

ELECTROFORESIS CUANTITATIVA DEL QUESO DE BOLA.

(QUANTITATIVE ELETROPHORESIS OF BOLA CHEESE).

por

M. A. ESTEBAN, A. MARCOS, J. FERNANDEZ-SALGUERO Y F. LEON*

En diferentes publicaciones anteriores hemos ofrecido información relativa a la proteólisis de las principales variedades de quesos típicamente españoles, así como de muchas variedades extranjeras importadas para la venta en nuestro país (Marcos *et al.*, 1976a-c, 1977, 1978b y 1979a-d; Fernández-Salguero y Marcos, 1977, Barreto, 1978, Marsilla, 1978; Fernández-Salguero *et al.*, 1978).

El tipo de queso extranjero de mayor volumen de producción y consumo nacional es el queso de bola, variedad de origen holandés similar al queso Edam. Del queso de bola hemos obtenido información sobre algunas características físicas y químicas relacionadas con su estabilidad antimicrobiana y su posible relación con la hidrólisis relativa de las principales caseínas (Marcos *et al.*, 1979c). Seguidamente ofrecemos algunos datos sobre la extensión y tipo de proteólisis de las mismas muestras de queso de bola comercial.

Material y métodos.

Muestras de queso. En el comercio se adquirieron 12 muestras de diferentes quesos de bola cuya pasta comestible se trituró con picadora Moulinex y se guardó en frascos herméticos mantenidos en congelación a -24° C.

Medidas de la extensión de la proteólisis.

Se utilizó el método espectrofotométrico de Vakaleris y Price (1959). La absorbancia a 270 nm y 290 nm de los extractos de las muestras de queso, en ácido clorhídrico-citrato sódico de pH $4,4 \pm 0,05$, se midió con espectrofotómetro Beckman DB-G y seguidamente se calcularon las concentraciones de tirosina y de triptófano solubles mediante las ecuaciones correspondientes.

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

Electroforesis cuantitativa en gel de poliacrilamida.

En la separación y cuantificación de las caseínas y sus primeros productos de degradación insolubles se siguió la técnica electroforética de El-Shibiny y Abd El-Salam (1976). La separación electroforética se realizó con un aparato Canalco modelo 1.200, como se ha descrito anteriormente (Marcos *et al.*, 1976a). A las columnas de gel se aplicaron alícuotas de 10 μ l de la fase acuosa clara obtenida después de disolver 100 mg de queso en 0,5 ml de solución de urea 8 M.

Después de la separación electroforética los geles se tiñeron con negro amido B 10 y se eliminó el colorante de fondo con decolorador rápido de geles Canalco.

Para determinar la densidad óptica de las bandas teñidas presentes en las diferentes regiones electroforéticas los geles se cortaron en segmentos, como indica la figura 1, se trituraron por separado en tubos cónicos de centrífuga y el colorante se extrajo cuantitativamente a 100° C durante 2 min. con 3 ml de solución de carbonato sódico al 2 p. 100. Después de centrifugar, la absorbancia de los extractos se midió a 650 nm con espectrofotómetro Bausch and Lomb mod. Spectronic 70.

Resultados y discusión.

Riqueza de los quesos en tirosina y triptófano solubles.

La cantidad de tirosina y de triptófano solubles se considera generalmente como un índice de maduración (Vakaleris y Price, 1959). La concentración de tirosina y de triptófano solubles de las muestras de queso de bola se muestra en el cuadro I. Como puede verse ambos valores varían ampliamente de una muestra a otras. La tirosina oscila entre 335 y 51 mg/100 g de queso; y el triptófano, entre 261 y 61 mg/100 g de queso. En todas las muestras, menos en una, se observa un claro predominio de la tirosina sobre el triptófano. Los valores medios correspondientes son 200 y 111 mg/100 g de queso.

Mayores cantidades de tirosina soluble que de triptófano soluble se han observado en el queso Cheddar (Vakaleris y Price, 1959) y en la mayor parte de las variedades de quesos españoles y europeos (Fernández-Salguero, 1975; Fernández-Salguero y Marcos, 1977; Barreto, 1978; Marcos *et al.*, 1979 a y d; Fernández-Salguero *et al.*, 1978). Esto es lógico dado que la caseína entera es más rica en tirosina que en triptófano. Sin embargo, también se ha observado el predominio constante del triptófano sobre la tirosina durante la maduración del queso Domiati (Abd El-Salm y El-Shibiny, 1972).

Imágenes electroforéticas y principales componentes.

En la lámina I se muestran los ferogramas en gel de poliacrilamida, a pH alcalino, de las caseínas de los quesos de bola y de sus primeros productos de degradación insolubles. Es evidente que las diferentes muestras exhiben un cuadro electroforético básico idéntico en lo que respecta al número y movilidad electroforética relativa de los principales componentes, si bien en algunas muestras ciertos componentes minoritarios se encuentran enmascarados por los mayoritarios o no son detectables a consecuencia de su baja concentración o de su degradación. El cuadro electroforético básico del queso de bola se representa esquemáticamente en la figura 1.

Proporciones relativas de las principales caseínas y de sus primeros productos de degradación insolubles.

Evidentemente existen amplias diferencias en los ferogramas (lámina I) en lo que se refiere tanto a la extensión de la maduración de las diferentes muestras de queso como a las proporciones relativas de las principales caseínas y sus primeros productos de degradación insolubles. En los ferogramas de la izquierda de la lámina I (muestras 1 y 2) la extensión de la proteólisis es mucho mayor que en los ferogramas de la derecha (muestras 8-11); en los primeros sólo quedan pequeñas cantidades de α_{s1} - y beta-caseína intactas e incluso el producto de degradación α_{s1} - (y el subproducto designado α_{s1} -II) ha sido en gran parte hidrolizado a compuestos solubles. También es claramente evidente que en general la α_{s1} -caseína aparece mucho más degradada que la beta-caseína, como suele ocurrir en la mayor parte de los quesos duros y semiduros de pH bajo (Lindqvist y Storgards, 1957). En todas las muestras la γ_1 -caseína es el producto de degradación más abundante de la beta-caseína.

Los porcentajes de la densidad óptica total de los geles teñidos que corresponden a los componentes presentes en las diferentes regiones electroforéticas de la figura 1 se indican en el cuadro II. Las proporciones relativas reales de dichos componentes no coinciden con los expresados porcentajes, debido a que difieren en la capacidad para fijar el colorante (El-Shibiny y El-Salam, 1976).

Los datos cuantitativos del cuadro II confirman sin embargo que, en general, la α_{s1} -caseína se ha hidrolizado mucho más que la beta-caseína. Por término medio, la α_{s1} -caseína residual sólo supone el 7 p. 100 de la densidad óptica total y todas las α_s -caseínas el 23 p. 100, mientras que la beta-caseína alcanza el 26 p. 100; en la caseína entera bovina las proporciones correspondientes son del 41 p. 100 y del 31 p. 100, respectivamente (Marcos *et al.*, 1979a). La variabilidad en la extensión de la hidrólisis de la beta-caseína es mucho mayor que la de los restantes com-

ponentes. Aunque la extensión de la hidrólisis de la α_{s1} - y de las demás α_s -caseínas es mayor que la de la beta-caseína, el porcentaje relativo de productos de degradación de las α_s -caseínas (α_{s1} -I y II) es menor que el de productos de degradación de la beta-caseína (gamma-caseínas). Esto se debe probablemente a diferencias en la capacidad para fijar colorante y a la mayor sensibilidad de los productos de degradación de las α_s -caseínas a la ulterior hidrólisis a productos solubles.

En casi todas las muestras de queso el principal producto de degradación de la beta-caseína es la γ_1 -caseína; y el menos abundante, la γ_2 -caseína.

Entre la fracción de la α_s -caseína y sus primeros productos de degradación insolubles no hemos encontrado correlaciones estadísticamente significativas, lo que sugiere la rápida hidrólisis de la α_s -caseína y/o sus primeros productos de degradación a péptidos solubles de bajo peso molecular. Sin embargo, los coeficientes de correlación son inversos y altamente significativos, entre beta-caseína y gamma-caseína entera ($r = -0,97^{***}$), γ_1 -caseína ($r = -0,86^{***}$), γ_2 -caseína ($r = -0,96^{***}$) y γ_3 -caseína ($r = -0,87^{***}$); hecho que corrobora que, en el queso, los componentes de la gamma-caseína proceden de la hidrólisis de la beta-caseína y que son relativamente estables a la ulterior proteólisis.

Relación entre los datos espectrofotométricos y los electroforéticos.

En un amplio grupo de diferentes variedades de quesos europeos encontramos que las concentraciones de tirosina soluble y triptófano soluble estaban directamente relacionadas con la hidrólisis de la beta-caseína y con los porcentajes de algunos de sus productos de degradación (γ_2 - y γ_3 -caseína). No estaban relacionadas con la proteólisis de la α_s -caseína ni con sus productos de degradación insolubles o con la γ_1 -caseína. Las relaciones observadas eran explicables, en el caso de la tirosina soluble, basándose en las estructuras primarias de las caseínas y de sus primeros productos de degradación solubles e insolubles. (Marcos *et al.*, 1979).

En el curso de la maduración del queso manchego se ha encontrado, sin embargo (Mora, 1979) una relación inversa entre la tirosina soluble y el triptófano soluble, con el porcentaje de α_s -caseína residual; y una relación directa con sus productos de degradación insolubles, así como con la gamma-caseína entera. Estas correlaciones resultan lógicas si se tiene en cuenta: (a) la proporción relativa inicial de α_s -caseína, mayor que la de beta-caseína; (b) que la α_s -caseína y sus primeros productos de degradación resultan más extensamente hidrolizados que la beta-caseína y la gamma-caseína entera; y (c) que la molécula de α_{s1} -caseína posee doble número de residuos, tanto de tirosina como de triptófano, y muchos más enlaces sensibles a la hidrólisis que la beta-caseína.

En el conjunto de muestras de queso de bola objeto del presente estudio no se han encontrado, sin embargo, correlaciones estadísticamente significativas entre las correlaciones de tirosina y de triptófano solubles y las proporciones relativas de las caseínas y primeros productos de degradación insolubles.

Relación de datos electroforéticos y diversas características físicas y químicas relacionadas con la proteólisis relativa de las principales caseínas.

El agua del queso, la concentración de proteína, sal, calcio, fósforo, cenizas totales y los valores a_w y pH son factores que afectan a la hidrólisis relativa de la alfa_s y beta-caseína (Creamer, 1970, 1971; Fox y Walley, 1971; Phelan *et al.*, 1973; Marcos *et al.*, 1976a, 1978a, 1979b). En los quesos de los Pedroches y de la Serena, fabricados con leche de oveja y con cuajo vegetal, la concentración de cenizas totales es el factor más significativamente relacionado con la proteólisis relativa de las principales caseínas (Marcos *et al.*, 1976a, 1978a, 1979b). En los quesos de bola objeto del presente estudio los cocientes cenizas/humedad no influyen, sin embargo, en la proteólisis relativa, debido a que afectan por igual a la hidrólisis de la alfa_s y de la beta-caseína (Marcos *et al.*, 1979c). Lo mismo ocurre con la concentración de ClNa (en g/100 g H₂O), y de agua (en g/100 g queso), así como con la actividad del agua (a_w). El pH del queso de bola, en cambio, está relacionado positivamente, a nivel altamente significativo ($r = 0,84^{***}$), con la hidrólisis relativa de las caseínas (relación alfa_s/beta), por influir en la hidrólisis de la beta-caseína ($r = -0,72^{**}$), sin estar relacionado significativamente con la degradación de la alfa_s-caseína. En el queso de bola la hidrólisis de la beta-caseína es tanto mayor cuanto más elevado es el valor pH, sin que éste influya significativamente en la hidrólisis de la alfa_s-caseína.

Resumen.

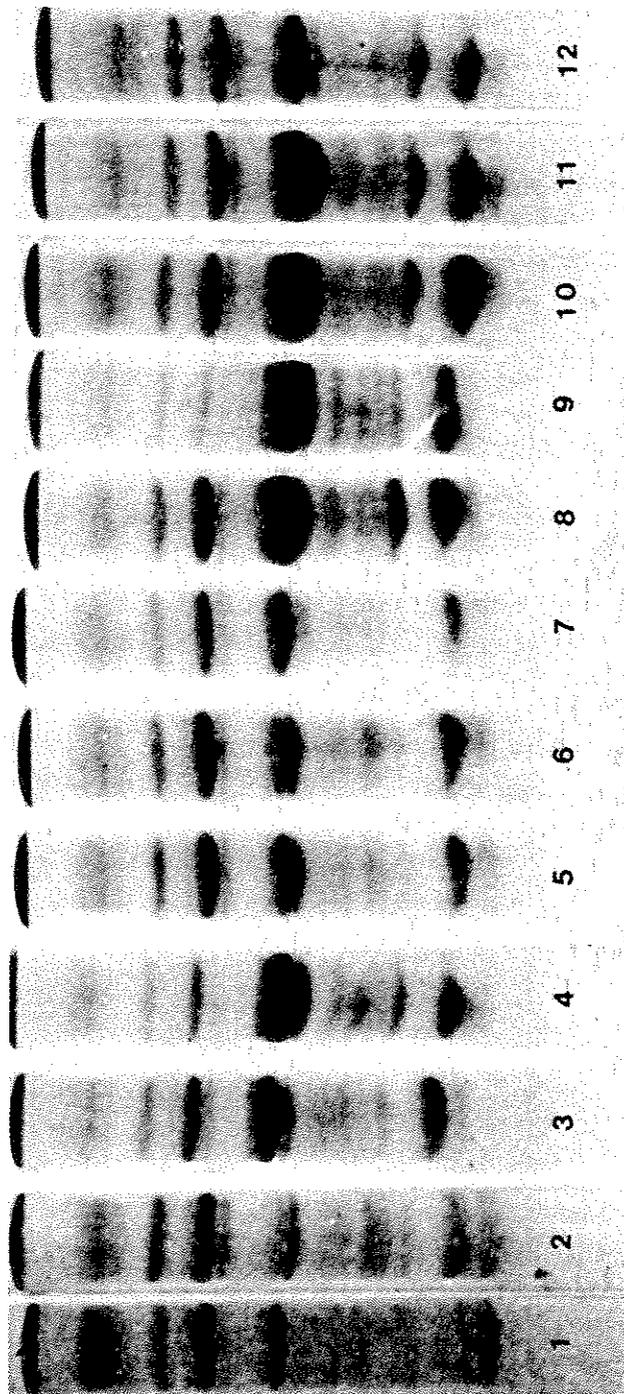
Sobre 12 muestras de queso de bola comercial se han estudiado la extensión y el tipo de proteólisis, combinando la electroforesis cuantitativa en gel de poliacrilamida con la medida espectrofotométrica de la tirosina y triptófano solubles.

Summary.

The extent of cheese ripening and the type of proteolysis have been studied on 12 samples of commercial bola cheese by combining quantitative PAGE electrophoresis and the spectrophotometric measurement of soluble tyrosine and soluble tryptophane.

Bibliografía.

- Abd El-Salam, M. H. y S. El-Shibiny, 1972.--*J. Dairy Res.*, 39: 219.
- Barreto, J., 1978.--*Tesina de licenciatura. Fac. Veter. Univ. Córdoba (España).*
- Creamer, L. K., 1970.--*N. Z. J. Dairy Sci. Technol.*, 5: 152.
- Creamer, L. K., 1971.--*N. Z. J. Dairy Sci., Technol.*, 6: 91.
- El-Shibiny, S. y M. H. Abd El-Salam, 1976.--*Milchwissenschaft*, 31: 80.
- Fernández-Salguero, J., J. Barreto y B. A. Marsilla, 1978.--*Arch. zootec.*, 27: 365.
- Fernández-Salguero, J. y A. Marcos, 1977.--*Trab. Cient. Univ. Córdoba (España). Núm. 13.*
- Fox, P. F. y B. F. Walley, 1971.--*J. Dairy Res.*, 38: 165.
- Lindqvist, B. y T. Storgards, 1957.--*Milchwissenschaft*, 12: 462.
- Marcos, A., M. A. Esteban y J. Fernández-Salguero, 1976a.--*Arch. zootec.*, 25: 75.
- Marcos, A., M. A. Esteban y J. Fernández-Salguero, 1978a.--*Arch. zootec.*, 27: 285.
- Marcos, A., M. A. Esteban y J. Fernández-Salguero, 1977.--*Trab. Cient. Univ. Córdoba (España) Núm. 15.*
- Marcos, A., M. A. Esteban, J. Fernández-Salguero, M. T. Mora y R. Millán, 1976b.--*Anal. Bromatol.*, 28: 57.
- Marcos, A., M. A. Esteban, J. Fernández-Salguero, M. T. Mora y R. Millán, 1976b.--*Anal. Bromatol.*, 28: 69.
- Marcos, A., M. A. Esteban, F. León y J. Fernández-Salguero, 1979a.--*J. Dairy Sci.*, 62: 892.
- Marcos, A., J. Fernández-Salguero y M. A. Esteban, 1978b.--*Arch. zootec.*, 27: 341.
- Marcos, A., J. Fernández-Salguero y M. A. Esteban, 1979b.--*Anal. Bromatol.*, 31: 91.
- Marcos, A., J. Fernández-Salguero, M. A. Esteban y F. León, 1979c.--*J. Dairy Sci.*, 62: 392.
- Marcos, A., F. León, J. Fernández-Salguero y M. A. Esteban, 1979d.--*Arch. zootec.*, 28: 123.
- Marsilla, B. A., 1978.--*Tesina de licenciatura. Fac. Veter. Univ. Córdoba (España).*
- Mora, M. T., 1979.--*Tesis doctoral. Univ. Córdoba (España).*
- Phelan, J. A., J. Guiney y P. F. Fox, 1973.--*J. Dairy Res.*, 40: 105.
- Vakaleris, D. G. y W. V. Price, 1959.--*J. Dairy Sci.*, 42: 264.



LAMINA I. Electroferogramas en gel de poliacrilamida a pH alcalino, de diferentes muestras de quesos de bola comerciales.

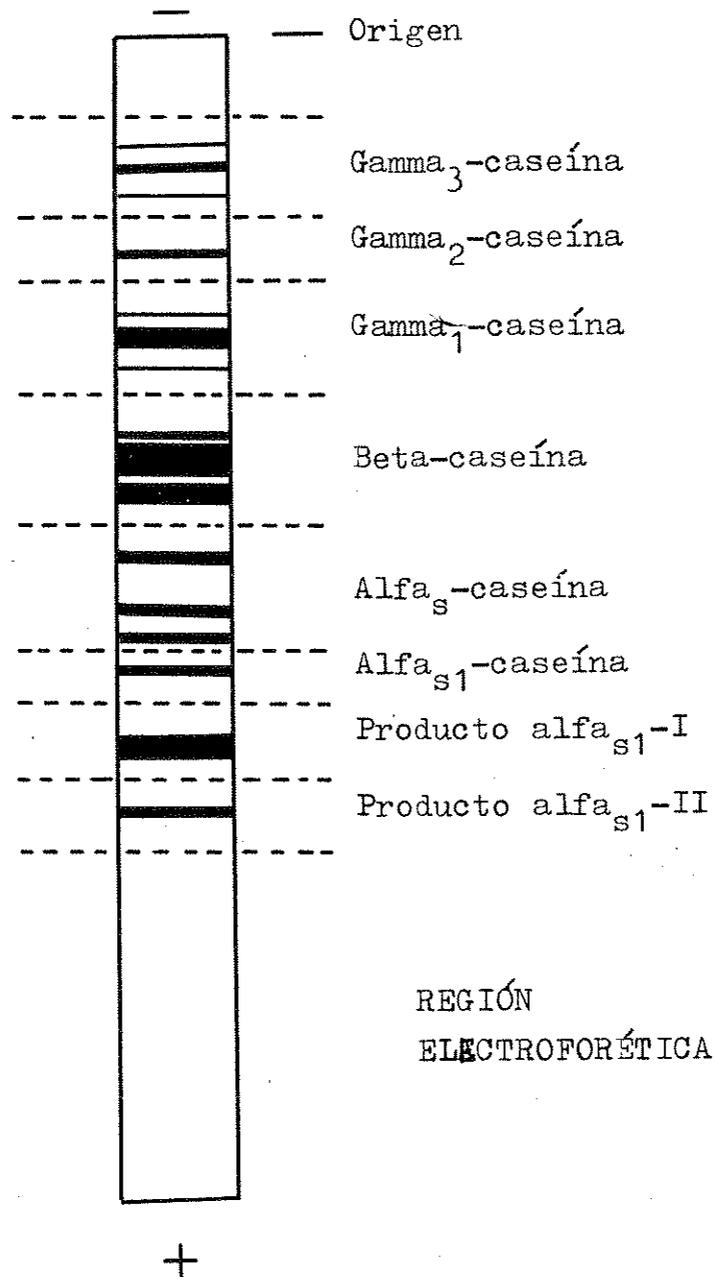


FIGURA 1. Cuadro electroforético básico de las principales caseínas y primeros productos de degradación insolubles del queso de bola comercial, en el que se indica la posición relativa de los componentes separados. Las líneas discontinuas delimitan las regiones electroforéticas objeto de cuantificación.

CUADRO I. Concentración de tirosina y triptófano solubles (mg/100 g queso).

Muestra número	Tirosina soluble	Triptófano soluble
1	335	162
2	270	115
3	150	97
4	153	78
5	223	96
6	247	105
7	150	108
8	174	77
9	317	69
10	162	61
11	166	99
12	51	261
\bar{x}	200	111
s	81	54

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

Muestra número	Porcentaje de la densidad óptica total							
	Alfa _{s1} -II	Alfa _{s1} -I	Alfa _{s1}	Alfa _s	Beta	Gamma ₁	Gamma ₂	Gamma ₃
1	9	8	13	12	12	17	9	21
2	8	10	5	18	12	22	9	16
3	6	13	5	16	24	17	7	12
4	6	11	7	17	35	11	4	9
5	6	13	4	19	18	20	8	12
6	6	13	6	17	19	20	8	11
7	5	12	6	18	22	18	7	12
8	5	12	9	15	34	14	4	7
9	3	14	6	18	41	8	4	6
10	5	7	7	14	37	15	5	10
11	3	12	6	16	34	15	6	8
12	5	12	8	15	23	18	7	12
\bar{x}	6	11	7	16	26	16	7	11
s	2	2	2	2	10	4	2	4