso Domiati fabricado con leche homogeneizada se ha observado un predominio constante de la tirosina sobre el triptófano, al contrario de lo que ocurre con el fabricado con leche sin homogeneizar (Abd El-Salam y El-Shibiny, 1972).

Componentes electroforéticos.

En la lámina I pueden verse los ferogramas en gel de poliacrilamida, a pH alcalino, de los quesos objeto de estudio; y en la figura 1, los diagramas indicativos de la movilidad relativa de los componentes detectados en el queso de vaca de San Simón (a) y en el queso de oveja de Idiazábal (b).

CUADRO I. Tirosina y triptófano solubles (mg/100 g queso) de diversos quesos españoles.

Queso de	tirosina	triptófano
San Simón	314	93
Ulloa	189	77
Tetilla	199	93
Cádiz	96	68
Burgos	619	51
Villalón	588	53
Almería	4	106
Cabrales	608	256
Santander	170	65
Fuerteventura	195	67
Roncal	235	77
Idiazábal	169	97



LAMINA I. Ferogramas en gel de poliacrilamida, a pH alcalino, de las caseínas y primeros productos de degradación de diferentes quesos españoles.

En el cuadro electroforético esquematizado en el diagrama (a) es el básico común de los quesos elaborados con leche de vaca, en lo que respecta al número de componentes y a su movilidad relativa, pero no a sus proporciones relativas. Dicho cuadro básico lo hemos observado en gran número de variedades diferentes, tanto de pasta prensada como cocida y tanto madurados por bacterias como por hongos superficiales o internos (Marcos *et al.*, 1978a; León *et al.*, 1978). En las imágenes electroforéticas en gel de poliacrilamida del queso Gouda, fabricado con cuajo y sin cuajo, tampoco se han detectado diferencias (Visser, 1977).

En los quesos de leche de vaca se presentan en la región de la α_s -caseína (figura 1) tres componentes principales, de los cuales el más abundante y de mayor migración electroforética es la α_{s1} -caseína; los tres componentes que se encuentran delante de la α_{s1} -caseína con productos de degradación de las α_s -caseínas (el de mayor movilidad no suele detectarse en la mayor parte de los casos); el producto de degradación menos móvil, situado inmediatamente delante de la α_{s1} caseína, es el primer producto de degradación de ésta, que se forma en el queso Cheddar por la acción exclusiva de la renina al hidrolizar el enlace peptídico Phe₂₄ Val₂₅ (Creamer y Richardson, 1974) o el enlace Phe₂₃-Phe₂₄ (Resmini *et al.*, 1976). Como resultado de la hidrólisis se libera un péptido N-terminal (Hill *et al.*, 1974) y un polipéptido C-terminal de mayor peso molecular que contiene la secuencia acídica de la α_{s1} -caseína. Creamer y Richardson (1974) han demostrado que el último es idéntico al primer producto de degradación de la α_{s1} -caseína por la acción de la renina, denominado α_{s1} -I, por Fox y Guiney (1973).

El producto de degradación α_{s1} -I es relativamente resistente a la ulterior proteólisis (Creamer y Richardson, 1974) y por ello se acumula en todos los quesos elaborados con leche de vaca y renina (Resmini *et al.*, 1976, Marcos *et al.*, 1978a). La estabilidad de este producto de degradación permite detectar la utilización de leche de vaca en la fabricación de queso manchego (Ramos *et al.*, 1977).

En la región de la beta-caseína de los ferogramas de los quesos fabricados con leche de vaca (figura 1a) se suelen detectar tres componentes, siendo el central y más abundante la beta-caseína; los otros dos componentes minoritarios de mayor y menor movilidad (frecuentemente enmascarados por la banda principal) quizás sean productos de degradación de la beta-caseína. El más móvil pudiera ser similar al primer producto de degradación de la beta-caseína por la acción de la renina, denominado beta-I (Creamer *et al.*, 1971), que posee movilidad ligeramente mayor que la beta-caseína, por contener la secuencia acídica N-terminal de ésta y perder un péptido de 17-20 residuos de la secuencia apolar C-terminal (Creamer, 1976).

En la región de la gamma-caseína (figura 1 a) se distinguen tres componentes principales (el de mayor y el de menor movilidad situados entre dos componentes minoritarios formando sendas ternas) que resultan de la hidrólisis de la beta-caseína. De los quesos de vaca Gouda y Cheddar se han aislado tres péptidos que se acumulan en la región de la gamma-caseína y que han sido identificados, de mayor a

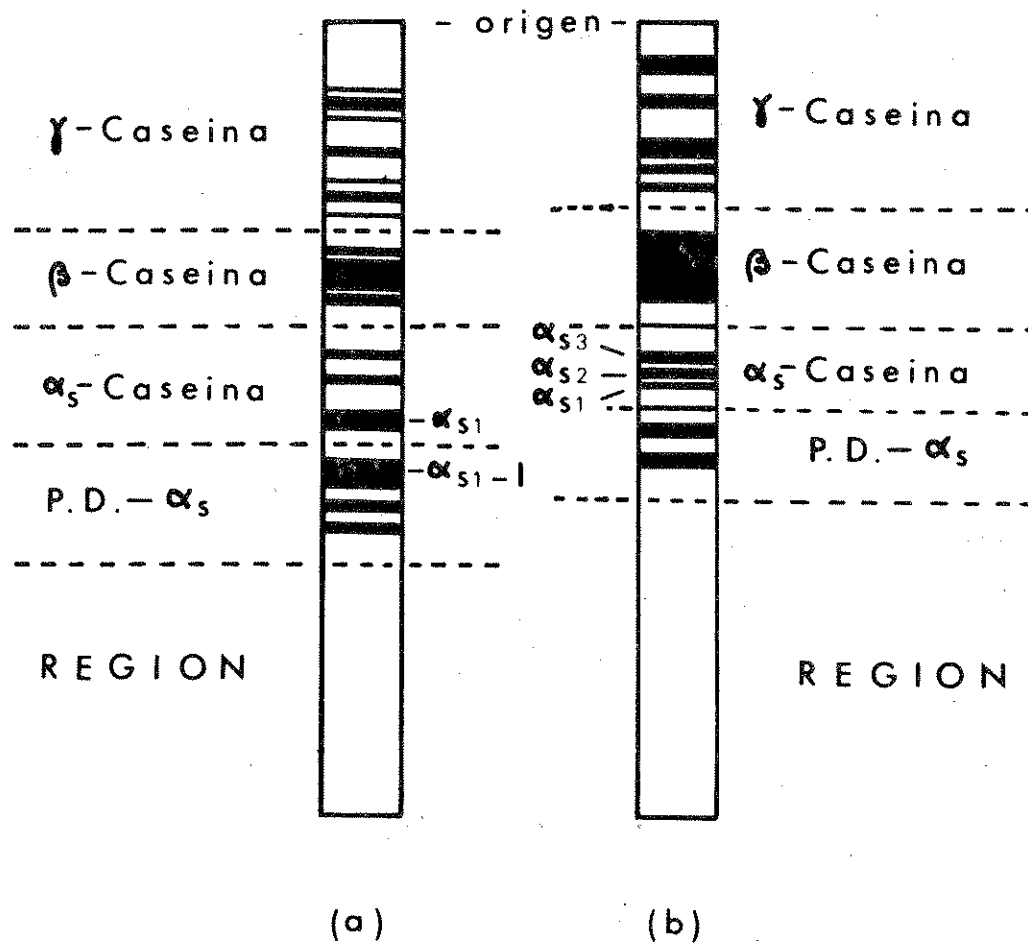


FIGURA 1. Diagramas indicativos de la movilidad relativa de las zonas electroforéticas detectadas en el queso de vaca de San Simón (a) y en el queso de oveja de Idiazábal (b). Las líneas discontinúas indican el nivel de los cortes de los geles, para la cuantificación de las proporciones relativas de los componentes de las diversas regiones.

menor movilidad, como la γ_1 -, γ_2 -, y γ_3 -caseína (Creamer, 1975a). Sin excluir la posible participación de las enzimas proteolíticas microbianas, se atribuye la acumulación de estos péptidos de escasa movilidad a la proteasa alcalina de la leche, que hidroliza a la beta-caseína a nivel de los enlaces peptídicos situados entre los residuos 28-29, 105-106 y 107-108, suprimiendo por tanto la secuencia N-terminal portadora de casi toda la carga neta de la beta-caseína (Creamer, 1975a). A la intervención de la proteasa alcalina puede imputarse el incremento de las caseínas minoritarias observado durante la maduración del queso Gouda preparado sin cuajo y sin cultivos *starter* (Visser, 1977).

Posiblemente los tres principales componentes de baja movilidad que se forman en todos los quesos fabricados con leche de vaca corresponda a la γ_1 -, γ_2 - y γ_3 -caseína o a productos análogos, ya que tienen similar movilidad relativa a los de los quesos Cheddar y Gouda (Marcos *et al.*, 1978a) y en los ferogramas se presentan siempre a nivel de las γ -caseínas de la leche de vaca recién coagulada. Es posible que se formen también por la acción de las enzimas proteolíticas microbianas sobre la beta caseína, debido a que en los quesos Emmental y Gruyère y en los madurados por hongos internos (Roquefort hecho con leche de vaca, Danabluu y Edelpilzkäse) se acumulan en mayor cantidad de la que es de esperar de la acción exclusiva de la proteasa alcalina (Marcos *et al.*, 1978a).

En los ferogramas de los quesos fabricados con leche de oveja (figura 1 b) se aprecian tres α_s -caseínas, de menor migración que las bovinas. La α_{s1} -caseína es la de mayor migración y la menos abundante. En situación pre- α_s se encuentran tres productos de degradación de la α_s -caseína. Los de mayor movilidad e intensidad proceden probablemente de la α_{s2} - y α_{s3} -caseína. En la región de la beta-caseína sólo se observa una banda única amplia que puede estar constituida por β_1 - y β_2 -caseína (Creamer, 1975) y en la región de la gamma-caseína se observan cinco productos de degradación de la beta-caseína (con diferente movilidad relativa que los que aparecen en los quesos de vaca), posiblemente constituidos por secuencias apolares de la porción C-terminal de la molécula de beta-caseína (equivalentes a las caseínas minoritarias bovinas), ya que también se ha detectado actividad proteasa-alcalina en la leche de oveja (Carini y Todesco, 1974).

Proporciones relativas de las caseínas y de sus productos de degradación.

En el cuadro II figuran las proporciones relativas de los componentes presentes en las cuatro regiones electroforéticas delimitadas por las líneas discontinuas de la figura 1.

En el queso de Cabrales, intensamente madurado por hongos internos, las caseínas se encuentran totalmente hidrolizadas en forma de compuestos de bajo peso molecular (inferior a unos 10.000 - 12.000 daltons) que no precipitan en el gel (cuadro II). Duplicando el volumen de muestra aplicada, en el ferograma sólo se aprecian tenues bandas correspondientes a la beta-caseína y sus primeros productos de degradación (lámina I).

CUADRO II. Proporciones relativas de alfa_s- y beta-caseína y de sus respectivos primeros productos de degradación, en algunas variedades de quesos.

Queso de	PORCENTAJE DEL TOTAL			
	Productos degradación Alfa _s -caseína	A _s -caseína	Beta-caseína	Productos degradación Beta-caseína
San Simón	19,32	17,61	30,88	32,19
Ulloa	15,29	15,71	44,56	24,42
Tetilla	13,62	16,62	41,96	27,79
Cádiz	16,67	15,54	40,11	27,68
Burgos	7,09	32,48	34,06	26,38
Villalón	2,19	29,93	31,39	36,50
Almería	5,38	26,89	39,61	28,12
Cabrales	0,00	00,00	00,00	00,00
Santander	2,89	19,05	49,70	28,27
Fuerteventura	11,98	13,91	51,30	22,75
Roncal	8,60	12,22	38,46	40,72
Idiazábal	14,02	15,02	45,08	25,88

En los quesos frescos de Burgos y Villalón la relación α_s/β se encuentra muy próxima a la unidad, mientras que en las restantes variedades la α_s -caseína aparece más extensamente degradada que la β -caseína. La relación α_s/β oscila desde 0,7 hasta 0,3.

A pesar de que en general la α_s -caseína se encuentra más degradada que la β -caseína, la proporción relativa de los productos de degradación de la β -caseína es muy inferior a la de productos de degradación de la α_s -caseína, debido a la mayor resistencia de los últimos a la ulterior hidrólisis enzimática.

Correlaciones estadísticas.

Desde hace tiempo se sabe que en la mayor parte de las variedades de quesos duros y semiduros de pH bajo, madurados por bacterias, la β -caseína es más resistente a la hidrólisis enzimática que la α_s -caseína. En solución de caseinato sódico y en los quesos de vaca Cheddar y Gouda se ha comprobado que la hidrólisis de la β -caseína por la acción de la renina se reduce, sin ser afectada la de α_s -caseína, con el aumento de la concentración de cloruro sódico y con la disminución de la actividad del agua (Creamer, 1970, 1971; Phelan *et al.*, 1973).

Disponiendo de información relativa al agua, sal, cenizas y a_w de este mismo conjunto de quesos (Esteban *et al.*, 1979) se han hallado las correlaciones existentes entre algunos valores composicionales y físicos con los datos del presente trabajo, relativos a la proteólisis.

Entre la concentración del cloruro sódico o de los minerales totales en la fase acuosa del queso y el grado de hidrólisis de las caseínas no se han encontrado correlaciones estadísticamente significativas, debido posiblemente a que el efecto de la sal queda enmascarado por otros factores ampliamente variables en las muestras.

Entre la a_w y la suma de los porcentajes de α_s -y β -caseína residuales existe en cambio una correlación positiva altamente significativa ($r = 0,82$ ***), siendo muy significativa la existente con el porcentaje de α_s -caseína residual ($r = 0,73$ **), y significativa la que hay con el porcentaje de β -caseína ($r = 0,66$ *). Esta relación positiva no indica que cuanto menor es la actividad del agua tanto mayor es la proteólisis de las caseínas; hecho que estaría en contradicción con las observaciones de Creamer (1970, 1971) y Phelan *et al.* (1973), sino que indica que a mayor proteólisis tanto más bajo es el valor a_w como consecuencia de la reducción de la presión de vapor del agua causada por los productos de bajo peso molecular resultantes de la proteólisis.

En el queso Emmental en curso de maduración, Rüegg y Blanc (1977) hallaron la existencia de una correlación negativa altamente significativa entre la actividad del agua y el nitrógeno no proteico. Marsilla (1978) ha encontrado en el queso de la Serena maduro una correlación negativa altamente significativa entre la a_w y el nitrógeno amínico (N del formol), y Marcos *et al.* (1978c) hallaron en el queso

manchego comercial una relación también negativa y altamente significativa entre la a_w y los aminoácidos libres totales.

Puesto que Vakaleris y Price (1959) observaron en el queso Cheddar una correlación positiva altamente significativa entre el contenido de tirosina y de triptófano solubles con el nitrógeno soluble total, procedimos a determinar la correlación existente entre la a_w y el triptófano soluble (en la fase acuosa de los quesos) y encontramos una relación negativa altamente significativa ($r = -0,96^{***}$), que confirma la interpretación de que cuanto mayor es la hidrólisis de las caseínas tanto mayor es la reducción del valor a_w y no a la inversa.

Como era de esperar, el triptófano soluble resultó estar negativamente relacionado con la suma de los porcentajes de la alfa_s-y beta-caseína residuales ($r = -0,92^{***}$), con el porcentaje de beta-caseína ($r = -0,82^{***}$) y con el porcentaje de alfa_s-caseína residual ($r = -0,70^{**}$). Es extraño que el nivel de significación del triptófano soluble con la beta-caseína sea mayor que con la alfa_s-caseína, ya que la beta-caseína se degrada menos que la alfa_s-caseína, contiene la mitad de triptófano y el único residuo de triptófano de la beta-caseína se encuentra en posición 143 quedando por tanto retenido en las gammas-caseínas insolubles, relativamente resistentes a la ulterior hidrólisis. La alfa_s-caseína, en cambio, se hidrolizan en mayor cuantía, posee dos restos de triptófano por molécula y tiene muchos más enlaces sensibles a la hidrólisis por la acción de la renina (Pellissier *et al.* 1974); además son fácilmente reducidos a sustancias solubles sus primeros productos de degradación (a excepción del alfa_s 1-I).

R e s u m e n .

Se ha determinado la extensión de la proteólisis en 12 variedades de quesos españoles, de tipo muy diverso, por medida espectrofotométrica de las concentraciones de tirosina y triptófano solubles. También se han cuantificado las proporciones relativas de las principales caseínas y de sus respectivos primeros productos de degradación, previa separación por electroforesis en gel de poliacrilamida. Se ha encontrado que el triptófano soluble está positivamente relacionado con la degradación de las caseínas y negativamente relacionado con la actividad del agua de los quesos, a consecuencia de la reducción de la presión de vapor del agua por las sustancias solubles de bajo peso molecular resultantes de la proteólisis.

S u m m a r y .

The extent of cheese ripening has been estimated in 12 Spanish cheese varieties by measuring spectrophotometrically the concentration of soluble tyrosine and soluble tryptophane. By a quantitative disc electrophoretique technique we have also estimated the relative proportions of the main caseins and their respective first degradation products.

The soluble tryptophane concentration in the cheeses showed a positive relationship to the water activity of the cheeses, due to the drop of the water vapor pressure caused by the soluble compounds of low molecular weight released by proteolysis.

Bibliografía.

- Abd El-Salam, M. H. y S. el-Shibiny, 1972.—Changes in proteins of Domiati cheese during pickling. *J. Dairy Res.*, 39: 219.
- Barreto, J. 1978.—Componentes nitrogenados del queso de Fuerteventura. Tesina de licenciatura. Fac. Vet. Univ. Córdoba (España).
- Carini, S. y R. Todesco, 1974.—The proteolytic system of ewes' milk. *Ind. Latte*, 10: 13.
- Creamer, L. K. 1970.—Protein breakdown in Gouda Cheese. *N. Z. J. Dairy Sci. Technol.*, 5: 152.
- 1971.—Beta-casein hydrolysis in Cheddar cheese ripening. *N. Z. J. Dairy Sci. Technol.*, 6: 91.
- 1975a.—Beta-casein degradation in Gouda and Cheddar cheese. *J. Dairy Sci.*, 58: 287.
- 1975b.—Comunicación personal.
- 1976.—A further study of the action of rennin on beta-casein. *N. Z. J. Dairy Sci., Technol.*, 11: 30.
- Creamer, L. K.; E. Mills y E. L. Richards, 1971.—The action of rennets on the caseins. I. Rennin action on beta-casein-B in solution. *J. Dairy Res.*, 38: 269.
- Creamer, L. K. y B. C. Richardson, 1974.—Identification of the primary degradation product of α_{s1} -casein in Cheddar cheese. *N. Z. J. Dairy Sci., Technol.* 9: 9.
- El-Shibiny, S. y M. H. Abd El-Salam, 1976.—A quantitative disc electrophoretic technique to follow protein breakdown in cheese. *Milchwissenschaft*, 31: 80.
- Esteban, M.^a A.; J. Fernández-Salguero; F. León y A. Marcos, 1978.—Actividad del agua y pH del agua de algunos quesos españoles. *Arch. zotec.*, 28: 21.
- Fernández-Salguero, J. 1975.—Composición química y cambios de los compuestos nitrogenados durante la maduración del queso de los Pedroches. Tesis doctoral. Univ. Córdoba (España).

- Fernández-Salguero, J.; J. Barreto y B. A. Marsilla, 1978.--Datos no publicados.
- Fernández-Salguero, J. y A. Marcos, 1977.--Fracciones nitrogenadas y aminoácidos libres del queso de los Pedroches. *Trab. Cient. Univ. Córdoba (España)*, núm. 13.
- Fox, P. F. y J. Guiney, 1973.--Casein micelle structure: susceptibility of various caseins system to proteolysis. *J. Dairy Res.*, 40: 229.
- Hill, R. D., E. Lahav y D. Givol, 1974.--A rennin-sensitive bond in alfa_{s1}-B-casein. *J. Dairy Res.*, 41: 147.
- León, F.; M.^a A. Esteban; J. Fernández-Salguero y A. Marcos, 1978.--Estudio electroforético del queso de bola. En preparación.
- Marcos, A.; M.^a A. Esteban y J. Fernández-Salguero, 1976.--Influencia de diversos factores químicos y físicos en la proteólisis de las caseínas del queso. *Arch. zootec.*, 25: 73.
- Marcos, A.; M.^a Esteban; F. León y J. Fernández-Salguero, 1978a.--Electrophoretic patterns of some European cheeses: A comparative study. *J. Dairy Sci.* (enviado para su publicación).
- Marcos, A.; J. Fernández-Salguero y M.^a A. Esteban, 1978b.--Hidrólisis relativa de las caseínas del queso manchego maduro y primeros productos su degradación proteolítica. *Arch. zootec.*, 27: 341.
- Marcos, A.; J. Fernández-Salguero; M.^a T. Mora; M.^a A. Esteban y F. León, 1978c.--Aminoácidos libres del queso manchego. *Arch. zootec.*, 28: 29.
- Marsilla, B. A. 1978.--Principales componentes químicos y parámetros físicos del queso de la Serena. Tesis de licenciatura. *Fac. Vet. Univ. Córdoba (España)*.
- Millán, R. 1978.--Datos no publicados. *Fac. Vet. Univ. Córdoba (España)*.
- Mora, M.^a T. 1978.--Datos no publicados. *Fac. Vet. Univ. Córdoba (España)*.
- Ordóñez, J. A. 1974.--Microbiología y bioquímica del queso tipo Ulloa y preparación de un fermento para su elaboración a partir de leche pasteurizada. Tesis doctoral. *Univ. Oviedo*.
- Pellissier, J. P.; J. C. Mercier y B. Ribadeau Dumas, 1974.--Etude de la protéolyse des cséines alfa_{s1} et beta bovines par la présure. *Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys.*, 14343.
- Phelan, J. A.; J. Guiney y P. Fox, 1973.--Proteolysis of beta-casein in Cheddar Cheese. *J. Dairy Res.*, 40: 103.

- Ramos, e I. Martínez-Castro, 1976.--Etude de la protéolyse du fromage type Manchego au cours de l'affinage. *Lait*, 56: 164.
- Ramos, M.; I. Martínez-Castro y M. Juárez, 1977.--Detection of cow's milk in Manchego cheese. *J. Dairy Sci.*, 60: 870.
- Resmini, P.; S. Sarachi, C. Pazzaglia y G. De Bernardi, 1976.--Struttura primaria del primo peptide ad alta mobilità electtroforetica (α_{s1} -I) che si forma nella maturazione dei fromaggi. *Sci.Tecn. Lattiero-Casearia*, 27: 7.
- Rüegg, M. y B. Blanc, 1977.--Beziehungen zwischen Wasseraktivität, Wasersorptionsvermögen und Zusammensetzung von Käse. *Milchiswissenschaft*, 32: 193.
- Vakaleris, D. G. y W. V. Price, 1959.--A rapid spectrophotometric method for measuring cheese ripening. *J. Dairy Sci.*, 42: 264.
- Vissser, F. M. W. 1977.--Contribution of enzymes from rennet, starter bacteria and milk to proteolysis and flavour development in Gouda cheese. IV Protein breakdown: A gel electrophoretical study. *Nether. Milk Dairy J.*, 31: 247.