

UNIVERSITAT AUTONÒMA DE BARCELONA
UNITAT DE TECNOLOGIA DELS ALIMENTS

TESIS DOCTORAL

*PROCESOS DE PROTEOLISIS PRIMARIA QUE
INTERVIENEN EN LA MADURACION DEL QUESO
DE CABRA*

ANTONIO JOSE TRUJILLO MESA
Bellaterra, 1996

Departament de Patologia i Producció Animals
Facultat de Veterinària
Universitat Autònoma de Barcelona

***PROCESOS DE PROTEOLISIS PRIMARIA QUE
INTERVIENEN EN LA MADURACION DEL QUESO
DE CABRA***

Memoria presentada para optar al grado de doctor en Veterinaria.

Dirigida por:

DRA. CARMEN CARRETERO ROMAY

Presentada por:

ANTONIO JOSE TRUJILLO MESA

Bellaterra, enero 1996.

UAB
Universitat Autònoma de Barcelona

Biblioteca General
Edifici A
08193 Bellaterra (Barcelona) Espanya

CARMEN CARRETERO ROMAY, Profesora Titular de Tecnología de los Alimentos en el Departamento de la E.Q.T.A. de la *Universitat de Girona*,

HACE CONSTAR: que el licenciado en Veterinaria Antonio José Trujillo Mesa ha realizado bajo su dirección, en la Unidad de Tecnología de los Alimentos de la *Facultat de Veterinària* de la U.A.B., el trabajo titulado "Procesos de proteolisis primaria que intervienen en la maduración del queso de cabra", que presenta para optar al grado de Doctor.

Y para que así conste firmo el presente documento en Bellaterra, a dieciseis de enero de mil novecientos noventa y seis.

VºBº El Tutor



Dra. Carmen Carretero Romay

Facultat de Veterinària

Dra. Victoria Ferragut

Profesora Titular de Tecnología
de los Alimentos

| | |
|--------------|----------|
| Data | 16.01.96 |
| Entrada núm. | 99 |
| Sortida núm. | 12 |

A mis padres y a mi hermana

A ti Isabel

Quiero expresar mi agradecimiento a la Dra. Carmen Carretero Romay, directora de la presente Tesis, por el apoyo, dedicación, libertad y disponibilidad que me ha otorgado para realizar este trabajo.

Agradezco al Dr. Buenaventura Guamis, la ayuda que en todo momento me ha ofrecido.

A Viky por soportar mis cambios de humor, tener chicles y ser una "supertutora".

Del mismo modo quiero expresar mi agradecimiento a todos los compañeros de la *Unitat de Tecnologia dels Aliments* (incluidos los nuevos fichajes!).

Je remercie toutes les personnes du "labo" de chez Mr. Vassal et Mr. Gripon, notamment Mme. Delacroix, ma directrice de mon travail, ainsi que les stagiers qui m'ont facilité mon séjour à Paris.

A la CIRIT per concedir-me les Beques i Ajuts que han fet possible aquesta tesi.

A Roser por dedicarme su valioso tiempo en el analizador de imágenes.

A Gabi, José María, José María (St. Boi), Xavi, Juan Luis, JuanMa, Celia, Juliette, Mar, Marta, Laura y otros coleguillas de batallas, por aguantarme día a día.

INDICE

| | |
|--|----|
| INTRODUCCION Y OBJETIVOS | 1 |
| CAPITULO I. REVISION BIBLIOGRAFICA | 7 |
| I.1. LA LECHE DE CABRA | 9 |
| I.1.1. COMPOSICION GLOBAL | 9 |
| I.1.2. LAS PROTEINAS DE LECHE DE CABRA | 10 |
| I.1.2.1. Proteínas séricas | 10 |
| I.1.2.2. Caseínas | 11 |
| I.1.3. EL POLIMORFISMO GENETICO DE LAS CASEINAS CAPRINAS | 14 |
| I.1.4. EFECTOS DEL POLIMORFISMO GENETICO DE LA CASEINA α_{S1} CAPRINA SOBRE LA PRODUCCION Y PROPIEDADES DE LA LECHE | 16 |
| I.2. LA FABRICACION DEL QUESO | 16 |
| I.3. FENOMENOS BIOQUIMICOS DURANTE EL PROCESADO Y MADURADO DEL QUESO | 18 |
| I.3.1. GLICOLISIS | 19 |
| I.3.2. LIPOLISIS | 20 |
| I.3.3. PROTEOLISIS | 21 |
| I.3.3.1. Proteolisis en la leche de fabricación | 22 |
| I.3.3.2. La coagulación enzimática de la leche | 23 |
| I.3.3.3. Proteolisis durante el madurado del queso | 24 |
| I.3.3.3.1. Cuajo | 25 |
| I.3.3.3.2. Enzimas endógenos de la leche | 29 |
| I.3.3.3.3. Sistema proteolítico del fermento | 33 |
| I.3.3.3.4. Sistemas proteolíticos de otros microorganismos importantes en el madurado de diferentes variedades de queso. | 35 |
| I.3.3.3.5. Sistema proteolítico de bacterias acidolácticas no pertenecientes al fermento | 36 |
| I.3.3.4. Catabolismo de los aminoácidos | 36 |

| | |
|---|-----------|
| I.3.4. METODOS DE ESTUDIO DE LA PROTEOLISIS DE LAS CASEINAS <i>IN VITRO</i> Y EN QUESO | 37 |
| I.3.5. FABRICACION DE CUAJADAS MODELO | 40 |
| I.3.5.1. Obtención y preparación de la leche de fabricación | 41 |
| I.3.5.2. Fabricación de cuajadas modelo libres de fermento | 43 |
| I.3.5.3. Producción de cuajadas modelo libres de enzimas coagulantes | 44 |
| I.3.5.4. Cuajadas modelo libres de plasmina | 44 |
| I.4. LOS QUESOS DE LECHE DE CABRA | 45 |
| | |
| CAPITULO II. MATERIALES Y METODOS | 49 |
| | |
| II.1. HIDROLISIS DE DIFERENTES SUBSTRATOS CASEINICOS POR LOS ENZIMAS DEL CUAJO Y PLASMINA | 51 |
| II.1.1. PREPARACION DE SUBSTRATOS CASEINICOS | 51 |
| II.1.1.1. Obtención de las caseínas enteras | 51 |
| II.1.1.2. Preparación de la β -Cn caprina | 51 |
| II.1.1.2.1. Preparación a gran escala de fracciones ricas en caseínas β y α_s | 52 |
| II.1.1.2.2. Obtención de β -Cn caprina a partir de las fracciones enriquecidas con DEAE-celulosa mediante un procedimiento discontinuo | 53 |
| II.1.1.2.3. Obtención de α_{s1} -Cn caprina a partir de las fracciones enriquecidas | 54 |
| II.1.1.3. Preparación de las α_{s1} -Cn caprinas variantes genéticas AA y FF | 55 |
| II.1.1.3.1. Preparación a gran escala de fracciones ricas en α_{s1} -Cn AA y FF por cromatografía de intercambio catiónico en <i>batch</i> | 55 |
| II.1.1.3.2. Obtención de las α_{s1} -Cn AA y FF puras en columna de fase reversa preparativa | 56 |
| II.1.1.4. Caracterización de las fracciones proteicas mediante electroforesis y RP-HPLC | 57 |
| II.1.2. ENZIMAS, INHIBIDORES Y SUBSTRATOS COMERCIALES | 58 |
| II.1.3. MEDIDA DE LA ACTIVIDAD COAGULANTE | 60 |

| | |
|---|-----------|
| II.1.4. CONDICIONES DE HIDROLISIS DE LOS SUBSTRATOS CASEINICOS POR LOS ENZIMAS DEL CUAJO | 60 |
| II.1.5. CONDICIONES DE HIDROLISIS DE LOS SUBSTRATOS CASEINICOS POR LA PLASMINA | 61 |
| II.1.6. CONDICIONES DE HIDROLISIS DE LAS CASEINAS POR LA ACCION CONJUNTA DEL CUAJO Y LA PLASMINA | 62 |
| II.1.7. TECNICAS DE ELECTROFORESIS | 63 |
| II.1.8. CARACTERIZACION DE LOS PEPTIDOS SOLUBLES A pH 4.6 PROCEDENTES DE LA HIDROLISIS DE LAS α_{s1} -Cn (A y F) POR RP-HPLC | 64 |
| II.1.8.1. Aislamiento de los péptidos solubles a pH 4.6 | 64 |
| II.1.8.2. Composición aminoacídica | 65 |
| II.1.8.3. Análisis de secuencia aminoacídica | 65 |
| II.2. ESTUDIO DE LA PROTEOLISIS EN QUESO DE CABRA Y EN CUAJADAS MODELO | 66 |
| II.2.1. FABRICACION DE QUESOS DE CABRA DE PASTA PRENSADA NO COCIDA | 66 |
| II.2.2. FABRICACION DE CUAJADAS MODELO | 67 |
| II.2.2.1. Fabricación de cuajadas libres de fermento y coagulante (CLFC) | 67 |
| II.2.2.2. Fabricación de cuajadas libres de fermento (CLF) | 69 |
| II.2.3. TRATAMIENTO DE LAS CUAJADAS MODELO A ALTAS PRESIONES HIDROSTATICAS | 69 |
| II.2.4. COMPOSICION GLOBAL DE LA LECHE DE FABRICACION Y CUAJADA | 69 |
| II.2.5. ANALISIS MICROBIOLÓGICOS DE LA LECHE Y CUAJADA | 71 |
| II.2.6. ESTUDIO DE LA PROTEOLISIS EN CUAJADAS | 71 |
| II.2.7. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD COAGULANTE RESIDUAL EN CUAJADAS | 72 |
| II.2.8. DETERMINACION DE PLASMINA EN CUAJADA | 73 |
| CAPITULO III. HIDROLISIS DE DIFERENTES SUBSTRATOS CASEINICOS POR LOS ENZIMAS DEL CUAJO. RESULTADOS Y DISCUSION. | 77 |
| III.1. PREPARACION DE LA β -CN CAPRINA | 79 |
| III.2. PREPARACION DE LAS α_{s1} -CN A Y F CAPRINAS | 83 |
| III.3. PROTEOLISIS DE LA β -CN CAPRINA POR LOS ENZIMAS DEL CUAJO DE TERNERO | 86 |
| III.3.1. Proteolisis de la β -Cn caprina por el cuajo. Efecto del pH | 87 |

| | |
|---|------------|
| III.3.2. Proteólisis de la β -Cn caprina por la quimosina y pepsina bovinas | 90 |
| III.3.3. Efecto de la concentración de cuajo en la proteólisis de la β -Cn | 91 |
| III.3.4. Efecto del NaCl en la proteólisis de la β -Cn por el cuajo | 92 |
| III.3.5. Efecto del pH en la proteólisis de la β -Cn adicionada del 5% NaCl por el cuajo | 93 |
| III.3.6. Comparación de los productos de hidrólisis de las caseínas β caprina y bovina | 94 |
| III.3.7. Efecto del nivel de fosforilación de la β -Cn al ser hidrolizada por los enzimas del cuajo | 95 |
| III.4. PROTEOLISIS DE LA α_{s1}-CN CAPRINA POR LOS ENZIMAS DEL CUAJO DE TERNERO | 98 |
| III.4.1. Proteólisis de la α_{s1} -Cn por el cuajo. Efecto del pH | 98 |
| III.4.2. Efecto del NaCl en la proteólisis de la α_{s1} -Cn por el cuajo | 100 |
| III.4.3. Efecto del pH en la proteólisis de la α_{s1} -Cn adicionada del 5% NaCl por la acción del cuajo | 101 |
| III.4.4. Proteólisis de la α_{s1} -Cn caprina por el cuajo, quimosina y pepsina bovinas | 102 |
| III.5. PROTEOLISIS DE LAS CASEINAS α_{s1} A y F CAPRINAS POR ACCION DE LOS ENZIMAS DEL CUAJO EN DIFERENTES CONDICIONES IONICAS | 103 |
| III.5.1. Proteólisis de las α_{s1} -Cn A y F por la quimosina | 104 |
| III.5.1.1. Estudio de la fase soluble a pH 4.6 | 105 |
| III.5.1.2. Estudio de la fracción insoluble a pH 4.6 | 108 |
| III.5.2. Proteólisis de la α_{s1} -Cn A por acción de la quimosina en función de las condiciones iónicas del medio reaccionante | 111 |
| III.5.2.1. Estudio de la fracción soluble a pH 4.6 | 111 |
| III.5.2.2. Estudio de la fracción insoluble a pH 4.6 | 112 |
| III.5.3. Proteólisis de la α_{s1} -Cn A por acción de diferentes coagulantes | 113 |
| III.5.3.1. Estudio de la fracción soluble a pH 4.6 | 114 |
| III.5.3.2. Estudio de la fracción insoluble a pH 4.6 | 114 |
| III.5. HIDROLISIS DE LA CASEINA CAPRINA POR LOS ENZIMAS DEL CUAJO | 115 |
| III.5.1. Hidrólisis de la caseína caprina por el cuajo. Efecto del pH | 115 |

| | |
|--|------------|
| III.5.2. Hidrólisis de la caseína bovina por el cuajo y comparación con la caprina | 119 |
| III.5.3. Efecto del NaCl en la proteólisis de la caseína caprina por el cuajo | 119 |
| III.5.4. Efecto de la concentración de cuajo en la proteólisis de la caseína caprina | 120 |
| III.6. HIDROLISIS DE LA CASEINA CAPRINA CONTENIENDO DIFERENTES VARIANTES GENETICAS DE α_{s1}-CN POR LOS ENZIMAS DEL CUAJO | 121 |
| III.6.1. Estudio electroforético de la caseína caprina con diferentes variantes genéticas de α_{s1} -Cn | 121 |
| III.6.2. Hidrólisis de la caseína caprina con diferentes alelos para la α_{s1} -Cn por acción del cuajo | 122 |
| III.7. HIDROLISIS DE LA α_{s2}-CN POR LOS ENZIMAS DEL CUAJO | 123 |
| CAPITULO IV. HIDROLISIS DE DIFERENTES SUBSTRATOS CASEINICOS POR ACCION DE LA PLASMINA. RESULTADOS Y DISCUSION. | 125 |
| IV.1. HIDROLISIS DE LA β-Cn CAPRINA POR ACCION DE LA PLASMINA Y COMPARACION DE LOS PRODUCTOS DE DEGRADACION CON SU HOMOLOGA BOVINA | 127 |
| IV.1.1. Hidrólisis de la β -Cn caprina por la plasmina | 128 |
| IV.1.2. Comparación de la acción de la plasmina sobre las caseínas caprinas y bovinas | 129 |
| IV.1.3. Electroforesis bidimensional de los hidrolizados obtenidos de las β -Cn caprina y bovina por acción de la plasmina | 132 |
| IV.1.4. Hidrólisis de la caseína entera caprina por la plasmina caprina | 135 |
| IV.2. HIDROLISIS DE LA α_{s1}-CN CAPRINA POR LA PLASMINA | 136 |
| IV.2.1. Estudio de la fracción insoluble a pH 4.6 | 136 |
| IV.2.2. Estudio de la fracción soluble a pH 4.6 | 138 |
| IV.3. HIDROLISIS DE LAS α_{s1}-CN A y F POR LA PLASMINA | 138 |
| IV.3.1. Estudio de la fracción soluble a pH 4.6 | 138 |
| IV.3.2. Estudio de la fracción insoluble a pH 4.6 | 140 |
| IV.4. HIDROLISIS DE LA α_{s2}-CN POR LA PLASMINA | 141 |

| | |
|---|-----|
| IV.5. HIDROLISIS DE DIFERENTES SUBSTRATOS CASEINICOS CAPRINOS Y BOVINOS POR LA ACCION SIMULTANEA O CONSECUTIVA DE LOS ENZIMAS DEL CUAJO Y PLASMINA | 141 |
| IV.5.1. Hidrólisis de las caseínas enteras caprina y bovina por la acción simultánea de los enzimas del cuajo y plasmina | 142 |
| IV.5.2. Hidrólisis de las β -Cn caprina y bovina por la acción consecutiva de los enzimas del cuajo y plasmina | 145 |
| | |
| CAPITULO V. ESTUDIO DE LA PROTEOLISIS EN QUESOS DE LECHE DE CABRA | 147 |
| | |
| V.1. ESTUDIO ELECTROFORETICO DE LA PROTEOLISIS PRIMARIA DE LA CASEINA EN QUESO DE CABRA | 149 |
| V.2. PRODUCCION DE CUAJADAS LIBRES DE FERMENTOS Y COAGULANTES CON FLORA MICROBIANA CONTROLADA MEDIANTE EL USO DE ALTAS PRESIONES HIDROSTATICAS | 155 |
| V.2.1. Tratamiento de la leche de fabricación | 156 |
| V.2.2. Técnica de fabricación de quesos | 157 |
| V.2.2.1. Quesos obtenidos por acidificación química | 157 |
| V.2.2.2. Quesos obtenidos por acidificación química y libres de coagulantes (CLFC) | 160 |
| V.2.2.3. Efecto de la presurización en las CLF y CLFC | 162 |
| | |
| CONCLUSIONES | 165 |
| | |
| BILIOGRAFIA | 171 |

ABREVIATURAS

- ACN: Acetonitrilo
AMC: 7-amino-4-metil cumarina
AOAC: Association of Official Analytical Chemist
 a_w : Actividad del agua
C: g bisacrilamida/T
CC: Cuaja Control
CeR: *Centre Especial de Recerca*
CLF: Cuajada Libre de Fermento
CLFP: Cuajada Libre de Fermento Presurizada
CLFC: Cuajada Libre de Fermento y Coagulante
CLFCP: Cuajada Libre de Fermento y Coagulante Presurizada
Cn/CN: caseína
DEAE: Dietilaminoetil
DMSO: Dimetilsulfóxido
DTT: Ditiotreitól
FIL: Federación Internacional de Lechería
FPLC: Cromatografía Líquida Rápida de Proteínas
GDL: Glucono- δ -Lactona
INRA: *Institute National de Recherche Agronomique*
Mr: Masa Relativa
NNC: Nitrógeno no Caseínico
NNP: Nitrógeno no Proteico
NSA: Nitrógeno Soluble en Agua
NT: Nitrógeno Total
PAAGE: Electroforesis en Gel de Poliacrilamida y Agarosa
PAGE: Electroforesis en Gel de Poliacrilamida
PCR: Reacción de la Polimerasa en Cadena
PP: Proteosa Peptona
RP-HPLC: Cromatografía Líquida de Alta Eficacia en Fase Inversa
SDS: Dodecíl Sulfato Sódico
T: gramos Acrilamida + gramos Bisacrilamida/100 mL de solución
TU: Tampón Urea
TCA: Acido tricloroacético
TFA: Acido trifluoroacético
UC: Unidades Coagulantes
UFC: Unidades Formadoras de Colonias

INTRODUCCION Y OBJETIVOS

INTRODUCCION

Europa posee una antigua tradición en ganado caprino que hoy en día constituye una realidad palpable por la existencia de una gran diversidad de productos fabricados a partir de leche de cabra, como leches pasterizadas, aromatizadas, UHT, yogures, mantequilla, nata, helados, siendo el queso el producto que se sitúa como predominante.

Tradicionalmente la ganadería caprina en Europa se caracteriza por efectivos importantes y por la presencia en zonas de montaña de grandes rebaños extensivos, frecuentemente mezclados con rebaños ovinos, de producción mixta (leche y carne). Estas dos circunstancias se dan también en España, país con una climatología muy favorable para el desarrollo de este tipo de ganado.

La entrada de España y Portugal a la Unión Europea (UE) ha producido un incremento del 40% de los efectivos caprinos ya existentes, situando la cifra en 14.5 millones de cabezas. La cabaña comunitaria ostenta hoy en día el 83% del ganado caprino europeo (excluyendo la antigua URSS). Los países mediterráneos representan la cantidad más importante y dentro de la UE, son Grecia y España los países que poseen casi el 75% del total.

El potencial anual de producción en leche de cabra comunitario se estima en 2000 millones de litros. Grecia produce el 30%, con un 46% del total del ganado, siguen España y Francia con un 28% y 9% de la cabaña respectivamente, que representa un 28% de la producción lechera para cada una. Estos tres países aseguran globalmente el 86% de la producción comunitaria de leche de cabra (Le Jaouen y Toussaint, 1993).

El análisis de los sistemas de transformación de la leche de cabra en Europa muestra una gran heterogeneidad en función de las tradiciones de consumo de productos lácteos de cada país. A pesar de estas diferencias, generalmente coexiste una transformación en granja orientada hacia la venta local y una elaboración industrial más o menos desarrollada. La industria transforma globalmente entre el 20% y 60% de la producción nacional, dependiendo del país. Francia procesa industrialmente casi las 2/3 partes de su producción, seguida de España, Italia y Grecia. Estos dos últimos países presentan una transformación industrial minoritaria coexistente con una elaboración artesana tradicional preponderante (Georgelet,

1993).

La evolución actual del caprino lechero en España se caracteriza por un retroceso de las estructuras clásicas en beneficio de una ganadería intensiva, con vocación comercial, que se desarrolla desde hace algunos años sobre la base de nuevos métodos de producción, conllevando generalmente un aumento del tamaño del rebaño. Una de las razones que podrían justificar estos cambios es la aplicación de la cuota lechera para el vacuno, que conduce a los ganaderos de bovino a reconvertirse o a diversificar su actividad con el caprino. Otra explicación, no menos importante, se basa en el desarrollo e intensificación de los productores tradicionales, debido a la evolución del mundo de la comercialización que tiende hacia la producción industrial.

OBJETIVOS

El objetivo principal de la presente tesis ha consistido en el estudio de la proteólisis primaria producida por la acción de diferentes enzimas, importantes en el madurado del queso, sobre la fracción caseínica de la leche de cabra.

Los objetivos concretos del trabajo fueron:

- Estudiar la actividad enzimática del cuajo, la quimosina y pepsina y la plasmina sobre el complejo caseínico o las caseínas de cabra aisladas.
- Caracterizar los productos procedentes de la proteólisis desarrollada por estas enzimas.
- Valorar el efecto de algunos parámetros de maduración del queso sobre la proteólisis (pH, temperatura, NaCl, tiempo, concentración de enzima, etc.) en estos sistemas caseínicos.
- Conocer el efecto del polimorfismo genético de la α_{s1} -Cn sobre la proteólisis primaria y secundaria.
- Desarrollar un sistema para la obtención de cuajadas modelo válido para estudiar los procesos enzimáticos descritos, en condiciones de maduración real.

La tesis se ha dividido en capítulos, según se describe a continuación:

- **Capítulo I:** consta de una revisión bibliográfica relativa a los fenómenos proteolíticos derivados de la hidrólisis *in vitro* de las caseínas debido a la acción de diferentes enzimas que afectan principalmente a la proteólisis del queso. También se hace una descripción detallada de las proteínas lácteas caprinas, polimorfismo genético y de los últimos trabajos publicados en leche y queso de cabra relacionados con el tema.

- **Capítulo II:** este capítulo se dedica a la descripción de los materiales y métodos utilizados durante el desarrollo de las experiencias realizadas.

- **Capítulo III:** en este capítulo se describen los estudios realizados sobre la hidrólisis de diferentes substratos caseínicos por acción de algunos enzimas coagulantes importantes en la elaboración del queso. Este capítulo incluye un trabajo de hidrólisis de dos variantes genéticas (A y F) de la caseína α_{s1} por acción de la quimosina a pH 5.2 en presencia del 3% NaCl, condiciones iónicas de muchos quesos jóvenes. Este trabajo se realizó bajo la dirección de la Dra. Agnès Delacroix-Buchet en los laboratorios de la *Station de Recherche Laitière* y de la *Station des Proteines* del INRA (Jouy-en-Josas, Francia).

Parte de este capítulo ha sido publicado:

Trujillo, A.J.; Guamis, B.; Carretero, C. (1995). Proteolysis of goat β -casein by calf rennet under various factors affecting the cheese ripening process. *J. Agr. Food Chem.* 43, 1472-1478.

- **Capítulo IV:** aquí estudiamos la acción proteolítica de un enzima nativo de la leche, la proteasa alcalina de la leche o plasmina, al hidrolizar diferentes substratos caseínicos. También se resume los resultados obtenidos al someter diferentes componentes caseínicos y productos de degradación a la acción simultánea o consecutiva de los enzimas del cuajo y de la plasmina.

- **Capítulo V:** este capítulo incluye un estudio mediante PAGE-urea de la proteólisis primaria en quesos de cabra producidos en el CeR (*Centre Especial de Recerca*) de Tecnología de los Alimentos, y de diferentes tipos de quesos de cabra de tipo comercial. También se describe un método de obtención de cuajadas modelo mediante altas presiones hidrostáticas, que servirá en futuros trabajos para calificar y cuantificar la contribución de cada uno de los agentes proteolíticos involucrados en la maduración del queso.

CAPITULO I

I.1. LA LECHE DE CABRA

I.1.1. COMPOSICION GLOBAL

La composición y las características que presenta la leche de cabra han sido objeto de diferentes revisiones bibliográficas (Parkash y Jenness, 1968; Jenness, 1980; Juárez y Ramos, 1986).

En la Tabla 1 se muestran algunos datos bibliográficos relativos a la composición media de leches de cabra de España y otros países, en comparación a la que presenta la leche de vaca.

De acuerdo con los autores antes citados, la leche de cabra de razas seleccionadas productoras de grandes cantidades de leche (Saanen y Alpina), se caracteriza en general y en comparación a la leche de vaca, por contenidos más pobres en extracto seco, lactosa y compuestos nitrogenados. En la Tabla 1 también puede observarse que los parámetros antes mencionados, pueden variar por la influencia de diferentes factores ligados al animal (raza, estado de lactación), a la zona geográfica (temperatura, fotoperiodo, alimentación), etc. Las fracciones nitrogenadas de la leche de cabra se reparten según una distribución muy similar a la que presenta la leche de vaca. Comparativamente a la leche de vaca, la leche de cabras muy seleccionadas en altas producciones en leche, se caracteriza por valores medios más bajos en nitrógeno total y en caseínas. Esto no ocurre así en razas autóctonas, incluidas las razas españolas, debido en parte a un contenido mayor en proteínas solubles y en caseínas que más tarde explicaremos más detenidamente (Tabla 2). Sin embargo, la concentración en nitrógeno no proteico (sobre todo de urea) es sensiblemente más elevada en leche cabra (Grappin y col., 1981).

La materia grasa se encuentra mayoritariamente en forma de glóbulos grasos como en el caso de la leche de vaca, aunque la proporción de glóbulos grasos pequeños ($<4.5 \mu\text{m}$) es más importante en la leche de cabra (Mehaia, 1995). La composición en lípidos y la naturaleza de éstos, es muy similar en ambas leches, siendo la diferencia más notable la existencia de una proporción más elevada en ácidos grasos de cadena corta, básicamente caprílico (C_8) y cáprico (C_{10}) (García Olmedo y col., 1979). Ciertos autores atribuyen una correlación positiva entre la tasa de ácidos grasos libres de la leche de cabra y la intensidad

del "sabor a cabra" (Bakke y col., 1977), teniendo una importancia especial los ácidos grasos de cadena ramificada tipo 4-metiloctanoico y 4-etiloctanoico (Kim Ha y Lindsay, 1991). Estos ácidos grasos por ser de cadena corta pueden ser absorbidos a nivel intestinal por un mecanismo más simple que los de cadena larga. Este hecho, junto con la mayor proporción de glóbulos grasos pequeños, confiere a la leche de cabra un notable interés nutricional debido a su mejor digestibilidad.

La lactosa, azúcar distintivo y casi exclusivo de la leche, se presenta en la cabra en proporción muy cercana a la de la leche de vaca (Tabla 1) y varía un poco en función del estado de lactación.

En cuanto a la composición mineral, y de forma global, las leches de cabra y vaca son muy similares sobre todo en calcio, fósforo y magnesio (Parkash y Jenness, 1968; Holt y Jennes, 1984); sin embargo la leche de cabra es más rica en potasio y cloro y más pobre en citrato que la leche de vaca (Juárez y Ramos, 1986).

I.1.2. LAS PROTEÍNAS DE LECHE DE CABRA

Las proteínas lácteas bovinas, que son bien conocidas, se clasifican en diferentes familias muy definidas: las 4 caseínas (Cn) α_{s1} , α_{s2} , β y κ , y las proteínas séricas α -lactalbúmina, β -lactoglobulina, seroalbúmina y las inmunoglobulinas (Jenness, 1979). En la leche de cabra encontramos los mismos componentes proteicos.

I.1.2.1. Proteínas séricas

Las principales proteínas séricas que encontramos en la leche caprina son la α -lactalbúmina y β -lactoglobulina; las fracciones minoritarias son la seroalbúmina, inmunoglobulinas y las proteosas-peptonas. La concentración en proteínas séricas difiere en la leche de cabra y vaca, siendo los datos cuantitativos divergentes según los autores debido principalmente al origen de la leche analizada (raza) y al método analítico utilizado (Jenness, 1982; Storry y col., 1983).

Se conoce bien la secuencia completa de la β -lactoglobulina (Préaux y col., 1979), confirmada por su secuencia genómica (Folch y col., 1994), y como su homóloga bovina cuenta con 162 aminoácidos. Esta proteína posee características fisicoquímicas parecidas a la bovina (Phillips y Jenness, 1965).

La secuencia de la α -lactalbúmina ha sido determinada por McGillivray y col. (1979), corregida por Shewale y col. (1984) y por último confirmada por su secuencia genómica (Villotte y col., 1991). La α -lactalbúmina caprina difiere de la bovina por 11 substituciones aminoacídicas sobre un total de 123 aminoácidos y no contiene residuos metionina. Esta proteína presenta 2 variantes en la especie caprina (Maes y col., 1976) visibles por técnicas de electroforesis.

La fracción proteosa-peptona caprina también ha sido caracterizada por diferentes autores, mostrándose muy similar a la bovina (Khatoun y Joshi, 1987; Ramos y col., 1988; Mati y col., 1991).

I.1.2.2. Caseínas

La mayoría de los conocimientos generales relativos a las caseínas de la leche hacen referencia a la caseína bovina. Así, es oportuno describir en este momento las características generales de las caseínas bovinas y más tarde detallar los datos que hasta hoy en día son conocidos de las caseínas caprinas.

Las caseínas representan la fracción proteica mayor de la leche y se definen como un grupo heterogéneo de fosfoproteínas que precipitan a partir de la leche descremada a pH 4.6 y a 20°C (Thompson y col., 1965). Estas proteínas se clasifican según su movilidad electroforética relativa en geles de poliacrilamida o de almidón, a pH alcalino, en presencia de urea, con o sin mercaptoetanol (Eigel y col., 1984). El complejo caseínico se constituye de 4 componentes principales: 4 cadenas polipeptídicas fosforiladas denominadas α_{s1} , α_{s2} , β y κ (ésta última también glicosilada). Las caseínas, aunque tienen una estructura menos ordenada y más flexible que la típica proteína globular del suero que la hacen fácilmente accesible a los enzimas proteolíticos, tienen una estructura secundaria significativa y posiblemente hasta terciaria (Swaigood, 1993). Estas proteínas se organizan en la leche en

forma de micelas asociadas a un complejo mineral, compuesto de fosfato cálcico.

La secuencia primaria de las 4 caseínas bovinas es bien conocida (Mercier y col., 1971; Ribadeau-Dumas y col., 1972; Mercier y col., 1973; Brignon y col., 1977). Tres de las caseínas (α_{s1} , α_{s2} y β) son insolubles en presencia de CaCl_2 a 20°C , siendo la κ -Cn soluble en estas condiciones. Las caseínas α_{s1} y α_{s2} presentan una heterogeneidad visible por electroforesis a pH alcalino, ligado a su grado de fosforilación variable (0, 1 y 2, 3, 4, 6, respectivamente), y la κ -Cn por su nivel de glicosilación (no menos de 10).

Referente a las caseínas caprinas y después de los trabajos de Boulanger y col. (1984) y Grosclaude y col. (1987), se conoce que la caseína caprina se compone, al igual que la bovina, de 4 fracciones: α_{s1} , α_{s2} , β y κ , presentando características muy similares a las bovinas. Las proporciones en estas 4 fracciones se han determinado muy recientemente (Tabla 3) observándose que los valores que presentan cada una de ellas difieren bastante de los que presenta la leche de vaca. En general la caseína caprina se caracteriza por ser rica en caseína β y pobre en α_{s1} -Cn.

Las micelas de caseína caprina presentan un grado de dispersión y diámetro medio más grandes, una mineralización más elevada y un nivel de hidratación inferior, con respecto a las micelas bovinas (Richardson y col., 1974; Ono y Creamer, 1986; Jaubert, 1992), lo que explica en gran parte su mayor sensibilidad a los tratamientos térmicos.

Las α_s -Cn, identificadas por Zittle y Custer (1966) y Zittle (1967), son objeto de numerosos trabajos de investigación durante los últimos años, debido a las características tan peculiares que presentan y que más tarde explicaremos con detalle. Esta fracción caseínica muestra una movilidad electroforética menor que la de la α_{s1} -Cn bovina, propiedad utilizada por diferentes autores para detectar mezcla de leche de vaca y cabra.

Es en 1984 cuando Boulanger y col. identifican y caracterizan 2 caseínas distintas en este complejo: α_{s1} y α_{s2} . Estas dos proteínas se superponen parcialmente en geles de poliacrilamida a pH alcalino y pueden ser separadas a pH ácido. También observaron una gran heterogeneidad, debido a diferencias cuantitativas notables en α_{s1} -Cn en leches individuales, que se asocian a un polimorfismo genético complejo del locus de esta proteína.

La estructura primaria de la α_{s1} -Cn de cabra ha sido descrita por Brignon y col. (1989) dando a conocer que contiene 199 aminoácidos, como su homóloga bovina y mostrando un 80% de similitud con ella.

Esta fracción también presenta una gran heterogeneidad en leches individuales, debido a una variación en el grado de fosforilación (entre 7 y 9), que explica el origen de las diferentes bandas observadas en geles de poliacrilamida e isoelectroenfoque (Chianese y col., 1993).

Los datos relativos a la α_{s2} -Cn son más limitados y se resumen en los trabajos de Richardson y Creamer (1975) y Boulanger y col. (1984). Recientemente se ha secuenciado el ADN complementario (ADNc) de esta proteína (Bouniol, 1993), dando a conocer que tiene 208 aminoácidos, un aminoácido más que su homóloga bovina, y una similitud del 88% con ésta.

A pesar de que la β -Cn es la proteína más abundante en la leche de cabra, se le han dedicado pocos trabajos de investigación hasta el momento. Esta proteína en geles de poliacrilamida a pH alcalino se desarrolla como 2 bandas, con movilidades electroforéticas diferentes denominadas β_1 y β_2 , diferenciándose por el número de residuos fosforilados (6 y 5, respectivamente) (Richardson y Creamer, 1974). Chianese y col. (1993) han dado a conocer la gran heterogeneidad de esta proteína en leches individuales, debida a las múltiples posibilidades de fosforilación, observando hasta 4 formas distintas (3, 4, 5 y 6).

La estructura primaria de la β -Cn caprina ha sido deducida de la secuencia nucleotídica del gen (Roberts y col., 1992). Presenta 207 aminoácidos, 2 menos que su homóloga bovina, debido a la delección del dipéptido Pro₁₇₉-Tyr₁₈₀, mostrando una similitud entre ambas del 90%.

La κ -Cn caprina fue aislada por Zittle y Custer (1966) a partir de caseína entera y fue descrita como una fracción glicoproteica con propiedades similares a la κ -Cn bovina, rápidamente hidrolizada por la quimosina, soluble en presencia de calcio a cualquier temperatura, con poder estabilizante frente al calcio de las α_s -Cn caprinas y bovinas. Mercier y col. (1976a) publicaron su estructura primaria, la cual ha sido recientemente confirmada por la secuencia del ADNc correspondiente, excepto para el residuo aminoacídico en posición 113 (Asn→Asp) (Coll y col., 1993). Esta proteína presenta 171 aminoácidos (2 más que la bovina) y una similitud del 84% con su homóloga bovina. Según Addeo y col. (1978), la κ -Cn caprina es heterogénea presentando 5 componentes (κ_1 - κ_5) que difieren en su composición glucídica.

1.1.3. EL POLIMORFISMO GENETICO DE LAS CASEINAS CAPRINAS

La β -Cn ha sido considerada durante mucho tiempo como monomorfa en esta especie, hasta que análisis de leche de cabra de raza Garganica reveló la existencia de un probable alelo nulo (Dall'Olio y col., 1989), confirmado más tarde en otras razas (Mahé y Grosclaude, 1993).

La α_{s2} -Cn es igualmente polimorfa presentando 2 variantes, A y B (Boulangier y col., 1984), aunque hay trabajos que describen una tercera variante (Chianese y col, 1992; Bouniol y col., 1994).

También la κ -Cn es polimorfa describiéndose dos variantes, A y B (Di Luccia y col. 1992; Law y Tzibula, 1993).

La α_{s1} -Cn es la proteína que muestra más interés a nivel de polimorfismo, que últimamente es objeto de múltiples estudios en diferentes centros de investigación. Esta proteína se distingue por un fuerte polimorfismo estructural asociado a una variabilidad alélica cuantitativa. Los primeros trabajos realizados por Grosclaude y col. (1987) y Mahé y Grosclaude (1989) establecieron que este polimorfismo está determinado por un mínimo de 7 alelos que se distribuyen en 4 clases cuantitativas: los alelos A, B y C se acompañan de una producción alta en α_{s1} -Cn (3.6 g/L y alelo), el alelo E asociado a un nivel medio (1.6 g/L y alelo), los alelos D y F, asociados a un nivel bajo de síntesis (0.6 g/L y alelo) y el alelo O que confiere el fenotipo nulo. Los animales homocigotos OO para este locus, no sintetizan esta proteína o lo hacen en forma de trazas.

En la Tabla 4 se muestran las frecuencias alélicas para el locus de α_{s1} -Cn en diversas razas lecheras caprinas europeas. A nivel teórico la diferencia entre dos individuos homocigotos AA y FF para este locus, sería de 6 g de proteína/L. Según los mismos autores antes nombrados, existe una gran correlación entre la cantidad de α_{s1} -Cn y la caseína total, siendo los efectos cuantitativos del polimorfismo de esta proteína un parámetro que repercute fuertemente en la caseína total de la leche: aproximadamente 4 g/L entre los homocigotos arriba expuestos, que representa una diferencia para la tasa de caseína cercana al 20%.

Estas diferencias afectan de manera decisiva al aprovechamiento tecnológico de la leche de cabra y en particular al comportamiento frente a la coagulación en la obtención de cuajadas, como veremos más adelante.

Como se muestra en la Tabla 4, las razas más seleccionadas en la producción lechera (Saanen y Alpina) presentan frecuencias muy altas para los alelos E y F. En lo que respecta a las principales razas españolas, generalmente tienen frecuencias alélicas F muy bajas, siendo más abundantes los alelos E y B. La raza canaria tiene una frecuencia alta para el alelo A, pero también para el alelo nulo o O.

Se ha descrito la secuencia aminoacídica de la α_{s1} -Cn caprina, así como las diferencias existentes entre las variantes A, B, C, D, E y F (Brignon y col., 1989 y 1990), que se resumen en la Tabla 5. Las variantes A, B, C y E se diferencian por sustituciones aminoacídicas, mientras que las variantes D y F, presentan alteraciones estructurales más profundas, materializadas por deleciones internas de 11 y 37 aminoácidos respectivamente, incluyendo una zona de fosforilación múltiple de esta proteína. Las sustituciones que caracterizan a la variante E son parte también de la variante C y sin embargo estas variantes presentan diferentes niveles de síntesis proteica, por lo cual en este caso se puede afirmar que las mutaciones correspondientes a estas sustituciones no son responsables de la tasa menor de síntesis asociada a la variante E.

La variante G es una subdivisión de la D, recientemente observada. Las variantes D y G presentan una movilidad electroforética y una tasa de síntesis parecidas, pero la G se distingue por una deleción diferente a la que presenta la D.

Las diferentes deleciones encontradas tienen su origen a nivel del gen; así por ejemplo la deleción de la variante F se debe a una anomalía en el proceso de eliminación de intrones del ARN mensajero (ARNm), inducida por la deleción de un solo nucleótido dentro de la secuencia del exón noveno del gen de la α_{s1} -Cn (Leroux y col., 1992). Los mecanismos por los cuales esta deleción puntual es susceptible de producir la reducción de la tasa de síntesis para este alelo aún están en estudio.

Muy recientemente han sido descritas 4 nuevas variantes para la α_{s1} -Cn denominadas C¹, A¹, X y W (Chianese y col., 1995a).

I.1.4. EFECTOS DEL POLIMORFISMO GENÉTICO DE LA CASEÍNA α_{s1} CAPRINA SOBRE LA PRODUCCIÓN Y PROPIEDADES DE LA LECHE

Los estudios derivados de Barbieri y col. (1995) han dado a conocer diferencias significativamente favorables en la tasa de proteínas verdaderas (AA > AE, AF > EE, EF > FF) y la tasa butírica (AA, AE, AF > EF, FF). Este trabajo demuestra que el polimorfismo puede afectar a la producción cuantitativa de leche; las cabras AA producen menos leche que las AE, AF, EE y EF.

El análisis de las propiedades fisicoquímicas de las leches de cabras homocigotas para los 3 alelos principales (A, E, F) confirma los efectos del genotipo sobre la tasa proteica y butírica, mostrando efectos marcados sobre el diámetro de las micelas y su grado de mineralización cálcica. Las micelas de menor tamaño corresponden a las leches AA, característica susceptible de favorecer el comportamiento quesero, ya que la firmeza del gel formado aumenta al disminuir el tamaño de las micelas (Remeuf y col., 1991; Remeuf, 1993).

La influencia del tipo de α_{s1} -Cn sobre la fracción mineral es limitada, aunque existe una concentración de calcio total más elevada en las leches AA; esta característica representa también una ventaja tecnológica, ya que determina en parte la aptitud a la coagulación enzimática.

Estos estudios confirman que el alelo fuerte es un alelo favorable para mejorar la aptitud quesera de la leche de cabra.

I.2. LA FABRICACION DEL QUESO

La fabricación del queso tiene como principio la concentración de la caseína y grasa en un factor de 6 a 12, según la variedad. En la producción tradicional esta concentración se consigue por coagulación de la caseína, formando un gel donde queda retenida la grasa. Cuando este gel se corta o se rompe y se contrae (sinéresis) libera el lactosuero, que contiene principalmente proteínas solubles, la lactosa y una parte de los componentes salinos. La sinéresis depende fundamentalmente de la temperatura, pH, agitación, concentración proteica

y de los iones calcio. Durante la fabricación se establecen estos parámetros a fin de controlar el contenido en humedad de la cuajada y así del futuro queso.

El reciente desarrollo de técnicas tales como la ultrafiltración permite, hoy en día, concentrar la totalidad de la fase coloidal de la leche (caseína, proteínas séricas, grasa y sales coloidales) sin hacer uso de la coagulación, aunque en la práctica este tipo de técnicas se acostumbran a complementar con el tratamiento enzimático a fin de obtener una cuajada de textura adecuada.

La coagulación de la caseína se induce por el uso de:

- Enzimas específicos, normalmente pertenecientes a las familia de las proteasa ácidas o aspartoproteasas, que hidrolizan la κ -Cn, estabilizadora de la micela de caseína.
- Precipitación isoelectria a $\text{pH} \approx 4.6$, mediante una acidificación de origen biológico (bacterias lácticas) o por acidificación química mediante el uso de compuestos ácidos o acidogénicos (normalmente la glucono- δ -lactona).
- Calentamiento de 80 a 90°C a $\text{pH} \approx 5.2$.

Los quesos de coagulación ácida o mixta (ácida/calentamiento) son consumidos generalmente en fresco, sin embargo la mayoría de los quesos producidos mediante coagulación enzimática son madurados durante períodos de tiempo variables en función del tipo de producto.

La fabricación de quesos de coagulación enzimática se puede dividir en 3 fases principales bien distintas: la conversión de la leche en cuajada, trabajo y preparación de ésta para obtener el queso básico de características deseadas y el madurado o afinado hasta el producto definitivo.

La primera fase conlleva diferentes operaciones:

- Coagulación
- Acidificación
- Sinéresis/deshidratación
 - . corte del gel
 - . recalentamiento o cocción
 - . prensado
- Salado

Un tipo de coagulación especialmente extendido en la fabricación de quesos de cabra es la coagulación mixta (ácida/enzimática) que suele realizarse con concentraciones elevadas de fermentos lácticos y muy diluídas de cuajo, así como a temperatura baja (20°C), muy inferior a la óptima de crecimiento de los microorganismos y de la actividad enzimática. El tiempo de obtención de cuajadas por esta vía es muy largo, de 8 a 22 horas, y en este tipo de cuajadas no se produce prácticamente desuerado. El producto así obtenido tiene unas características reológicas intermedias entre la cuajada ácida y la enzimática y se utiliza para la obtención de quesos de pasta blanda.

I.3. FENOMENOS BIOQUIMICOS DURANTE EL PROCESADO Y MADURADO DEL QUESO

Durante el madurado intervienen numerosos fenómenos bioquímicos como la glicolisis, lipolisis y proteolisis, ésta última objeto principal de nuestro trabajo, que se traducen en una digestión enzimática de los constituyentes de la cuajada, reacciones que le confieren características nuevas modificando su composición, su aspecto y textura, desarrollando el sabor y la formación de compuestos aromáticos (Desmazeud y Gripon, 1977; Law, 1981, 1984).

1.3.1. GLICOLISIS

Uno de los primeros acontecimientos en la fabricación de muchas variedades de queso es la fermentación de lactosa residual ($\approx 98\%$ se pierde en el lactosuero) en ácido láctico, producida por las bacterias lácticas del fermento añadido o bien por la flora natural de la leche en quesos fabricados con leche cruda.

Tanto la cantidad de ácido láctico, como el período dentro del proceso de fabricación en que se produce, dependen de la variedad de queso. Así por ejemplo, en queso tipo Cheddar, la mayoría del ácido láctico se produce antes del moldeado, mientras que en otras muchas variedades ocurre principalmente después (Fox y col., 1990).

El momento en que se desarrolla la acidificación determina el método de salado; mezcla de sal con cuajada en quesos tipo Cheddar y salado en superficie (por frotamiento con granos de sal o por inmersión en salmueras) en las demás variedades.

La producción de ácido láctico afecta decisivamente a casi todas las etapas de la fabricación del queso, condicionando la composición y calidad finales. Las consecuencias más importantes derivadas de la acidificación se resumen en la Tabla 6 (Fox y col. 1990).

Los cuatro primeros puntos de la Tabla 6 se abordarán posteriormente cuando hablemos de cada proteasa en particular.

La tensión que presentan los geles de coagulación enzimática viene dada en gran parte por el pH del gel (Marshall y col., 1982). El desarrollo de la acidificación incrementa la sinéresis de la cuajada, que a su vez afecta a la composición y así al madurado y la calidad final.

El pH al cual se produce el desuerado determina el contenido mineral de un queso. La pérdida de calcio y fósforo procedentes de las micelas de caseína es un factor decisivo en la proteólisis posterior y así condiciona la estructura básica y textura del queso (Lawrence y col., 1983). Como consecuencia, cuajadas con un pH muy bajo, como ocurre en las de leche de cabra obtenidas por coagulación predominantemente ácida, tienen en general una textura quebradiza, mientras que cuajadas con pH más elevados, como en el queso Emmental, tienden a ser más elásticas y manejables.

La proteólisis durante el madurado modifica la textura del queso. O'Keeffe y col. (1975) observaron que la caseína se hidroliza más rápidamente a bajo pH que al pH normal

del queso, debido principalmente a la solubilización del complejo fosfato cálcico coloidal de las micelas de caseína que forman la cuajada, haciendo que las micelas sean más susceptibles a la proteólisis. Paralelamente, y como veremos más adelante, se produce también más retención de quimosina (enzima principal de los extractos de cuajo), más activa a pH ácido, siendo ésta la principal causa del incremento de proteólisis que exhiben los quesos de bajo pH (Creamer y col., 1985).

La sal tiene numerosas funciones muy importantes en el queso, que se resumen en la Tabla 7, teniendo el pH propiedades sinérgicas con la sal en dichas funciones. El pH afecta a su vez la cantidad de sal retenida durante el salado, como se ha observado en cuajadas tipo Cheddar que retienen más cantidad de sal a pH más alto y viceversa (Gilles, 1976).

I.3.2. LIPOLISIS

En la mayoría de las variedades de queso este fenómeno bioquímico se da con poca intensidad y muchas veces se considera indeseable, predominando los fenómenos de proteólisis (Fox, 1989).

La leche contiene una lipasa muy potente, la lipoproteínlipasa (LPL), con una relativa estabilidad térmica; se requiere un tratamiento térmico de 78°C 15 s para alcanzar su inactivación completa (Driessen, 1989). Es probable que esta lipasa tenga alguna contribución a la lipólisis en queso fabricado a partir de leche pasteurizada, especialmente aquella tratada en condiciones de subpasteurización. Este enzima es muy selectivo en la hidrólisis de ácidos grasos esterificados en posición 3. El hecho de que la mayoría del ácido butírico se encuentre esterificado en esta posición, podría explicar la alta concentración en este ácido graso libre en queso.

La lipasa de la leche de cabra ha sido descrita y caracterizada por diferentes autores (DeFeo, 1982; Chilliard y col., 1984) y su contenido parece estar asociado a la variante genética en α_{s1} -Cn (Delacroix-Buchet y col., en prensa).

Las bacterias acidolácticas, especialmente *Lactococcus* y *Lactobacillus*, presentan actividades lipásica y esterasa pequeñas pero cuantificables, aunque no se dispone de mucha información al respecto (Kamaly y col., 1990).

Excepciones a la situación general expuesta son algunas variedades como los quesos de vena azul y ciertos quesos de pasta dura italianos, Parmesano o Romano, donde la lipólisis juega un papel importantísimo en el desarrollo del aroma y sabor.

En las variedades italianas, la lipólisis se debe fundamentalmente a las lipasas exógenas (esterasas pregástricas), que se añaden a la leche de producción, de forma más o menos purificada, formando parte como componente de los enzimas coagulantes. Las esterazas pregástricas tienen una alta especificidad hacia los ácidos grasos de cadena corta esterificados en posición 3, liberando grandes cantidades de éstos que son responsables de las propiedades picantes y sabor característico de estos quesos.

Los quesos de flora fúngica, especialmente los de vena azul, son los que presentan un nivel más elevado de lipólisis, donde más del 25% del total de los ácidos grasos son liberados en algunas variedades. Esta intensa lipólisis se debe principalmente a las lipasas extracelulares liberadas por *Penicillium roqueforti* y *P. camemberti* (Gripón, 1993).

I.3.3. PROTEOLISIS

Múltiples revisiones bibliográficas han tenido como objeto el estudio de la proteólisis, sin duda porque este fenómeno bioquímico representa el principal evento en la maduración de muchas variedades de quesos (Grappin y col., 1985; Rank y col., 1985; Fox, 1988, 1989; Fox y Law, 1991; Visser, 1993; van den Berg y Exterkate, 1993).

El mecanismo por el cual la cuajada, relativamente insípida, se transforma en queso con texturas, aromas y sabores diferentes, todavía no se conoce totalmente. Los procesos proteolíticos, además de contribuir tanto de forma directa como indirecta (a través del catabolismo de los aminoácidos) al gusto y aroma del queso, potencian el sabor al favorecer la liberación de compuestos sápidos durante la masticación. Por otra parte, determinan de modo decisivo el desarrollo de la textura, debido a la ruptura de la red de caseína y al aumento de pH que originan a través de la formación de amoníaco (Fox, 1989).

I.3.3.1. Proteolisis en la leche de fabricación

Se han descrito dos causas principales en este tipo de proteolisis que puede afectar tanto a la fabricación como a la calidad final del queso: la producida por los enzimas microbianos y por las proteasas endógenas de la leche.

La flora microbiana es la predominante en la leche refrigerada de partida. Aparentemente estas bacterias no suponen ningún problema, en cuanto se refiere a proteolisis, si la población bacteriana no excede de 10^6 UFC/mL leche; una mayor población en este tipo de flora causa bajos rendimientos en la producción de queso, por pérdida de sólidos totales durante el desuerado, además de aumentar el contenido acuoso de la cuajada, produciendo una textura pastosa y diferentes defectos organolépticos (Cousin, 1982; Fairbairn y Law, 1986; Hicks y col., 1986).

Las lipasas producidas por la flora microbiana son probablemente más importantes que las proteasas, en cuanto a desarrollo de defectos en las características sensoriales del queso, porque las proteasas son solubles en agua y se pierden con el suero de quesería, mientras que las lipasas quedan retenidas junto a los glóbulos grasos en la matriz proteica de la cuajada (Fox, 1989).

La leche contiene diferentes proteasas, entre las que destaca sin duda la proteasa alcalina, también llamada plasmina. Esta proteasa, que tiene una función más o menos importante durante la maduración del queso como después veremos, hidroliza preferentemente la β -Cn, produciendo las γ -Cn y algunos péptidos de la fracción proteosa peptona, así como la α_{s2} -Cn, pudiendo afectar de forma negativa las propiedades de la leche de fabricación. Tanto el tiempo de coagulación como la tensión y sinéresis del gel formado, se ven afectados al avanzar la lactación, sobre todo en los últimos estadios. El queso así producido, presenta un alto contenido acuoso y un cuerpo y textura deficientes. Estos cambios se han asociado a la proteolisis producida por la plasmina, aunque Grufferty y Fox (1988a) han observado que el tiempo de coagulación, así como el estado general de la micela de caseína para formar el gel, se afectan sólo si la proteolisis producida por este enzima es extensa.

Las proteasas procedentes de las células somáticas son también una causa de proteolisis en la leche, especialmente la leche procedente de animales que padecen una

mastitis clínica o subclínica (Kitchen, 1981; De Rham y Andrews, 1982; Senyk y col., 1985).

Grieve y Kitchen (1985) mostraron que la actividad proteolítica de la plasmina es de 2 a 8 veces superior a la desarrollada por un inóculo de leucocitos de 10^6 /mL leche. Sin embargo, diferentes estudios han dado a conocer que estas proteasas son capaces de producir proteólisis en la leche, afectando de manera negativa al rendimiento y calidad final del queso (Munro y col., 1984; Grandison y Ford, 1986; Rogers y Mitchell, 1994).

Hoy en día se están realizando diversos trabajos a este respecto en leche de pequeños rumiantes (cabra y oveja), observándose una mayor proteólisis en comparación a la leche de vaca relacionada con los mayores recuentos en células somáticas, las cuales aportan gran cantidad de activadores del plasminógeno que es convertido en plasmina (Droke y col., 1993; Politis y col., 1994), siendo un parámetro muy importante a tener en cuenta en la fabricación de queso de leche de estas especies.

I.3.3.2. La coagulación enzimática de la leche

La función primera de los enzimas que componen el cuajo añadidos a la leche de fabricación es iniciar la coagulación. Este proceso se basa en una proteólisis puntual, rápida y altamente específica de la κ -Cn a nivel del enlace peptídico Phe₁₀₅-Met₁₀₆, produciendo un péptido hidrofílico llamado caseinomacropéptido (CMP) y micelas de paracaseína.

En su forma nativa, las micelas de caseína se mantienen en dispersión coloidal estabilizadas en la leche por repulsiones de tipo estérico y electrostático, debido a su carga negativa. Cuando el CMP es liberado, la micela se desestabiliza y entonces a una temperatura adecuada ($>20^{\circ}\text{C}$) y en presencia de iones calcio, la leche empieza a coagular.

La κ -Cn caprina es igualmente hidrolizada a nivel del enlace antes nombrado, escindiendo la molécula en 2 segmentos peptídicos: la para κ -Cn o κ -Cn (f1-105) hidrófoba y el CMP o κ -Cn (f106-171; f106-169 en el CMP bovino) altamente hidrófilo (Mercier y col., 1976a, b).

I.3.3.3. Proteolisis durante el madurado del queso

La actividad proteolítica en el queso viene determinada por:

- Los agentes proteolíticos presentes. Fox (1989) establece 5 categorías diferentes de agentes proteolíticos en el queso:

- Los enzimas del agente coagulante.
- Las proteasas endógenas de la leche, especialmente la plasmina.
- Las bacterias del fermento y sus enzimas.
- Otros microorganismos importantes en la maduración de diversas variedades de quesos (bacterias propiónicas, *Brevibacterium linens*, levaduras y hongos especialmente *Penicillium roqueforti* y *P. candidum*).
- Enzimas procedentes de bacterias que no forman parte de los fermentos.

- Las condiciones fisicoquímicas a que se somete el queso durante la maduración, entre las que destacan:

- Relación sal/humedad.
- Temperatura de maduración.
- pH durante la maduración.
- Potencial de oxidación reducción.
- Contenido en calcio y fósforo.

La proteolisis acaecida en el queso se puede dividir en primaria y secundaria. La proteolisis primaria se puede definir como aquéllos cambios en las caseínas β , γ , α_s , péptidos, y otras bandas menores que se detectan en geles de poliacrilamida. Los productos de proteolisis secundaria podrían incluir aquellas proteínas, péptidos, y aminoácidos solubles en la fase acuosa del queso y que son extraíbles en la fracción soluble en agua (Rank y col., 1985).

I.3.3.3.1. Cuajo

Los principales enzimas proteolíticos que componen el cuajo de ternero son la quimosina y la pepsina en proporción de ~75% quimosina y 25% pepsina. Aproximadamente entre 3-15% de la quimosina añadida a la leche de fabricación se retiene en la cuajada y el resto se pierde en el suero de quesería. El enzima retenido en la cuajada permanece estable a lo largo del madurado del queso (Matheson, 1981; Boudjellab y col. 1994).

La concentración de quimosina en forma activa en el queso depende de las tecnologías aplicadas en la fabricación. En la Tabla 8 se nombran los principales factores que afectan la actividad de la quimosina. Los factores 1, 2, 3 y 5 tienen influencia directa en la cantidad retenida en el queso y el resto intervienen en su actividad.

La cantidad de enzima en queso es más o menos proporcional a la añadida; si doblamos la cantidad de enzima en la fabricación no obtendremos justo el doble de enzima retenido en el queso sino aproximadamente 1.5 veces la concentración original.

Durante el desuerado pH bajos causan una alta retención de quimosina en la cuajada, mientras que los coagulantes de origen bacteriano y fúngico se retienen en muy pequeña cantidad independientemente del pH (Creamer y col., 1985).

El CaCl_2 , utilizado en cantidades considerables, produce un efecto similar al descrito anteriormente debido a que contribuye en disminuir el pH de la leche.

La actividad de la quimosina residual se ve afectada por las temperaturas de recalentamiento o cocción. La temperatura de inactivación de la quimosina en suero de quesería se alcanza a 54°C y pH 6.4 durante 14 minutos (Garnot y Molle, 1987). Sin embargo durante la fabricación de queso Comté de Gruyère a 52°C y otras variedades de pasta cocida, aún se detecta una pequeña actividad durante la maduración (Delacroix-Buchet y Fournier, 1992; Boudjellab y col. 1994).

Si partimos de la hipótesis que la cantidad de quimosina en la fase húmeda del queso es similar a la del suero, un queso con mayor humedad tendrá una cantidad de enzima también mayor.

Por último, un incremento en la intensidad de pasterización de la leche de fabricación causa un aumento en el contenido de proteínas solubles en la cuajada, produciendo un queso

de textura gomosa y que no madura bien, debido fundamentalmente a una disminución en la accesibilidad de la quimosina hacia la caseína.

Con respecto a la pepsina y de acuerdo con Green y Foster (1974), en queso tipo Cheddar no se detecta actividad alguna; sin embargo O'Keeffe y col. (1978) encontraron una actividad significativa en el mismo tipo de queso. Esta discrepancia se puede explicar por las diferencias en pH de los quesos estudiados.

Se han realizado múltiples estudios sobre la acción proteolítica de los enzimas del cuajo y de los principales coagulantes microbianos y fúngicos sobre las caseínas bovinas, extrapolando los resultados al queso.

Los estudios llevados a cabo sobre hidrólisis *in vitro* de las caseínas por los enzimas del cuajo han centrado su atención principalmente sobre las α_{s1} y β -Cn. Los trabajos realizados sobre la κ -Cn se han dirigido a identificar el punto exacto de ruptura de esta proteína (Phe₁₀₅-Met₁₀₆) y a estudios de cinética realizados con ayuda de substratos sintéticos. Otros constituyentes caseínicos como la α_{s2} -Cn, para κ -Cn y γ -Cn son bastantes resistentes a la degradación por los enzimas del cuajo en el queso, aunque en solución la α_{s2} -Cn es hidrolizada por la quimosina dando diferentes péptidos (McSweeney y col., 1994a).

La β -Cn bovina en solución es secuencialmente hidrolizada por la quimosina a nivel de los enlaces peptídicos 189-190 y/o 192-193, 163-164 y/o 165-166 y/o 167-168, 139-140 y 127-128 dando los productos de degradación denominados β -I, β -II, β -III y β -IIIb, respectivamente (Creamer, 1976; Pelissier et al., 1974; Visser and Slangen, 1977). β -IIIb sólo se forma en condiciones de incubación extremas, tal como pH muy bajo y después de períodos de incubación muy largos (Visser y Slangen, 1977).

La hidrólisis de la β -Cn por la quimosina es inhibida en gran parte en presencia del 5% de NaCl y totalmente cuando la concentración de NaCl es del 10%.

Mulvihill y Fox (1979b) estudiaron la actividad proteolítica de las quimosinas y las pepsinas bovinas, ovinas, caprinas y porcinas sobre la β -Cn de estas cuatro especies, anunciando secuencias aminoacídicas muy similares para estas proteínas, debido a que presentan un patrón proteolítico muy parecido frente a estos dos enzimas.

Carretero y col. (1994) señalan al menos 4 productos proteolíticos procedentes de la β -Cn caprina tratada con extracto de cuajo de ternero a pH 5.4.

También la α_{s1} -Cn bovina es susceptible de ser hidrolizada por la quimosina. Se han realizado numerosos trabajos dando a conocer que su hidrólisis es dependiente del pH y NaCl (Mulvihill y Fox, 1977, 1979a). La influencia de la concentración de sal sobre la actividad proteolítica, en comparación con la β -Cn, muestra un comportamiento diferente, observándose hidrólisis de la α_{s1} -Cn incluso a concentraciones del 20% (Mulvihill y Fox, 1977).

La hidrólisis de la α_{s1} -Cn para producir su producto inmediato de hidrólisis α_{s1} -I, en presencia de sal en concentración del 5%, se ve ligeramente estimulada a pH 5.2 mostrando la influencia del pH (Mulvihill y Fox, 1980).

La primera hidrólisis producida por la acción de la quimosina en esta proteína conlleva la ruptura del enlace Phe₂₃-Phe₂₄ (Hill y col., 1974) dando el péptido α_{s1} (f 24-199) o α_{s1} -I detectado en geles de poliacrilamida (Creamer y Richardson, 1974).

Mulvihill y Fox (1979a) y Pélissier y col. (1974) identificaron enlaces potencialmente susceptibles de ser hidrolizados en esta proteína. Recientemente se ha establecido de manera definitiva la especificidad de la quimosina sobre la α_{s1} -Cn (McSweeney y col., 1993d), dando a conocer datos muy interesantes. Los perfiles peptídicos solubles a pH 4.6 provenientes de hidrolizados a pH 6.5 y 5.2 (este último añadido de NaCl al 5%) tienen unos péptidos en común y algunas diferencias, como un péptido producido a pH 6.5 que no aparece a pH 5.2, y cinco péptidos detectados a este pH que no se evidencian a pH 6.5. Estos hechos indican la dependencia de las condiciones iónicas en la hidrólisis de esta proteína.

También la α_{s1} -Cn caprina es susceptible de ser hidrolizada por los enzimas del cuajo. Addeo y col. (1988) estudiaron la acción hidrolítica de la quimosina en caseína entera mediante diferentes técnicas electroforéticas dando a conocer 2 bandas de mayor recorrido que la α_{s1} -Cn llamando a estos péptidos de forma global α_{s1} -I, por comparación al de su homóloga bovina.

Carretero y col. (1994) aislaron la α_{s1} -Cn caprina y la sometieron a hidrólisis utilizando un extracto de cuajo, evidenciando en PAGE-urea 3 bandas de mayor recorrido electroforético que la α_{s1} -Cn, que corresponde al péptido primario de degradación (PPD) de esta proteína. La aparición de las diferentes bandas electroforéticas pertenecientes a una misma proteína, se explica por la gran heterogeneidad que presenta la α_{s1} -Cn en la cabra, concretamente debido a diferentes niveles de fosforilación en leches individuales (de 7 a 9).

El hecho de que el PPD aparezca como tres bandas indica que los productos proteolíticos incluyen las zonas fosforiladas.

El estudio de la proteólisis en queso muestra diferencias considerables respecto a las observaciones realizadas sobre caseínas aisladas en disolución. Así la β -Cn es bastante resistente a la proteólisis en la mayoría de las variedades en que se utiliza como coagulante cuajo animal, permaneciendo aproximadamente el 50% de esta proteína sin hidrolizar al final del madurado (Ledford y col., 1966; Phelan y col., 1973; Creamer, 1975; Martín-Hernández y col., 1992; Carretero y col., 1994). Existe una gran controversia en torno a la hidrólisis de la β -Cn por los enzimas del cuajo y la formación de sus productos típicos de degradación (β -I, β -II y β -III) en el queso. Los estudios más recientes identifican en diferentes variedades, incluido el queso de cabra, el péptido β -I (Marcos y col., 1979; Zamorani y col., 1992; Carretero y col., 1994; McSweeney y col., 1994b) y posiblemente β -II (Carretero y col., 1994).

En diferentes variedades de quesos, la α_{s1} -Cn es degradada intensa o totalmente a su producto inmediato de hidrólisis α_{s1} -I, el cual permanece intacto hasta estados avanzados de la maduración donde también es hidrolizado por los enzimas del cuajo y los bacterianos, para dar finalmente péptidos de pequeño tamaño y aminoácidos (Creamer y Richardson, 1974).

Estudios realizados en cuajadas asépticas y quesos con flora controlada han mostrado que el coagulante es el responsable de la proteólisis primaria detectada por electroforesis, así como de la mayor parte del nitrógeno soluble a pH 4.6. Los mismos estudios indican que, contrariamente, el coagulante produce cantidades pequeñas de nitrógeno soluble en ácido tricloroacético al 12% y ácido fosfotúngstico (O'Keeffe y col., 1976a; Visser, 1977b; Visser y de Groot-Mostert, 1977; O'Keeffe y col., 1978).

Se considera que la proteólisis producida por los enzimas del cuajo es responsable de la textura blanda de los quesos, por lo menos en los primeros estadios de maduración, a través de la hidrólisis de la α_{s1} -Cn para producir el péptido α_{s1} -I (de Jong, 1976; Creamer y Olson, 1982). Sin embargo la matriz proteica del queso sufre a lo largo de la maduración otros procesos proteolíticos debidos al propio coagulante, la plasmina y los enzimas bacterianos, modificando así la textura, aroma y sabores del queso.

Para que el queso tenga una calidad organoléptica aceptable es necesario que los diferentes agentes proteolíticos actúen secuencialmente y en un perfecto estado de equilibrio

(Figura 1). Así la acción concertada en los enzimas residuales coagulantes, los endógenos de la leche y las proteasas del fermento proveen de substratos adecuados a las peptidasas del fermento, para que éstas generen péptidos de tamaño reducido y aminoácidos libres. Las desviaciones que se puedan producir en este delicado proceso afectarán a la textura, aroma y sabor deseados en el producto final.

I.3.3.3.2. Enzimas endógenos de la leche

La leche contiene aproximadamente unos 60 enzimas endógenos, algunos de los cuales se han aislado y caracterizado en diferentes especies. Algunos de estos enzimas pueden contribuir de forma activa en diferentes aspectos durante el madurado del queso, pero su nivel de participación aún es incierto por la falta de estudios al respecto. Esta aparente falta de interés se puede justificar por el hecho de que estos enzimas son relativamente constantes en la leche, muchos de ellos se inactivan durante el proceso de pasterización previa a la fabricación del queso y su concentración es mínima en comparación a los enzimas del cuajo o bacterianos.

Los enzimas endógenos que podrían tener una función durante el madurado del queso son la proteasa alcalina o plasmína, la proteasa ácida y la fosfatasa ácida. Es interesante remarcar que todos estos enzimas son estables a los tratamientos térmicos, incluso a altas temperaturas.

Hemos querido incluir en este apartado a la fosfatasa ácida por la importante función que desarrolla durante el afinado, ya que la degradación completa de la caseína durante el madurado del queso se lleva a cabo por la acción combinada de las proteasas y fosfatasas.

a. Plasmína

La plasmína es un enzima a destacar por su función en la proteólisis durante el madurado del queso, contribuyendo de forma más o menos importante en las diferentes variedades.

Este enzima ha sido objeto de numerosos trabajos y revisiones bibliográficas (Humbert y Alais, 1979; Fox, 1981; Visser, 1981; Miranda y Gripon, 1986; Grufferty y Fox, 1988b).

La plasmina (fibrinolisisina EC 3.4.21.7) es una serínproteasa con propiedades similares a la tripsina, presenta un pH óptimo de 7.5-8, pero se demuestra activa en las condiciones de madurado del queso (Kaminogawa y col., 1972). Este enzima tiene una gran especificidad por los enlaces peptídicos que contienen lisina y arginina.

La leche contiene todo un sistema alrededor de este enzima, compuesto por su precursor plasminógeno, inhibidores de la plasmina, activadores del plasminógeno e inhibidores de los activadores del plasminógeno. Tanto la plasmina como el plasminógeno se asocian principalmente a las micelas de caseína y así pasan a formar parte de la cuajada durante su producción; los otros componentes del sistema son solubles y la mayoría se pierden con el suero de quesería.

La plasmina también ha sido descrita en la leche de cabra (Zittle y Custer, 1963; Varshney y Mathur, 1979), presentando características similares y el sistema completo de activadores e inhibidores (Politis y col., 1994).

Existen numerosos trabajos referentes a la hidrólisis producida por la plasmina sobre las diferentes caseínas bovinas. Los substratos más susceptibles de hidrólisis en la leche son $\beta > \alpha_{s2} > \alpha_{s1} > \kappa$ (Chen y Ledford, 1971; Kaminowaga y Yamauchi, 1972; De Rham y Andrews, 1982). La β -Cn bovina tiene unos 15-17 enlaces peptídicos que son susceptibles de ser atacados por la plasmina dependiendo de la variante genética (Pélissier y col., 1974; Pahkala y col., 1989; Visser y col., 1989; Papoff y col., 1995). Los enlaces peptídicos más susceptibles de ser hidrolizados son sin duda $\text{Lys}_{28}\text{-Lys}_{29}$, $\text{Lys}_{105}\text{-His}_{106}$ y $\text{Lys}_{107}\text{-Glu}_{108}$, produciendo las caseínas γ_1 o β (f29-209), γ_2 o β (f106-209), γ_3 o β (f108-209) y los componentes de la fracción proteosa peptona (PP)8 rápido o β (f1-28), PP5 o β (f1-105/107) y el péptido β (f29-106/107) (Gordon y col., 1972; Andrews, 1978 a y b; Andrews y Alichanidis, 1983).

La α_{s2} -Cn también es un buen substrato para la plasmina conociéndose los numerosos enlaces hidrolizados (Snoeren y Van Riel, 1979; Le Bars y Gripon, 1989; Visser y col., 1989).

En solución la α_{s1} -Cn es también susceptible a la hidrólisis por la plasmina (Aimutis y Eigel, 1982; Le Bars y Gripon, 1993; McSweeney y col., 1993c), pero parece ser resistente en la leche. La κ -Cn, al igual que la β -lactoglobulina y α -lactalbúmina se muestran estables frente a este enzima en todas las condiciones estudiadas (Chen y Ledford, 1971; Yamauchi y Kaminogawa, 1972).

En la leche de cabra no se ha estudiado el efecto de este enzima sobre las diferentes fracciones proteicas en forma aislada ni sobre la caseína entera. Las únicas referencias bibliográficas encontradas son las publicadas por Ciafarone y Addeo (1984) donde identifican las γ -Cn caprinas por su similitud a las bovinas mediante electroforesis de isoelectroenfoque y Moio y col. (1990) que describen la γ_2 -Cn caprina por el mismo método electroforético.

Aunque la plasmina no es un agente proteolítico tan importante como los enzimas coagulantes durante la maduración, como se ha podido comprobar por la elaboración de cuajadas modelo, es un factor proteolítico a tener en cuenta sobre todo en algunas variedades de queso.

La actividad de la plasmina en el queso depende de los factores enunciados en la Tabla 9.

Existen diferencias significativas en cuanto al contenido de plasmina en función de la especie animal, individuo, raza, época de lactación y factor clínico (mamitis), observándose un incremento al final de la lactación (De Rham y Andrews, 1983; Richardson, 1983; Rollema y col. 1983; Schaar, 1985; Benslimane y col, 1990; Politis y col., 1989; Pasquini y col., 1993).

La actividad de la plasmina en la leche de fabricación aumenta debido a la pasterización, por la conversión de plasminógeno en plasmina, o bien por la inactivación de los inhibidores (Grufferty y Fox, 1988b). De igual forma, en quesos de pasta cocida, la temperatura de cocción estimula la actividad de la plasmina por el mismo mecanismo (Delacroix-Buchet y Fournier, 1992).

Grufferty y Fox (1988a) y Farkye y Fox (1990) encontraron que en el intervalo de pH 4.6-6.6, la plasmina se mantiene asociada a las micelas de caseína. Por otra parte, estos mismos autores mostraron que ni el pH al desuerado ni el método de salado afectan a la cantidad retenida en el queso de coagulación enzimática. En quesos de coagulación ácida se produce una pérdida de plasmina, al disociarse de la micela de caseína a pH < 4.6, aparte de

obtenerse una cuajada desmineralizada con una mayor retención de enzimas coagulantes.

La concentración óptima de sal en la fase húmeda del queso para la actividad proteolítica de la plasmina se sitúa en el 2% (Delacroix-Buchet y Trossat, 1991).

Finalmente la plasmina es más activa en quesos con pH elevados que no a pH ácidos, aunque es activa en un intervalo de pH 4-9 (Kaminogawa y col., 1972).

Todos estos factores hacen pensar que la plasmina es muy importante, junto con los enzimas bacterianos, en quesos de pasta cocida, donde el coagulante es casi completamente desnaturalizado (Casey col., 1987; Ollikainen y Nyberg, 1988; Ollikainen y Kivelä, 1989). En la Tabla 10 se recoge la importancia relativa de este enzima en comparación a los coagulantes en diferentes variedades de queso.

El estudio de este enzima en cuajadas modelo, donde el coagulante se ha eliminado y la acidificación es producida por vía química con glucono- δ -lactona, indica que la plasmina contribuye a la formación del nitrógeno soluble a pH 4.6, pero en menor cantidad que los enzimas del cuajo o los del fermento, y que no contribuye a la formación de péptidos pequeños ni aminoácidos libres (Visser, 1977b; De Groot-Mostert, 1977).

b. Proteasa ácida de la leche

Esta proteasa endógena ha sido aislada y caracterizada por Kaminogawa y Yamauchi (1972) en leche de vaca. No hay datos concernientes a la existencia de esta proteasa en leche de cabra.

Su actividad óptima se sitúa a pH 3.2-4.0 e hidroliza preferentemente a la caseína $\alpha_{s1} > \beta > \kappa$ en forma aislada. La especificidad por las caseínas es comparable a la de la quimosina produciendo péptidos muy similares a los fragmentos α_{s1} -I, β -I, β -II y para κ -Cn (Kaminogawa y col., 1980).

Visser y De Groot-Mostert (1977) detectaron una actividad proteolítica débil a pH ácido, imputable a esta proteasa, en cuajadas asépticas libres de coagulante y microorganismos, por la aparición de un péptido de movilidad electroforética idéntica al α_{s1} -I.

Se ha aislado y caracterizado una proteasa de carácter ácido, probablemente perteneciente a la familia de las aspartatoproteasas y diferente de la quimosina, en diferentes

variedades de queso (Gouda, Emmental y Gruyère), mostrando propiedades idénticas a la proteasa ácida de la leche (Igoshi y col., 1986; Igoshi y Arima, 1993), que según los autores sería la responsable de la producción del péptido de degradación α_{s1} -I en quesos tipo Suizo, donde el coagulante es casi completamente inactivado en el proceso de cocción de la pasta durante la fabricación.

c. Fosfatasa ácida

La leche contiene principalmente dos tipos de fosfatasas: la ácida y alcalina. La fosfatasa alcalina se concentra en el glóbulo graso y así también en el queso. Este enzima se inactiva por tratamientos de pasteurización y su estudio sólo sería importante en quesos fabricados a partir de leche cruda.

La fosfatasa ácida es estable a las altas temperaturas y aunque se concentra principalmente en la fase acuosa de la leche, también se observa actividad en el queso. El fermento y otras bacterias que se añaden al queso durante la fabricación poseen estas dos fosfatasas. Durante la maduración, las caseínas son hidrolizadas por los enzimas del cuajo, plasmina y proteasas bacterianas formándose fosfopéptidos. La hidrólisis completa de estos fosfopéptidos se lleva a cabo por la acción de diferentes proteasas y peptidasas bacterianas y por las fosfatasas. De esta forma, a las fosfatasas se les asigna un papel importante en el madurado del queso y en el desarrollo del aroma y sabor, papel que hoy en día es sólo putativo ya que no existen trabajos específicos sobre este tema (Fox y Stepaniak, 1993).

I.3.3.3. Sistema proteolítico del fermento

Los fermentos más frecuentemente usados en la fabricación de quesos incluyen principalmente los mesófilos, representados por diferentes especies de *Lactococcus* y *Leuconostoc* y también los termófilos representados por especies de *Lactobacillus* y *Streptococcus salivarius* subsp *thermophilus*.

Numerosas revisiones bibliográficas han centrado su atención en el estudio del sistema proteolítico de estos microorganismos (Castberg y Morris, 1976; Thomas y Mills, 1981;

Thomas y Pritchard, 1987; Kamaly y Marth, 1989; Laan y col., 1989; Khalid y Marth, 1990; Konings y col., 1991; Tan y col., 1993).

Estas bacterias poseen un sistema proteolítico compuesto por proteasas y peptidasas. Las proteasas se localizan predominantemente a nivel extracelular (pared celular o bien membrana celular), aunque se ha encontrado alguna actividad proteásica de tipo intracelular. Las principales actividades proteásicas descritas hasta el momento corresponden a las conocidas bajo el nombre de P_I y P_{III} . Ambas proteasas actúan preferentemente sobre la β -Cn, aunque también sobre α_{s1} y κ , siendo estas proteínas substratos mejores de la proteasa tipo P_{III} que de P_I (Visser, 1993).

Las peptidasas se clasifican en extra e intracelulares y principalmente se distinguen según sean exo o endopeptidasas. Estas degradan los péptidos formados por proteasas de diferentes orígenes hasta pequeños péptidos y aminoácidos.

Este sistema proteolítico es muy importante durante el madurado del queso. Es generalmente aceptado que los enzimas del fermento son liberados a la matriz proteica durante la lisis bacteriana. La localización exacta de estos enzimas es un factor muy importante para que el madurado del queso se lleve a cabo de forma controlada. El orden en el que actúan los enzimas garantiza un balance de hidrólisis adecuado, asegurando la formación de productos que son intermediarios o forman parte de los aromas y gustos de los quesos.

Estudios realizados mediante cuajadas modelo, han mostrado que el sistema proteolítico del fermento es el responsable fundamental de la formación de los péptidos de pequeño tamaño y aminoácidos (Gripon y col., 1975; Desmazeaud y col., 1976; Kleter, 1976; O'Keeffe y col., 1976a; Visser, 1977b; Visser y De Groot-Mostert, 1977; O'Keeffe y col., 1978). Estos enzimas contribuyen muy poco, o nada, en la formación de péptidos de gran tamaño en el queso, aunque son capaces de hidrolizar las caseínas intactas en solución, especialmente la β -Cn (McSweeney y col., 1993b). Este hecho no tiene especialmente importancia en el queso, ya que existen otras proteasas como las del cuajo o la plasmina, a las que ya nos hemos referido, que se encargan de realizar esta función.

I.3.3.3.4. Sistemas proteolíticos de otros microorganismos importantes en el madurado de diferentes variedades de queso

Propionibacteria shermanii es un componente esencial de la microflora de quesos de pasta prensada cocida. Su principal función en estos quesos es la conversión del lactato en propionato, acetato y CO₂, siendo este último responsable de la formación de "ojos" característicos, aunque también tiene una función en la proteólisis durante la maduración.

En queso tipo Emmental, este microorganismo, es responsable de la formación de grandes cantidades de prolina, lo que puede contribuir a su típico sabor dulce.

Propionibacteria parece tener un sistema proteolítico poco desarrollado, sin proteasas pero con numerosas peptidasas (Sahlström y col., 1989).

Brevibacterium linens es el mayor componente de la flora en superficie de diferentes quesos de pasta untable y de algunos quesos tradicionales de superficie enmohecida (Limburger, Tilsit, Gubeen y Milleens). La función exacta de este microorganismo no es conocida, pero se sabe que tiene una gran contribución en la proteólisis y catabolismo de aminoácidos durante el madurado. Este microorganismo tiene un potente sistema proteolítico, especialmente en actividades peptidásicas (Fox y col., 1993).

Las levaduras se desarrollan principalmente en la superficie de los quesos y presentan actividades proteolíticas apreciables que varían según las especies y las cepas. El sistema proteolítico de las levaduras es particularmente apto en la liberación de pequeños péptidos y aminoácidos (Schmidt, 1982).

Los hongos son agentes proteolíticos importantes en diferentes variedades de quesos de superficie y pasta enmohecida, siendo los más profundamente estudiados *Penicillium roqueforti* y *P. caseicolum*. Estos dos hongos poseen un potente sistema proteolítico constituido por metaloproteasas neutras y ácidas, aminopeptidasas y carboxipeptidasas (Trieu-Cuot y col., 1982).

En quesos de vena azul la proteólisis en los primeros estadios de maduración se debe fundamentalmente a la acción de las proteasas del cuajo y plasmina, pero durante el crecimiento, desarrollo y esporulación de los hongos, son los enzimas fúngicos quienes dominan la proteólisis (Le Bars y Gripon, 1981).

En el caso de los quesos de superficie enmohecida son también los enzimas fúngicos, fundamentalmente las proteasas extracelulares de *P. caseicolum*, los responsables de la degradación profunda que sufren las caseínas α_{s1} y β , produciendo péptidos de pequeño tamaño y aminoácidos (Desmazeaud y col., 1976). Esta intensa degradación conduce a la textura típica en estos quesos: blanda a nivel superficial y más compacta en el interior.

I.3.3.3.5. Sistema proteolítico de bacterias acidolácticas no pertenecientes al fermento

Estas bacterias aparecen en el queso, bien procedentes de la leche cruda o pasteurizada, o bien se añaden durante la fabricación. Este tipo de bacterias alcanzan recuentos de hasta 10^7 - 10^8 UFC/g en algunas variedades de quesos y son representadas por diferentes especies del género *Lactobacillus*, *Micrococcus* y *Pediococcus*.

Existe una gran discusión sobre la contribución de estos microorganismos en el madurado del queso. Generalmente se considera que el queso tipo Cheddar y otras muchas variedades producidas a partir de leche cruda, maduran más rápidamente y desarrollan aromas y gustos más intensos, que los producidos con leche pasteurizada, aunque la calidad final del producto es muy variable (McSweeney y col., 1993a; McSweeney y col., 1994c; Bouton y Grappin, 1995). Esto sugiere que estos microorganismos tienen una función importante durante el madurado del queso, aunque no hay que descartar algunos efectos negativos producidos principalmente por *Lactobacillus* y *Pediococcus* de tipo heterofermentativo.

Su contribución al madurado del queso ha sido objeto de recientes revisiones bibliográficas (Peterson y Marshall, 1990; Bhowmik y Marth, 1990).

I.3.3.4. Catabolismo de los aminoácidos

En el curso de la maduración de los quesos, la degradación de las proteínas no se para en la producción de aminoácidos libres. Estos son susceptibles de ser transformados en diferentes compuestos por diversos mecanismos. Numerosas moléculas producidas por el

catabolismo de los aminoácidos son compuestos aromáticos o precursores de estos compuestos. En quesos de vena azul o de superficie enmohecida, se detecta la presencia de ciertos aminoácidos ausentes en las proteínas de la leche, como es el caso del ácido γ -aminobutírico o la ornitina; al parecer estos productos resultan de la degradación del ácido glutámico y de la arginina (Hemme y col., 1982). Otros aminoácidos aparecen en los quesos en cantidades notablemente inferiores que en las caseínas, como es el caso del ácido aspártico, serina, tirosina y contrariamente hay aminoácidos como la leucina, fenilalanina y alanina que se detectan en tasas más elevadas en el queso que en las caseínas (Do-Ngoc y col., 1971).

También hay que hacer mención en este apartado de la presencia de las aminas no volátiles (tiramina, triptamina e histamina) detectadas en la mayoría de las variedades de queso.

Hemme y col. (1982) proponen un esquema general de catabolismo microbiano de los aminoácidos durante el madurado del queso, donde en una primera etapa, los aminoácidos podrían ser modificados por cuatro grupos de enzimas: decarboxilasas, transaminasas, desaminasas y liasas. Los productos de esta primera etapa podrían continuar degradándose hasta la formación de compuestos volátiles, tal como el amoníaco, cetonas, aldehídos, ácidos o compuestos azufrados que forman parte del aroma de la mayoría de los quesos (Adda y col., 1978).

I.3.4. METODOS DE ESTUDIO DE LA PROTEOLISIS DE LAS CASEINAS *IN VITRO* Y EN QUESO

La proteolisis es una hidrólisis de los enlaces peptídicos que conlleva la aparición, a partir de una proteína íntegra, de péptidos de diferente tamaño. La hidrólisis de cada enlace provoca la aparición de nuevos productos con propiedades fisicoquímicas diferentes a las de la proteína inicial. El fraccionamiento de estos productos permite determinar la importancia de la proteolisis, que podemos evaluar por medida de diferentes fracciones con el uso de diversas técnicas: medida de la densidad óptica, medida del nitrógeno, reacción colorimétrica, etc. Las técnicas más utilizadas en el estudio de los hidrolizados de caseína

se pueden agrupar en 2 grandes grupos: precipitaciones fraccionadas (a pH 4.6, o en presencia de ácido tricloroacético más o menos concentrado, por ejemplo) y separación en función de características fisicoquímicas. Estas últimas a su vez se pueden dividir en separaciones por carga (electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de urea, mixtos poliacrilamida-agarosa), pH isoelectrico (isoelectroenfoque), tamaño (electroforesis en medio SDS), etc.

El estudio de la proteólisis comprende igualmente la identificación precisa de los enlaces peptídicos hidrolizados.

La precipitación fraccionada de los hidrolizados de caseínas es muy utilizada porque es un método rápido y simple que nos permite caracterizar fácilmente diferentes grupos de productos nitrogenados. Estos comprenden diferentes fracciones:

1. **fracción no caseínica** que corresponde a los productos solubles a pH 4.6, pH en el cual la caseína intacta es normalmente insoluble,
2. **fracción caseínica** que agrupa los productos insolubles a pH 4.6, es decir las caseínas intactas o proteolizadas en un grado tal que permanecen insolubles a este pH, que corresponde al pHi de las caseínas,
3. **fracción nitrogenada no proteica** que es la fracción soluble en ácido tricloroacético a una concentración final generalmente del 12%.

El estudio de la proteólisis mediante sistemas electroforéticos es un método que está en continua evolución. La separación de las diferentes caseínas según su carga clásicamente se ha realizado a pH 8.6-8.9, en presencia de urea y de un reductor de puentes disulfuro, en gel de almidón, de poliacrilamida o en gel mixto de poliacrilamida-agarosa. La sensibilidad de esta técnica ha hecho que sea un útil muy apreciado para estudiar las diferentes fracciones caseínicas y sus productos de hidrólisis (Eigel y col., 1984; Creamer, 1991).

Otro método electroforético es el isoelectroenfoque. Esta técnica se basa en el principio de que una proteína dispuesta en un punto cualquiera de un gradiente de pH y sometida a un campo eléctrico migrará hasta el valor de pH en que su carga se hará nula. Este sistema posee una resolución muy grande comparada con las electroforesis clásicas y ha sido muy utilizado en estudios de polimorfismo genético de las caseínas (Addeo y col., 1988). Sin embargo, el número tan grande de bandas que aparecen en el gel hace que la interpretación de resultados sea a veces dificultosa. La inclusión de anticuerpos

monoespecíficos para cada una de las caseínas facilita mucho la interpretación de los resultados (Chianese y col., 1995c).

La hidrólisis de una proteína conlleva la aparición de productos de proteólisis con pesos moleculares inferiores al de la proteína original. Así la identificación de estos productos por estimación de sus pesos moleculares aporta información muy valiosa. La determinación de pesos moleculares de proteínas o de péptidos por electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS es hoy en día una técnica muy corriente y es utilizada en la caracterización de los productos de degradación de las lactoproteínas. Este tipo de electroforesis permitió a Groves y col. (1972) determinar el peso molecular de las γ -Cn. Kaminogawa y col. (1980) confirmaron, por electroforesis en presencia de SDS, que los productos resultantes de la acción de la proteasa ácida de la leche sobre las caseínas α_{s1} , β y κ fueron similares a los fragmentos α_{s1} -I, β -I, β -II y para κ -Cn obtenidos por acción de la quimosina.

La electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS ha sido utilizada como segunda dimensión después de una focalización isoelectrica o de un gel de poliacrilamida en presencia de urea para obtener una imagen más completa de un hidrolizado caseínico o para distinguir productos que se solapan en la primera dimensión (Trieu-Cuot y Addeo, 1982; Trieu-Cuot y Gripon, 1982; Tutta y col., 1992).

Los métodos de fraccionamiento utilizados en el queso como medida de proteólisis, a través de medidas del contenido en nitrógeno por el método Kjeldahl de estas fracciones, son numerosos y han sido recientemente revisados por Christensen y col. (1991). De estas fracciones cabe destacar:

1. **fracción soluble en agua**, fracción muy heterogénea y que según estudios electroforéticos contiene las proteínas del suero, productos de bajo peso molecular procedentes de la degradación de las caseínas y aminoácidos libres,
2. **fracción insoluble a pH 4.6** la cual contiene caseínas y péptidos de alto peso molecular según los análisis realizados por HPLC en fase reversa y electroforesis (Christensen, 1991),
3. **fracción soluble a pH 4.6**, fracción muy heterogénea y que según los estudios electroforéticos se compone de las proteínas del suero, la fracción proteosa-peptona, productos de bajo peso molecular procedentes de la hidrólisis de las caseínas y aminoácidos libres (O'Keefe y col., 1978; Christensen, 1991),

4. fracción soluble en ácido tricloroacético al 12% que contiene pequeños péptidos (2-20 residuos) y aminoácidos (Reville y Fox, 1978; Kuchroo y Fox, 1982),

5. fracción soluble en ácido fosfotúngstico al 5%, fracción que contiene pequeños péptidos (<600 Da) y aminoácidos libres (Jarret y col., 1982).

Sin embargo estos métodos de fraccionamiento y valoración del nitrógeno son a veces laboriosos y consumen mucho tiempo. Así se han ideado diferentes métodos rápidos que reemplacen a estos últimos y que a la vez nos den una medida fiable de la proteólisis. Estos métodos se basan en la determinación del contenido en triptófano y tirosina, en el análisis de los grupos amino libres mediante el uso del formol, ninhidrina, fluorescamina, etc, y en el uso de diferentes colorantes como el negro amido o naranja G que precipitan las proteínas y péptidos. Esta serie de métodos han sido revisados por Ardö y Meisel (1991).

Las técnicas de electroforesis utilizadas en el estudio de la proteólisis del queso son las mismas que las descritas anteriormente. -Creamer (1991) describe las técnicas más corrientes, sus limitaciones y las compara con otros métodos. Shalabi y Fox (1987) compararon diversas técnicas electroforéticas en el examen de diferentes fracciones nitrogenadas del queso obteniendo mejores resultados con la utilización de geles PAGE-urea.

Por último nombrar los métodos cromatográficos, cada día más numerosos y utilizados, como la cromatografía de permeación de geles, cromatografía de intercambio iónico o la fase reversa (RP), en sus versiones clásica o aplicada a la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC). Ardö y Gripon (1991) describen estos métodos, su utilización y aplicación en la valoración de la proteólisis en el queso.

I.3.5. FABRICACION DE CUAJADAS MODELO

En estos últimos años se han desarrollado diversos sistemas modelo que permiten cuantificar, de forma directa o indirecta, la contribución de cada uno de los diferentes agentes proteolíticos que participan durante el madurado del queso. Estos sistemas modelo abarcan una serie de métodos de estudio que comprenden desde la caseína entera o las diferentes fracciones caseínicas aisladas, hasta la fabricación de cuajadas modelo en las que están presentes uno o varios agentes proteolíticos.

El estudio de la acción individual de diferentes enzimas presentes en el queso sobre substratos caseínicos, se centra principalmente en la obtención de información referente a la caracterización de péptidos, por diferentes sistemas electroforéticos, en condiciones óptimas de hidrólisis y condiciones iónicas similares a las que se dan en el queso. Y por otra parte en la especificidad del enzima hacia el substrato, evidenciando los puntos precisos de ruptura proteica. Los resultados se extrapolan después a la proteolisis observada en el queso.

El estudio de cuajadas modelo nos aproxima aún más a la realidad de los procesos bioquímicos que acontecen en el queso, calificando y cuantificando la acción individual de cada uno de los agentes proteolíticos antes expuestos.

En este apartado se revisarán las diferentes técnicas, hoy en día disponibles, en la elaboración de las cuajadas modelo.

1.3.5.1. Obtención y preparación de la leche de fabricación

Hasta el momento los métodos utilizados en la producción de cuajadas modelo se han basado principalmente en una recolección de leche lo más higiénica posible e incluso aséptica, para evitar la presencia de la flora que se añade a la leche durante el ordeño. Perry y McGillivray (1964) desarrollaron una técnica aséptica de ordeño, esterilizando químicamente las pezoneras de ordeño y desinfectando la ubre de animales previamente seleccionados por la calidad microbiológica de su leche (< 100 UFC/mL). Esta técnica también ha sido utilizada por otros autores como Kleter y de Vries (1974) y O'Keeffe y col. (1976b) obteniendo recuentos de 6-100 UFC/mL y < 500 UFC/mL, respectivamente. Kleter (1976) y Reiter y col. (1969) obtuvieron leche aséptica directamente por cateterización de las cisternas de la ubre del animal. La correcta utilización de estos métodos nos permite obtener leche estéril directamente del animal. En la práctica estos métodos son poco utilizados, por la gran complejidad de manejo que conllevan, el riesgo que supone para el animal y las pequeñas cantidades de leche recolectadas, insuficientes para realizar producciones de queso, especialmente en el caso de los pequeños rumiantes.

Las leches así recolectadas, se sometían normalmente a diferentes tratamientos térmicos para reducir al máximo los recuentos bacterianos. Perry y McGillivray (1964) usaron

una pasteurización en cuba (68°C, 5 min) y Champman y col. (1966) pasteurizaron (71.6°C, 17 s) sin utilizar ninguna técnica de ordeño aséptico, obteniendo leche con muy bajos recuentos para la fabricación de queso. Otros muchos autores han utilizado la pasteurización a alta temperatura y corto tiempo, para obtener leche de muy buena calidad microbiológica (Kleter, 1976; Reiter y col., 1967; Visser, 1976 y 1977a).

Turner y Lawrence (1986) mostraron que para obtener cuajadas asépticas con ≤ 1 UFC/10 kg de producto, procedentes de una leche con recuentos $\geq 10^3$ UFC/mL era necesaria, una reducción de 10^8 durante la pasteurización, lo cual se consigue calentando a 72°C durante 58 s o a 83°C y 15 s.

Le Bars y col. (1975) obtuvieron leche estéril (< 10 bacterias/mL, en forma de esporas) con un tratamiento térmico de esterilización (UHT) a 110°C que les permitió fabricar una cuajada modelo. Esta técnica presenta el inconveniente de la influencia negativa que tiene el tratamiento térmico UHT sobre la coagulación de la leche y la imposibilidad de formación de la cuajada con una dureza adecuada. Para paliar estos defectos se tiene que modificar la tecnología de fabricación aumentando el aporte de CaCl_2 , la cantidad de enzimas coagulantes añadidos y la temperatura de coagulación, parámetros que son muy importantes en el desarrollo del madurado del queso.

Diferentes autores describen la presencia de esporas de *Bacillus* en las cuajadas modelo, provenientes de la leche de fabricación. Estas bacterias proceden de la piel de la ubre y se añaden a la leche a través de las pezoneras de la máquina de ordeño mecánico, siendo resistentes a los tratamientos térmicos. El uso de desinfectantes aplicados a la ubre y la desinfección intensiva de las instalaciones de ordeño podría evitar en parte este problema, pero no de forma radical (Visser, 1977a). Para evitar esta fuente de contaminación se han ideado diferentes métodos como la adición a la leche de producción de diferentes antibióticos (Reiter y col., 1967; Le Bars y col., 1975), nitratos y timerosal (Noomen, 1977a y b), etc.

La nisina en asociación con la penicilina y la estreptomina, son generalmente suficientes para detener el desarrollo de *Bacillus* durante un período mínimo de 1 mes (Le Bars y col., 1975).

En la producción de las cuajadas modelo es necesario una fabricación en condiciones asépticas. Diferentes autores han utilizado sistemas cerrados estériles de producción, donde se incluye todo el material de la fabricación y el aire es esterilizado (Mabbit y col., 1959;

Perry y McGillivray, 1964; Chapman y col., 1966; Reiter y col., 1967 y 1969). Le Bars y col. (1975) fabricaron cuajadas modelo en cámaras asépticas con aire filtrado. O'Keeffe y col. (1975 y 1976b) y McSweeney y col. (1994c) utilizaron cubas pequeñas introducidas en baños termoestabilizados de agua realizando las producciones en cámaras de flujo laminar.

I.3.5.2. Fabricación de cuajadas modelo libres de fermento

Durante los primeros momentos de la maduración del queso, se produce una bajada de pH debida principalmente a la transformación de la lactosa en ácido láctico, producido fundamentalmente por la flora del fermento. Si se pretende producir un queso libre de fermento para caracterizar la proteólisis producida por otros enzimas, nos veremos obligados a simular esta bajada de pH a fin de reproducir idénticas condiciones de reacción.

La técnica de producción de cuajadas modelo libres de fermento fue introducida por Mabbit y col. (1955) y ensayada en queso tipo Cheddar usando la glucono- δ -lactona (GDL). La GDL es un acidificante químico que actúa de forma progresiva debido a su conversión en ácido glucónico en presencia de agua. Cuando se añade a la cuajada para simular el descenso de pH producido por el fermento, ésta reduce el pH de forma más rápida que cuando se acidifica de forma biológica. Un pH inferior al normal, durante el desuerado de la cuajada, afecta de forma significativa a la cuajada final debido a diferentes fenómenos antes comentados: mayor retención de los enzimas del cuajo (sobre todo de quimosina) en la matriz proteica de la cuajada (Visser, 1977a; Creamer y col., 1985) y una desintegración precoz del complejo fosfato cálcico coloidal que mantiene unidos a diferentes grupos de micelas de caseína, haciendo que éstas sean más susceptibles a la proteólisis (Fox, 1989).

La técnica desarrollada por Mabbit y col. (1955) causa mayor descenso en el pH que el producido por la adición del fermento (O'Keeffe y col., 1975), y por lo tanto es cuestionable para su uso. La técnica de O'Keeffe y col. (1975), basada en la anterior, ajusta mejor la curva de acidificación producida por el fermento, mediante la utilización de ácido láctico y GDL en la leche de producción y cuajada, respectivamente.

I.3.5.3. Producción de cuajadas modelo libres de enzimas coagulantes

La producción de cuajadas modelo libres de enzimas coagulantes nos permite, de forma indirecta, calificar y cuantificar la contribución de estos enzimas tan importantes durante la maduración del queso. Por otra parte suprimiendo el fermento y los enzimas coagulantes podremos estudiar la contribución de los enzimas endógenos de la leche.

La producción de este tipo de cuajadas es complicada ya que el coagulante es imprescindible para obtener una cuajada de tipo enzimático. Se ha desarrollado una serie de técnicas basadas en la inactivación del coagulante, después de la hidrólisis de la κ -Cn. O'Keeffe y col. (1977) utilizaron como coagulante la pepsina porcina, enzima más sensible al pH que la quimosina, ya que pierde totalmente su actividad a pH 7. Estos autores fabricaron cuajadas libres de coagulante incrementando el pH de la cuajada, ya cortada y antes del desuerado, hasta pH 7 y calentándola hasta 40°C para inactivar la pepsina porcina.

Visser (1976) usó leche desprovista de calcio y magnesio en la producción de este tipo de cuajadas. A bajas concentraciones de calcio, la coagulación no se produce, pero sí la hidrólisis de la κ -Cn. El coagulante puede ser entonces fácilmente inactivado por tratamiento térmico (72°C, 15 s) obteniendo posteriormente la cuajada por adición de CaCl₂.

Mulvihill y col. (1979) mostraron las características tan peculiares que presenta la quimosina de lechón de cerdo, que es capaz de hidrolizar la κ -Cn pero que parece inactiva hacia las caseínas β y α_s , lo que apunta un posible uso en la obtención de cuajadas libres de coagulantes.

Por último, el uso de los enzimas coagulantes inmovilizados, capaces de hidrolizar la κ -Cn sin incorporarse a la leche, sería una opción ideal en la fabricación de este tipo de cuajadas modelo. Sin embargo, diferentes estudios realizados con enzimas inmovilizados han mostrado que parte de éstos se añaden a la leche por solubilización (Carlson y col., 1986).

I.3.5.4. Cuajadas modelo libres de plasmina

La eliminación de los efectos proteolíticos de la plasmina en las cuajadas modelo, hoy en día aún es objeto de investigación. La contribución de este enzima en el madurado puede

ser investigada por eliminación del resto de los agentes proteolíticos, produciendo una cuajada donde el coagulante es posteriormente inactivado y acidificada con GDL.

Son bien conocidos diferentes inhibidores de la plasmina (denominados generalmente inhibidores de las serínproteasas), sin embargo la mayoría de ellos son demasiado tóxicos para su utilización en este tipo de experiencias. Otras sustancias, tales como el inhibidor trípico de la soja, aprotinina, ácido 6-amino hexanoico (AAH), N- α -p-tosil-L-lisina clorometilcetona (TLCK) o la 3,4-dicloroisocumarina, no presentan tanta toxicidad, pero prácticamente no han sido utilizadas en el estudio de cuajadas modelo. Farkye y Fox (1991) utilizaron el AAH para mostrar la contribución de la plasmina en el madurado de queso tipo Cheddar, fabricado en condiciones normales. Los resultados obtenidos por estos autores, muestran que la plasmina tiene una función importante en la formación del nitrógeno soluble en el madurado de este tipo de queso.

I.4. LOS QUESOS DE LECHE DE CABRA

Como se ha indicado anteriormente en la introducción de esta memoria, la mayor parte de la leche de cabra se destina a la fabricación de queso y en la mayoría de los casos, la fabricación de este tipo de queso se ha realizado a nivel artesanal más que a escala industrial. Es precisamente por este motivo que se han desarrollado numerosas variedades que han tomado el nombre de la localidad de procedencia. En Francia los más conocidos son: *Saint Maure*, *Chabichou*, *Crotting de Chavignol*, y en España, Majorero, Camerano, Málaga, Cádiz y Almería.

Tanto en los quesos de cabra como en los de oveja, parece que cada país de la Europa Comunitaria se ha decantado por unos sistemas de elaboración, de forma que sus respectivos quesos pertenezcan casi exclusivamente a unas determinadas familias. Así la totalidad de los quesos de cabra franceses pertenecen a quesos de pasta blanda y superficie enmohecida, mientras que esta familia apenas si tiene presencia en España, donde abundan los quesos de pasta prensada no cocida.

Centrándonos en los quesos españoles elaborados con leche de cabra y tomando como referencia el *Catálogo de Quesos de España* (Ministerio de Agricultura, Pesca y

Alimentación, 1990), nos encontramos que de las 81 variedades de quesos catalogados en España, 25 se elaboran exclusivamente con leche de cabra y otros 21 son leches de mezcla, donde también figura la leche de cabra.

Entre los quesos puros de cabra existen algunas variedades que se consumen siempre como quesos frescos: Alicante, Camerano, Cádiz y Murcia. Todos son de coagulación enzimática y pasta compacta o prensada pero blanda, ya que contienen más de un 50% de humedad. Hay otros como los de La Siberia, La Vera y Serranías de Málaga, de elaboración similar, pero consumidos tiernos, y los de Acehuche, Albarracín, Alhama de Granada, Buelles, Conejero, Gata-Hurdes, Majorero, Palmero, Quesaila, Sierra Morena y Tiétar, que se consumen semicurados o curados. El de Aracena suele consumirse de muy curado a añejo. También pertenecen a éste último grupo de quesos, los quesos de Ibores y el de Murcia al vino, con la particularidad de que reciben tratamientos superficiales que dan al producto final unas características organolépticas totalmente diferenciales. El de los Ibores es sometido durante su afinado a un embadurnado superficial con una mezcla de aceite de oliva y pimentón dulce, que produce una corteza limosa de color anaranjado. El de Murcia al vino es lavado tres o cuatro veces de forma superficial con vino tinto, adquiriendo la corteza una tonalidad violácea.

Finalmente, entre los quesos puros de cabra hay unas variedades cuya elaboración es netamente distinta de las anteriores, quedando encuadrados en otras familias. El de Babia y Laciana es de coagulación predominantemente láctica y pasta blanda con la corteza ligeramente enmohecida. El de la *Garrotxa* es de coagulación mixta, pasta blanda y corteza totalmente cubierta de una capa aterciopelada de moho grisáceo, con una textura untuosa y sabor acentuado. Por último, el *Cendrat del Montsec* es de coagulación netamente láctica, con pasta blanda y cremosa, cubierto externamente de cenizas y moho.

Entre los quesos elaborados con mezcla de leche de cabra y oveja, merece especial mención el Tronchón, queso de coagulación enzimática y pasta prensada.

Los quesos españoles de pasta azul se elaboran casi en su totalidad con mezcla de leche de dos o tres especies, aunque siempre con mayor presencia de leche de vaca. Cabrales, Picón y Gamonedo se encuentran entre nuestros quesos más prestigiosos y valorados.

En estos últimos años se han publicado diferentes trabajos sobre distintas variedades de quesos de leche de cabra, tales como Majorero (Fontecha y col., 1990; Mantín-Hernández y col., 1992), Gredos (Medina y col., 1992), Los Ibores (González y col., 1993), Valdeteja (Fresno y col., 1988; Carballo y col., 1994), Babia-Laciana (Argumosa y col., 1992), Cendrat del Montsec (Carretero y col., 1992 y 1994; Mor-Mur y col., 1992 y 1994) y Garrotxa (Beltrán y col., 1993).

La composición en fracciones nitrogenadas de un queso de cabra madurado es diferente según el tipo de fabricación quesera, y así de la actividad más o menos importante de los agentes responsables de la degradación de las proteínas en el curso de la fabricación y de la maduración.

La degradación de las proteínas constitutivas del queso es poco intensa en un queso de pasta prensada tipo Babia-Laciana ya que al final de su afinado, la cantidad de nitrógeno soluble observado es del orden del 10% del nitrógeno total. La proteólisis global es netamente más amplia en quesos de pasta blanda y con corteza enmohecida como el *Cendrat del Montsec* y en quesos de pasta lavada, donde se observan cantidades importantes de nitrógeno soluble a pH 4.6, del orden del 29% y del 41%, respectivamente (Tabla 11).

La repartición de las diferentes fracciones nitrogenadas pertenecientes a la fracción soluble, es igualmente diferente de un tipo de queso a otro (Tabla 11). Los quesos cuya maduración es debida principalmente a las bacterias lácticas, como el queso Babia-Laciana, contienen niveles relativamente bajos en nitrógeno no proteico y bajos niveles en nitrógeno amoniacal (alrededor del 53% y 6.6%, respectivamente), en cambio los madurados bajo el efecto de una flora compleja, en la que tiene parte la flora fúngica, son quesos ricos en nitrógeno no proteico y amoniacal, que representan el 84% y 18%, del nitrógeno soluble, respectivamente.

Los efectos del polimorfismo de la α_{s1} -Cn en la fabricación y madurado del queso de leche de cabra están recibiendo especial atención. Se han realizado diferentes ensayos de fabricaciones (Vassal y col., 1994) tomando como modelo un queso de pasta blanda y superficie enmohecida (*Pélardon des Cévennes*) y otro de pasta prensada no cocida (*St. Paulin*), evidenciando diferencias en la firmeza máxima y velocidad de endurecimiento del gel, rendimiento y firmeza media de los quesos para los diferentes alelos estudiados: AA > EE > FF. Las diferencias de firmeza del queso constatadas por medidas instrumentales,

también han sido confirmadas por un jurado de degustación, según el cual, el gusto a "cabra" tiende a ser menos pronunciado en los quesos fabricados a partir de leches AA. Resultados similares han sido descritos por Pirisi y col. (1994), en cuanto a composición de leche, propiedades de fabricación y características de textura en estos tipos de queso. Por otra parte el nivel de proteólisis es más importante (como muestran los análisis Kjeldhal realizados a partir de las fracciones nitrogenadas), y los productos de hidrólisis diferentes (como muestran los perfiles electroforéticos y de HPLC) en quesos tipo A comparados con los tipo F (Delacroix-Buchet y col., en prensa).

CAPITULO II

II.1. HIDROLISIS DE DIFERENTES SUBSTRATOS CASEINICOS POR LOS ENZIMAS DEL CUAJO Y PLASMINA

II.1.1. PREPARACION DE SUBSTRATOS CASEINICOS

II.1.1.1. Obtención de las caseínas enteras

Las caseínas completas caprinas y bovinas se prepararon a partir de leche entera de mezcla procedente de cabras de raza Murciano-Granadina y vacas de raza Frisona, respectivamente, pertenecientes a la Granja Experimental de la *Facultat de Veterinària* de la UAB (Bellaterra, Barcelona). El proceso de separación fue el siguiente: desnatado (3000 rpm, 30°C, 20 min), dilución a la mitad con agua destilada, precipitación a pH 4.6 con HCl 1 N, 30°C y posteriormente centrifugación a 1000 rpm, 10 min. El precipitado se redispersó en agua destilada y se llevó a pH 7 con NaOH 1 N para su completa disolución. El proceso de precipitación-disolución se repitió tres veces consecutivas y finalmente la caseína fue liofilizada.

En el estudio de hidrólisis de las caseínas enteras caprinas con diferentes genotipos para la α_{s1} -Cn (BB, BE, BF, BO, EE, EF, EO, FF) se partió de leches individuales de animales con cada genotipo. La caracterización de estos animales fue realizada por la Unidad de Genética de la *Facultat de Veterinària* de Barcelona, utilizando la técnica de Reacción de la Polimerasa en Cadena (PCR) (Amigues y col., en preparación).

En el estudio de hidrólisis de las α_{s1} -Cn, variantes A y F por acción de diferentes enzimas coagulantes, se partió de leche entera de cabras de diferentes razas, provenientes de la *Station de Testage Caprin* (48110 Ste. Croix Vallée Française, Francia) y que presentaban homocigosis para los alelos A y F de la α_{s1} -Cn.

II.1.1.2. Preparación de la β -Cn caprina

Con el fin de aumentar la eficacia y el rendimiento del método de obtención de la β -Cn, se prepararon fracciones ricas en esta proteína para posteriormente purificarla, siguiendo

la metodología detallada a continuación.

II.1.1.2.1. Preparación a gran escala de fracciones ricas en caseínas β y α_s

Se utilizó el método de Hipp y col. (1955), basado en la distinta solubilidad que presentan las fracciones caseínicas a diferentes concentraciones de urea.

Se partió de la caseína entera liofilizada que se disolvió al 10% en urea 6.6 M y se añadió H_2SO_4 3.5 M, lentamente, hasta pH 1.5. La solución se diluyó con agua destilada hasta una concentración de urea 2.2 M. Después de 2 h de reposo, la proteína precipitada se recogió por centrifugación a 3000 rpm, durante 20 min a temperatura ambiente. El precipitado se lavó con una mezcla compuesta de urea 6.6 M, H_2SO_4 3.5 M y agua destilada en proporciones semejantes a las anteriores y fue recogido de nuevo por centrifugación. Los dos sobrenadantes obtenidos se guardaron para ser dializados y liofilizados posteriormente (sobrenadante 1). Este tratamiento nos permite extraer la κ -Cn del resto de los componentes caseínicos.

El precipitado obtenido (precipitado 1) se disolvió en urea 6.6 M, acidificando el pH de la disolución hasta 4.5 con HCl 1.M, para posteriormente diluirlo con agua destilada hasta alcanzar una concentración de urea 3.3 M. A esta concentración de urea el complejo caseínico α_s precipita quedando en solución la β -Cn. Este segundo precipitado se separó por centrifugación y fue lavado varias veces con agua destilada, disuelto en agua, dializado y liofilizado (precipitado 2). El sobrenadante (sobrenadante 2) se diluyó hasta una concentración de urea 1.7 M y se ajustó el pH a 4.9, obteniéndose un precipitado que se recogió por centrifugación. Este precipitado se lavó con agua varias veces, se dializó y finalmente se liofilizó (precipitado 3). Al sobrenadante resultante de esta separación se le añadió $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ en forma sólida hasta una concentración 1.6 M, para precipitar el resto de proteína disuelta, se centrifugó, se dializó y finalmente se liofilizó (precipitado 4). La Figura 2 esquematiza el proceso de obtención de estas fracciones.

II.1.1.2.2. Obtención de β -Cn caprina a partir de las fracciones enriquecidas con DEAE-celulosa mediante un procedimiento discontinuo

Este método, descrito en la separación de las diferentes fracciones caseínicas bovinas (Wei y Whitney, 1985), se testó sobre la caseína entera caprina para posteriormente adecuarlo a la obtención de β -Cn caprina a partir de fracciones enriquecidas en esta proteína.

Preparación de la celulosa

En la separación de las diferentes fracciones caseínicas se utilizó una celulosa modificada, la dietilaminoetil celulosa (DEAE-cellulose fast flow, Sigma, St Louis, USA), que se suspendió en agua destilada, se filtró y se sometió a los siguientes lavados: NaCl 0.25 N y NaOH 0.25 N, hasta pH básico del filtrado, agua destilada hasta pH neutro y HCl 0.25 N hasta pH ácido. Finalmente se lavó con agua destilada hasta que el filtrado dio nuevamente pH neutro.

La celulosa húmeda se acondicionó con tampón imidazol-HCl 0.01 M, pH 7.4, añadido de timerosal 0.02% (p/v) como agente germicida. Aproximadamente se utilizaron 6 mL de tampón por cada gramo de celulosa húmeda. La celulosa así preparada se dejó en reposo 30 min para después separar por decantación diferentes impurezas de la celulosa y se filtró a vacío a través de papel Whatman n° 41. Finalmente se almacenó a 4°C en recipiente hermético hasta su uso.

Preparación de la caseína

Con el fin de controlar la pureza de las fracciones caseínicas separadas mediante este método, y en especial de la β -Cn, se realizó una separación a pequeña escala partiendo de 2 g de caseína entera liofilizada.

La caseína se disolvió en 80 mL de urea 3.3 M que contenía 0.02% de timerosal y ditioneitol (DTT) 2 mM. Esta dispersión se dializó durante 24 h a 4°C, frente a 2 veces su volumen de la solución: urea 3.3 M, timerosal 0.02% y 77 mg DTT/L, pH 7.4 (a esta solución la denominaremos tampón urea, TU).

Fraccionamiento

Los 80 mL de la disolución anterior se mezclaron en un vaso de precipitados de 250 mL, con 4 g de celulosa (peso en seco), previamente acondicionada, y se diluyeron con TU hasta conseguir una relación 25:1 (v:p).

La mezcla se agitó suavemente de forma manual durante 5 min y se dejó en reposo otros 5 min y, a continuación, se filtró a vacío a través de papel Whatman nº 40. La celulosa retenida sobre el papel de filtro, se devolvió al vaso de precipitados y se repitió dos veces el mismo procedimiento, añadiendo cada vez un volumen de TU similar al del filtrado anterior. Las diferentes fracciones caseínicas se fueron obteniendo por repetición de este procedimiento con el uso de concentraciones salinas crecientes en el TU, según el gráfico que aparece en la Figura 3, con la excepción de que no se incluyó DTT en el TU con concentraciones salinas superiores a 0.085 M.

Los diferentes filtrados se recogieron por separado, se dializaron exhaustivamente frente a 100 veces su volumen de agua destilada, mediante una membrana de diálisis Visking (Medinacell International Ltd., Reino Unido), y se liofilizaron. Su caracterización se realizó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) en presencia de urea (PAGE-urea) y dodecil sulfato sódico (PAGE-SDS).

II.1.1.2.3. Obtención de α_{s1} -Cn caprina a partir de las fracciones enriquecidas

Las fracciones enriquecidas en el complejo caseínico α_s obtenidas por precipitación diferencial en soluciones de urea (precipitado 2) se repasaron a través de la DEAE-celulosa, según el método descrito anteriormente, con el objeto de retirar la β -Cn contaminante.

El complejo caseínico α_s fue fraccionado en las α_{s1} y α_{s2} -Cn mediante el método propuesto por Brignon y col. (1976). La fracción α_s se disolvió en urea 6.6 M y el pH se ajustó a 7 para dializarse posteriormente. A esta solución se le añadió etanol al 96% en proporción 1:1 (v/v) seguido de la adición lenta de acetato amónico 1 M disuelto en etanol al 75% para precipitar la α_{s2} -Cn. El precipitado recogido por centrifugación, se dializó y liofilizó. El sobrenadante se diluyó con agua hasta alcanzar una concentración en etanol del

10% para después precipitar la α_{s1} -Cn a pH 4.6 mediante adición de HCl 1 M. El precipitado se redisolvió, dializó y finalmente se liofilizó.

II.1.1.3. Preparación de las α_{s1} -Cn caprinas variantes genéticas AA y FF

Con el objeto de aumentar la eficacia y rendimiento en la obtención de estas dos proteínas se prepararon fracciones ricas en ambas que posteriormente fueron largamente purificadas.

II.1.1.3.1. Preparación a gran escala de fracciones ricas en α_{s1} -Cn AA y FF por cromatografía de intercambio catiónico en *batch*.

Las α_{s1} -Cn AA y FF se obtuvieron por el método descrito por Jaubert y Martin (1992), mediante cromatografía de intercambio catiónico, utilizando como soporte *SP-Sepharose Fast Flow* (Pharmacia Biotech., Uppsala, Suecia), en un sistema discontinuo a fin de purificar mayores cantidades de proteína.

Preparación del soporte cromatográfico

La sefarosa en cantidad de 300 mL y suspendida en etanol al 20%, se lavó repetidas veces con agua desionizada hasta quedar libre de alcohol, por filtración a vacío a través de un embudo-filtro de borosilicato de porosidad 5-15 μm y se acondicionó añadiendo tampón formiato-Na 0.2 M, conteniendo urea 6.6 M, pH 4.0 (tampón A), hasta que el pH del filtrado fue idéntico al del tampón original.

Preparación de las caseínas

Como en el fraccionamiento anterior el método de separación se testó tomándose 1 g de las caseínas enteras liofilizadas que se disolvieron en 30 mL de tampón A que contenía β -mercaptoetanol 14 mM. Seguidamente estas disoluciones se dejaron durante 2 h a 37°C

a fin de que se completase la reducción.

Fraccionamiento

Las caseínas reducidas se mezclaron en embudos-filtros de 200 mL con 50 mL de la sefarosa ya acondicionada y se diluyeron con 100 mL de tampón A, conteniendo NaCl 0.12 M. La mezcla se agitó muy suavemente durante 5 min y a continuación se filtró a vacío. La sefarosa retenida en el filtro se volvió a resuspender con un volumen igual al del filtrado anterior y se repitió la extracción de la misma manera. Las diferentes fracciones caseínicas se obtuvieron por repetidas extracciones con concentraciones salinas crecientes en el tampón A, según el gráfico que aparece en la Figura 4.

Se filtraron pequeñas alícuotas de las diferentes fracciones caseínicas obtenidas a través de filtros de 0.45 μm (Millipore Corp., Bedford, USA) y se analizaron por HPLC en fase reversa (RP-HPLC) para verificar su pureza, haciendo especial atención a la fracción donde se eluye la α_{s1} -Cn. Finalmente las fracciones ricas en α_{s1} -Cn, se dializaron en agua y se liofilizaron para ser sometidas, posteriormente, a una purificación final en columna preparativa.

En los procesos posteriores de fraccionamiento y obtención de fracciones ricas en α_{s1} -Cn, se partió de 5 g de caseína entera utilizando la totalidad de la sefarosa (300 mL) en el fraccionamiento. La fracción 3 consistió en sólo dos filtrados, uno realizado con tampón A y NaCl 0.35 M para obtener la totalidad de α_{s1} -Cn, y otro utilizando tampón A y NaCl 1 M, para eluir toda proteína del soporte cromatográfico. En la variante F se realizaron 5 extracciones con tampón A y NaCl 0.20 M, en lugar de 4, para extraer al máximo esta proteína.

II.1.1.3.2. Obtención de las α_{s1} -Cn AA y FF puras en columna de fase reversa preparativa

Las fracciones ricas en α_{s1} -Cn se separaron en un equipo de cromatografía líquida rápida de proteínas (FPLC[®], Pharmacia Biotech.) compuesto por un monitor detector UV-1,

conectados a un controlador LCC-500. La separación se realizó mediante una columna HR16/50 (Pharmacia) de dimensiones 50 cm x 16 mm rellena de silicagel C₄, 300 Å, 15-20 μm (Vydac C₄, Touzart y Matignon, Francia).

Los solventes, previamente degaseados con helio, consistieron en: solvente A, ácido trifluoroacético (TFA) 0.115% (v/v) en agua y solvente B, TFA 0.1% (v/v) en acetonitrilo (ACN) al 80% en agua (v/v). En la separación de las caseínas se utilizó un gradiente lineal de elución del 45 al 55% del solvente B durante 185 min, con un caudal de 3 mL/min.

Las muestras enriquecidas en α_{s1}-Cn fueron disueltas en el solvente A, hasta una concentración del 6% (p/v), inyectándose 50 mL de esta solución en cada ciclo de separación cromatográfica.

II.1.1.4. Caracterización de las fracciones proteicas mediante electroforesis y RP-HPLC

Las diferentes fracciones caseínicas obtenidas en el proceso de separación a partir de la caseína entera, se caracterizaron mediante PAGE-urea y PAGE-SDS como se describe en el apartado 1.7 de este capítulo.

RP-HPLC

Esta técnica fue utilizada en la caracterización de las fracciones enriquecidas en α_{s1}-Cn AA y FF, y en el control de pureza de estas proteínas.

El equipo de cromatografía dispuso de dos bombas tipo 501 y 510, un detector de absorvancia 484 (214 nm) y un inyector automático WISP 712, controlado por el soporte informático Baseline 810 (Waters, Milford, USA).

Las separaciones se llevaron a cabo mediante una columna Vydac C₄, 214 TP 54 (Touzart y Matignon, Francia) de 15 cm de longitud, mantenida a una temperatura de 40°C.

Los solventes, previamente degaseados con helio, consistieron en: solvente A, TFA 0.115% (v/v) en agua y solvente B, TFA 0.1% (v/v) en ACN al 80% en agua (v/v). En la separación de las caseínas se utilizó un gradiente lineal de elución del 37 al 53% del solvente B durante 30 min, con un caudal de 1 mL/min (Jaubert y Martin, 1992).

II.1.2. ENZIMAS, INHIBIDORES Y SUBSTRATOS COMERCIALES

Extractos de cuajo de ternero (Granday® 520, Renifor-15/E)

La actividad declarada para Renifor-15/E por la casa comercial (Laboratorios Miret S.A., Barcelona) es de 100 unidades coagulantes (UC)/mL (1 UC es la cantidad de enzima requerido para coagular 10 mL de leche en polvo reconstituida, de alta calidad microbiológica, conteniendo CaCl₂ 10 mM en 100 s a 30°C, según se especifica en la norma FIL 110A:1987). El extracto de cuajo contiene 780 mg de quimosina (EC 3.4.23.4)/L y 565 mg de pepsina bovina (EC 3.4.23.1)/L. La actividad coagulante de la pepsina bovina representa el 25% de la actividad coagulante total.

La actividad declarada para Granday® 520 por la casa comercial (Sanofi Bio-Ind., 21201 Beaune Cedex, Francia) fue de 550 mg/L de quimosina y 303 mg/L de pepsina bovinas.

Extracto de cuajo caprino (Grandine® 165)

Este producto coagulante comercializado por Sanofi Bio-Ind. con una actividad declarada de 182 mg quimosina/L y 97 mg pepsina/L, es un cuajo caprino obtenido a partir de animales lactantes.

Quimosina bovina (Aniren™ 600 y 880)

Las actividades declaradas por la casa comercial (Sanofi Bio-Ind.) fueron de 657 y 880 mg quimosina/L, respectivamente. Estos productos son cuajos de ternero compuestos en un 100% por quimosina animal natural.

Pepsina bovina (Bovipep® 1700)

La actividad declarada por la casa comercial (Sanofi Bio-Ind.) es de 1700 mg pepsina/L. Este producto es un cuajo procedente de abomasos de bovinos adultos compuesto

en un 100% por pepsina animal natural.

Plasmina bovina (Fibrinolisisina; EC 3.4.21.7)

La actividad declarada por la casa comercial (Sigma) es de 2-4 unidades Sigma/mg proteína. Una unidad Sigma es la cantidad de enzima que, a partir de la α_s -Cn, libera en 20 min a pH 7.5 y temperatura de 37°C, una cantidad de productos solubles en ácido perclórico equivalentes a un ΔA_{275} de 1.0.

Inhibidor trípico de la soja

La presentación de este producto por la casa comercial (Sigma) es en forma liofilizada. Un mg de proteína inhibe 1-3 mg de tripsina, con una actividad aproximada de 10000 unidades BAEE. Una unidad de tripsina produce un ΔA_{253} de 0.001/min, utilizando como sustrato benzoil-L-arginina etil éster (BAEE) a pH 7.6 y 25°C.

La dosis utilizada en los ensayos fue de 1 mg/mL (De Koning y Kaper, 1981; De Rham y Andrews, 1982a, b).

3,4-Dicloroisocumarina

Se presenta en forma liofilizada (Sigma, St. Louis, USA). La dosis utilizada en los ensayos fue de 0.05 mg/mL (Harper y col., 1985).

β -Cn bovina

Presentada por la casa comercial (Sigma) en forma liofilizada, libre de sal y con un mínimo del 90% de pureza testado por electroforesis.

II.1.3. MEDIDA DE LA ACTIVIDAD COAGULANTE

Las soluciones enzimáticas se estandarizaron a igual actividad coagulante mediante una modificación del método de Berridge (Collin y col., 1977). Se añadió 1 mL de solución enzimática a 10 mL de leche en polvo de alta calidad microbiológica (INRA, Poligny, Francia) reconstituida al 12% con CaCl_2 10 mM. El tiempo de coagulación lo dio la aparición de flóculos en la pared del tubo de ensayo, que contenía la leche añadida del coagulante en un baño termoestabilizado a 30°C.

En otros casos la estandarización se llevó a cabo mediante el uso de un tromboelastógrafo Formagraph (Foss Electric S.A., Paris, Francia) según describe Delacroix-Buchet y col. (1994). La temperatura de coagulación se fijó a 30°C y los coagulantes se diluyeron en tampón piperazina hexahidratada 25 mM a pH 5.3. Se añadió 200 μL de las soluciones enzimáticas a 10 mL de leche en polvo (INRA) reconstituída al 12% con CaCl_2 como en el caso anterior. A partir de los formagramas se obtuvo el tiempo (min) de gelificación de la leche en polvo, evaluada como el tiempo entre la adición del coagulante y el principio del endurecimiento del gel.

II.1.4. CONDICIONES DE HIDROLISIS DE LOS SUBSTRATOS CASEINICOS POR LOS ENZIMAS DEL CUAJO

Se prepararon soluciones de caseína entera de cabra y vaca y $\beta\text{-Cn}$ de estas dos especies, así como de $\alpha_{s1}\text{-Cn}$ caprina provenientes de leches de mezcla al 2.5% (p/v), en tampón acético-acetato 50 mM a pH 6.6, conteniendo timerosal 0.02% (p/v) como germicida, y se calentaron (80°C, 30 min) para prevenir la actividad de la proteasa alcalina de la leche durante la incubación. A estas soluciones se añadieron los enzimas del cuajo a nivel de 0.1 UC/mL. Las soluciones fueron entonces individualmente ajustadas a diferentes pH (3.8, 4.2, 4.6, 5.0, 5.4, 5.8, 6.2 y 6.6) e incubadas durante diferentes tiempos (1, 2, 4, 6, 15, 30, 48 y 72 h), en rotación (13 rpm), a 30°C en estufa *Hot-Cold*. Al final de cada período de incubación los enzimas del cuajo fueron inactivados por calentamiento en baño de agua (100°C, 5 min) y el pH de las soluciones caseínicas acidificado a 4.6, mediante

adición de tampón acético-acetato (McGann y col., 1972), para separar por centrifugación (12000 rpm, 10 min) las fracciones soluble e insoluble a pH 4.6. Los sobrenadantes obtenidos fueron filtrados a través de filtros de nitrato de celulosa de 0.45 μm de poro y analizados por PAGE-SDS. Los precipitados se redisolviaron en urea 7.0 M y fueron analizados por PAGE-urea y PAGE-SDS.

Otras condiciones de hidrólisis especiales utilizadas en este trabajo se expondrán en los capítulos de resultados y discusión.

En las α_{s1} -Cn A y F se partió de soluciones al 1% (p/v) en tampón fosfato 100 mM a pH 6.5 y 5.2, ésta última añadida de NaCl 3%, que contenían NaN_3 0.05% (p/v) como agente germicida. Las soluciones proteicas fueron tratadas con los diferentes enzimas coagulantes con la misma actividad coagulante: Granday® 520 y Aniren™ 600 utilizadas en soluciones al 1% (v/v), y Grandine® 165 en solución al 2.5% (v/v). Posteriormente se incubaron a 30°C durante diferentes tiempos (0, 0.25, 1, 3, 6, 12, 24 y 48 h). Al final de cada período, los coagulantes fueron inactivados por calentamiento y el pH ajustado a 4.6. Después de centrifugar (12000 rpm, 10 min), los sobrenadantes se filtraron a través de filtros de 0.45 μm y se analizaron por RP-HPLC con el objeto de separar los péptidos solubles a pH 4.6. Los precipitados se redisolviaron en un urea 9 M y se tomaron muestras para caracterizarlas por electroforesis (PAAGE).

También se hizo un ensayo de hidrólisis utilizando como substrato soluciones de α_{s2} -Cn, obtenida en la purificación de las α_{s1} -Cn A y F, a pH 6.2 y 30°C, durante diferentes períodos de incubación (0, 0.5, 1, 2, 4 y 6 h). En este caso los productos de hidrólisis se caracterizaron por PAGE-urea.

II.1.5. CONDICIONES DE HIDROLISIS DE LOS SUBSTRATOS CASEINICOS POR LA PLASMINA

Se prepararon soluciones de caseína entera de cabra y vaca y β -Cn de estas dos especies, así como de las caseínas α_{s1} y α_{s2} caprinas provenientes de leches de mezcla, al 2.5% (p/v) en tampón tris-HCl 0.05 y pH 8.0, a las que se añadió timerosal 0.02% (p/v) como agente germicida y se atemperaron durante 30 min a 37°C. Las soluciones caseínicas

fueron tratadas con 0.02 unidades Sigma de plasmina bovina por mL de solución proteica, e incubadas durante diferentes tiempos (5, 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120 y 150 min). Transcurridos los tiempos de incubación, la plasmina se inactivó por calentamiento (100°C, 10 min) y posteriormente se bajó el pH de las soluciones hasta 4.6 con tampón acético-acetato. Después de centrifugación (12000 rpm, 10 min), los sobrenadantes se filtraron a través de filtros de nitrato de celulosa de 0.45 μ m de poro y fueron analizados por PAGE-SDS. Los precipitados se redisolieron en urea 7.0 M y fueron analizados por PAGE-urea y PAGE-SDS.

En las α_{s1} -Cn A y F se partió de soluciones proteicas al 1% (p/v) disueltas en tampón NH_4HCO_3 50 mM, pH 8.0 añadido de NaN_3 0.05% (p/v) para evitar cualquier crecimiento microbiano. Las muestras se trataron con 0.02 unidades Sigma de plasmina bovina por mililitro de solución proteica y se incubaron a 37°C durante 0.5, 1, 2, 4 y 6 h. Tras el período de incubación la plasmina se inactivó por calentamiento (100°C, 10 min) y el pH se redujo a 4.6 como en el caso anterior, separándose por centrifugación la fase soluble de la insoluble. Los sobrenadantes se caracterizaron por cromatografía (RP-HPLC) y los precipitados por electroforesis (PAAGE).

Se realizó un ensayo de hidrólisis con la α_{s2} -Cn a pH 8.0 y 37°C durante períodos de incubación de 0, 30, 60, 90, 120 y 150 min.

II.1.6. CONDICIONES DE HIDROLISIS DE LAS CASEINAS POR LA ACCION CONJUNTA DEL CUAJO Y LA PLASMINA

Se prepararon soluciones de caseína entera caprina y bovina al 2.5% (p/v) en tampón acético-acetato 50 mM en el intervalo de pH 3.8-6.6, conteniendo timerosal como agente antimicrobiano. A estas soluciones se añadió el cuajo (0.1 UC/mL) y la plasmina (0.02 unidades Sigma/mL) y se incubaron durante un período de 15 h a 30°C. Transcurrido el período de incubación los enzimas se inactivaron por calentamiento (100°C, 10 min) y la fracción insoluble a pH 4.6 fue caracterizada en PAGE-urea.

De igual forma se hidrolizaron soluciones de caseína entera caprina y bovina a pH 6.2 y 30°C en períodos de incubación de 1, 2, 4, 6, 15 y 30 h.

La descripción de otros substratos caseínicos especiales, así como las condiciones de hidrólisis utilizadas en estos ensayos serán descritos en el capítulo correspondiente de resultados y discusión.

II.1.7. TECNICAS DE ELECTROFORESIS

PAGE-urea

Las fracciones caseínicas liofilizadas y disueltas en urea 7.0 M, se analizaron mediante PAGE en geles de 0.7 mm según el método descrito por Akroyd (1968) con $T=8.8\%$ (T =gramos de acrilamida + gramos de bisacrilamida/100 mL), $C=2.3\%$ (C =gramos de bisacrilamida/% T) y urea 5 M a pH 8.9 como describen Carretero y col. (1994).

PAGE-SDS

Este tipo de análisis electroforéticos en presencia de agentes desnaturalizantes, sodio dodecil sulfato (PAGE-SDS), se realizó en geles de 0.7 mm según la técnica de Laemmli (1970). Se utilizó un gel de concentración con $T=4\%$ y $C=2.7\%$ y un gel de resolución con $T=15\%$ y $C=2.7\%$. Las masas moleculares relativas (M_r) de las distintas fracciones proteicas se obtuvieron utilizando un kit de calibración de M_r (Sigma), constituido por: seroalbúmina (66 kDa), ovoalbúmina (45 kDa), gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (36 kDa), anhidrasa carbónica (29 kDa), tripsinógeno (24 kDa), inhibidor trípico de la soja (20.1 kDa), α -lactalbúmina (14.2 kDa) y aprotinina (6.5 kDa).

PAAGE

Esta técnica de electroforesis se realizó por el método descrito por Uriel (1966) en geles de $T=5\%$ y $C=3\%$ en presencia de agarosa (Pharmacia Biotech.) al 0.8% (p/v), a pH 8.6, tal y como describen Gripon y col. (1975).

Electroforesis bidimensional

Las electroforesis bidimensionales se realizaron según la técnica descrita por Tutta y col. (1992). La primera dimensión se realizó en PAGE-urea, e inmediatamente una carrera de este primer gel se dispuso cuidadosamente en la zona superior de un gel PAGE-SDS para desarrollar la segunda dimensión.

Tinción

Los geles se tiñeron con Azul de Coomassie R-250 (Uriel, 1966) y se destiñeron con repetidos lavados en soluciones de etanol/ácido acético/glicerol/agua (200/50/25/725; v/v/v/v). Los geles se secaron entre 2 láminas de celofán a temperatura ambiente.

Densitometría

Las lecturas densitométricas se realizaron a 633 nm con un densitómetro láser (LKB 2202 Ultroskan), conectado a un integrador (Hewlett Packard 3390A), que calculó el porcentaje relativo de cada proteína relacionando la altura del pico correspondiente con la suma total de las alturas de todos los picos.

II.1.7. CARACTERIZACION DE LOS PEPTIDOS SOLUBLES A pH 4.6 PROCEDENTES DE LA HIDROLISIS DE LAS α_{s1} -Cn (A y F) POR RP-HPLC

II.1.7.1. Aislamiento de los péptidos solubles a pH 4.6

Los péptidos solubles a pH 4.6 obtenidos en la hidrólisis de la α_{s1} -Cn por los enzimas del cuajo fueron separados por RP-HPLC utilizando una columna DeltaPack C₁₈ (5 μ m) de dimensiones 3.9 x 150 mm (Waters, Nihon, Japón) y una precolumna μ BonddepakTM C₁₈ (Waters, Milford, USA). En la separación se utilizaron dos sistemas diferentes de solventes: i) sistema TFA que se compuso de solvente A (TFA 0.115%, v/v, en agua) y solvente B

(ACN 60%, agua 40%, TFA 0.1%) y ii) sistema fosfato que se compuso de solvente A (fosfato potásico 50 mM, pH 7.0) y solvente B (ACN 60% en solvente A). Los péptidos se eluyeron en el sistema TFA mediante un gradiente lineal de 0 a 80% de solvente B durante 35 min, y de 20 a 30 % de solvente B durante 20 min en el sistema fosfato. El caudal utilizado fue de 1 mL/min y la absorbancia registrada a 214 nm. La temperatura de la columna se mantuvo a 40°C durante el proceso de separación.

Algunos picos obtenidos a través del sistema TFA fueron colectados y purificados con el sistema fosfato. Los péptidos separados bajo estas condiciones fueron recromatografiados usando un gradiente de ACN-agua con el fin de desalar los péptidos antes de realizar el análisis de secuencia.

En la hidrólisis de las α_{s1} -Cn A y F por acción de la plasmina se realizó un perfil cromatográfico de los péptidos solubles a pH 4.6 para comparar ambas variantes genéticas. En estas separaciones se utilizó el sistema TFA con un gradiente lineal de 20 a 75% de solvente B durante 110 min para lograr una mejor separación de péptidos.

II.1.7.2. Composición aminoacídica

Los péptidos fueron caracterizados y algunos identificados mediante su composición aminoacídica después de hidrólisis (HCl 5.7 M, 110°C, 24 h, bajo vacío). Los aminoácidos fueron separados y cuantificados por cromatografía de intercambio catiónico seguido de una derivatización con ninhidrina en un analizador automático de aminoácidos 420A (Applied Biosystems, San José, USA).

II.1.7.3. Análisis de secuencia aminoacídica

La determinación de las secuencias aminoacídicas N-terminales se realizaron por la degradación de Edman automatizada en un secuenciador de proteína Applied Biosystem modelo 477A. Los derivados feniltiohidantoína-aminoácido se separaron en columna de RP (Spherisorb ODS 2, C₁₈, S.F.C.C., Francia) en un equipo HPLC (Spectra Physics, San José,

USA).

Los residuos C-terminales se obtuvieron por análisis de los aminoácidos libres después de un tratamiento con carboxipeptidasa A.

II.2. ESTUDIO DE LA PROTEOLISIS EN QUESO DE CABRA Y EN CUAJADAS MODELO

En todas las producciones efectuadas, la leche de cabra procedió de cabras de raza Murciano-Granadina, pertenecientes a la Granja Experimental de la *Facultat de Veterinària* de Barcelona.

II.2.1. FABRICACION DE QUESOS DE CABRA DE PASTA PRENSADA NO COCIDA

Escala laboratorio

Se realizaron a nivel de laboratorio diferentes fabricaciones de quesos de pequeño tamaño (~250 g/queso). En este tipo de experiencias se partió de 5 L de leche pasterizada (72°C, 15 s), la cual se atemperó a 30°C y fue añadida de un 2% de fermentos lácticos (AM Larbus S.A., Madrid) constituidos por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* y *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, preparados por incubación en leche desnatada pasterizada (85°C, 30 min) del cultivo liofilizado (0.04%, p/v), a 30°C durante 18 h. El fermento añadido a la leche de fabricación se homogeneizó bien por toda la leche y se dejó reposar durante 5 min, para luego agregar CaCl₂ (0.006%, p/v) y un extracto de cuajo (Renifor-15/E) al 0.02%, con un contenido en quimosina activa de 780 mg/L. La leche con el coagulante añadido se dejó en reposo, a 30°C, hasta que el gel formado adquirió la consistencia adecuada (~30-35 min, desde la adición del coagulante). Seguidamente se procedió al corte del gel hasta tamaño de grano de garbanzo y se recalentó la cuajada a razón de 3°C/5 min hasta 36°C, temperatura que se mantuvo durante 5 min. Los quesos desueraron en molde, provisto de una gasa de algodón, y se prensaron durante 30 min con una presión de 0.5 kg/cm². Finalmente, se salaron por inmersión en salmuera al 19% de NaCl durante 30 min. En la Figura 5 se

muestra el diagrama de fabricación del queso de cabra.

Escala Planta Piloto

Se realizaron a nivel de Planta Piloto (CeR, *Centre Especial de Recerca*) diferentes fabricaciones de quesos de cabra de aproximadamente 1 kg de peso. En este tipo de experiencias se partió de 100 L de leche pasteurizada (72°C, 15 s), la cual se atemperó a 30°C y fue añadida de un 2% de fermentos lácticos (AM Larbus S.A., Madrid) constituidos por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* y *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, preparados por incubación en leche desnatada pasteurizada (85°C, 30 min) del cultivo liofilizado (0.04%, p/v), a 30°C durante 18 h. El fermento añadido a la leche de fabricación se homogeneizó bien por toda la leche y se dejó reposar durante 5 min, para luego agregar CaCl₂ (0.006%, p/v) y un extracto de cuajo (Renifor-10/E) al 0.02%, con un contenido en quimosina activa de 560 mg/L. La leche con el coagulante añadido se dejó en reposo, a 30°C, hasta que el gel formado adquirió la consistencia adecuada (~30-35 min, desde la adición del coagulante). Seguidamente se procedió al corte del gel hasta tamaño de grano de garbanzo y se recalentó la cuajada a razón de 3°C/5 min hasta 36°C, temperatura que se mantuvo durante 5 min. Los quesos desueraron en molde, provisto de una gasa de algodón, y se prensaron durante 1 h con una presión de 0.5 kg/cm² y 17 h a 2 kg/cm². Finalmente, se salaron por inmersión en salmuera al 19% de NaCl, durante 4 h y se maduraron en cámara a 14°C y 80% de humedad relativa (HR), durante 30 días.

II.2.2. FABRICACION DE CUAJADAS MODELO

II.2.2.1. Fabricación de cuajadas libres de fermento y coagulante (CLFC)

La fabricación de quesos libres de flora láctica se realizó mediante la utilización de la glucono- δ -lactona (GDL) en forma sólida y ácido láctico, según la técnica de O'Keeffe y col. (1975). Esta técnica simula, mediante el uso de un acidificante químico progresivo, la GDL, el perfil de variación de pH que desarrolla el fermento láctico en el queso.

La fabricación de quesos libres de coagulante se llevó a cabo siguiendo la modificación n° 2 de O'Keeffe y col. (1977), utilizando la pepsina porcina como coagulante de la leche y la posterior inactivación de éste a pH 7.0 y 38°C.

La unión de estas dos técnicas hace posible obtener quesos libres de flora láctica y enzimas coagulantes, en éstos sólo la proteasa alcalina de la leche (plasmina) es activa durante la maduración.

La pepsina porcina utilizada en la producción de cuajadas modelo tuvo una actividad declarada por la casa comercial (Sigma) de 890 unidades Anson/mg proteína; 1 unidad Anson es la cantidad de enzima que libera en 1 min, a partir de hemoglobina, a pH 2.0 y temperatura de 37°C, una cantidad de productos solubles en ácido tricloroacético equivalentes a un ΔA_{280} de 0.001 y que presenta un poder coagulante 1:10000. Este enzima se presenta en forma de polvo amarillento. Para su utilización se redisolvió en tampón acético-acetato 0.05 M, pH 5.35, conteniendo NaCl 15%.

Para estas producciones se partió igualmente de 5 L de leche, que fue como en el caso anterior pasteurizada, atemperada y añadida de CaCl_2 , así como de una mezcla de antibióticos (Amresco®, Iberlabo S.A., Barcelona), compuesta de 100000 U penicilina, 100 mg estreptomicina y 250 mg anfotericina B. Seguidamente se adicionó a la leche ácido láctico de uso alimentario (Purac 80, Purac S.A., Barcelona), hasta alcanzar un pH 6.45, pH que se consigue tras la adición de los fermentos lácticos justo antes de añadir el coagulante. Se adicionó a la leche la solución preparada de pepsina porcina (0.3%, v/v) y se dejó en reposo hasta que el gel adquirió la consistencia requerida (~40 min), para proceder al corte hasta tamaño de grano de garbanzo. A la mezcla cuajada-suero se le adicionó en agitación suave NaOH 10 N, en pequeñas alícuotas durante 10-15 min, hasta pH 7.0. La cuajada se recalentó a razón de 4°C/5 min hasta 38°C, temperatura que se mantuvo durante 5 min.

El queso se pre-prensó en molde de forma manual, para obtener una cuajada lo más seca posible, y se adicionó GDL (Lysactone®, Roquette frère, 62136 Lestrem, Francia) sólida, en forma de lluvia, a razón de 7 g/250 g cuajada, que se homogeneizó con ayuda de una espátula. Los quesos desueraron en molde con gasa de algodón para luego ser prensados y salados.

Todas las soluciones adicionadas a la leche de fabricación se esterilizaron, por filtración en filtro de 0.2 μm (Anotop™ 25, Anotec, Reino Unido) o bien en autoclave a

120°C, 15 min. El material utilizado en la fabricación también se esterilizó en autoclave y todas las operaciones de producción se realizaron en cámara de flujo laminar para evitar la contaminación por microorganismos.

En la Figura 6 se muestra el diagrama de obtención de quesos CLFC y en la Figura 7 aparece el sistema de fabricación en cámara de flujo laminar.

II.2.2.2. Fabricación de cuajadas libres de fermento (CLF)

Este tipo de fabricación se realizó utilizando un extracto de cuajo, tal y como se describe en la fabricación del queso de cabra, y utilizando la GDL como acidificante químico (Figura 6), llevando a cabo la producción en cámara de flujo laminar igual que en el caso anterior. En este tipo de cuajadas los enzimas que participan en la proteólisis durante la maduración del queso son principalmente los coagulantes y la plasmina.

II.2.3. TRATAMIENTO DE LAS CUAJADAS MODELO A ALTAS PRESIONES HIDROSTATICAS

Con el fin de eliminar los diferentes microorganismos sobrevivientes al tratamiento de pasterización o que ganaron acceso a la cuajada durante su fabricación y manipulación, la cuajada una vez salada, se envasó al vacío y presurizó a 400 MPa durante 10 min, a 2°C, en un pascalizador experimental de tipo discontinuo (ACB, Nantes, Francia) de 2 L de capacidad total en cilindro.

II.2.4. COMPOSICION GLOBAL DE LA LECHE DE FABRICACION Y CUAJADAS

Determinación del pH: medida directa sobre la leche y sobre un homogeneizado cuajada-agua (1:1, p/v) con un pH-metro Crison, modelo 2001.

Determinación del extracto seco: según normas de la Federación Internacional de Lechería (FIL-IDF) 4A y 21B (1982 y 1987, respectivamente). Esta determinación tiene su principio en la evaporación del agua de la muestra en estufa, a temperatura de $102 \pm 2^\circ\text{C}$.

Determinación de la materia grasa: según métodos butirométricos Gerber y van Gulik, según las normas de la Federación Internacional de Lechería (FIL-IDF) 105 y 152 (1981 y 1991, respectivamente).

Determinación del nitrógeno total (NT): según norma FIL-IDF 20B (1993). Análisis basado en la digestión de una porción de muestra con una mezcla de ácido sulfúrico concentrado y de sulfato potásico, utilizando el sulfato de cobre II como catalizador, para convertir así el nitrógeno orgánico presente en sulfato de amonio. Se adiciona hidróxido de sodio en exceso para liberar el amoníaco, el cual es seguidamente destilado sobre solución de ácido bórico y determinado por valoración volumétrica, utilizando una solución de ácido clorhídrico, calculándose así la cantidad de nitrógeno de la muestra según la cantidad de amoníaco producido.

Determinación del contenido en cloruros en cuajada: según la norma AOAC 935.43 (1990). Método basado en la destrucción de la materia orgánica del queso por permanganato potásico y ácido nítrico, y determinación argentimétrica en presencia de sulfato amónico férrico como indicador.

Determinación del fósforo total en cuajada: según norma FIL-IDF 33C (1987). Técnica basada en una mineralización de la cuajada por ácido sulfúrico y peróxido de hidrógeno, formación de azul de molibdeno por adición de una solución de ácido ascórbico-molibdato y medida fotométrica a 820 nm del color azul formado.

Determinación del calcio total en cuajada: según el método complexométrico de Pearce (1977), usando el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA).

II.2.5. ANALISIS MICROBIOLÓGICOS DE LA LECHE Y CUAJADAS

Preparación y homogenización de las muestras: según describen Kosikowski y Brown (1973).

Recuento de bacterias aerobias mesófilas: en medio *Plate Count Agar* (PCA; Oxoid, RU) a 30°C durante 48 h (ICMSF, 1983).

Recuento de enterobacterias: en medio *Violet Red Bile Glucose Agar* (VRBG; Oxoid) a 37°C durante 48 h (ICMSF, 1983).

II.2.6. ESTUDIO DE LA PROTEOLISIS EN CUAJADAS

El nitrógeno soluble en agua (NSA) se extrajo según el método de Kuchroo y Fox (1982). Se homogenizan 30 g de queso finamente rallado con 60 mL de agua destilada, con ayuda de un Ultra-Turrax, a 5000 rpm durante 5 min. El factor de dilución se determina en peso debido a las dificultades de aforar el homogeneizado de queso. La suspensión obtenida se calienta en baño maría a 40°C durante una hora, seguidamente se centrifuga a 7000 rpm durante 30 min a 10°C. El sobrenadante obtenido por centrifugación se filtra a través de lana de vidrio y se guarda para obtener las diferentes fracciones nitrogenadas.

El precipitado contiene las fracciones caseínicas, después de ser resuspendido varias veces en agua destilada y obtenido por centrifugación, se guarda para liofilizarlo y analizarlo por PAGE-urea.

A partir del sobrenadante, que contiene el NSA, se separa el nitrógeno no caseínico (NNC) obtenido por precipitación del NSA a pH 4.6 mediante adición de tampón acético-acetato. El nitrógeno no proteico (NNP) se obtiene precipitando el NSA con ácido tricloroacético hasta concentración final del 12%.

El NNC y NNP se determinaron mediante el método automatizado Kjeldahl y se expresaron como porcentaje del NT.

II.2.7. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD COAGULANTE RESIDUAL EN CUAJADAS

Se realizó mediante el método de Singh y Creamer (1990). Esta técnica se basa en la descrita por Carlson y col. (1985). Estos autores incubaron leche adicionada de pequeñas cantidades de enzimas coagulantes de concentración desconocida durante un tiempo definido. Este ensayo fue seguido de la adición de una cantidad de coagulante de actividad conocida, la cual coagulaba la leche en pocos minutos. Observaron que el cambio en el tiempo de coagulación ocasionado por la incubación inicial era directamente proporcional a la cantidad inicial de coagulante añadida a la leche.

Extracción de los enzimas coagulantes

Se tomaron 40 g de cuajada finamente rallada y se mezclaron con 60 g de tampón cacodilato sódico-HCl 0.05 M, pH 6.0, que contenía CaCl_2 0.1 M y NaCl 0.86 M. La mezcla se homogeneizó, pesó e incubó a 30°C durante 4 h para más tarde ser centrifugada a 10000 rpm y 4°C durante 1 h. El sobrenadante se obtuvo por filtración sobre papel Whatman n° 41 y se pesó. El tubo de centrifuga que contenía el precipitado del queso y el papel de filtro utilizado se pesaron para determinar las cantidades de sobrenadante retenidos en estas fracciones.

Substrato de ensayo

El substrato de ensayo se compuso de leche en polvo desnatada de alta calidad microbiológica (INRA), al 1.5% (p/v) disuelta en tampón cacodilato sódico-HCl 0.05 M, pH 6.0 que contenía CaCl_2 0.01 M.

Procedimiento

Se dispusieron 20 mL del substrato de ensayo en 6 tubos y se dejaron atemperar a 30°C durante 30 min. Al substrato se le añadió 1 mL del extracto de cuajada y se incubó a

30°C durante 5, 10, 15, 20, 30 y 40 min. Al final de cada período de incubación se agregó una cantidad predeterminada y conocida de una solución estándar del enzima utilizado en la fabricación de la cuajada a cada uno de los tubos de ensayo y se determinó el tiempo de coagulación según describen Collin y col. (1977). Al tiempo, en segundos, transcurrido desde la adición del extracto de cuajada al substrato ensayo hasta la adición de la solución estándar de enzima se le dio el nombre de tiempo de incubación y al tiempo, en segundos, transcurrido desde la adición de la solución estándar de enzima hasta la formación visible de flóculos en la pared del tubo de ensayo, se le dio el nombre de tiempo de coagulación.

La cantidad de coagulante retenido en la cuajada expresado en unidades coagulantes (UC)/kg cuajada, se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$UC/kg = \frac{-S}{1+S} \frac{\text{Peso sobrenadante}}{\text{Peso cuajada}} \frac{100}{\text{Factor dilución}} \cdot 1000$$

S es la pendiente y se calcula a partir de una recta de regresión entre el tiempo de incubación y el tiempo de coagulación.

El extracto de cuajo utilizado en el ensayo contuvo 100 UC/mL.

Ya que sólo el 80% del enzima retenido en la cuajada puede ser extraído en el sobrenadante por este método, se utilizó un factor de corrección de 1.25 para obtener la cantidad absoluta de enzima presente en la cuajada.

II.2.8. DETERMINACION DE PLASMINA EN CUAJADA

Esta determinación se realizó por espectrofluorimetría según el método de Richardson y Pearse (1981). El ensayo usa un substrato no fluorescente N-succinil-L-alanil-L-fenilalanina-L-lisil-7-amido-4 metil-cumarina (péptido cumarínico), el cual es hidrolizado por la plasmina para dar 7-amino-4-metil cumarina (AMC), producto fluorescente.

Extracción de plasmina

Se partió de 1 g de cuajada finamente rallada al cual se adicionaron 9 mL de citrato sódico al 2% estéril. Esta mezcla se incubó durante 15 min a 37°C en baño maría. La solución lechosa se desnató por centrifugación a 1000 g, 5 min a 4°C y la solución bajo la capa de grasa se volvió a centrifugar a 27000 g durante 10 min a 4°C. Con la solución clara así obtenida se determinó la actividad en plasmina.

Procedimiento de determinación

La determinación se realizó con un espectrofluorímetro Perkin-Elmer modelo 3000, termoestabilizado a 25°C y las longitudes de onda de excitación y de emisión utilizadas fueron de 380 y 460 nm, respectivamente.

El cero se hizo antes de la medida sobre la solución siguiente:

| | |
|--|-------------|
| - Extracto de cuajada | 50 μ L |
| - Dimetilsulfóxido (DMSO) | 32 μ L |
| - Tampón tris-HCl 50 mM, NaCl 110 mM a pH 7.5 | 718 μ L |

La determinación de plasmina en las muestras de cuajada se realizó en un volumen final también de 800 mL conteniendo:

| | |
|--|-------------|
| - Extracto de cuajada | 50 μ L |
| - Tampón tris-HCl 50 mM, NaCl 110 mM a pH 7.5 | 590 μ L |
| - Péptido cumarínico 1 mM (añadido en tiempo 0) | 160 μ L |

La medida se realizó a los 5-10 min, según la cantidad de plasmina de las muestras estudiadas. Los resultados obtenidos se expresaron en unidades AMC. Una unidad AMC

equivale a 1 nmol de AMC producido por minuto y por gramo de cuajada. El espectrofluorímetro fue estandarizado diariamente mediante la utilización de una gama de patrones, comprendiendo concentraciones de AMC comercial (Sigma) de 0 a 3×10^{-7} M.

CAPITULO III

III.1. PREPARACION DE LA β -CN CAPRINA

Las técnicas empleadas hasta el momento en el fraccionamiento de caseínas incluyen procedimientos químicos de separación en urea, alcohol, ácido sulfúrico, etc., que permiten obtener fracciones enriquecidas en caseínas individuales; la cromatografía de afinidad que separa caseínas sin grupos SH- (α_{s1} y β) de las que contienen grupos sulfhidrilo (κ y α_{s2}) y la cromatografía de intercambio iónico. La cromatografía de intercambio iónico es la técnica que ofrece mayores posibilidades, al permitir la separación de moléculas que aun presentando tamaños similares, difieren ligeramente en cuanto a punto isoeléctrico.

En este trabajo se optó por la obtención de fracciones enriquecidas en diferentes caseínas para posteriormente purificarlas, ya que este método nos permite obtener grandes cantidades de caseína con una pureza muy elevada, necesarias para realizar las hidrólisis por los diferentes enzimas estudiados.

Antes de comentar los resultados obtenidos en el fraccionamiento de la caseína caprina y ya que la caracterización de las diferentes fracciones se realizó mediante PAGE-urea y PAGE-SDS, es necesario describir brevemente el comportamiento de las caseínas caprinas en estos sistemas electroforéticos.

Patrones electroforéticos de las caseínas caprinas en PAGE-urea y PAGE-SDS

El electroforegrama de la caseína entera caprina (Figura 8) presenta, en PAGE-urea, una serie de bandas de baja movilidad electroforética, similares a las γ -Cn bovinas. En PAGE-SDS éstas migran por debajo de las caseínas mayores e incluso de la para κ -Cn, indicando un peso molecular inferior que ésta última.

Seguidamente aparecen dos bandas principales, β_1 y β_2 , las cuales difieren en su nivel de fosforilación (6/5) (Richardson y Creamer, 1974). En PAGE-SDS da una sola banda, ya que la diferencia de peso molecular debido a un residuo fosfato, hace variar muy poco el peso molecular total de esta proteína y se sitúa por debajo del complejo α_s .

La κ -Cn caprina migra, en PAGE-urea, como una serie de bandas que contiene un componente principal que se sitúa justo debajo de β_2 o bien se superpone con ella parcialmente, y diferentes componentes de mayor movilidad que ésta última (hasta 5; κ_1 - κ_5),

que se diferencian por su distinto nivel de glicosilación (Addeo y col., 1978). Algunos autores (Assenat, 1967; Remeuf y col., 1989) ante la imposibilidad de cuantificar la κ -Cn de forma separada, optan por tratar las muestras con cuajo animal a concentraciones muy bajas, capaces de hidrolizarla en $\text{para}\kappa$ -Cn, cuantificando este último producto y aplicándole un factor de corrección para obtener la cantidad en κ -Cn originaria en la muestra. En PAGE-SDS, la κ -Cn, migra por debajo de la β -Cn debido a su menor peso molecular. La $\text{para}\kappa$ -Cn caprina migra en geles PAGE-urea por encima de los componentes γ -Cn, y en PAGE-SDS por debajo de los componentes principales como una banda de bajo peso molecular.

El último grupo de bandas de mayor movilidad electroforética corresponde a la fracción caseínica α_s que comprende una mezcla de caseínas α_{s1} y α_{s2} que se superponen parcialmente en PAGE-urea (Boulanger y col., 1984; Addeo y col., 1988). La α_{s1} -Cn en general migra, en PAGE-urea, como una serie de bandas debido al diferente nivel de fosforilación (7-9) que presenta esta proteína en leches individuales (Chianese y col., 1993), pero su patrón electroforético puede variar como veremos más adelante según la variante genética. No existen datos bibliográficos que describan el patrón electroforético que presentan las diferentes variantes genéticas de esta proteína, no obstante las diferencias estructurales entre algunas de ellas conducirían sin duda a grandes cambios. En PAGE-SDS en geles al 20% de poliacrilamida tiene la misma movilidad que la β -Cn, pero en geles al 15% migra por encima de la β -Cn separándose, aunque tiene un peso molecular inferior a ésta última. La variante genética F de esta proteína se detecta perfectamente en este tipo de geles migrando por debajo de la κ -Cn, debido a su menor peso molecular resultante de la delección de 37 aminoácidos en su estructura proteica.

La α_{s2} -Cn, en PAGE-urea, da una serie de 3 bandas con menor movilidad electroforética en conjunto que las bandas que componen la α_{s1} -Cn, superponiéndose con algunas de ellas. La presencia de 3 bandas indica sin duda diferentes niveles de fosforilación. En PAGE-SDS esta proteína migra por encima de la α_{s1} -Cn por su mayor peso molecular.

Obtención de las fracciones enriquecidas

En la bibliografía aparecen diferentes métodos utilizados en la obtención de fracciones enriquecidas en caseínas individuales. Famelart y col. (1989) y Famelart y Surel (1994)

obtuvieron soluciones enriquecidas en β -Cn a 4°C, simplemente por modificación del pH y adición de NaCl o calcio. Murphy y Fox (1991) fraccionaron caseinato sódico usando membranas de ultrafiltración de 300 kDa a 4°C, obteniendo permeados ricos en β -Cn. Igarashi (1995) fraccionó directamente leche desnatada por un procedimiento basado en la solubilidad diferencial que presentan las fracciones caseínicas a soluciones de etanol conteniendo NaSCN y CaCl₂, y a soluciones de urea en presencia de fosfato cálcico, obteniendo fracciones que pueden ser utilizadas como fuente en la separación de las proteínas individuales.

En la obtención de fracciones enriquecidas en β -Cn se utilizó un método clásico basado en una precipitación selectiva según la solubilidad que presentan las caseínas a diferentes concentraciones de urea (Hipp y col., 1955). Este método, aunque requiere manipular grandes volúmenes de soluciones acuosas de urea, no necesita ningún tipo de material o infraestructura especial, permitiendo obtener las fracciones enriquecidas en menos de 6 h.

En la Figura 2 se representa el esquema en la obtención de fracciones ricas en caseínas, y en la Figura 9 los electroforegramas de los diferentes precipitados y sobrenadantes obtenidos por este método, caracterizados por PAGE-urea. Los electroforegramas muestran que el precipitado 2 consistió en la fracción caseínica α_s contaminada con cantidades apreciables de β -Cn. El sobrenadante 2 se compuso principalmente de β -Cn contaminado por la fracción α_s , sobre todo por la α_{s2} -Cn. La preparación enriquecida en κ -Cn (sobrenadante 1) apareció contaminada con grandes cantidades de caseínas β y α_s . Estos resultados son similares a los obtenidos por Christensen y Munksgaard (1989) y Shammet y col. (1992b) en el fraccionamiento de la caseína bovina.

A partir de estas fracciones enriquecidas en β -Cn (sobrenadante 2), una vez precipitadas por dilución de la concentración de urea a 1.7 M, se procedió a la purificación.

Purificación

A fin de purificar las caseínas contenidas en las fracciones enriquecidas obtenidas según la metodología expuesta anteriormente, se consideraron diferentes métodos propuestos para la obtención de caseínas aisladas puras.

Wei y Whitney (1985) desarrollaron un método que permite la obtención de fracciones caseínicas puras con altos rendimientos, trabajando en discontinuo y utilizando una celulosa substituida (DEAE-celulosa). Sanogo y col. (1989) basándose en este método obtuvieron grandes cantidades de β -Cn pura y fracciones enriquecidas en α_{s1} -Cn usando como soporte DEAE-celulosa y CaCl_2 como eluyente. Ng-Kwai-Hang y Pélissier (1989) aislaron diversas fracciones caseínicas con un alto grado de pureza ($>95\%$), excepto la α_{s2} -Cn que apareció contaminada con α_{s1} -Cn, pero con bajos rendimientos, utilizando cartuchos *QAE Zeta Prep 250* (LKB, Pharmacia). Cayot y col. (1992) utilizaron la *Q-Sepharose Fast Flow* (Pharmacia) para separar las diferentes caseínas, permitiendo la obtención de fracciones muy puras con alto rendimiento. El inconveniente que presenta este método es la necesidad de realizar unos 60 lavados para eluir todas las fracciones que posteriormente deben ser concentradas por ultrafiltración. Leaver y Law (1992) desarrollaron un método rápido en la obtención de grandes cantidades de β -Cn utilizando un intercambiador de cationes (*S-Sepharose Fast Flow*, Pharmacia) con un alto grado de pureza.

Se escogió la técnica descrita por Wei y Whitney (1985) por diferentes razones, entre ellas, el poder procesar grandes cantidades de muestra y obtener del orden de gramos de caseínas individuales en un corto tiempo, y por no requerir infraestructura especializada.

Ya que este método fue desarrollado para la separación de las caseínas bovinas, se realizó una caracterización electroforética de las diferentes fracciones eluidas a partir de caseína entera de cabra, para poder escoger las condiciones de elución para cada una de las caseínas caprinas, en especial de la β -Cn.

La caracterización de los diferentes filtrados obtenidos a partir del fraccionamiento completo de la caseína caprina (Figura 3), se efectuó mediante PAGE-urea (Figura 10) y PAGE-SDS (Figura 11).

De los resultados obtenidos se deduce que cada familia de caseínas, aparece concentrada en una fracción, aunque existieron ligeras diferencias entre los filtrados de una determinada fracción. Los filtrados 0_0 , 0_1 y 0_2 , obtenidos a partir del tampón urea (TU) original sin adición de sal, consistieron principalmente en pequeñas cantidades de β -Cn.

Los filtrados 1_1 , 1_2 y 1_3 contuvieron principalmente la β -Cn, aunque como se observa en el gel de PAGE-SDS aparecieron contaminados con κ -Cn y una pequeña cantidad del complejo α_s , especialmente el filtrado 1_1 .

Los filtrados 2₁, 2₂ y 2₃, extraídos con TU añadido de NaCl 0.085 M, consistieron en una mezcla de caseínas β y α_s , donde la κ -Cn había desaparecido.

Las fracciones 3 y 4 consistieron en α_s -Cn, donde la β -Cn contaminante se hizo cada vez menos evidente hasta llegar a desaparecer por completo a partir del filtrado 4₁. La fracción 5 se mostró casi siempre libre de proteína, aunque en algunos casos se evidenciaron trazas del complejo caseínico α_s .

A partir de las fracciones enriquecidas en β -Cn y cromatografiadas en DEAE-celulosa, el proceso fue más simple obteniéndose esta proteína en los filtrados 1₁, 1₂ y 1₃ libre de cualquier otra caseína.

El complejo caseínico α_s caprino se obtuvo libre de β -Cn, a partir de las fracciones enriquecidas en esta proteína: filtrados 3₂, 3₃, 4₁, 4₂ y 4₃.

Wei y Whitney (1985) trabajando con caseína bovina lograron separar la α_{s2} -Cn (fracción 3) de la α_{s1} -Cn (fracción 4). Los filtrados correspondientes a las fracciones 3 y 4 obtenidos en la separación de la caseína caprina, se compusieron de una mezcla de caseínas α_{s1} y α_{s2} . Se intentó recromatografiar diferentes filtrados de las fracciones 3 y 4, pero en el caso de la caseína caprina no fue posible separar estas dos proteínas mediante este procedimiento. De aquí que se ensayara un método eficaz, rápido y sencillo para realizar la separación del complejo α_s . El método utilizado fue el de Brignon y col. (1976), descrito en el apartado II.1.1.2.3., consiguiéndose separar la α_{s1} -Cn con un alto grado de pureza, pero con una pequeña contaminación en α_{s2} -Cn. La contaminación en α_{s2} -Cn pudo ser eliminada en gran parte repitiendo el procedimiento de separación, pero no se consiguió aislar la α_{s2} -Cn de forma pura.

III.2. PREPARACION DE LAS α_{s1} -CN A Y F CAPRINAS

También en este caso se partió de fracciones enriquecidas en α_{s1} -Cn para posteriormente purificarlas por cromatografía en fase reversa (RP) adaptada a un equipo de FPLC con el objeto de obtener estas proteínas cromatográficamente puras. Aunque es posible obtener α_{s1} -Cn pura mediante este método directamente a partir de la caseína entera, se prefirió partir de fracciones enriquecidas por la cantidad relativamente pequeña en que se

encuentran las α_{s1} -Cn en las leches de cabra, sobre todo la variante F, que teóricamente se produce a un nivel de 0.6 g/L y alelo (Mahé y Grosclaude, 1989).

Obtención de las fracciones enriquecidas

El método utilizado para la obtención de fracciones ricas en α_{s1} -Cn fue la cromatografía de intercambio catiónico con *SP-Sepharose* ya que es una de las pocas técnicas, junto con la cromatografía en fase reversa, que permite un aislamiento eficaz de esta proteína. Las condiciones en que se aplicó esta metodología están recogidas en el apartado II.1.1.3.1.

En los perfiles cromatográficos (Figura 12) obtenidos a partir de los filtrados que se representan en la Figura 4, de nuevo cada grupo de caseínas apareció concentrado en una fracción, excepto la κ -Cn, la cual se obtuvo junto a la β -Cn en la fracción 1. Como muestran Jaubert y Martín (1992), es posible separar estas dos proteínas mediante la cromatografía de intercambio catiónico, utilizando diferentes concentraciones de NaCl. Nuestro objetivo durante la puesta a punto de la técnica fue desarrollar un método rápido y eficaz en la preparación de α_{s1} -Cn, reduciendo al máximo el tiempo requerido en el proceso de fraccionamiento, eliminando las caseínas β y κ en un sola fracción.

Los perfiles obtenidos a partir de los filtrados (Figura 12) muestran que la fracción 0 (filtrado obtenido a partir del tampón A libre de NaCl) quedó libre de proteína, indicando que la proporción entre la caseína entera reducida y resina utilizadas, fue la correcta.

La fracción 1, obtenida en presencia de NaCl 0.12 M en el tampón A, contuvo principalmente las caseínas β y κ . En el cuarto filtrado (1₄) aparecieron cantidades no despreciables de α_{s1} -Cn, así que se guardó para liofilizarlo y posteriormente purificarlo.

La fracción 2, extraída con NaCl 0.20 M, se compuso principalmente de α_{s1} -Cn relativamente pura. Los filtrados 2₁-2₃ contuvieron una gran concentración en α_{s1} -Cn y el filtrado 2₄ presentó contaminación con α_{s2} -Cn. Esta fracción es la que se debe considerar como enriquecida en α_{s1} -Cn, siendo el nivel de pureza alcanzado en los primeros 3 filtrados suficientemente alto para realizar un estudio de hidrólisis en un sistema electroforético. La necesidad, en nuestro caso, de obtener una pureza cromatográfica exige ulterior purificación de los filtrados. Dada esta exigencia de purificación posterior y la baja cantidad absoluta de

α_{s1} -Cn disponible, se decidió incluir todos los filtrados que contuvieran la proteína en cantidad apreciable, aunque fuera contaminada con otras caseínas.

La fracción 3, extraída a partir de concentraciones de NaCl 0.35, consistió principalmente en la α_{s2} -Cn. El filtrado 3₁ contuvo concentraciones similares en caseínas α_{s1} y α_{s2} . Este filtrado se reservó también para su posterior purificación. La Tabla 12 resume la composición proteica de los diferentes filtrados.

Purificación

El método cromatográfico en fase reversa adaptado a un equipo FPLC se describe en el apartado II.1.1.3.2.

La Figura 13 muestra los perfiles cromatográficos, obtenidos por FPLC, de las fracciones enriquecidas en α_{s1} -Cn A y F, en el proceso de purificación final. Los picos correspondientes a las α_{s1} -Cn se recogieron y analizaron por RP-HPLC con objeto de comprobar su grado de pureza. Los cromatogramas FPLC mostraron dos diferencias principales. El pico cromatográfico correspondiente a la α_{s1} -Cn F mostró un comportamiento anómalo en RP-HPLC. Esta proteína eluyó antes que la α_{s1} -Cn A, y muy próxima a la α_{s2} -Cn, aunque teóricamente tendría que eluir más tarde, al estar desprovista de 6 grupos fosfato y por lo tanto presentar una naturaleza más hidrofóbica que la α_{s1} -Cn A. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Jaubert y Martin (1992) para esta misma proteína, y Ferranti y col. (1995) para la variante D de la α_{s1} -Cn ovina, e indican que no siempre es posible predecir el comportamiento cromatográfico de las caseínas en RP a partir de su estructura primaria, y viceversa. Por otra parte este pico cromatográfico fue muy pequeño, en comparación a la variante A ya que ambas variantes se asocian con diferentes contenidos proteicos en la leche.

La Figura 14 muestra los cromatogramas obtenidos para las α_{s1} -Cn A y F en el análisis RP-HPLC. El análisis cromatográfico de la variante A dio 2 picos consecutivos (uno de ellos mayoritario), lo que hizo pensar en una posible contaminación. Sin embargo, observando el área de los picos, la contaminación debería de ser muy grande, hecho bastante improbable en este tipo de separaciones. Con objeto de comprobar la naturaleza de ambos picos se recogieron y se realizó un análisis en composición aminoacídica. Este análisis reveló

que la composición aminoacídica de ambos productos era idéntica y equivalente a la estructura aminoacídica de la α_{s1} -Cn A caprina. Quizás la aparición de 2 picos en el cromatograma se deba a los distintos niveles de fosforilación que presenta esta proteína.

El cromatograma perteneciente a la α_{s1} -Cn F mostró un sólo pico, no dejando ninguna duda respecto a la eficacia del sistema de purificación.

De esta manera el método FLPC desarrollado se muestra un sistema rápido y muy eficaz para la purificación de cantidades considerables (multigramo) de estas proteínas. Aunque esta técnica no se ha utilizado en este trabajo para separar otras caseínas, es igualmente útil, eficaz y rápida en el proceso de purificación del resto de caseínas.

La técnica de Jaubert y Martin (1992) de RP-HPLC se demuestra en este trabajo útil en la separación de proteínas que difieren solamente en el grado de fosforilación, como se ha comprobado por análisis aminoacídico de los diferentes componentes en que se resuelve la α_{s1} -Cn A.

III.3. PROTEOLISIS DE LA β -CN CAPRINA POR LOS ENZIMAS DEL CUAJO DE TERNERO

Se han dedicado escasos estudios a la β -Cn caprina, aunque esta proteína es la más abundante en el complejo caseínico de las leches de cabra (Remeuf y Lenoir, 1985; Grosclaude y col., 1987; Carretero y col., 1994). Los trabajos existentes en β -Cn bovina describen que es hidrolizada en solución por la quimosina dando los péptidos de degradación β -I, β -II, β -III y β -IIIb (Creamer, 1976; Pelissier y col., 1974; Visser y Slangen, 1977). El péptido β -IIIb sólo es formado en condiciones extremas de incubación, como pueden ser valores de pH muy bajos durante tiempos de incubación prolongados (Visser y Slangen, 1977).

Mulvihill y Fox (1979b) estudiaron la actividad proteolítica y especificidad de las quimosinas y pepsinas bovinas, ovinas, caprinas y porcinas sobre las caseínas β de estas cuatro especies, mostrando patrones electroforéticos muy similares, lo que sugiere que estas proteínas probablemente tendrían secuencias aminoacídicas muy próximas entre ellas.

En queso no han sido detectados claramente β -I y el resto de productos característicos

de degradación provenientes de la hidrólisis de la β -Cn por acción del cuajo. Ledford y col. (1966), en queso Cheddar, y Trieu-Cuot y Gripon (1982), en queso Camembert, no detectaron la presencia de estos productos de degradación y concluyeron que el cuajo no actuaba sobre la β -Cn en estos quesos. Sin embargo, Marcos y col. (1979), en diferentes variedades de queso, y Carretero y col. (1994), en queso *Cendrat del Montsec*, mencionaron la presencia del péptido β -I.

A continuación se muestra un estudio realizado sobre la actividad proteolítica y especificidad del cuajo en la hidrólisis de la β -Cn caprina, bajo diferentes condiciones proteolíticas y tecnológicas que afectan el proceso de madurado del queso.

III.3.1. Proteolisis de la β -Cn caprina por el cuajo. Efecto del pH

La Figura 15 muestra para diferentes pH y tiempos de incubación crecientes, el patrón proteolítico de la β -Cn sometida a la acción del cuajo bovino.

Los electroforegramas dan a conocer que la β -Cn es hidrolizada en 5 productos de degradación que hemos designado de β -I a β -V, de acuerdo con la clasificación dada por Creamer y col. (1971), según el orden de aparición y su mayor movilidad electroforética en condiciones alcalinas. En las diferentes condiciones consideradas se observaron las siguientes características peculiares:

1. La β -Cn caprina migra en PAGE alcalina como 2 bandas principales, β_1 y β_2 , las cuales difieren en su nivel de fosforilación (6/5) (Richardson y Creamer, 1974), obteniéndose productos de degradación, por acción de los enzimas del cuajo, que también aparecieron como 2 bandas, por incluir la zona fosforilada de la β -Cn.
2. β -I y β -IV mostraron movilidades electroforéticas muy similares a las presentadas por la β -Cn y β -III, respectivamente.
3. β -IV y β -V se formaron en pequeñas cantidades en estas condiciones proteolíticas y tuvieron una capacidad débil de tinción.
4. La β -Cn fue hidrolizada de forma óptima a β -I a pH 6.2 y a β -II a pH 3.8. Aunque β -III se produjo en todo el intervalo de pH, se formó mayoritariamente a valores de pH ≥ 5.4 . β -IV apareció en todo el intervalo de pH y β -V tuvo un óptimo de formación a pH ≤ 5.0 . Estos

2 últimos productos de degradación se formaron en todo momento en pequeñas cantidades. A pH isoelectrico (pH 4.6), la hidrólisis de la β -Cn fue mínima, así como la formación de sus productos de degradación.

La Figura 15 muestra también que el pH no tuvo influencia en la especificidad proteolítica del cuajo al actuar sobre la β -Cn, pero la actividad del cuajo se mostró altamente dependiente del valor de pH.

Después de 1 h de incubación, los polipéptidos β -I y β -II aparecieron en todo el intervalo de pH estudiado. La β -Cn fue óptimamente hidrolizada a $\text{pH} \geq 5.4$, aunque a pH 4.2 también mostró una fuerte degradación. A pH 4.6 se observó una hidrólisis mínima y a pH 3.8, 5.0 y 6.6 se degradó poca cantidad de caseína. El polipéptido β -II apareció de forma óptima a pH ácidos extremos (Figura 15, A).

Después de 2 h de incubación el patrón electroforético no cambió notablemente pero se produjo una intensificación de bandas.

A las 4 h de incubación y a pH 6.2 se observó una gran degradación de β -Cn y formación de β -I. A pH isoelectrico, se continuó observando menor degradación. A pH 6.6, cerca del 50% de la β -Cn inicial se degradó dando el polipéptido β -I y una cantidad pequeña de β -II (Figura 15, B).

Tras 6 h de incubación y en el intervalo de pH 5.8-6.2, la β -Cn desapareció para dar β -I; a pH 6.2, β -I representó el 90% del total de los polipéptidos formados (Figura 15, C).

Después de 15 h de incubación la β -Cn desapareció a valores de $\text{pH} \geq 5.4$. A pH 6.6 se produjo un máximo de formación de β -I pero a la vez una producción mínima o nula de β -II. Parece ser que β -I a pH 6.6 es altamente resistente a la acción enzimática del cuajo y así se acumula sin ser hidrolizado. El polipéptido β -II se produjo a lo largo de todo el intervalo de pH, con un mínimo a pH 6.2-6.6 y un máximo a pH 3.8 (Figura 15, D). A este último pH se produjo poca cantidad de β -I, pero grandes cantidades de β -II. Este hecho se puede explicar, bien por una rápida hidrólisis del polipéptido β -I a β -II, o bien por una serie de cambios conformacionales que podrían darse en la β -Cn debido a su estado de agregación a este pH (la precipitación proteica es visible en el intervalo de pH 3.8-5.0), que haría que los enlaces susceptibles de hidrólisis en la producción de β -I, no fueran completamente disponibles a la acción hidrolítica de los enzimas y sí los correspondientes a β -II, favoreciéndose globalmente la producción de este polipéptido.

Tras 30 h de incubación se formaron los productos de degradación β -III, β -IV y β -V. Los polipéptidos β -III y β -IV se produjeron de forma óptima a $\text{pH} \geq 5.4$, y β -V a $\text{pH} \leq 5.0$ (Figura 15, E). En todo momento a lo largo de las experiencias realizadas, los polipéptidos aparecieron de forma secuencial, y no hubo evidencia alguna de la formación de algún producto de degradación procedente de la β -Cn, si su producto predecesor no fue formado; así la aparición de β -II y β -III sólo es posible si existe formación y posterior degradación de β -I. Según estos resultados podemos concluir que el primer ataque de los enzimas del cuajo sobre la β -Cn produciría el polipéptido β -I, el cual sería degradado casi totalmente a β -II y entonces β -II podría ser hidrolizado dando β -III. Finalmente, β -III podría dar β -IV y β -V. Esta secuencia hidrolítica puede ser explicada de esta forma si la β -Cn y los productos de degradación que de ella se derivan, adoptasen una conformación tal que hiciera inaccesible otros sitios de hidrólisis.

Después de 48 h de incubación, las bandas electroforéticas correspondientes a β -III, β -IV y β -V vieron incrementada su densidad. El patrón electroforético a las 72 h, período máximo de incubación estudiado, fue similar excepto para β -IV y β -V, que aparecieron ligeramente reducidos (Figura 15, F), indicando una posible hidrólisis de estos productos que darían otros no visibles en este sistema electroforético.

El análisis en PAGE-SDS mostró que los productos de hidrólisis, insolubles a $\text{pH} 4.6$, obtenidos a partir de la β -Cn tuvieron masas moleculares relativas (M_r , expresadas en Da) en el intervalo de 22300-12800. Las condiciones de incubación (pH y tiempo) usados en este análisis se escogieron con el objeto de obtener todos los productos de hidrólisis de forma secuencial para identificarlos y caracterizarlos (Figura 16).

El M_r para la β -Cn fue de 27500; este resultado no es del todo coincidente con el peso molecular calculado a partir de su secuencia aminoacídica (M_r 23800). Los datos descritos en la bibliografía muestran que el peso molecular de las caseínas α_{s1} y β bovinas obtenido en geles de SDS, son mayores que los calculados a partir de su secuencia aminoacídica, aunque los valores obtenidos son válidos y entran en el intervalo de los alcanzados por otros métodos físicos. Este hecho se puede explicar por el recorrido anormal que presentan las caseínas en el sistema electroforético de Laemmli, migrando en una posición cercana a la anhidrasa carbónica (M_r 29000). Parece ser que cada caseína individual liga diferentes cantidades de SDS, debido quizás a una cuestión de equilibrio competitivo al

ligar SDS o bien debido a la interacción entre moléculas de caseínas (Bash y col., 1985). Los resultados obtenidos son similares a los presentados por Groves y col. (1972) y Green y Pastewka (1976).

Los M_r calculados por PAGE-SDS para los 5 grupos de péptidos insolubles a pH 4.6 (β -I a β -V), obtenidos por la hidrólisis de la β -Cn por acción de los enzimas del cuajo, fueron de 22300, 21400, 20700, 18900 y 12800, respectivamente.

Asimismo, el análisis en PAGE-SDS de la fracción soluble a pH 4.6 mostró la formación de productos con M_r entre 23600-8500. Las bandas predominantes variaron con el pH y las condiciones iónicas utilizadas en las experiencias. Los patrones electroforéticos correspondientes a los pH estudiados fueron muy similares, aunque se observó alguna diferencia a pH 3.8. Los productos de degradación formados a pH 5.4 y 6.6 incluyeron péptidos con M_r entre 23600-14700; otros péptidos con M_r menor de 14500 formados a pH 3.8, no aparecieron claramente a otros pH. Después de 15 h de incubación y a pH 6.6, aparecieron nuevos péptidos con M_r de 19900 y 19400 (Figura 17).

III.3.2. Proteólisis de la β -Cn caprina por la quimosina y pepsina bovinas

Las proteasas gástricas son tradicionalmente utilizadas en la fabricación de muchas variedades de queso, siendo el extracto de cuajo de ternero y el cuajo bovino los más utilizados para este fin. Ambos tipos de cuajos contienen quimosina y pepsina a diferentes niveles dependiendo del tipo, individuo, alimentación y edad de los animales (Andren y Collin, 1986, 1988). Debido al descenso en la obtención de estómagos de animales jóvenes y al incremento en la producción de queso, hoy en día, estas preparaciones enzimáticas contienen más pepsina bovina que antaño. Ya que la actividad proteolítica de la pepsina bovina es mayor y parece ser más dependiente del pH al coagular la leche que la quimosina (Fox, 1969), es interesante establecer las diferencias, si existen, en la habilidad de estos enzimas para hidrolizar la β -Cn caprina.

Para ello se prepararon soluciones de β -Cn (2.5%, p/v), que se trataron con soluciones de quimosina y pepsina bovinas a nivel de 0.1 UC/mL (soluciones enzimáticas estandarizadas a igual actividad coagulante), se ajustaron a diferentes pH y se incubaron a

30°C durante 15 h.

De los resultados obtenidos en los electroforegramas (Figura 18) es evidente que, en conjunto y para idéntica actividad coagulante, la pepsina bovina fue más proteolítica que la quimosina. La β -Cn fue hidrolizada a β -I por ambas enzimas, siendo la quimosina la más eficiente en la producción de este polipéptido, el cual mostró gran resistencia a su hidrólisis posterior, sobre todo a $\text{pH} \geq 5.4$, tal y como ocurrió en las experiencias de hidrólisis de la β -Cn por los enzimas del cuajo. El polipéptido β -II sólo apareció a $\text{pH} \leq 5.0$ en los hidrolizados obtenidos a partir de la quimosina, mientras que los productos β -II, β -III, β -IV y β -V aparecieron en los hidrolizados obtenidos por la pepsina bovina, en igual tiempo de incubación.

III.3.3. Efecto de la concentración de cuajo en la proteólisis de la β -Cn

La mayoría del cuajo añadido a la leche en la fabricación del queso se pierde en el suero de quesería y sólo una pequeña cantidad queda incluida en la cuajada después de la fabricación del queso, dependiendo de las condiciones tecnológicas citadas anteriormente en el Capítulo I. El cuajo residual parece ser muy estable durante el madurado del queso (Matheson, 1981; Boudjellab y col., 1994) contribuyendo de forma esencial en la proteólisis durante el madurado y así consecuentemente también en el desarrollo del aroma, gusto y textura del queso (Fox, 1989).

En este estudio las cantidades utilizadas de enzima son equivalentes a aquellas retenidas en la cuajada según diferentes autores (Fox, 1988; Boudjellab y col., 1994). Los valores indicados a continuación como UC/mL, corresponden al 20% y 6% del cuajo retenido en la cuajada cuando se trata la leche de fabricación con enzima en proporción de 20 mL/100 L leche.

Así, se trataron diferentes muestras de β -Cn con extracto de cuajo a nivel de 4×10^{-3} y 1.2×10^{-3} UC/mL, se ajustaron a diferentes pH y fueron incubadas a 30°C durante 15 h.

Los electroforegramas de la Figura 19 muestran que el extracto de cuajo, a ambas concentraciones y a lo largo de todo el intervalo de pH estudiado, es capaz de producir los polipéptidos β -I y β -II. El resto de productos de degradación no se formaron ya que las

concentraciones enzimáticas usadas fueron pequeñas para este tiempo de incubación. La utilización de períodos de incubación prolongados hizo posible la formación del resto de productos proteolíticos.

III.3.4. Efecto del NaCl en la proteólisis de la β -Cn por el cuajo

El NaCl influencia el madurado del queso a través de su efecto sobre la actividad del agua (a_w), aunque probablemente tienen influencia otros efectos más específicos, parcialmente debidos a la a_w (Guinee y Fox, 1993).

En el queso, β -I y el resto de bandas características resultantes de la acción de los enzimas del cuajo sobre la β -Cn, no han sido claramente identificadas, existiendo divergencias en los resultados obtenidos por diferentes autores como se ha comentado anteriormente.

Carretero y col. (1994) en queso *Cendrat del Montsec*, producido a partir de leche de cabra, muestran que a lo largo del afinado, la zona electroforética que ocupa la fracción caseínica α_s disminuye en intensidad, para posteriormente aumentar, y por otra parte observan que el polipéptido β -II obtenido a partir de soluciones de caseína entera de cabra por acción de los enzimas del cuajo, presenta una movilidad electroforética similar a la presentada por la fracción caseínica α_s . Según estos autores el incremento en la zona α_s podría ser debida a la aparición del producto de degradación β -II.

Las diferencias observadas entre los distintos autores y tipos de queso descritos se deben quizás a la tecnología usada durante la fabricación del queso y las condiciones de madurado, a la proporción en enzimas coagulantes, y también posiblemente a las técnicas analíticas utilizadas.

En este estudio se partió de soluciones de β -Cn (2.5%, p/v) que contenían 0, 0.5, 1, 2.5, 5, 10 y 15% (p/v) de NaCl y que posteriormente fueron adicionadas de cuajo a nivel de 0.1 UC/mL, ajustadas a pH 5.4 e incubadas a 30°C durante 15 h.

Los electroforegramas de la Figura 20 muestran que la β -Cn fue más resistente a la hidrólisis del cuajo al elevarse la concentración de NaCl. A 15% de NaCl, sólo se observó una ligera proteólisis. Los péptidos característicos de degradación β -I, β -II y β -III se

formaron hasta que la concentración de NaCl alcanzó el 2.5%. El polipéptido β -II se formó en cantidades apreciables al 5% de NaCl pero no a mayores concentraciones. A concentraciones de 10 y 15% sólo se observó la formación de pequeñas cantidades de β -I. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Mulvihill y Fox (1978) y Gouda (1987) para la β -Cn bovina.

Las razones que justifican esta inhibición aún no son claras, pero es conocido que la sacarosa, el glicerol o una concentración proteica elevada producen un efecto parecido. La β -Cn es bastante resistente a la proteolisis en la mayoría de las variedades de queso en que se utiliza como coagulante cuajo animal, permaneciendo grandes cantidades de la proteína sin hidrolizar al final del madurado (Ledford y col., 1966; Creamer, 1975; Carretero y col., 1994). Sin duda el NaCl juega un papel inhibitorio de la proteolisis en el queso, aunque quesos hiposodados o sin salar también presentan niveles bajos de hidrólisis en esta caseína, lo que hace pensar que otros factores ligados al madurado tienen una importancia vital en esta inhibición (Fox y col., 1993). Es posible que la inhibición sea debida a cambios de conformación producidos por la presencia de iones.

III.3.5. Efecto del pH en la proteolisis de la β -Cn adicionada del 5% NaCl por el cuajo

En estas experiencias se tomaron soluciones de β -Cn (2.5%, p/v) adicionadas de NaCl (5%, p/v), se ajustaron a diferentes pH, se trataron con cuajo a nivel de 0.1 UC/mL y finalmente se incubaron a 30°C durante 15 h.

Los electroforegramas de la Figura 21 muestran que el efecto inhibitorio del NaCl sobre la β -Cn varió con el pH. La inhibición fue más pronunciada al disminuir el pH, especialmente a $\text{pH} \leq 5.0$. El polipéptido β -I se produjo en todo el intervalo de pH estudiado, aumentando en intensidad al incrementar el pH, especialmente a pH 6.6. β -II fue el principal producto de degradación formado a bajos valores de pH ($\text{pH} \leq 4.6$). β -III no se evidenció en el intervalo de pH estudiado en estas condiciones. Sin embargo, tanto β -I como β -II se formaron en presencia del 5% NaCl y a pH 5.4, condiciones iónicas de la mayoría de quesos jóvenes o poco afinados.

El efecto inhibitorio del NaCl en la proteólisis de la β -Cn bovina también es pH dependiente. Sin embargo, a valores bajos de pH, el NaCl altera la especificidad proteolítica de la quimosina y pepsina, inhibiendo la formación de β -III a concentraciones del 2.5% y promueve la formación de 2 péptidos nuevos (Mulvihill y Fox, 1978). En el caso de la β -Cn caprina y en las condiciones proteolíticas y sistema electroforético utilizados, no se observó la aparición de nuevos productos de proteólisis.

III.3.6. Comparación de los productos de hidrólisis de las caseínas β caprina y bovina

La Figura 22 muestra la secuencia de las caseínas β caprina y bovina. La homología existente entre estas 2 proteínas es muy elevada (>90%) con secuencias aminoacídicas similares, por lo menos en las regiones descritas como susceptibles de hidrólisis por la quimosina en la β -Cn bovina. La diferencia más significativa entre ambas proteínas se debe a la delección del dipéptido Pro₁₇₉-Tyr₁₈₀ en la β -Cn caprina. La quimosina hidroliza la β -Cn bovina a través de los enlaces peptídicos 189-190 y/o 192-193, 163-164 y/o 165-166 y/o 167-168, 139-140 y 127-128 dando los productos de degradación denominados β -I, β -II, β -III y β -IIIb (Creamer, 1976; Pélissier y col., 1974; Visser y Slangen, 1977).

En este estudio comparativo se partió de soluciones de β -Cn caprina y de caseína entera bovina que fueron tratadas con cuajo a nivel de 0.1 UC/mL, pH 5.4, a 30°C durante diferentes períodos de incubación (1, 2, 4, 6 y 15 h). Los electroforegramas de la Figura 23 muestran la acción proteolítica de los enzimas del cuajo sobre la β -Cn caprina y la caseína entera bovina. En estas condiciones proteolíticas, la caseína entera bovina produce, en un sistema de electroforesis PAGE-urea, 4 productos principales identificados como β -I, β -II y β -III que proceden de la hidrólisis de la β -Cn y el producto denominado α_{s1} -I procedente de la hidrólisis de la α_{s1} -Cn por los enzimas del cuajo (de Jong y de Groot-Mostert, 1977). Los productos β -I, β -II y β -III producidos a partir de las caseínas β caprina y bovina se mostraron idénticos o muy similares en PAGE-urea. La banda electroforética más rápida de la β -Cn caprina y de sus productos de degradación, tuvieron movilidades electroforéticas idénticas que las presentadas por la β -Cn bovina y sus productos de degradación, respectivamente. Estos resultados sugieren que la β -Cn caprina podría ser atacada por los

enzimas del cuajo en las mismas regiones descritas como susceptibles de hidrólisis en su homóloga bovina por la acción de la quimosina. La presencia de los polipéptidos β -IV y β -V en los hidrolizados caprinos, podría ser explicada por una diferencia a nivel de conformación proteica respecto a la β -Cn bovina, quizás debida a la delección del dipéptido Pro₁₇₉-Tyr₁₈₀ antes nombrado, que haría accesible otros puntos de hidrólisis a la acción proteolítica de los enzimas del cuajo.

III.3.7. Efecto del nivel de fosforilación de la β -Cn al ser hidrolizada por los enzimas del cuajo

Las estructuras primarias pertenecientes a algunas caseínas en la que se incluye la β -Cn caprina (Roberts y col., 1992), no han sido determinadas directamente a partir de la proteína, sino que se han deducido de las correspondientes secuencias del ADNc. Estas técnicas tienen el inconveniente principal de no dar información alguna de las modificaciones que ocurren durante los procesos de transcripción y traducción hasta dar una proteína "madura". Actualmente diferentes laboratorios están trabajando en estas proteínas con objeto de verificar los cambios que sufre el ARNm e identificar los residuos fosforilados.

El análisis electroforético a pH alcalino de la β -Cn caprina presenta 2 bandas de intensidades similares. Richardson y Creamer (1974) denominaron estas bandas como β_1 y β_2 , en base a su composición aminoacídica y contenido en fosfato, atribuyéndoles 6 y 5 residuos por mol, respectivamente, como ya se ha comentado anteriormente.

Los trabajos de Roberts y col. (1992) muestran que la secuencia Ser₁₇-Ser-Ser-Glu-Glu₂₁, reconocida por una caseinquinasa específica, es altamente conservada en las especies mamíferas incluida la caprina.

Estudios recientes han mostrado que este perfil puede variar en número de componentes e intensidades, incluso puede darse el caso en que las bandas correspondientes a la β -Cn no aparezcan en el gel de electroforesis. Esta gran heterogeneidad ha sido atribuida a la existencia de variantes genéticas (Dall'Olio y col., 1989), y a diferentes niveles de fosforilación de la cadena proteica, siendo el número de residuos fosfato por molécula de proteína variable de 3 a 6 (Chianese y col., 1993). La intensidad diferente, para cada una de

las bandas electroforéticas pertenecientes a esta proteína, depende del porcentaje de cada una de las distintas formas fosforiladas en muestras individuales. Los niveles de fosforilación 3 y 4 se encuentran en muy baja proporción en comparación a los niveles 5 y 6.

Este fenómeno no es exclusivo de la β -Cn caprina, describiéndose hasta 7 niveles de fosforilación diferentes (1-7) en la β -Cn ovina (Chianese y col., 1995b).

Según Mercier (1981) son necesarias las secuencias Thr/Ser-X-A, donde X representa un aminoácido y A un residuo dicarboxílico, para que el proceso de fosforilación se produzca, siendo el residuo Thr peor aceptor de fosfatos que la Ser. Los lugares donde A es un dicarboxílico son considerados como sitios primarios de fosforilación (posiciones 14, 20, 21, 37 y 43) y aquéllos con un residuo fosforilado en esta posición son considerados como secundarios (posiciones 17 y 19), dando un total de 7 sitios potenciales de fosforilación en la β -Cn caprina (Figura 22), igual que ocurre en su homóloga ovina.

Teóricamente, los diferentes grados de fosforilación deberían afectar la formación de los productos de degradación propios de la β -Cn al ser hidrolizada por los enzimas del cuajo, obteniéndose grupos de péptidos formados por tantas bandas electroforéticas como niveles de fosforilación se incluyen en la proteína.

Con el objeto de verificar esta hipótesis se purificó β -Cn procedente de una muestra individual que contenía al menos 5 niveles de fosforilación visibles por PAGE-urea.

La β -Cn purificada se hidrolizó con cuajo (0.1 UC/mL) a diferentes pH y a 30°C durante un período de tiempo de 30 h.

La Figura 24 muestra los resultados de esta experiencia. El perfil observado para la β -Cn purificada presentó 2 bandas principales de gran intensidad que corresponden a los niveles de fosforilación 5 y 6 (5P y 6P), y otras 3 bandas de menor intensidad siendo 2 de ellas de menor recorrido electroforético y 1 de mayor recorrido. Si consideramos que las bandas mayoritarias pertenecen a los niveles 5P y 6P (Richardson y Creamer, 1974), las 2 bandas de menor recorrido electroforético corresponderían a niveles de fosforilación inferiores, posiblemente 3P y 4P, tal y como describen Chianese y col. (1993). Sin embargo la banda de mayor recorrido, respecto a los componentes principales, tendría un nivel de fosforilación superior posiblemente 7P (no descrita hasta el momento en caprino) igual que ocurre en la β -Cn ovina.

Mercier (1981) relacionó la producción de formas multifosforiladas de caseína con una deficiencia en caseinquinasa, resultando un proceso ineficiente al fosforilar grandes cantidades de caseína a nivel del aparato de Golgi.

Teniendo en cuenta las posiciones potenciales de fosforilación en la β -Cn caprina y las formas predominantes 5P y 6P, el resto de formas fosforiladas observadas en PAGE-urea se podría construir una hipótesis que explicase estos resultados:

1. Las formas 5P y 6P (formas principales) serían el resultado de la fosforilación de los residuos Ser en las posiciones 18, 19 y 35 (posiciones primarias de fosforilación), residuos Ser en las posiciones 15 y 17 (donde A es un residuo SerP) y de un residuo Thr de las posiciones 12 o 41.
2. La forma 7P tendría fosforilados todos los sitios potenciales antes nombrados.
3. La forma 4P tendría fosforiladas las posiciones primarias y un residuo Ser de las posiciones 15 o 17.
4. En la forma 3P sólo se fosforilarían las posiciones primarias.

Los productos de degradación obtenidos por acción del cuajo presentaron las siguientes características:

1. Los péptidos β -I obtenidos tras la hidrólisis de la β -Cn se compuso de 2 bandas de gran intensidad óptica y de 3 bandas de menor intensidad y recorrido electroforético.
2. A pH 5.4-6.6 fueron visibles todas las bandas de los péptidos β -I ya que la β -Cn fue hidrolizada por completo en este intervalo de pH, mientras que a pH 3.8-5.0 sólo se observaron las 3 bandas más rápidas de este producto de degradación. Las bandas de menor recorrido se solaparon con las bandas de la β -Cn residual.
3. El producto β -II, como en el caso anterior, mostró un perfil electroforético de 5 componentes peptídicos perfectamente visibles en los electroforegramas en todo el intervalo de pH estudiado.
4. Los polipéptidos β -III, β -IV y β -V también aparecieron, pero en una proporción tal, que fue difícil apreciar los componentes peptídicos minoritarios o menos fosforilados. Teóricamente los componentes más lentos del β -IV se solaparían con los más rápidos del β -III.

Todos los puntos de hidrólisis de la β -Cn caprina y de sus productos de degradación conducen a péptidos que contienen todos los residuos fosforilados, quizás debido a que la

zona fosforilada de estos compuestos dificulta la acción proteolítica de los enzimas del cuajo en esta región.

III.4. PROTEOLISIS DE LA α_{s1} -CN CAPRINA POR LOS ENZIMAS DEL CUAJO DE TERNERO

III.4.1. Proteolisis de la α_{s1} -Cn por el cuajo. Efecto del pH

La Figura 25 muestra el efecto del pH en la proteolisis de la α_{s1} -Cn por el cuajo a 30°C durante 4 y 6 h, respectivamente. Como en el caso de la β -Cn, la α_{s1} -Cn presenta diferentes niveles de fosforilación (7-9) que se traducen en PAGE-urea en la presencia de 3 bandas electroforéticas que corresponden a la misma cadena proteica con diferentes grados de fosforilación (Chianese y col., 1992).

Los electroforegramas dan a conocer un óptimo de pH en la hidrólisis de la α_{s1} -Cn por los enzimas del cuajo para dar su producto primario de degradación (PPD) entre 5.8 y 6.2. A las 8 h de hidrólisis, en este mismo intervalo de pH, la α_{s1} -Cn desapareció casi completamente y sus productos de hidrólisis también sufrieron una proteolisis considerable. Finalmente a las 15 h de incubación, tanto la α_{s1} -Cn como el PPD habían desaparecido.

Contrariamente a $\text{pH} \leq 5.0$ se apreció una proteolisis mínima, no observándose la formación de productos de degradación, incluso cuando el tiempo de incubación se prolongó a 15 h.

De los resultados obtenidos podemos afirmar que esta caseína es mucho más sensible a la acción del cuajo que la β -Cn de forma aislada, pero también mucho más dependiente del pH de reacción; en iguales condiciones hidrolíticas (0.1 UC/mL, pH 5.4-6.6, 30°C) la α_{s1} -Cn es degradada en aproximadamente 8 h, mientras que la β -Cn tarda más de 15 horas en hidrolizarse por completo.

Con el objeto de inducir una mayor proteolisis a $\text{pH} \leq 5.0$ las experiencias anteriormente descritas se repitieron introduciendo una concentración de cuajo más alta (1 UC/mL). La Figura 26 muestra los resultados de esta hidrólisis a 1 h de incubación. Los electroforegramas muestran una hidrólisis óptima de la α_{s1} -Cn a pH 5.8-6.6 y mínima a pH

3.8-5.0, aunque no nula. Los productos de degradación obtenidos a pH 3.8-5.0 tuvieron un patrón electroforético diferente al presentado a pH 5.4-6.6. Este hecho sugiere que el pH de reacción influencia de manera decisiva la naturaleza de los productos de proteólisis formados.

Los patrones electroforéticos de los PPD formados a lo largo del intervalo de pH estudiado sugieren la formación de dos polipéptidos que se solapan parcialmente en este tipo de gel, y que se forman en mayor o menor cantidad dependiendo del pH de reacción. A pH 3.8 aparecieron 3 bandas de intensidad débil con una movilidad electroforética muy próxima a la α_{s1} -Cn, tal y como aparecen a pH 5.8-6.6, aunque en este caso la intensidad es mayor. A pH 5.0 aparecieron de nuevo 3 bandas pero con una movilidad mayor aunque próxima a las 3 bandas anteriormente descritas. A pH 4.2, 4.6 y 5.4 se observaron estados de transición entre estos tipos de polipéptidos, predominando los polipéptidos de mayor recorrido electroforético a pH 4.2 y 4.6, y a pH 5.4 las de menor movilidad.

La Figura 27 representa gráficamente los electroforegramas obtenidos en la hidrólisis de la α_{s1} -Cn por el cuajo a diferentes pH.

Con el objetivo de confirmar la producción solapada de los diferentes PPD formados según el pH utilizado en la hidrólisis, se realizó una electroforesis bidimensional de los hidrolizados obtenidos a pH 5.4, que contiene ambos PPD.

La Figura 28 muestra el resultado de esta experiencia, identificándose la α_{s1} -Cn residual y dos zonas con material peptídico de peso molecular diferente. Ambas zonas constaron de diferentes componentes electroforéticos.

Los Mr (Da) calculados para estos 2 productos fueron en conjunto de 18300 para el que tuvo menor movilidad electroforética en PAGE-urea, y de 15200 para el de mayor movilidad. El Mr hallado para la α_{s1} -Cn fue de 24500, valor que coincide con el peso molecular calculado a partir de su secuencia primaria.

En los trabajos realizados en la α_{s1} -Cn bovina (Mulvihill y Fox, 1977) se describe la aparición consecutiva de diferentes péptidos denominados α_{s1} -I a IV a pH > 5.8. En un trabajo más reciente se detalla la naturaleza de estos péptidos correspondiendo α_{s1} -I al péptido α_{s1} (f24-199) y α_{s1} -II al péptido α_{s1} (f24-164) (McSweeney y col., 1993d). Como veremos más adelante estos puntos de hidrólisis también son susceptibles de ser atacados por la quimosina en la α_{s1} -Cn caprina (apartado III.5.1.1.). Los Mr obtenidos para estos dos polipéptidos concuerdan con los calculados a partir de las secuencias primarias. La formación

de un polipéptido u otro, o bien una mezcla de los dos, dependiendo del pH de reacción, tendría su explicación en el estado de agregación de esta proteína según el pH. De esta forma y siguiendo con la nomenclatura adoptada en la especie bovina, según la movilidad electroforética respecto a la α_{s1} -Cn, denominaremos estos productos de hidrólisis como α_{s1} -I y α_{s1} -II. Así a pH 5.8-6.6 y 3.8 aparecería casi exclusivamente el polipéptido α_{s1} -I, a pH 5.0 aparecería principalmente el polipéptido α_{s1} -II y a pH 4.2, 4.6 y 5.4 aparecería una mezcla de ambos.

Ambos polipéptidos se desarrollan en PAGE-urea como 3 bandas debido a los grados de fosforilación diferente que presenta el producto de hidrólisis, al incluir en su estructura primaria las zonas fosforiladas de la α_{s1} -Cn.

Hay que señalar que en las condiciones de hidrólisis y sistemas electroforéticos utilizados, la proteólisis de la α_{s1} -Cn sólo dio los productos de degradación anteriormente descritos. En la hidrólisis de su homóloga bovina se han descrito diversos péptidos correspondientes a puntos de hidrólisis potenciales (Mulvihill y Fox, 1979a). Sin embargo, cerca de la mitad de los péptidos identificados por estos autores, no han sido aislados ni identificados en un trabajo más reciente realizado por McSweeney y col. (1993d). Según estos autores las discrepancias observadas entre los resultados previos obtenidos en la hidrólisis de la proteína bovina y los recientemente descritos, se deberían a diferencias en las condiciones de hidrólisis o bien a las técnicas analíticas utilizadas en la identificación de los péptidos.

III.4.2. Efecto del NaCl en la proteólisis de la α_{s1} -Cn por el cuajo

En estas experiencias se partió de soluciones (2.5%, p/v) de α_{s1} -Cn, añadidas de NaCl, llevándose las soluciones finales a 0, 0.5, 1, 2.5, 5, 10 y 15% (p/v) a pH 5.4 y se trataron con cuajo (0.1 UC/mL). Finalmente las soluciones se incubaron a 30°C durante 6 h. Los electroforegramas de la Figura 29 muestran, en contraste con la β -Cn, que en general la proteólisis de la α_{s1} -Cn, a pH 5.4, fue estimulada al incrementarse la concentración de NaCl, sobre todo al 5%, y disminuyó a concentraciones de NaCl del 10-15%. A estos últimos valores también se produjo una proteólisis importante, en comparación con la β -Cn,

donde iguales contenidos de NaCl son capaces de parar las reacciones de hidrólisis. Estos datos concuerdan con los obtenidos para la α_{s1} -Cn bovina (Mulvihill y Fox, 1980; Gouda, 1987).

III.4.3. Efecto del pH en la proteólisis de la α_{s1} -Cn adicionada del 5% NaCl por la acción del cuajo

Se tomaron soluciones de α_{s1} -Cn (2.5%, p/v) que contenían NaCl 5% (p/v) y se ajustaron los pH en una escala de 3.8-6.6 a intervalos de pH de 0.4 unidades. Las soluciones se trataron con cuajo (0.1 UC/mL) y se incubaron a 30°C durante 1, 2, 4 y 6 h.

Los electroforegramas de la Figura 30 muestran esta experiencia a las 2 y 4 h de incubación, respectivamente. Como se observa el efecto del NaCl varió con el pH; a pH 5.0-6.6, la concentración en NaCl utilizada tuvo un cierto efecto inhibitorio en la proteólisis de la α_{s1} -Cn, y especialmente en la posterior degradación del PPD. Al descender el pH, el NaCl estimuló la proteólisis de la proteína como es visible en los electroforegramas, sobre todo a pH 3.8 y 4.6.

Se han descrito resultados similares para la proteína bovina, mostrando en esta especie una especificidad diferente del enzima coagulante por la proteína en presencia de NaCl a pH 5.2, produciéndose los productos denominados α_{s1} -VII-VIII (Mulvihill y Fox, 1979a, 1980).

En las condiciones de hidrólisis y sistema electroforético utilizados no se obtuvo resolución suficiente para poder describir la presencia de nuevos productos de degradación de forma concluyente, aunque en los pH más favorables y tras 2 h de incubación parecen esbozarse depósitos polipeptídicos de mayor movilidad electroforética, poco nítidos y todavía no identificados (Figura 30). El péptido producido a pH 3.8 con adición del 5% NaCl fue equivalente al α_{s1} -II, en lugar del α_{s1} -I producido sin adición de sal. A pH 5.0 y en presencia del 5% NaCl se observó un mezcla de péptidos y el resto de los pH se definieron como una forma u otra (α_{s1} -I a $\text{pH} \geq 5.4$ y α_{s1} -II a $\text{pH} \leq 4.6$), sin existir estados de transición. La Figura 31 resume la formación de estos polipéptidos según las condiciones iónicas utilizadas.

Esta experiencia demuestra que la acción del cuajo sobre la α_{s1} -Cn caprina es dependiente de las condiciones iónicas utilizadas, y tanto una variación de pH como la

presencia de NaCl condicionan la naturaleza de los productos de hidrólisis formados.

El NaCl es generalmente usado en el procesamiento de alimentos a bajas concentraciones para incrementar la solubilidad proteica. Sin embargo, Strange y col. (1994) demostraron que la solubilidad de la α_{s1} -Cn bovina, y en general de todas las caseínas, decrece en un 30% en presencia de NaCl 0.1 M a pH inferiores del isoelectrico (pH 4.6). En nuestro caso y a $\text{pH} \leq 4.6$, el NaCl podría producir una bajada en la solubilidad de la proteína modificando su estado de agregación, favoreciendo la formación de los péptidos α_{s1} -II frente al α_{s1} -I, por un cambio en la conformación proteica.

III.4.4. Proteolisis de la α_{s1} -Cn caprina por el cuajo, quimosina y pepsina bovinas

En este trabajo se partió de soluciones de α_{s1} -Cn (2.5%, p/v) a pH 5.4 en presencia del 5% NaCl (p/v) que se trataron con cuajo de ternero (Renifor 15/E), quimosina (AnirenTM 880) y pepsina bovina (Bovipep[®] 1700) a nivel de 0.1 UC/mL. Las soluciones se incubaron a 30°C durante 0.5, 1, 2, 4, y 6 h.

La Figura 32 muestra los electroforegramas obtenidos en los hidrolizados anteriormente descritos. En todos los casos la α_{s1} -Cn fue degradada al PPD, siendo la pepsina el enzima más proteolítico para igual actividad coagulante, seguido del cuajo y la quimosina.

A las 6 h de hidrólisis la pepsina hidrolizó toda la proteína, mientras que a este mismo tiempo de incubación quedaron restos de ella en la hidrólisis producida por el cuajo, y una cantidad apreciable en la realizada bajo la acción de la quimosina. Los PPD producidos por la quimosina y pepsina se mostraron estables al ataque proteolítico de estos enzimas, mientras que el producido bajo la acción del cuajo fue hidrolizado en gran parte posteriormente. Parece ser que la acción conjunta de ambos enzimas (quimosina y pepsina) produce una degradación más intensa de este producto de hidrólisis.

III.5. PROTEOLISIS DE LAS CASEINAS α_{s1} A y F CAPRINAS POR ACCION DE LOS ENZIMAS DEL CUAJO EN DIFERENTES CONDICIONES IONICAS

Los estudios realizados sobre las proteínas de leche de cabra han dado a conocer que todas las caseínas presentan, en mayor o menor grado, polimorfismo genético (Boulanger y col., 1984; Addeo y col., 1988; Dall'Olio y col., 1989; Di Luccia y col., 1990). Sin embargo, el polimorfismo tan especial que presenta la α_{s1} -Cn ha hecho que sea el centro de atención de numerosos equipos de investigación.

El locus de la α_{s1} -Cn se distingue por un fuerte polimorfismo y sobre todo por el hecho de que existe, entre alelos o grupos de alelos, grandes diferencias a nivel de síntesis proteica.

Se han dedicado pocos estudios concernientes a las propiedades que presentan estas leches en la fabricación del queso. Ciafarone y Addeo (1984), así como Ambrosoli y col. (1988), dieron a conocer que leches con bajo contenido en α_{s1} -Cn coagulan más rápidamente, pero también producen cuajadas más blandas y difíciles de manejar (Emaldi y Ciafarone, 1987; Remeuf y col., 1989, 1991), en comparación con las leches que presentan un contenido alto en α_{s1} -Cn.

Este polimorfismo afecta la cantidad de leche producida (Barbieri y col., 1995), encontrándose diferencias en el porcentaje de grasa y características micelares (Remeuf, 1993) entre los alelos A, E y F.

Cada una de las variantes genéticas de baja síntesis proteica se caracterizan por la deleción de una secuencia aminoacídica (residuos 59-95 en F y 59-69 en D) que es el resultado de un procesado anómalo del ARNm (Brignon y col., 1990).

Como resultado de estas diferencias, las leches con un contenido alto en α_{s1} -Cn muestran una aptitud mayor a la coagulación y dan mayores rendimientos queseros, respecto a las variantes de contenido medio y bajo de proteína (Pirisi y col., 1994; Vassal y col., 1994). Sin embargo, los quesos fabricados con leches que contienen los alelos fuertes tienen menos grasa, son quesos de textura más firme y tienen menos sabor a "cabra" que los producidos a partir de leches que contienen los alelos E y F (Vassal y col., 1994). Por otra parte parece ser que los quesos fabricados a partir de leches A presentan una proteolisis más importante (como muestran los análisis Kjeldhal realizados a partir de las fracciones

nitrogenadas) y productos de hidrólisis diferentes (como muestran los análisis electroforéticos y perfiles cromatográficos obtenidos por HPLC), respecto a quesos fabricados con leches F (Delacroix-Buchet y col., en prensa).

La quimosina es el principal enzima que encontramos en diferentes cuajos naturales utilizados para inducir la coagulación en el proceso de fabricación de queso. Este enzima es activo sobre las caseínas α_{s1} y β caprinas en solución como se ha descrito anteriormente, mostrándose en todos los casos más activa sobre la α_{s1} -Cn. En queso estas diferencias son mucho más acusadas, por la influencia de las condiciones iónicas ya comentadas en los apartados III.4.2 y 4.3.

La proteólisis producida por los enzimas del cuajo, vía hidrólisis de la α_{s1} -Cn en α_{s1} -I, es la responsable de la textura blanda de los quesos en estadios tempranos de maduración (de Jong, 1976; Creamer y Olson, 1982).

El cuajo produce péptidos que a su vez sirven de substratos a las proteasas y peptidasas microbianas para producir péptidos de pequeño tamaño, aminoácidos y otros componentes que son necesarios en el desarrollo de las características organolépticas.

Ya que la α_{s1} -Cn es una de las caseínas más hidrolizadas durante el madurado del queso, es necesario estudiar en qué forma el polimorfismo de esta proteína sería condicionante de las diferencias observadas en la proteólisis, textura y características organolépticas.

III.5.1. Proteólisis de las α_{s1} -Cn A y F por la quimosina

En este trabajo se partió de α_{s1} -Cn A y F cromatográficamente puras, que fueron tratadas con quimosina bovina (AnirenTM 600) en unas condiciones hidrolíticas que simulan las condiciones iónicas presentadas por quesos jóvenes de cabra (pH 5.2 y 3% NaCl). Las características experimentales se describen en el apartado II.1.4. de esta memoria.

III.5.1.1. Estudio de la fase soluble a pH 4.6

La Figura 33 muestra los cambios en los perfiles de elución de los péptidos solubles a pH 4.6 obtenidos por RP-HPLC, en la hidrólisis de las α_{s1} -Cn A y F por acción de la quimosina a pH 5.2 en presencia del 3% de NaCl, a lo largo de diferentes períodos de incubación.

En las muestras control, donde el enzima es inactivado rápidamente tras su adición (tiempo 0), sólo apareció un gran pico (indicado en la Figura con un asterisco), con un tiempo de elución aproximado de 16 min, que correspondió al benzoato sódico utilizado en las preparaciones de quimosina como agente antimicrobiano. La identidad de este producto se verificó inyectando en el cromatógrafo la solución enzimática de quimosina y el benzoato sódico puro, obteniéndose picos con tiempos de elución idénticos.

En el transcurso de la hidrólisis de la α_{s1} -Cn A se formó un número relativamente importante de péptidos; a las 3 h de incubación (Figura 33, f) se observó la aparición de aproximadamente 10 picos principales. En el hidrolizado obtenido a las 12 h, se incrementó el número de péptidos y a las 24 h de hidrólisis sólo se apreciaron diferencias cuantitativas en el área de los picos correspondiente a los péptidos formados, pero no en el número.

La aparición rápida de un número elevado de péptidos en un período relativamente corto de hidrólisis (3 h), sugiere un mecanismo de acción enzimática de la quimosina en los extremos de la α_{s1} -Cn A, produciendo un número considerable de péptidos solubles a pH 4.6.

En el caso de los hidrolizados realizados en la α_{s1} -Cn F y a las 3 h (Figura 33, e) de incubación, sólo se evidenció la formación de 5 péptidos principales, indicando variaciones en los parámetros cinéticos de la reacción enzimática dependientes de la variante genética de α_{s1} -Cn. En general la variante A se mostró más susceptible a la proteólisis por la quimosina que la F, como es evidente en los cromatogramas. Este hecho podría ser explicado por una conformación proteica diferente adoptada en la α_{s1} -Cn F, respecto a la variante A, que podría deberse a la delección que presenta (residuos 59-95) que la haría más resistente al ataque proteolítico de la quimosina. De igual forma la conformación proteica de la variante F podría hacer susceptibles diferentes enlaces peptídicos a la acción de la quimosina, obteniéndose péptidos diferentes respecto a la variante A, o bien potenciándose la formación de unos péptidos frente a otros, como veremos más adelante.

La Figura 34 muestra los perfiles de elución de la fracción soluble a pH 4.6 obtenidos por RP-HPLC a partir de los hidrolizados correspondientes a la α_{s1} -Cn (variantes A y F) por la acción de la quimosina a las 24 h. Los péptidos principales (picos A3, A6, A11, A12, F1, F2, F8 y F9) se identificaron a partir de las fracciones de elución recogidas después de 1 h y 3 h de incubación para las variantes A y F, respectivamente. El resto de péptidos producidos en ambas variantes se separaron e identificaron a partir de los hidrolizados obtenidos a las 24 h de incubación. Aunque en ambas variantes hubo péptidos con el mismo tiempo de elución, éstos fueron aislados e identificados en sus hidrolizados respectivos, ya que en un número elevado de casos se encontró que un pico contuvo más de un péptido.

La Tabla 13 muestra las secuencias determinadas para los diferentes picos, y la Figura 35 indica la posición de estos péptidos en las moléculas de la α_{s1} -Cn A y F. Los resultados de secuencia dieron a conocer datos muy interesantes:

1. Un solapamiento considerable entre péptidos que explica en gran parte las dificultades encontradas al aislarlos.
2. Los perfiles peptídicos encontrados para cada una de las variantes tuvieron un número de péptidos en común (f21-23 y f24-32 en ambas variantes, f143-149 y f106-112, f165-199 y f128-162, f102-120 y f65-83 en las variantes A y F, respectivamente), mientras que otros péptidos fueron sólo detectados en la variante A (f92-94, f83-91, f81-?, f1-16, f121-142, f19-23, f180-199 y f165-179) y en la variante F (f65-?, f65-105 y f1-23).
3. Los enlaces peptídicos hidrolizados por la quimosina fueron: **Leu₁₆-Asn₁₇**, **Glu₁₈-Asn₁₉**, **Phe₂₃-Val₂₄**, **Phe₂₈-Pro₂₉**, **Phe₃₂-Arg₃₃**, **Ile₄₄-Gly₄₅**, **Tyr₈₀-Ile₈₁**, **Gln₈₂-Lys₈₃**, **Tyr₉₁-Leu₉₂**, **Tyr₉₄-Leu₉₅**, **Leu₁₀₁-Lys₁₀₂**, **Leu₁₀₉-Glu₁₁₀**, **Leu₁₂₀-His₁₂₁**, **Leu₁₄₂-Ala₁₄₃**, **Leu₁₄₉-Phe₁₅₀**, **Leu₁₅₆-Arg₁₅₇**, **Trp₁₆₄-Tyr₁₆₅**, **Phe₁₇₉-Ser₁₈₀** para la variante A y **Phe₂₃-Val₂₄**, **Phe₃₂-Arg₃₃**, **Leu₆₄-Lys₆₅**, **Leu₈₃-His₈₄**, **Leu₁₀₅-Ala₁₀₆**, **Leu₁₁₂-Phe₁₁₃**, **Leu₁₁₉-Asp₁₂₀** y **Trp₁₂₇-Tyr₁₂₈** para la variante F.
4. Nueve de los enlaces peptídicos hidrolizados e identificados en la variante A (señalados en negrita en el punto 3) coinciden con aquéllos descritos por McSweeney y col. (1993d) en la α_{s1} -Cn B bovina.
5. En ambas variantes caprinas los enlaces susceptibles de hidrólisis tuvieron un residuo aromático o hidrofóbico en la parte N-terminal del enlace peptídico (4 Phe-X, 1 Trp-X, 2 Tyr-X y 7 Leu-X para la variante A, y 2 Phe-X, 1 Trp-X y 6 Leu-X para la variante F). En la variante A también se hidrolizaron enlaces que contenían residuos Glu y Gln. Estos

resultados concuerdan con la especificidad de la quimosina al actuar sobre las caseínas β (Visser y Slangen, 1977) y α_{s1} (McSweeney y col., 1993d) bovinas.

6. La variante A fue extensamente hidrolizada identificándose péptidos de todas las regiones de su molécula excepto de la zona Gly₄₅ a Tyr₈₀. Esta secuencia contiene 7 de los 8 residuos fosfoserina de la α_{s1} -Cn A 8-P lo que podría explicar la resistencia de esta zona al ataque proteolítico de la quimosina. Resultados similares han sido obtenidos para la α_{s1} -Cn bovina y los enzimas quimosina y plasmina (McSweeney y col., 1993c, d).

7. Las zonas más hidrolizadas en la variante A se situaron a nivel de los enlaces Phe₂₃-Val₂₄, Leu₁₄₂-Ala₁₄₃ y Trp₁₆₄-Tyr₁₆₅, y en la variante F Phe₂₃-Val₂₄ y Leu₆₄-Lys₆₅.

8. El enlace peptídico Leu₆₄-Lys₆₅ de la variante F fue hidrolizado en mayor proporción que en la variante A (Leu₁₀₁-Lys₁₀₂), formándose hasta 4 péptidos diferentes. Estos resultados pueden ser explicados por la conformación proteica diferente antes mencionada. La diferencia de conformación haría más disponible el enlace peptídico Leu₆₄-Lys₆₅ de la variante F a la acción de la quimosina y como consecuencia sería más hidrolizado.

9. La secuencia aminoacídica delecionada en la variante F, y presente en la variante A, fue hidrolizada a nivel de los enlaces Tyr₈₀-Ile₈₁, Gln₈₂-Lys₈₃, Tyr₉₁-Leu₉₂ y Tyr₉₄-Leu₉₅, produciendo los péptidos f81-94, f83-91 y f92-94.

La secuencia peptídica (ver Figura 35) y el cambio en el área relativa de los diferentes picos encontrados sugiere el siguiente esquema de proteólisis en las variantes A y F: la quimosina primero hidrolizaría el enlace Phe₂₃-Val₂₄ produciendo el péptido f1-23 y los polipéptidos complementarios α_{s1} A (f24-199) y α_{s1} F (f24-162). En la variante A el péptido f1-23 no fue identificado directamente quizás porque fue hidrolizado rápidamente en los péptidos f1-16 y f19-23. El próximo enlace hidrolizado en la variante A sería Trp₁₆₄-Tyr₁₆₅, que se corresponde con el enlace Trp₁₂₈-Tyr₁₂₉ en la variante F, produciendo los péptidos f165-199 y f24-164 (A) y f129-162 y f24-128 (F). El péptido α_{s1} A (f24-164), con 10 enlaces susceptibles de hidrólisis, produciría un número elevado de fragmentos en este orden: f109-142, f121-142, f102-120 y f143-149. El péptido α_{s1} A (f165-199) podría ser hidrolizado a nivel del enlace peptídico Phe₁₇₉-Ser₁₈₀ produciendo los fragmentos f180-199 y f165-179. El péptido α_{s1} F (f24-128) sería hidrolizado en el siguiente orden: Leu₆₄-Lys₆₅, Leu₁₁₉-Asp₁₂₀, Leu₁₀₅-Ala₁₀₆, Ala₁₁₂-Phe₁₁₃ y Leu₈₃-His₈₄.

III.5.1.2. Estudio de la fracción insoluble a pH 4.6

Antes de abordar el estudio electroforético de los hidrolizados de las α_{s1} -Cn A y F obtenidos por la acción de la quimosina, se describirá brevemente el comportamiento de las caseínas caprinas en el sistema electroforético utilizado en este estudio; geles de poliacrilamida en presencia de agarosa (PAAGE).

Caseína entera

Los componentes caseínicos caprinos resueltos por PAAGE a pH 8.6 (Figura 36) se desarrollan como una serie de bandas que se identificaron en base a sus movilidades electroforéticas usando como patrones algunas fracciones puras aisladas. La κ -Cn también fue identificada por su alta sensibilidad a la acción de la quimosina, resultando de su hidrólisis la aparición en el gel del péptido para κ -Cn.

La β -Cn migró como dos bandas, igual que sucede en PAGE-urea, debido a sus dos niveles de fosforilación.

La κ -Cn migró a pH 8.6 como una sola banda por debajo de los componentes de la β -Cn, debido al tratamiento previo del gel con β -mercaptoetanol como agente reductor.

La α_{s2} -Cn migró en general como 3 componentes (uno de ellos mayoritario), siendo uno de ellos predominante sobre los demás y presentando una movilidad electroforética mayor que los componentes de la α_{s1} -Cn, independientemente de la variante genética de ésta. También es evidente en el electroforegrama de la caseína entera que incluye la α_{s1} -Cn A, un solapamiento parcial entre los componentes más lentos de la α_{s2} -Cn y los componentes más rápidos de la α_{s1} -Cn A.

Como en el caso de la β -Cn, la α_{s1} -Cn A presenta niveles de fosforilación diferentes, y como en PAGE-urea, esta proteína migra como 3 bandas.

La delección que caracteriza la variante F (residuos 59-95) conlleva la pérdida de 5 residuos fosfoseril contiguos. Leroux y col. (1992) dividen los ARNm pertenecientes a la α_{s1} -Cn F en dos clases: las formas cortas (F1-F4) y largas (F5-F9), las cuales representan aproximadamente el 60 y 40% de los transcritos, respectivamente. Las formas cortas de ARNm deberían teóricamente traducirse en cadenas proteicas acortadas, ya que todas ellas

presentan la delección de los residuos 59-95. Aproximadamente la mitad de las formas largas de ARNm se traducirían en cadenas proteicas que contendrían la secuencia aminoacídica deleccionada en las formas cortas y presentarían una estructura proteica similar a la α_{s1} -Cn A. Sin embargo estos autores no determinaron cuáles de estos transcritos son traducidos, y en qué proporción, en proteínas de diferente tamaño.

En resumen y de forma teórica, cabría esperar que la proteína madura correspondiente a la α_{s1} -Cn F estuviese compuesta por una mezcla de dos especies moleculares que se diferenciarían principalmente en la delección de la secuencia aminoacídica 59-95.

La aparición de diferentes formas de ARNm para una proteína no es un caso aislado y característico de la α_{s1} -Cn F caprina. Ferranti y col. (1995) mostraron que las variantes A, C y D de la α -Cn ovina se componen de dos especies moleculares que difieren entre sí en la delección aminoacídica de los residuos 141-148, produciendo cadenas proteicas de 199 y 191 aminoácidos respectivamente, donde la forma proteica más larga representa el 80% de la proteína total. De igual manera, las α_{s2} -Cn caprina y ovina aparecen como dos formas no alélicas producidas por diferentes formas de ARNm (Boisnard y Petrissant, 1985; Boisnard y col., 1991).

La variante F de la α_{s1} -Cn caprina migró en PAAGE entre las caseínas κ y α_{s2} , y se compuso de 3 componentes principales (2 bandas de gran intensidad óptica y una tercera de baja intensidad) y una serie de componentes menores. Los componentes principales corresponderían a la misma cadena proteica con diferentes niveles de fosforilación y los componentes menores podrían ser los transcritos largos alternativos procedentes del alelo F. Es interesante remarcar que el péptido más lento de la variante F tuvo una movilidad electroforética coincidente con la κ -Cn. Iguales resultados se obtuvieron en PAGE-urea (resultados no mostrados).

Esta variante es altamente defosforilada, en comparación a la variante A, lo cual explica la movilidad electroforética observada en PAAGE.

La Figura 37 muestra con más detalle y de forma ampliada el patrón electroforético de la variante F en PAAGE. En el electroforegrama se observa la serie de bandas de mayor recorrido que los componentes principales, presentando movilidades electroforéticas idénticas a los péptidos que forman la variante A, sugiriendo que podrían ser los mismos. Así la variante F sería una mezcla de dos especies moleculares de diferentes tamaños (199 y 162

residuos). Las lecturas densitométricas realizadas sobre la α_{s1} -Cn F mostraron que los componentes menores representaron el 31% de la proteína total, cifra similar a la dada para los transcritos largos del ARNm de esta proteína. Estos electroforegramas son sin duda una evidencia, a nivel proteico, de las diferentes formas de ARNm descritas para el alelo F por Leroux y col. (1992).

Hidrólisis

La Figura 38 muestra los electroforegramas pertenecientes a los hidrolizados de las α_{s1} -Cn A y F (quimosina, pH 5.2 y 3% NaCl) obtenidos a lo largo de diferentes períodos de incubación. Bajo estas condiciones hidrolíticas ambas variantes fueron completamente hidrolizadas en 3 y 6 h respectivamente, mostrándose más resistente a la hidrólisis la variante F que la A. Estos resultados confirman los obtenidos por RP-HPLC en el estudio de la fracción soluble a pH 4.6.

El PPD detectado en la hidrólisis de la variante A se desarrolló en 3 bandas como la α_{s1} -Cn A, indicando que las zonas de fosforilación de la proteína están incluidas en este producto de degradación. De acuerdo con la nomenclatura propuesta anteriormente para el PPD según su movilidad electroforética en condiciones alcalinas, el PPD producido a pH 5.2 y en presencia de NaCl correspondería al polipéptido α_{s1} -II. El PPD fue degradado tras su formación quedando sólo restos a las 12 h de hidrólisis.

En los electroforegramas también aparecieron una serie de depósitos de material peptídico (no menos de 4) con capacidades débiles de tinción y movilidades electroforéticas menores a la α_{s1} -Cn A. Es importante subrayar la especificidad de la quimosina al hidrolizar los diferentes péptidos que componen la α_{s1} -Cn A y el PPD. La α_{s1} -Cn A hidrolizada más rápidamente fue la de mayor grado de fosforilación (Figura 38, carrera 4). En el PPD, fue el péptido con menor grado de fosforilación el más rápidamente hidrolizado (Figura 38, carreras 5 y 6).

Los hidrolizados obtenidos a partir de la α_{s1} -Cn F mostraron patrones electroforéticos muy diferentes a los descritos anteriormente para la variante A. También en este caso la proteína con mayor grado de fosforilación fue degradada más rápidamente, en comparación al resto.

Los principales productos de degradación se presentaron en forma de 2 bandas de gran intensidad óptica y una tercera de baja intensidad con una movilidad electroforética en conjunto superior a la α_{s1} -Cn F. El producto de hidrólisis de menor movilidad tuvo una localización próxima a la presentada por el componente principal más rápido de la α_{s1} -Cn íntegra. En esta hidrólisis también se formó una serie de material peptídico de menor movilidad que la proteína entera, observándose la aparición de un péptido adicional con una movilidad muy baja. El PPD obtenido en esta variante podría tener su origen en la hidrólisis del enlace peptídico Phe₂₃-Val₂₄ para producir el péptido α_{s1} F (f24-162).

En ambas variantes los PPD formados fueron posteriormente hidrolizados a lo largo de los períodos de incubación, sin producir otros productos de degradación de mayor movilidad apreciables en el sistema electroforético.

III.5.2. Proteolisis de la α_{s1} -Cn A por acción de la quimosina en función de las condiciones iónicas del medio reaccionante

Mulvihill y Fox (1977, 1979a) demostraron que la especificidad proteolítica de la quimosina al hidrolizar la α_{s1} -Cn bovina era dependiente del pH de reacción y del estado de agregación del substrato. También se ha demostrado este efecto para la α_{s1} -Cn caprina (apartados III.4.1, 4.2 y 4.3), encontrando una dependencia de las condiciones iónicas utilizadas.

En este trabajo se intentará establecer hasta que punto una variación en el pH o bien la concentración del NaCl son capaces de producir un cambio en el patrón proteolítico de esta proteína al ser hidrolizada por la quimosina.

III.5.2.1. Estudio de la fracción soluble a pH 4.6

La Figura 39 muestra los perfiles peptídicos pertenecientes a los hidrolizados obtenidos a pH 6.5 y 5.2, este último en presencia de NaCl al 3%, a las 24 h de hidrólisis. Como es visible en los cromatogramas, la variante A se mostró más susceptible a la

proteólisis por acción de la quimosina, como indica la aparición de un número más elevado de picos, a pH 5.2 en presencia de NaCl, que a pH 6.5 libre de NaCl.

En estos hidrolizados aparecieron una serie de picos en común (A3, A6, A7, A8, A11 y A12 que corresponden a los péptidos f21-23, f157-164, f110-142, f19-23, f102-120, f143-149, f24-32, **f24-28** y **f165-199**), pero las proporciones formadas de cada péptido variaron con las condiciones iónicas utilizadas. Sólo los péptidos marcados en negrita aparecieron en mayor proporción a pH 6.5, mientras que el resto lo fue a pH 5.2.

Un número elevado de picos formados a pH 5.2 (A1, A2, A4, A5, A9 y A10 que corresponden a los péptidos f92-94, f83-91, f81-?, f33-44, f1-16, f180-199 y f165-179) no aparecieron a pH 6.5, mientras que dos picos con tiempos de retención de 25.25 y 26.93 min (identificados en los cromatogramas como X e Y, respectivamente) formados en gran cantidad a pH 6.5, no aparecieron en los hidrolizados obtenidos a pH 5.2. Estos dos picos no fueron aislados ni caracterizados.

Los patrones cromatográficos expuestos anteriormente corroboran los resultados obtenidos en PAGE-urea (apartados III.4.1, 4.2 y 4.3), mostrando claramente que la naturaleza de los productos obtenidos en la hidrólisis de la α_{s1} -Cn por acción de la quimosina son dependientes de las condiciones iónicas presentes en el medio de reacción.

III.5.2.2. Estudio de la fracción insoluble a pH 4.6

La Figura 40 muestra los electroforegramas de los hidrolizados obtenidos de la α_{s1} -Cn A por acción de la quimosina a pH 6.5 y 5.2 en presencia del 3% NaCl.

A pH 6.5 la α_{s1} -Cn A fue hidrolizada casi completamente a las 48 h, mientras que a pH 5.2 (en presencia de NaCl) desapareció a las 6 h, mostrando la influencia positiva del NaCl en la hidrólisis de esta proteína.

Los patrones electroforéticos presentados en los hidrolizados realizados a pH 5.2 fueron idénticos a los descritos en el apartado III.5.1.2. Los patrones obtenidos a pH 6.5 presentaron diferencias significativas como era de esperar. Estas diferencias se centraron básicamente en la naturaleza del PPD, observándose a pH 6.5 un PPD con una movilidad electroforética inferior al obtenido a pH 5.2. Como se describió anteriormente, la naturaleza

del PPD es dependiente fundamentalmente de las condiciones iónicas utilizadas en las hidrólisis. El PPD obtenido a pH 6.5, denominado α_{s1} -I según su movilidad electroforética relativa a la α_{s1} -Cn, se solapó parcialmente con ésta en el sistema electroforético utilizado (PAAGE). Este solapamiento entre bandas no ocurre en PAGE-urea, como se mostró anteriormente, produciéndose una separación neta entre la proteína y su producto de degradación.

A pH 6.5 se formó una serie de depósitos peptídicos de menor movilidad electroforética que la α_{s1} -Cn, como ocurrió a pH 5.2, pero en número inferior de bandas. También a este pH aparecieron diferentes bandas con movilidades electroforéticas mayores que el polipéptido α_{s1} -I en forma de 2 grupos compuestos por múltiples bandas. Quizás estas bandas correspondan a productos de degradación provenientes de la hidrólisis de α_{s1} -I.

III.5.3. Proteolisis de la α_{s1} -Cn A por acción de diferentes coagulantes

Existe una gran variedad de enzimas de origen animal con capacidad de coagular la leche, pero sin duda han sido los cuajos de animales lactantes y la pepsina bovina, los coagulantes más utilizados en la fabricación de queso.

Los cuajos preparados a partir de estómagos de mamíferos lactantes contienen una serie de enzimas cuya función principal es coagular la leche en el estómago de estos animales, incrementando así la eficiencia digestiva. Aunque estas preparaciones contienen los enzimas naturales y teóricamente óptimos para producir la coagulación de la leche de cada una de las especies, la utilización de cuajo caprino no está muy extendida, siendo el precio, superior al cuajo de ternero, el mayor inconveniente que presenta.

Hoy en día el uso de los cuajos caprinos queda restringido a las fabricaciones artesanas de queso de cabra, y sólo Francia e Italia utilizan este tipo de cuajo en algunas de sus variedades industriales (Pecorino, Provolone, etc.). En España sólo algunas variedades de queso como los de Gata-Hurdes están elaborados con cuajo natural de cabrito.

Ya que el cuajo de caprinos lactantes es el cuajo óptimo para coagular la leche de cabra sería interesante ver si los productos de hidrólisis son semejantes o no, a los producidos por la quimosina o por un cuajo de ternero.

En este trabajo se partió de soluciones de α_{s1} -Cn A (1%, p/v) a pH 5.2 añadida del 3% NaCl que fueron hidrolizadas por soluciones de quimosina (AnirenTM 600), cuajo de ternero (Granday[®] 520) y cuajo de cabrito (Grandine[®] 165) estandarizadas a igual actividad coagulante. La temperatura de incubación fue de 30°C y los períodos de incubación de 0, 0.25, 1 y 3 h.

III.5.3.1. Estudio de la fracción soluble a pH 4.6

La Figura 41 muestra los perfiles peptídicos de los hidrolizados obtenidos a partir de la α_{s1} -Cn A por acción de la quimosina, cuajo de ternero y cuajo caprino a las 3 h de hidrólisis.

El análisis cromatográfico mostró perfiles peptídicos muy similares para los diferentes coagulantes testados, aunque la cantidad relativa de cada pico varió con el coagulante utilizado. En general el cuajo de ternero y la quimosina se mostraron más proteolíticos que el cuajo caprino, produciendo los péptidos A3, A5, A7, A8, A9, A10 y A12, en mayor proporción. Los péptidos A4, A6 y A11 fueron producidos en cantidades aproximadamente iguales.

La comparación entre los cromatogramas pertenecientes a la hidrólisis realizada con quimosina y cuajo de ternero, mostró una similitud muy elevada, incluso en las proporciones de los péptidos formados.

III.5.3.2. Estudio de la fracción insoluble a pH 4.6

La Figura 42 muestra los electroforegramas obtenidos en la hidrólisis de la α_{s1} -Cn A por acción de la quimosina, cuajo de ternero y cuajo caprino a pH 5.2 en presencia del 3% NaCl, durante diferentes períodos de incubación.

Los patrones electroforéticos obtenidos a partir de los diferentes hidrolizados presentaron características casi idénticas para los 3 tipos de coagulantes utilizados. La α_{s1} -Cn A fue degradada progresivamente en los diferentes estadios de incubación, permaneciendo

sin hidrolizar cantidades pequeñas de esta proteína a las 3 h de hidrólisis, sobre todo en los hidrolizados donde se utilizó el cuajo caprino como agente proteolítico. El PPD formado fue idéntico para los tres tipos de coagulantes, tipo α_{s1} -II como corresponde a las condiciones iónicas utilizadas.

Estos resultados demuestran que la utilización de cuajo de cualquiera de las dos especies mencionada no debería afectar a la calidad del queso obtenido por cuanto respecta a la hidrólisis durante la maduración.

III.5. HIDROLISIS DE LA CASEINA CAPRINA POR LOS ENZIMAS DEL CUAJO

En el transcurso de los estudios realizados en nuestros laboratorios sobre la proteólisis durante el madurado de queso de leche de cabra nos hemos encontrado con diferentes resultados a nivel de degradación de las caseínas α_s y β . Ya que estas proteínas pueden ser hidrolizadas por los enzimas del cuajo, como hemos mostrado anteriormente, parece ser que las condiciones del madurado del queso determina principalmente las diferencias en proteólisis. Las condiciones fisicoquímicas de madurado que más influyen la proteólisis son el pH, el contenido en NaCl y la humedad.

El objetivo del siguiente trabajo trata de obtener información, mediante un sistema modelo como es la caseína entera, que nos pueda ayudar a dilucidar las diferencias de proteólisis encontradas en el queso entre las fracciones caseínicas. Para ello centraremos el trabajo en la influencia del pH, NaCl y concentración de cuajo en la hidrólisis de la caseína caprina por acción del cuajo utilizando diferentes métodos electroforéticos como métodos analíticos en la detección de la proteólisis.

III.5.1. Hidrólisis de la caseína caprina por el cuajo. Efecto del pH

La Figura 43 ilustra la acción proteolítica del cuajo sobre la caseína entera caprina a diferentes pH.

A 1 h de hidrólisis (Figura 43, A) el patrón electroforético fue casi idéntico a la caseína control para el intervalo de pH estudiado. Los cambios observados más significativos fueron los siguientes:

1. Apareció una banda de muy corto recorrido electroforético que corresponde a la $\text{para}\kappa\text{-Cn}$.
2. Con una movilidad ligeramente mayor que la $\beta\text{-Cn}$ aparecieron varios péptidos de características semejantes al $\beta\text{-I}$ descrito en la hidrólisis de la $\beta\text{-Cn}$ por el cuajo, y que se formó en todo el intervalo de pH estudiado, aunque de forma más pronunciada a $\text{pH} \geq 5.4$, dándose un mínimo de formación a $\text{pH} 4.6\text{-}5.0$.
3. Con movilidades superiores a la presentada por el complejo caseínico α_s aparecieron una serie de péptidos que corresponden al producto de hidrólisis primario de la $\alpha_{s1}\text{-Cn}$ (PPD).

A las 2 h de hidrólisis el patrón electroforético varió poco, consistiendo la diferencia principalmente en una intensificación de las bandas pertenecientes a los productos de hidrólisis. Las medidas densitométricas muestran un mínimo de hidrólisis de la $\beta\text{-Cn}$ a $\text{pH} 4.6$ y un máximo de formación del polipéptido $\beta\text{-I}$ a $\text{pH} 5.8$. El PPD tuvo una formación más intensa a pH extremos (3.8 y 6.6).

A las 4 h de hidrólisis el patrón electroforético fue aún más acentuado apareciendo nuevos productos de proteolisis. Uno de ellos tuvo una movilidad electroforética idéntica al polipéptido $\beta\text{-II}$, y se situó de forma solapada a las bandas más rápidas del complejo caseínico α_s (Figura 43 B, carrera 2) donde tiene su formación máxima, perfectamente visible a $\text{pH} 3.8$. De igual manera aparecieron dos bandas con movilidades coincidentes con las bandas más lentas del PPD, sobre todo evidentes a $\text{pH} \geq 5.4$ que corresponden también a un producto de degradación de la $\beta\text{-Cn}$, el polipéptido $\beta\text{-III}$. También aparecieron, pero de forma muy débil, otros productos de hidrólisis con movilidades electroforéticas superiores al PPD, tenuemente visible a $\text{pH} \leq 5.0$. Estos péptidos corresponden a los productos $\beta\text{-IV}$ y $\beta\text{-V}$ como veremos más adelante de forma más clara. Los diferentes solapamientos entre productos de proteolisis y caseínas intactas hacen que las lecturas densitométricas sean difíciles de realizar y den resultados contradictorios como por ejemplo un aumento en la fracción α_s en el transcurso del tiempo de hidrólisis. La fracción $\text{para}\kappa\text{-Cn}$ permaneció intacta mostrando una gran resistencia a la acción proteolítica del cuajo, al igual que la $\alpha_{s2}\text{-Cn}$.

A las 6 h de hidrólisis no se produjeron grandes cambios, acentuándose los productos nuevos de hidrólisis antes nombrados.

A las 15 h (Figura 43, C) se incrementó la formación del polipéptido β -II, visible ahora en todo el intervalo de pH estudiado mostrando igual movilidad que las bandas más rápidas de las caseínas α_s . También se hicieron más evidentes los péptidos β -IV y β -V, perfectamente visibles a $\text{pH} \leq 5.0$. A este tiempo de incubación se produjo un cambio en la intensidad de las bandas pertenecientes a la α_{s2} -Cn con la aparición simultánea de diferentes bandas de bajas movilidades electroforéticas, visibles a $\text{pH} \leq 4.6$ en la región de las γ -Cn y próximas a la $\text{para}\kappa$ -Cn.

A las 30 h (Figura 43, D) se acentuaron las bandas correspondientes a los productos de degradación β -II, β -III, β -IV y β -V y se produjo una disminución drástica en las bandas correspondientes a la α_{s2} -Cn.

A las 48 h de hidrólisis (Figura 43, E) aún se detectaron restos de β -Cn intacta, mostrando que esta proteína tiene una susceptibilidad menor a la proteólisis en el sistema caseínico completo que en soluciones de proteína aislada, donde es totalmente hidrolizada aproximadamente a las 15 h a $\text{pH} \geq 5.4$, resultados que concuerdan con los obtenidos por Fox y Guiney (1973) para la caseína bovina. De igual manera, la α_{s1} -Cn es más susceptible a la proteólisis por acción del cuajo en solución que en este sistema caseínico, así como más susceptible a la proteólisis que la β -Cn en la hidrólisis de la caseína caprina entera. Un cambio observable en este período de hidrólisis consistió en la disminución en intensidad de la banda correspondiente a la $\text{para}\kappa$ -Cn, evidente a pH muy ácidos. Este resultado muestra que los enzimas del cuajo, además de presentar una gran actividad proteolítica de naturaleza muy específica sobre la κ -Cn, son capaces de hidrolizar la $\text{para}\kappa$ -Cn. Sanogo y col. (1987) describieron resultados similares para el péptido bovino a pH 5.0 en presencia del 5% NaCl. Diferentes autores describen una gran resistencia a la hidrólisis de la $\text{para}\kappa$ -Cn en el queso (Green y Foster, 1974), sin embargo trabajos recientes han dado a conocer que este péptido puede ser degradado posteriormente en el transcurso del madurado (Calvo y col., 1992). Quizás las diferencias en los resultados se deban a las técnicas de análisis utilizadas, mucho más resolutivas en el último caso. Shammet y col. (1992a) estudiaron la actividad proteolítica de algunos enzimas coagulantes al actuar sobre la κ -Cn de forma aislada observando que estos enzimas hidrolizaban la proteína de forma diferente y que el péptido $\text{para}\kappa$ -Cn podía ser proteolizado en el transcurso de la hidrólisis.

También en este período de incubación se produjo una intensificación de las bandas cercanas a la $\text{para}\kappa\text{-Cn}$, procedentes de la hidrólisis de la $\alpha_{s2}\text{-Cn}$.

A las 72 h (Figura 43, F) la $\beta\text{-Cn}$ desapareció por completo y el patrón electroforético obtenido tras este período de incubación fue semejante al presentado en la hidrólisis *in vitro* de la $\beta\text{-Cn}$ aislada por acción del cuajo. La $\alpha_{s2}\text{-Cn}$ también desapareció por completo con la producción de diferentes productos de hidrólisis con movilidades menores a la $\beta\text{-Cn}$. Los péptidos $\beta\text{-I}$ fueron degradados casi completamente a $\text{pH} \leq 5.0$, mientras que a $\text{pH} \geq 5.4$ se observaron cantidades apreciables de este producto de hidrólisis. Los péptidos $\beta\text{-II}$ fueron los productos que se formaron en mayor proporción y no hubo cambios perceptibles para los péptidos $\beta\text{-III}$, $\beta\text{-IV}$ y $\beta\text{-V}$.

La Figura 44 muestra los diagramas densitométricos correspondientes a los electroforegramas obtenidos mediante PAGE-urea, de la caseína caprina entera y tratada con cuajo en los períodos de incubación de 6 y 72 h a $\text{pH} 5.4$.

La Figura 45 muestra el análisis en PAGE-SDS de la fracción insoluble a $\text{pH} 4.6$ de los hidrolizados obtenidos a $\text{pH} 5.4$ a partir de la caseína caprina entera durante los diferentes períodos de incubación por acción del cuajo. Los productos de hidrólisis caracterizados en este análisis tuvieron M_r (Da) de 22900-9800. Destacaron por su intensidad 3 bandas, dos de las cuales presentaron M_r de 22900 y 21600, M_r equivalentes a los presentados por los péptidos $\beta\text{-I}$ y $\beta\text{-II}$. Otros péptidos tuvieron M_r de 20700, 17300, 14500, 12600, 10900 y 9800. Los péptidos con M_r 20700, 17300 y 12600 podrían corresponder a $\beta\text{-III}$, $\beta\text{-IV}$ y $\beta\text{-V}$. El péptido con M_r de 14500 fue la tercera banda de alta intensidad y correspondió a la $\text{para}\kappa\text{-Cn}$, con M_r similar al calculado para su estructura primaria. El resto de péptidos quizás procedan de la hidrólisis de las caseínas α_s .

Como puede apreciarse en los electroforegramas, la $\alpha_{s1}\text{-Cn}$ desapareció rápidamente, y a las 4 h sólo quedaron restos de esta proteína. En cambio la $\alpha_{s2}\text{-Cn}$ se degradó muy lentamente quedando trazas a las 72 h. También fue más lenta la degradación de la $\beta\text{-Cn}$, casi completamente hidrolizada a las 48 h. Igualmente se observó la resistencia a la hidrólisis de la $\text{para}\kappa\text{-Cn}$, muy estable durante las primeras 15 h, para después disminuir de intensidad progresivamente hasta las 72 h donde sólo quedaron trazas de ella. En resumen el orden de susceptibilidad a la proteólisis de los diferentes componentes caseínicos por acción del cuajo al hidrolizar la caseína completa caprina fue: $\alpha_{s1} > \beta > \alpha_{s2} > \text{para}\kappa\text{-Cn}$.

Paralelamente se realizaron diferentes ensayos de hidrólisis de la caseína caprina a temperaturas de incubación de 7 y 15°C, simulando las temperaturas de refrigeración y madurado del queso obteniéndose iguales productos proteolíticos. A ambas temperaturas se produjo un enlentecimiento de la reacción enzimática debido al descenso de la temperatura, teniéndose que alargar los períodos de incubación hasta 5 días para obtenerse de forma visible todos los productos de hidrólisis antes descritos (resultados no mostrados).

III.5.2. Hidrólisis de la caseína bovina por el cuajo y comparación con la caprina

En la Figura 46 se muestran los electroforegramas obtenidos a partir de los hidrolizados procedentes de la caseína bovina realizados en iguales condiciones hidrolíticas que la caseína caprina, a las 15 h de incubación. En ellos se pueden identificar de menor a mayor movilidad electroforética la β -Cn residual, el péptido β -I, β -II, la α_{s1} -Cn residual y los péptidos β -III y α_{s1} -I. Los péptidos β -I y β -II aparecieron de forma más o menos intensa a lo largo de todo el intervalo de pH, mientras que β -III sólo fue visible a $\text{pH} \geq 5.4$. Es interesante apreciar que en este tiempo de incubación permanecieron sin hidrolizar cantidades significativas de α_{s1} -Cn, así como del péptido α_{s1} -I, mostrando que en iguales condiciones proteolíticas, tanto la α_{s1} -Cn y el PPD caprinos son más susceptibles a la hidrólisis que sus homólogos bovinos.

III.5.3. Efecto del NaCl en la proteólisis de la caseína caprina por el cuajo

La Figura 47 muestra los electroforegramas obtenidos a partir de los hidrolizados de 15 h, realizados sobre soluciones de caseína caprina a pH 5.4 por el cuajo adicionadas de concentraciones crecientes de NaCl (0, 0.5, 1, 2.5, 5, 10 y 15%).

En el electroforegrama correspondiente a la hidrólisis realizada en ausencia de NaCl (carrera 2) aparecieron los productos típicos de degradación procedentes de la β -Cn (β -I a β -III). A medida que la concentración de NaCl fue incrementado, estos productos de hidrólisis se formaron en menor cantidad, debido al efecto inhibitorio del NaCl en la

proteólisis de la β -Cn. Se produjo una disminución acusada en la proteólisis de la β -Cn a concentraciones de NaCl del 5%, visible del electroforegrama correspondiente (carrera 6) por la disminución en la formación de β -I. Estos datos concuerdan con los obtenidos en la hidrólisis *in vitro* de la β -Cn por la acción del cuajo (apartado III.3.4.) y con los obtenidos por Fox y Walley (1971) y Sanogo y col. (1987) en la hidrólisis de la caseína bovina en estas condiciones iónicas.

La α_{s1} -Cn se hidrolizó por completo en el tiempo de incubación realizado (15 h), mostrando su mayor sensibilidad a la hidrólisis incluso a concentraciones del 15% NaCl.

Las bandas electroforéticas situadas entre los péptidos β -I y β -II corresponderían a la α_{s2} -Cn residual.

Otro dato interesante que cabe destacar es la disminución de la banda correspondiente a la $\text{para}\kappa$ -Cn a concentraciones de NaCl $\geq 10\%$, sugiriendo que el NaCl a altas concentraciones podría estimular la proteólisis de este péptido.

III.5.4. Efecto de la concentración de cuajo en la proteólisis de la caseína caprina

En estas experiencias se ensayaron 2 concentraciones diferentes de cuajo, una equivalente a la cantidad de enzima añadida a la leche en la producción de queso (20 mL/100 L leche), y la segunda que simula una retención enzimática en la matriz proteica del queso del 6% (Fox, 1988).

Se partió de soluciones proteicas de caseína completa (2.5%, p/v) que se trataron con cuajo de ternero a concentraciones de 2×10^{-2} UC/mL y 1.2×10^3 UC/mL, se ajustaron a diferentes pH y fueron incubadas a 30°C durante 15 h.

Cuando la caseína fue tratada con una concentración equivalente a la añadida a la leche de producción de queso (Figura 48), los péptidos β -I aparecieron en todo el intervalo de pH y de forma más intensa a $\text{pH} \geq 5.4$. La fracción caseínica α_s pareció permanecer casi intacta a las 15 h de hidrólisis, sin embargo los electroforegramas muestran más intensidad en las 2 bandas más rápidas de la fracción α_s , que podrían corresponder a β -II que junto a la α_{s2} -Cn dan un patrón electroforético muy semejante al complejo caseínico α_s . La α_{s1} -Cn, en las condiciones empleadas no se hidrolizó totalmente como mostró el análisis realizado

en PAGE-SDS (resultado no mostrado). El PPD no fue visible ya que a las concentraciones de cuajo utilizadas, éste se formaría en pequeñas cantidades y sería posteriormente hidrolizado en otros componentes de menor tamaño, no resueltos en este sistema electroforético.

La caseína tratada con una concentración de cuajo equivalente a una retención del 6% en la matriz proteica del queso, no tuvo grandes cambios aparentes como muestra los electroforegramas de la Figura 48. Los péptidos β -I aparecieron netamente visibles a $\text{pH} \geq 5.4$. De igual manera que en el caso anterior, β -II podría formarse y situarse de forma coincidente con el complejo caseínico α_s , pero de forma más débil ya que la cantidad de cuajo utilizada fue mucho menor.

III.6. HIDROLISIS DE LA CASEINA CAPRINA CONTENIENDO DIFERENTES VARIANTES GENÉTICAS DE α_{s1} -Cn POR LOS ENZIMAS DEL CUAJO

III.6.1. Estudio electroforético de la caseína caprina con diferentes variantes genéticas de α_{s1} -Cn

En la Figura 49 se muestran los electroforegramas obtenidos por PAGE-urea de la caseína entera caprina de diferentes individuos presentando genotipos distintos de α_{s1} -Cn (BB, BE, BF, B0, EE, EF, E0 y FF). La Tabla 14 presenta la tasa de síntesis y frecuencias alélicas encontradas en la Granja Experimental de la *Facultat de Veterinària* (UAB).

Las muestras que contuvieron una cantidad alta en α_{s1} -Cn, mostraron 2 bandas intensas y una banda más débil (la más rápida de todas) en la zona electroforética descrita para esta proteína, con pequeñas diferencias en intensidad óptica dependiendo de la combinación de alelos. Las muestras con menos cantidad de α_{s1} -Cn presentaron bandas menos intensas y en un número variable debido al efecto de los alelos F y 0 (Figura 49, carreras 6-9).

Los electroforegramas también mostraron que hubo una variación, relacionada con las variantes de la α_{s1} -Cn, de la cantidad de otras fracciones caseínicas. En general se observa que al bajar el contenido en α_{s1} -Cn, la zona electroforética de la β -Cn se incrementa

así como la de la α_{s2} -Cn. La caseína entera que contuvo la variante genética BB de la α_{s1} -Cn (carrera 2) presentó una intensidad menor en las bandas pertenecientes a la α_{s2} -Cn. La caseína entera que contuvo la variante genética FF de la α_{s1} -Cn (carrera 9) presentó una zona electroforética a nivel de la β -Cn muy engrosada así como en las bandas correspondientes a la α_{s2} -Cn. El engrosamiento de la zona de la β -Cn puede ser debido en parte a un aumento en el componente principal de la κ -Cn, coincidente en parte con la β_2 . Estos datos concuerdan con los de Law y Tziboula (1992).

Como se describió anteriormente (apartado III.5.1.2.) la α_{s1} -Cn F presenta una movilidad electroforética entre las caseínas κ y α_{s2} , y muy diferente a la presentada por la variante A. Esto podría explicar el patrón electroforético de la muestra de la caseína con los alelos EF (carrera 7), que aún presentando una concentración teórica superior en α_{s1} -Cn que la muestra con los alelos E0, tuvo una zona electroforética α_s de menor intensidad.

III.6.2. Hidrólisis de la caseína caprina con diferentes alelos para la α_{s1} -Cn por acción del cuajo

En la Figura 50 se muestran los electroforegramas de caseínas presentando diferentes variantes genéticas de caseínas α_{s1} hidrolizadas por los enzimas del cuajo a pH 6.6 durante 0.5, 4 y 15 h.

A los 30 min de hidrólisis β -I ya fue evidente, sobre todo en las variantes genéticas con menor contenido en α_{s1} -Cn (Figura 50, A). Las diferentes fracciones α_{s1} fueron disminuyendo en intensidad debido a la hidrólisis enzimática, mientras que la α_{s2} -Cn permaneció evidente y poco degradada.

A las 4 h de hidrólisis (Figura 50, B) β -I incrementó en intensidad y se evidenciaron productos de degradación con mayor movilidad electroforética que la α_{s1} -Cn. Estos productos de degradación correspondieron al PPD y sólo fueron observables en las variedades genéticas de α_{s1} -Cn con mayor contenido en proteína. La α_{s2} -Cn continuó casi sin hidrolizarse.

A las 15 h (Figura 50, C) el patrón electroforético de degradación fue muy parecido al que presenta la β -Cn aislada hidrolizada por el cuajo, con la formación de los compuestos de hidrólisis β -I a β -IV y la degradación casi total de esta proteína. Los péptidos β -I y β -II

se formaron en mayor proporción en las variantes con mayor cantidad de α_{s1} -Cn. La α_{s1} -Cn desapareció por completo, así como sus compuestos de degradación primarios, y la α_{s2} -Cn permaneció casi sin hidrolizar.

En este momento se están realizando en nuestro laboratorio estudios más profundos sobre la hidrólisis por los enzimas del cuajo de las caseínas que contienen las variante genéticas AA, EE y FF de la α_{s1} -Cn.

III.7. HIDROLISIS DE LA α_{s2} -CN POR LOS ENZIMAS DEL CUAJO

La Figura 51 muestra los electroforegramas obtenidos en la hidrólisis de la α_{s2} -Cn por acción de los enzimas del cuajo (0.1 UC/mL) a 30°C y pH 6.2 durante períodos de tiempos de 0, 0.5, 1, 2, 4 y 6 h.

La α_{s2} -Cn obtenida en la purificación de la α_{s1} -Cn a través de la columna preparativa en RP y un equipo FPLC, apareció en PAGE-urea como 4 bandas situadas en la zona del complejo caseínico α_s caprino, y una serie de bandas de menor recorrido que corresponderían a diferentes productos contaminantes no identificados.

La serie de bandas observadas en la zona electroforética de la fracción α_s consistiría en una misma proteína con niveles de fosforilación diferente, al igual que ocurre en la caseína bovina (Eigel y col., 1984). En este caso como se observa en los electroforegramas, las bandas más rápidas se solaparían con las más lentas de la α_{s1} -Cn.

Durante los períodos de hidrólisis, la α_{s2} -Cn fue degradada progresivamente por los enzimas del cuajo, formándose una serie de productos de hidrólisis que tuvieron movilidades electroforéticas inferiores (primer grupo), similares (segundo grupo) y superiores (tercer grupo) a la proteína intacta. El primer grupo consistió aproximadamente en 3-4 bandas que se situaron en la zona electroforética de los componentes γ . El tercer grupo contuvo no menos de 8 bandas de gran intensidad óptica. Por último el segundo grupo correspondió a 2-3 bandas coincidentes con algunos componentes de la α_{s2} -Cn. El número elevado de bandas electroforéticas indica que la proteína es escindida en el centro de la molécula dando numerosos péptidos.

En el último período de incubación (6 h) aún hubo restos de α_{s2} -Cn sin hidrolizar, lo que demuestra que aunque esta proteína es degradada por los enzimas del cuajo es mucho menos sensible que la α_{s1} -Cn. McSweeney y col. (1994a) obtuvieron resultados similares para su homóloga bovina.

CAPITULO IV

IV.1. HIDROLISIS DE LA β -Cn CAPRINA POR ACCION DE LA PLASMINA Y COMPARACION DE LOS PRODUCTOS DE DEGRADACION CON SU HOMOLOGA BOVINA

La plasmina principal proteasa endógena de la leche puede afectar las propiedades de la leche y de diferentes productos lácteos durante su almacenamiento (Miranda y Gripon, 1986; Grufferty y Fox, 1988b), y tiene una función importante durante el madurado de diferentes variedades de quesos (Ollikainen y Kivelä, 1989; Farkye y Fox, 1991, 1992; Farkye y Landkammer, 1992).

Los productos de degradación producidos a partir de las caseínas bovinas han sido caracterizados en diferentes estudios. Las β y α_{s2} -Cn son hidrolizadas rápidamente por la plasmina (Snoeren y Van Riel, 1979), la α_{s1} -Cn es hidrolizada, pero más lentamente, y la κ -Cn y las proteínas del suero se muestran resistentes al ataque proteolítico de este enzima (Eigel, 1977a).

La hidrólisis de la β -Cn por acción de la plasmina produce inicialmente las γ -Cn (Kaminogawa y Yamauchi, 1972; Eigel y col., 1979; Snoeren y van Riel, 1979) y algunos de los componentes de la fracción proteosa peptona (Andrews, 1978a, b; Eigel y Keenan, 1979; Andrews y Alichanidis, 1983). Las γ -Cn se componen de las γ_1 , γ_2 y γ_3 -Cn que corresponden a los fragmentos β -Cn (f29-209), β (f106-209) y β (f108-209), respectivamente (Gordon y col., 1972; Groves y col., 1972; Eigel, 1977b). Los fragmentos complementarios β -Cn (f1-28), β (1-105/107) y β (f29-105/107) han sido también aislados en la especie bovina, identificándose algunos de ellos con componentes de la fracción proteosa peptona (PP).

También se ha descrito, aislado y caracterizado una proteasa alcalina de las mismas características que la plasmina bovina en la leche de cabra (Varshey y Mathur, 1979).

El objetivo principal perseguido en este trabajo fue caracterizar los diferentes fragmentos obtenidos a partir de la β -Cn caprina por la acción de la plasmina bovina por medio de diferentes sistemas electroforéticos, y comparar estos fragmentos de hidrólisis a los obtenidos a partir de su homóloga bovina. De igual forma se estudiaron los productos de proteolisis procedentes de la hidrólisis de la caseína caprina completa por acción de la plasmina bovina y caprina.

IV.1.1. Hidrólisis de la β -Cn caprina por la plasmina

Para la realización de este estudio se utilizó la plasmina bovina porque es comercialmente asequible, al contrario que la caprina, y los trabajos publicados por Schaller y Rickly (1988) indican una gran similitud entre la estructura y los dominios funcionales de los enzimas de estas dos especies.

En la Figura 52 se muestra el resultado de la hidrólisis de la β -Cn por la plasmina. El análisis electroforético en PAGE-urea revela la presencia de tres bandas principales (A, B, C) y una banda de débil intensidad (D) todas ellas de movilidad electroforética inferior que la β -Cn. También se evidencian otras bandas (E) pero con movilidades electroforéticas superiores a la presentada por la β -Cn. Estas últimas aparecieron en forma de 2 grupos, uno de muy baja intensidad óptica (4 bandas en forma de dobletes) con una movilidad inmediata a la que presenta la β -Cn y otro (no menos de 7) de alta intensidad y mayor recorrido.

Este patrón electroforético sugiere la producción, a partir de la β -Cn caprina, de componentes parecidos u homólogos a las γ -Cn y fragmentos N-terminales complementarios producidos por la acción de la plasmina sobre la β -Cn bovina.

La Figura 53 muestra las secuencias de las β -Cn caprina y bovina. La homología entre estas dos proteínas es muy alta (>90%) con secuencias aminoacídicas similares en las regiones descritas como susceptibles al ataque proteolítico de la plasmina.

Las bandas correspondientes a la β -Cn fueron desapareciendo a medida que transcurrió el tiempo de incubación y progresivamente fueron apareciendo los productos A, B, C, D y E. Los componentes A y B fueron incrementando de intensidad a medida que avanzó el tiempo de incubación, en cambio C y D incrementaron de intensidad para luego disminuir progresivamente. El componente D se formó en muy pequeña cantidad y aproximadamente a los 120 min desapareció por completo. La β -Cn desapareció paralelamente a la formación de estos compuestos quedando solamente trazas a los 90 min. Igual ocurrió para los productos proteolíticos de mayor movilidad electroforética (componentes E), que incrementaron su intensidad (máxima a los 60 min) para después ir desapareciendo, indicando que son productos sensibles a ser hidrolizados de nuevo, igual que ocurre con los componentes C y D.

Estos productos de degradación también fueron visibles en la caseína entera de cabra cuando se trató con plasmina como muestra la Figura 54. Los componentes A y B se produjeron en mayor cantidad que los componentes C y D. Dentro de la caseína entera, la β -Cn se hidrolizó a lo largo de los períodos sucesivos de incubación, siendo a los 90 min donde se observó un cambio drástico, apareciendo pequeñas cantidades en el último período de incubación (150 min). Igual ocurrió con el complejo caseínico α_s , siendo la α_{s2} -Cn la fracción que se hidrolizó más rápidamente en comparación a la α_{s1} -Cn. Al final de la incubación el complejo caseínico α_s fue casi completamente hidrolizado al igual que la β -Cn. La κ -Cn se mostró bastante resistente al ataque de la plasmina durante los diferentes períodos de incubación, como se pudo apreciar en los electroforegramas PAGE-SDS (Figura 55). Estos resultados permiten establecer el perfil de degradación para las caseínas caprinas al ser hidrolizadas por la plasmina en el siguiente orden; $\beta \approx \alpha_s > \kappa$. Estos resultados se asemejan bastante a los encontrados en la especie bovina y contradicen los obtenidos por Varshey y Mathur (1979) para la especie caprina. Estos autores proponen el siguiente perfil: $\kappa > \alpha_s > \beta$.

IV.1.2. Comparación de la acción de la plasmina sobre las caseínas caprinas y bovinas

Con el objeto de caracterizar y profundizar más en el estudio de estos componentes, se hidrolizaron y compararon los productos de hidrólisis producidos a partir de la caseína entera y la β -Cn bovinas mediante diversos métodos electroforéticos.

En la Figura 56 se muestran los patrones electroforéticos (PAGE-urea) de los productos de degradación obtenidos a partir de la caseína bovina entera por acción de la plasmina. Se observaron numerosas bandas de las cuales se pudieron identificar las pertenecientes a las β -Cn, α_{s1} , α_{s2} , γ_1 , γ_2 y γ_3 . Aunque el Comité de la *American Dairy Science Association* (Eigel y col., 1984) propone la nomenclatura de β X-1P (f29-209), β X (f106-209), β X (f108-209), β X-5P (f1-105/107), β X-1P (f29-105/107) y β X-4P (f1-28), donde X designa la variante genética de β -Cn y P el número de residuos fosfato del fragmento, para designar los componentes γ_1 , γ_2 , γ_3 , PP5, PP8 lento y PP8 rápido bovinos, respectivamente, se seguirá utilizando la terminología con letras griegas para una abreviada y rápida identificación.

Las bandas que aparecen con un mayor recorrido electroforético (Figura 56, carreras 1 y 10) pertenecen al inhibidor trípico de la soja (SBTI), añadido a la muestra control que se sometió a iguales condiciones de hidrólisis que la muestra con período de incubación más largo (150 min). Como puede observarse en el electroforegrama, la plasmina fue inhibida pero no de forma total, dada la presencia de productos de degradación, indicando que este inhibidor de las serínproteasas no inhibe eficazmente la actividad de la plasmina. Estos resultados concuerdan con los de De Rham y Andrews (1982) y Rollema y col. (1981). Otro inconveniente que se presenta al utilizar este inhibidor es su inclusión en los electroforegramas con una posible perturbación en la interpretación de los resultados. Por ello se decidió utilizar en algunas ocasiones otro inhibidor, la 3,4-dicloroisocumarina (DCI), potente inhibidor de la plasmina humana (Harper y col., 1985), y de mejor manejo que otros como el di-isopropil-fluorofosfato, altamente tóxico. Los resultados obtenidos en los ensayos realizados demuestran que la 3,4-DCI es un inhibidor extremadamente eficaz que además no deja traza alguna en los geles electroforéticos.

Los electroforegramas de la Figura 56 dan a conocer una hidrólisis progresiva de las caseínas con la aparición simultánea de diferentes productos de degradación. La α_{s2} -Cn fue rápidamente hidrolizada por la plasmina. La β -Cn también fue hidrolizada quedando sólo restos de esta proteína al final de la incubación (150 min). Paralelamente a esta hidrólisis se produjo un aumento en las γ -Cn. En PAGE-urea la γ_1 -Cn tuvo una movilidad intermedia entre γ_2 y γ_3 . La identidad de estas bandas es bien conocida, sin embargo el orden en que migran (γ_3 , γ_1 y γ_2) ha sido con frecuencia mal interpretado como muestran McSweeney y col. (1994b).

La α_{s1} -Cn también fue disminuyendo en intensidad confirmando que, aunque no es un sustrato preferido de la plasmina, también es susceptible de hidrólisis (Le Bars y Gripon, 1993; McSweeney y col., 1993c). Hay que hacer especial atención en el hecho de que en idénticas condiciones proteolíticas, la fracción caseínica α_{s1} caprina (Figura 54) es hidrolizada por la plasmina con más intensidad que su homóloga bovina, en períodos de tiempo iguales, indicando una mayor sensibilidad a la hidrólisis.

Por último la κ -Cn, en las condiciones hidrolíticas ensayadas y durante los períodos de incubación realizados, se mostró poco sensible al ataque proteolítico de la plasmina como muestran los electroforegramas en PAGE-SDS (Figura 57), resultados que concuerdan con

los obtenidos por Chen y Ledford (1971) y Eigel (1977a).

Con una movilidad electroforética intermedia entre las β y α_{s2} -Cn aparecieron dos bandas que corresponderían a los fragmentos β -Cn 1P (f29-105/107). Otros productos de degradación con un recorrido mayor que la α_{s1} -Cn corresponderían a los fragmentos β -Cn 5P (f1-105/107) así como a diferentes productos provenientes de la hidrólisis de la α_{s1} -Cn.

La hidrólisis de la β -Cn bovina por la plasmina (Figura 58) dio un número de bandas identificadas como la β -Cn residual y las γ_1 , γ_2 y γ_3 -Cn. Las bandas con mayor movilidad electroforética corresponden a los fragmentos N-terminales de la β -Cn antes-nombrados.

Los electroforegramas de las Figuras 56 y 58 muestran la existencia de bandas situadas en la zona electroforética de las γ -Cn (señaladas con flechas discontinuas) no identificadas hasta el momento. Su formación puede ser explicada considerando 2 posibilidades:

1. Resultados obtenidos por diferentes autores (Pahkala y col., 1989; Visser y col., 1989; Papoff y col., 1995) muestran la existencia de otros puntos de hidrólisis tipo Lys-X, en medio de la molécula de la β -Cn bovina, que son también sensibles a la hidrólisis por la plasmina. Trieu-Cuot y Gripon (1981), estudiando por electroforesis bidimensional los patrones electroforéticos de las γ -Cn, obtenidas a partir de un hidrolizado de la β -Cn bovina producido por la plasmina, identificaron dos bandas menores con valores de pH isoelectrico superiores a la γ_2 -Cn, asignando el nombre de γ_m a uno de ellos. En nuestro sistema electroforético (PAGE-urea) se observaron 2 bandas de menor intensidad que las γ -Cn. Una de ellas tuvo una movilidad electroforética menor que la γ_2 -Cn, identificada como γ_x , y la otra se situó entre las bandas correspondientes a las γ_2 y γ_1 -Cn (identificada como γ_y).

2. Su presencia podría ser también explicada por el polimorfismo genético de la β -Cn bovina. El patrón electroforético que presenta esta proteína en nuestro gel muestra dos bandas de diferente intensidad óptica, perteneciendo cada banda a una variante genética diferente (variantes A y B, tal y como se describe en el electroforegrama correspondiente). La Tabla 15 resume las substituciones aminoacídicas en las variantes genéticas A y B de esta proteína. Teniendo en cuenta estas substituciones podríamos obtener diferentes fragmentos peptídicos para la γ_1 -Cn en todas las variantes genéticas, fragmentos peptídicos del componente γ_2 en las variantes A³ y B diferentes al resto, y un fragmento peptídico para el componente γ_3 de la variante B que se diferenciaría de sus homólogos. El hecho de que estos fragmentos de

talla idéntica contengan diferentes substituciones puntuales, podría alterar su movilidad electroforética dando la formación de nuevas bandas de débil intensidad en la zona de las γ -Cn.

La Figura 59 compara, mediante PAGE-urea, los componentes A, B, C, D y E caprinos, las γ -Cn y los fragmentos complementarios N-terminales obtenidos por hidrólisis de las β -Cn caprina y bovina, respectivamente.

Los componentes A, B y C caprinos mostraron movilidades electroforéticas similares a las presentadas por γ_x , γ_2 y γ_y , respectivamente. El componente D presentó una movilidad electroforética intermedia entre γ_x y γ_3 . Los componentes E presentaron en conjunto una movilidad electroforética similar a los componentes N-terminales bovinos, pero un patrón electroforético más complicado.

IV.1.3. Electroforesis bidimensional de los hidrolizados obtenidos de las β -Cn caprina y bovina por acción de la plasmina

Las Figuras 60 y 61 muestran el mapa electroforético en geles obtenidos por electroforesis bidimensional de los hidrolizados realizados sobre las β -Cn caprina y bovina, respectivamente.

Los resultados obtenidos muestran que los componentes A, B, C y D caprinos producidos por hidrólisis de la β -Cn por la acción de la plasmina presentaron una gran semejanza con los productos obtenidos en los hidrolizados a partir de su homóloga bovina.

La hidrólisis de la β -Cn bovina dio diferentes depósitos de material peptídico donde se pudo identificar:

1. La β -Cn residual, las γ_1 , γ_2 y γ_3 -Cn, según su posición proveniente de la primera dimensión y peso molecular calculado directamente. El M_r (Da) calculado para la γ_1 -Cn fue de 20600 y de 9600 para γ_2 y γ_3 (igual peso molecular ya que se diferencian en sólo dos aminoácidos). Estos resultados coinciden con los obtenidos por Trieu-Cuot y Gripon (1981) y Trieu-Cuot y Addeo (1981).
2. Los productos con mayor movilidad electroforética en PAGE-urea (primera dimensión), correspondientes a diferentes fragmentos N-terminales complementarios a las γ -Cn,

presentaron un M_r que varió entre 12000 y 12600. Otros componentes que aparecieron cerca de la β -Cn podrían corresponder a las partes complementarias de los componentes γ_x y γ_y , o también a productos contaminantes de la caseína de partida, ya que la casa comercial cita un 90% de pureza electroforética para esta proteína.

3. Los productos γ_x y γ_y fueron identificados por su posición relativa, en PAGE-urea (primera dimensión), con respecto al resto de componentes γ , y mostraron M_r similares a γ_2 - γ_3 y γ_1 , respectivamente. El componente γ_x presentó un M_r de 10000, algo superior que γ_2 y γ_3 , y el componente γ_y tuvo un M_r de 19600, M_r un poco inferior al presentado por γ_1 .

El patrón electroforético bidimensional del hidrolizado caprino (Figura 60, B) fue, en comparación al bovino, esencialmente el mismo, presentando las siguientes características:

1. Los componentes A y B tuvieron la misma localización en el gel que las γ_2 y γ_3 -Cn y así también casi idénticos M_r de 9200. Estos componentes podrían corresponder a los fragmentos β (f106-207) y β (f108-207).

2. El componente C tuvo una localización similar a γ_1 y mostró un M_r de 21400 y podría corresponder al fragmento β -1P (f29-207).

3. El componente D mostró un M_r idéntico al componente C. Su origen puede ser explicado en base a los niveles diferentes de fosforilación que presenta la β -Cn caprina (ver apartado III.3.7.). Atendiendo a las reglas de fosforilación dadas por Mercier (1981) y los resultados de fosforilación obtenidos en la especie ovina (Chianese y col., 1995b) podemos pensar que el nivel 5P corresponde a la fosforilación de los lugares primarios (Ser₁₈, Ser₁₉ y Ser₃₅) y los residuos Ser₁₅ y Ser₁₇, mientras que el nivel 6P correspondería a la fosforilación de estos residuos y de un residuo Thr de las posiciones 12 o 41. La fosforilación de la Thr₄₁, tras la acción enzimática de la plasmina, nos llevaría a la obtención de 2 fragmentos de igual peso molecular pero de distinto contenido en residuos fosfato, y que en PAGE-urea se desarrollarían como bandas diferentes. Uno de estos fragmentos correspondería al componente C [β -1P (f29-207)] y el componente D correspondería al fragmento β -2P (f29-207). Las intensidades en que se formarían estos componentes dependerían de la proporción de cada una de las formas fosforiladas de la β -Cn en la muestra a hidrolizar.

4. Los componentes E de menor recorrido aparecieron como 2 pequeños depósitos peptídicos de M_r 8500 y 8700. Estos componentes aparecieron en PAGE-urea como 2 dobletes (4 bandas) con movilidades inmediatas a la β -Cn. Según el M_r hallado para estos compuestos

de degradación y localización en el gel PAGE-urea (Benali y col., 1994) serían compuestos homólogos a los fragmentos β -1P (f29-105/107) bovinos. El hecho de aparecer en forma de doblete confirma la hipótesis de que el residuo fosforilado para el nivel 6P en la β -Cn caprina correspondería a la Thr₄₁, formándose los fragmentos β -1P (f29-105/107) y β -2P (f29-105/107).

5. Los componentes E de mayor recorrido electroforético, tuvieron en conjunto *Mr* de 13600 y podrían corresponder principalmente a los péptidos β -5P (f1-105/107) y β -6P (f1-105/107).

Los resultados de hidrólisis obtenidos por PAGE-urea (Figura 52) dan a conocer una disminución en la intensidad de los componentes C y D y un aumento de los componentes A y B a lo largo de los periodos de incubación. Este hecho se puede explicar por la hidrólisis de los componentes C y D [β -1P (f29-207) y β -2P (f29-209)] para dar los componentes A y B ya que los primeros contienen los enlaces Lys₁₀₅-His₁₀₆ y Lys₁₀₇-Glu₁₀₈ sensibles a la acción de la plasmina. Se han obtenido resultados similares para la especie bovina (Papoff y col., 1995).

El análisis de imagen realizado por superposición de los geles bidimensionales se presenta en la Figura 62, mostrando la gran homología entre los productos de degradación para ambas especies. El ligero desplazamiento observado para las γ_2 y γ_3 -Cn, respecto a los componentes homólogos caprinos, se debe esencialmente a la diferente movilidad electroforética de estos componentes en la primera dimensión.

Aunque las movilidades electroforéticas, en PAGE-urea, de los componentes principales A, B y C son diferentes de los presentados por las γ_2 , γ_3 y γ_1 -Cn, respectivamente, el mapa peptídico mostrado por electroforesis bidimensional revela una distribución y *Mr* muy similares para estos componentes. Las diferencias de movilidades electroforéticas observadas en PAGE-urea se pueden explicar por la diferente carga total de estos péptidos debido a las substituciones puntuales que encontramos entre las β -Cn de estas dos especies y a la delección del dipéptido en la proteína caprina. De igual forma estas substituciones puntuales hacen que estos componentes tengan pH isoeléctricos diferentes en las especies bovina y caprina, y puedan ser fácilmente diferenciados por técnicas de isoelectroenfoque. Esta observación ha dado como resultado la puesta a punto de un método de detección de leche de vaca en leche de cabra, que ha sido adoptado por la Unión Europea como método de referencia en la detección de leche de vaca en queso de cabra. Moio y col.

(1990) han adaptado una versión rápida y sensible de esta técnica analítica al equipo Phastsystem™ (Pharmacia).

Los Mr obtenidos para los productos E concuerdan con los resultados obtenidos por diferentes autores en el estudio de diferentes componentes de la fracción proteosa-peptona caprina (Khatoon y Joshi, 1987; Ramos y col., 1988; Mati y col., 1991). El patrón más complejo, respecto al bovino, mostrado en PAGE-urea, podría tener su origen en la inclusión en su secuencia primaria de la parte fosforilada de la β -Cn caprina, formándose de nuevo dobletes de estos compuestos debidos a los diferentes niveles de fosforilación de esta proteína, visibles en los geles de PAGE-urea.

IV.1.4. Hidrólisis de la caseína entera caprina por la plasmina caprina

Con objeto de establecer si la plasmina caprina podría o no tener diferente especificidad que la plasmina bovina o si las caseínas de estas dos especies presentan diferentes susceptibilidades a la acción de la plasmina, se compararon los hidrolizados obtenidos a partir de la caseína caprina por acción de la proteasa alcalina endógena presente en la leche de cabra y los obtenidos por acción de la plasmina bovina (Figura 54).

Ya que la plasmina se libera muy rápidamente de las micelas de caseína a $\text{pH} \leq 4.6$ (Grufferty y Fox, 1988a), es de esperar que la caseína obtenida a partir de una precipitación ácida presente una actividad muy pequeña o nula en este enzima, por lo que se decidió en esta experiencia obtener la caseína mediante ultracentrifugación.

En un experimento similar a los llevados a cabo, se estudió la acción hidrolítica de la proteasa alcalina endógena de la leche de cabra a partir de caseína entera (2.5%, p/v) obtenida por ultracentrifugación (25000 rpm, 2 h, 20°C) a pH 8.0, durante períodos de incubación de 1, 6, 15, 24, 30, 48, 72 y 96 h a 37°C en presencia de timerosal (0.02%, p/v) para evitar cualquier contaminación o proliferación microbiana.

Los patrones electroforéticos (Figura 63) de los principales componentes semejantes a las γ -Cn bovinas, y el resto de las bandas producidas por la proteasa endógena caprina, fueron idénticos a los mostrados en los hidrolizados obtenidos a partir de la caseína caprina por la acción de la plasmina bovina. Este hecho sugiere que ambas proteasas tienen similar

especificidad para hidrolizar la caseína caprina. Por otra parte, la diferencia de velocidad de hidrólisis para las α_{s1} -Cn caprina y bovina es debida a una diferente susceptibilidad de estas caseínas a la acción de la plasmina.

IV.2. HIDROLISIS DE LA α_{s1} -CN CAPRINA POR LA PLASMINA

El presente trabajo describe la acción de la plasmina bovina sobre la α_{s1} -Cn obtenida a partir de leche de cabra de mezcla. Las frecuencias para las variantes genéticas de la α_{s1} -Cn encontradas en los individuos de donde procedió la leche se detallan en la Tabla 14.

IV.2.1. Estudio de la fracción insoluble a pH 4.6

La Figura X muestra los electroforegramas (PAGE-urea) obtenidos a partir de los hidrolizados de la α_{s1} -Cn por acción de la plasmina a pH 8.0 y 37°C, durante diferentes períodos de incubación. La α_{s1} -Cn fue degradada por la plasmina en 9-10 bandas detectadas por PAGE-urea, con movilidades electroforéticas superiores a la proteína entera, excepto para una banda visible a partir de los 60 min de hidrólisis, que presentó una movilidad algo inferior. Estos péptidos fueron visibles desde los primeros tiempos de hidrólisis y fueron incrementando su intensidad progresivamente en el transcurso del tiempo. La aparición rápida de un número elevado de péptidos podría ser el resultado de la hidrólisis inicial de la proteína hacia el centro de su molécula. La plasmina tiene una alta especificidad en hidrolizar los enlaces tipo Lys-X y en menor grado Arg-X (Weinstein y Doolittle, 1972), y precisamente en la α_{s1} -Cn se sitúan en el centro de la molécula un número elevado de este tipo de enlaces (ver Figura 35).

En el último período de incubación (150 min), aproximadamente el 30% de la proteína permaneció intacta. En las mismas condiciones proteolíticas y sistema electroforético, la β -Cn fue degradada casi por completo a los 90 min (apartado IV.1.1.) mostrando que la α_{s1} -Cn, aunque es susceptible a la acción proteolítica de la plasmina, es más resistente a la hidrólisis que la β -Cn, igual que ocurre con sus correspondientes

homólogas bovinas. Sin embargo, como se observó anteriormente en el apartado 1.1. de este capítulo, las β y α_{s1} -Cn son degradadas por la plasmina aproximadamente a la misma velocidad cuando el sistema caseínico utilizado es la caseína entera.

Los electroforegramas dan a conocer, como en el caso de la hidrólisis de la α_{s1} -Cn por acción de la quimosina, que las proteínas con diferentes niveles de fosforilación no fueron degradadas de forma homogénea, siendo la forma de mayor movilidad la más proteolizada, desapareciendo en el período último de incubación.

El patrón electroforético, detectado por PAGE-urea, de los productos de degradación fue en conjunto similar al encontrado por Andrews y Alichanidis (1983) y McSweeney y col. (1993c), en la hidrólisis de la α_{s1} -Cn bovina. Este constó de una serie de 3 bandas que aparecieron con aproximadamente igual intensidad y movilidades electroforéticas superiores al resto de bandas (identificadas en la Figura 64 como A, B y C), y que se produjeron en una mayor proporción respecto al resto.

El análisis electroforético bidimensional (Figura 65) realizado a partir del hidrolizado obtenido a los 150 min de incubación, muestra claramente una acumulación de péptidos en algunas de las bandas detectadas por PAGE-urea. El gel bidimensional se compuso de aproximadamente 17 depósitos peptídicos, que tuvieron un intervalo de pesos moleculares muy amplio. Los 3 péptidos (A, B y C), producidos en mayor proporción, presentaron pesos moleculares muy similares, sobre todo los péptidos B y C.

El análisis PAGE-SDS realizado sobre este mismo hidrolizado (Figura 66) dio a conocer que los péptidos formados tuvieron un intervalo de M_r entre 22100 y 8800. El péptido A presentó un M_r de 20400 y los péptidos B y C de 19200 (indistinguibles en PAGE-SDS por presentar pesos moleculares similares). Estos péptidos aparecieron en los electroforegramas como 2 bandas de mayor densidad óptica, respecto al resto de componentes, seguidos de 2 bandas con M_r de 16800 y 15800, y de una serie de 4 bandas con M_r de 11400, 10500, 9600 y 8800, respectivamente. Estos resultados son coincidentes con los obtenidos por Eigel (1977a) en la hidrólisis de la α_{s1} -Cn bovina por acción de la plasmina.

IV.2.2. Estudio de la fracción soluble a pH 4.6

La Figura 67 muestra los electroforegramas (PAGE-SDS) obtenidos a partir de las fracciones solubles a pH 4.6, de los hidrolizados realizados sobre la α_{s1} -Cn por acción de la plasmina, en diferentes períodos de incubación (5, 15, 30 y 45 min).

El patrón electroforético se caracterizó por un número elevado de bandas (no menos de 11) con un intervalo de M_r comprendido entre 20100 y 8100. Los péptidos con M_r 9300 y 8100 se produjeron en grandes cantidades, respecto al resto, lo que limitó la inclusión en el gel de los hidrolizados obtenidos con tiempos superiores de incubación. También se formaron en gran cantidad y al final de los períodos de incubación 3 bandas con M_r de 16600, 14800 y 13300.

IV.3. HIDROLISIS DE LAS α_{s1} -CN A y F POR LA PLASMINA

Ya que estas variantes presentan grandes diferencias estructurales como se ha descrito, sería interesante ver cómo se comportan estas proteínas, ante la acción proteolítica de la plasmina.

Como el período de incubación máximo (150 min) utilizado en el estudio de la α_{s1} -Cn, obtenida a partir de leche de mezcla, se mostró insuficiente para hidrolizar la totalidad de la proteína, en este trabajo se alargó el período de incubación hasta 6 h.

IV.3.1. Estudio de la fracción soluble a pH 4.6

La caracterización de los péptidos solubles a pH 4.6 se realizó mediante RP-HPLC. En este trabajo no se aislaron ni identificaron los péptidos, sólo se realizó un estudio y comparación de los perfiles peptídicos obtenidos tras las hidrólisis de estas variantes genéticas.

La Figura 68 muestra los cambios en los perfiles de elución de las α_{s1} -Cn A y F sometidas a la acción de la plasmina durante los diferentes períodos de incubación. Las

condiciones de elución escogidas en el método cromatográfico separaron los péptidos de ambas variantes en 2 grupos de picos distintos. El grupo de péptidos, con tiempos de elución entre 55 y 95 min, apareció más rápidamente que el grupo compuesto por péptidos con tiempos de elución entre 25 y 45 min.

Estos perfiles cromatográficos, sobre todo el obtenido para la variante A, fueron muy semejantes a los obtenidos por Le Bars y Gripon (1993) y McSweeney y col. (1993c) para la α_{s1} -Cn bovina.

La Figura 69 muestra con detalle los perfiles peptídicos obtenidos a partir de las variantes A y F en el último período de incubación (6 h). Los cromatogramas de ambas variantes fueron bastante similares entre sí. Los péptidos pertenecientes al segundo grupo tuvieron tiempos de elución muy similares en ambas variantes. Aunque la mayoría se formaron en proporciones superiores en la variante A, algunos de ellos fue más abundante en la variante F (picos con tiempos de elución de 52, 61-64 y 85-91 min).

El primer grupo de péptidos presentó algunas diferencias entre los dos hidrolizados, apareciendo una serie de ellos sin correspondencia en una y otra variante (picos con tiempos aproximados de elución de 19, 27 y 38 min para la variante A, y un pico eluido a los 11 min en la variante F).

En ambas variantes se observaron una serie de picos de naturaleza muy hidrofílica que eluyeron a los 5 min.

Los trabajos realizados en al α_{s1} -Cn bovina (Le Bars y Gripon, 1993; McSweeney y col., 1993c) dan a conocer que esta proteína es extensamente degradada por la plasmina identificando péptidos pertenecientes a múltiples zonas de la molécula, excepto para las regiones Gln₅₉-Lys₇₉ (zona multifosforilada en la proteína bovina y variante A caprina, e inexistente en la variante F caprina) y Gln₁₅₂-Lys₁₉₃. La secuencia Gln₅₉-Lys₇₉ contiene 7 residuos SerP, de los 8 que contiene la α_{s1} -Cn B 8-P bovina y la α_{s1} -Cn A 8-P caprina, sugiriendo que el contenido alto en SerP imposibilita o reduce considerablemente el potencial proteolítico de la plasmina en esta región. Este hecho podría explicar la similitud en los perfiles peptídicos obtenidos a partir de las variantes A y F caprinas. Los enlaces Lys₇₉-His₈₀ y Arg₉₀-Tyr₉₁ son susceptibles de ser hidrolizados por la plasmina en la α_{s1} -Cn bovina (Le Bars y Gripon, 1993; McSweeney y col., 1993c). Estos enlaces están incluidos en la α_{s1} -Cn A caprina (Lys₇₉-Tyr₈₀ y Arg₉₀-Tyr₉₁) y forman parte de la delección que caracteriza a la

variante F caprina. Las diferencias observadas para algunos picos en cada una de las variantes caprinas, podría ser explicadas precisamente por la inexistencia de estos dos puntos potenciales de hidrólisis en la variante F.

IV.3.2. Estudio de la fracción insoluble a pH 4.6

La Figura 70 muestra los electroforegramas obtenidos por PAAGE de los hidrolizados realizados a partir de las α_{s1} -Cn A y F por acción de la plasmina a pH 8.0, durante diferentes períodos de tiempo.

El patrón electroforético que presentó la variante A se compuso de una serie de 5 bandas con mayor movilidad que la proteína intacta, y otra serie de 4 bandas, en este caso de inferior movilidad. La α_{s1} -Cn A desapareció por completo tras 2 h de incubación, mostrando una susceptibilidad elevada a la acción proteolítica de la plasmina. Incluso en el tiempo 0 (inactivación inmediata de la plasmina tras su adición) apareció una banda electroforética de gran densidad óptica. Esta constituyó el producto más importante de hidrólisis a lo largo de los períodos de incubación. Este producto permaneció estable hasta estados avanzados de hidrólisis, desapareciendo casi por completo a las 6 h. El resto de productos proteolíticos de mayor movilidad electroforética desaparecieron a las 4 h de incubación. Sin embargo, los productos de hidrólisis de menor recorrido, respecto a la α_{s1} -Cn A, permanecieron estables durante todo el período de incubación.

El patrón electroforético de hidrólisis que presentó la variante F, fue significativamente diferente en comparación al obtenido en la variante A. En este caso se produjeron dos grupos de bandas con movilidades electroforéticas superiores e inferiores o coincidentes con la proteína entera. Los productos de más rápido recorrido aparecieron de forma débil a los 30 min y desaparecieron por completo a la hora de incubación. Los productos proteolíticos de menor movilidad fueron similares a los formados en los hidrolizados de la variante A. Sin embargo, el patrón electroforético perteneciente a los productos de mayor movilidad presentó diferencias considerables respecto al obtenido en la variante A.

IV.4. HIDROLISIS DE LA α_{s2} -CN POR LA PLASMINA

La Figura 71 muestra los electroforegramas obtenidos a partir de la α_{s2} -Cn por acción de la plasmina a 37°C y pH 8.0 durante diferentes períodos de hidrólisis (0, 30, 60, 90, 120 y 150 min).

Como se observa en los electroforegramas en el primer período de incubación se produjo un cambio drástico en el patrón electroforético, desapareciendo la totalidad de la α_{s2} -Cn para dar formación de diversos productos de degradación de menor movilidad electroforética, que posteriormente fueron desapareciendo para dar otros de mayor movilidad respecto a la α_{s2} -Cn. El patrón electroforético obtenido en la hidrólisis de esta proteína no fue muy nítido, observándose la aparición de múltiples depósitos de material peptídico difusos. La experiencia se repitió varias veces sin llegar a conseguir mejor resolución. Snoeren y Van Riel (1979) obtuvieron resultados similares en el estudio electroforético de la hidrólisis de la α_{s2} -Cn bovina por acción de la plasmina.

Los resultados muestran que en iguales condiciones hidrolíticas, la α_{s2} -Cn es hidrolizada más rápidamente que la β -Cn. Sin embargo esta experiencia se llevó a cabo en una condiciones hidrolíticas e iónicas que difieren bastante de las existentes en la leche y queso.

La plasmina es un enzima que hidroliza preferentemente los enlaces tipo Lys-X y Arg-X. La secuencia aminoacídica de la α_{s2} -Cn caprina (Bouniol, 1993) contiene numerosas regiones altamente básicas lo que explicaría en gran parte la preferencia de la plasmina por este substrato y la producción de un número relativamente pequeño de péptidos observables en PAGE-urea.

IV.5. HIDROLISIS DE DIFERENTES SUBSTRATOS CASEINICOS CAPRINOS Y BOVINOS POR LA ACCION SIMULTANEA O CONSECUTIVA DE LOS ENZIMAS DEL CUAJO Y PLASMINA

Como ya hemos comentado durante el madurado del queso se produce la rotura de la matriz proteica en péptidos de largo, mediano y pequeño tamaño, y aminoácidos. El desarrollo óptimo o negativo del proceso de madurado de un queso, y así de la calidad final

del producto, se debe precisamente al balance entre estos productos de hidrólisis. La producción de estos péptidos y aminoácidos de forma controlada es causa directa de la acción concertada de los enzimas coagulantes residuales, proteasas endógenas de la leche y proteasas del fermento, los cuales proveen de substratos adecuados a las peptidasas del fermento que se encargan de generar péptidos pequeños y aminoácidos (Visser, 1993).

Un modelo proteolítico de estudio más complicado es la utilización conjunta de 2 enzimas sobre un substrato caseínico simple o complejo como es la caseína entera. Este modelo nos acerca más a la realidad proteolítica que rodea el proceso de madurado del queso, que es el objetivo de esta experiencia.

IV.5.1. Hidrólisis de las caseínas enteras caprina y bovina por la acción simultánea de los enzimas del cuajo y plasmina

La Figura 72 muestra los electroforegramas obtenidos a partir de los hidrolizados de 15 h de la caseína bovina por acción del cuajo y plasmina, a diferentes pH. En ellos se pueden observar una serie de componentes identificables de menor a mayor movilidad como γ -Cn (γ_2 , γ_1 , γ_3), β -Cn residual, β -I, β -II, α_{s1} -Cn residual, β -III, α_{s1} -I y una serie de péptidos que quizás se originen a partir de la α_{s1} -Cn por acción del cuajo y correspondan al producto α_{s1} -II descrito por Mulvihill y Fox (1977).

Las diferencias de intensidad en las diferentes bandas aparecidas muestran la dependencia de pH de los enzimas utilizados en la hidrólisis de la caseína. A $\text{pH} \leq 5.0$ aparecieron productos de hidrólisis típicos del cuajo al proteolizar la β -Cn (β -I y β -II) y la α_{s1} -Cn (α_{s1} -I). A pH 5.0 se evidenció una pequeña cantidad de productos procedentes de la hidrólisis de la β -Cn por acción de la plasmina (componentes γ). A $\text{pH} \geq 5.4$ se formaron todos los productos proteolíticos nombrados anteriormente y de forma más acusada los componentes γ , así como el péptido β -III casi inexistente a $\text{pH} \leq 5.0$. La plasmina aunque es un enzima estable en un intervalo de pH de 4 a 9 (Kaminogawa y col., 1972) tuvo una actividad proteolítica apreciable a partir de $\text{pH} \geq 5.0$, en cambio el cuajo tuvo una actividad proteolítica importante en todo el intervalo de pH estudiado. Los péptidos β -I y β -II se formaron más intensamente a $\text{pH} \leq 5.0$, mientras que el péptido β -III lo fue a $\text{pH} \geq 5.4$. El

péptido α_{s1} -I apareció en proporciones similares a lo largo del intervalo de pH. Las β y α_{s1} -Cn tuvieron un máximo de degradación a pH 6.6, explicable ya que ambas enzimas son activas a este pH.

En la Figura 73 se muestran los electroforegramas obtenidos a partir de la caseína caprina en idénticas condiciones proteolíticas. En general la caseína caprina presentó patrones electroforéticos más complejos que los descritos para la caseína bovina con las siguientes características:

1. La zona perteneciente a las γ -Cn fue mucho más complicada que en el caso de la caseína bovina, apareciendo no menos de 7 bandas, algunas de las cuales se identificaron con los componentes homólogos de las γ -Cn bovinas. Sin embargo, hubo una serie de bandas en esta zona electroforética, principalmente 2 de menor recorrido, que no aparecieron en los hidrolizados bovinos. Estas tuvieron una localización muy similar a las obtenidas en la hidrólisis de la α_{s2} -Cn por acción del cuajo. Los componentes homólogos a las γ -Cn se hicieron visibles a partir de $\text{pH} \geq 5.4$, mientras que las 2 bandas de menor recorrido fueron visibles en todo el intervalo de pH aunque de forma más pronunciada a $\text{pH} \geq 5.4$. El hecho de que estas 2 bandas aparezcan también a pH ácidos extremos indica que son formadas por acción de los enzimas del cuajo y no por la plasmina.
2. La β -Cn fue hidrolizada de forma óptima a pH 3.8 y $\text{pH} \geq 6.2$, mientras que tuvo un mínimo de hidrólisis a pH 4.6.
3. El polipéptido β -I formado en grandes cantidades a pH 4.2-5.4. En el resto de pH estudiados β -I también fue visible, pero en menor proporción, quizás porque fue degradado posteriormente en otros componentes.
4. Tras β -I aparecieron 3 bandas electroforéticas claramente observables a $\text{pH} \leq 5.4$. Las 2 de mayor recorrido correspondieron a la α_{s2} -Cn. Estas 2 bandas también aparecieron pero con inferior intensidad a $\text{pH} \geq 5.8$, sugiriendo que son hidrolizadas por acción de la plasmina.
5. El polipéptido β -II apareció formado intensamente a $\text{pH} \leq 5.0$, aunque se originó también en el resto de intervalo de pH.
6. A continuación aparecieron una serie de bandas electroforéticas que se pudieron identificar como β -III, β -IV y β -V, perfectamente visibles a $\text{pH} \leq 5.0$. A $\text{pH} \geq 5.4$ el patrón electroforético que siguió a los péptidos β -II fue más complejo, debido a la mezcla de los péptidos β -III, β -IV y β -V con los fragmentos N-terminales provenientes de la hidrólisis de

la β -Cn por acción de la plasmina.

En el intervalo de $\text{pH} \geq 5.8$ en general, los productos de degradación procedentes de la β -Cn por acción del cuajo se formaron menos intensamente que en el resto de pH . Es precisamente en este intervalo de pH (≥ 5.8) donde la plasmina tuvo una acción más acentuada, visible por la aparición de las γ -Cn. La acción conjunta, en este intervalo de pH , de los enzimas del cuajo y la plasmina en la hidrólisis de la caseína, sería la responsable de la intensa degradación observada.

En las Figuras 74 y 75 aparecen los electroforegramas correspondientes a la hidrólisis de las caseínas caprinas y bovinas, respectivamente, por la acción conjunta de los enzimas del cuajo y de la plasmina a pH 6.2 y 30°C , durante diferentes períodos de incubación (1, 2, 4, 6, 15 y 30 h). En los dos casos se pudo observar la aparición de los productos típicos de degradación de los enzimas del cuajo (α_{s1} -I, β -I, β -II y β -III) y de la plasmina (γ -Cn) por hidrólisis de las α_{s1} y β -Cn. Estos se produjeron de forma progresiva al avanzar los períodos de incubación, pero también fueron hidrolizados posteriormente en otros productos como es visible en el último (30 h). En este período de hidrólisis tanto las γ -Cn como α_{s1} -I, β -I, β -II y β -III fueron disminuyendo en intensidad óptica, e incluso algunos de ellos desaparecieron por completo.

Es interesante remarcar que en iguales condiciones proteolíticas la α_{s1} -Cn caprina desaparece casi por completo a las 6 h de hidrólisis (algo confuso de apreciar por el solapamiento de esta proteína con el producto β -II), mientras que su homóloga bovina todavía permanece a las 30 h sin hidrolizar totalmente, mostrando la mayor susceptibilidad de la caseína caprina a la hidrólisis. Por otra parte el PPD no pudo ser apreciado en los electroforegramas caprinos ya que fue rápidamente hidrolizado tras su formación, mientras que en los electroforegramas bovinos fue visible en todos los períodos de incubación, apareciendo pequeñas cantidades incluso tras 30 h de hidrólisis.

Las α_{s2} -Cn bovina y caprina se mostraron más resistentes a la hidrólisis, respecto al resto de componentes caseínicos, pero fueron hidrolizadas gradualmente a lo largo del tiempo, quedando sólo restos en el último período de incubación. Un dato interesante a remarcar es el solapamiento del producto de degradación β -II bovino con uno de los componentes principales de la α_{s2} -Cn, perfectamente visible en los electroforegramas en las carreras 5 y 6 de la Figura 74.

IV.5.2. Hidrólisis de las β -Cn caprina y bovina por la acción consecutiva de los enzimas del cuajo y plasmina

Ya que las γ -Cn contienen los enlaces susceptibles de hidrólisis por acción de los enzimas del cuajo (β -I a β -III bovinos y β -I a β -V caprinos), y estos productos de degradación a su vez contienen los enlaces susceptibles de hidrólisis por acción de la plasmina, podrían ser hidrolizados posteriormente a su formación.

Con objeto de verificar esta hipótesis se realizaron dos experiencias paralelas. En una se hidrolizaron soluciones de β -Cn caprina y bovina (2.5%, p/v) con plasmina (0.02 U/mL) a pH 8.0 y 37°C durante 3 h. Transcurrido este tiempo se paró la reacción por calentamiento (100°C, 10 min) y se separaron los componentes solubles e insolubles a pH 4.6 por adición de tampón acético-acetato. La parte insoluble a pH 4.6 recogida por centrifugación, y que teóricamente contenían las γ -Cn, se resuspendió en tampón acético-acetato 0.05 M a pH 6.2, fue añadida de una solución de cuajo (0.1 UC/mL) y se mantuvo a 30°C durante diferentes tiempos de incubación (0, 1, 2, 4 y 6 h). Transcurridos estos tiempos la reacción se paró por calentamiento (100°C, 5 min), se separaron las fases solubles e insolubles a pH 4.6 y la fase insoluble se sometió a análisis PAGE-urea.

De igual forma se hidrolizaron soluciones de β -Cn caprina y bovina (2.5%, p/v) con cuajo (0.1 UC/mL) a pH 6.2 durante 18 h y a 30°C. Pasado este tiempo de hidrólisis se pasó la reacción por calentamiento (100°C, 5 min) y se separaron las fases solubles e insolubles a pH 4.6, obteniéndose la insoluble por centrifugación. Seguidamente el precipitado fue redissuelto en tampón tris-HCl 0.05 M, pH 8.0 y se añadió plasmina (0.02 U/mL) incubándose durante 0, 0.5, 1, 2 y 6 h. Tras los diferentes períodos de incubación el enzima fue inactivado y una porción de la muestra fue analizada por PAGE-urea.

Los resultados de la primera experiencia (Figura 76) muestran que las γ -Cn formadas no sufrieron hidrólisis posterior apreciable por acción del cuajo en los períodos de incubación ensayados ya que no apareció ningún producto de degradación diferente de ellas. Estos resultados son comparables a los obtenidos en el queso, donde estos componentes en general permanecen bastante estables sobre todo en los períodos finales de la maduración (Farkye y Fox, 1991).

En las Figuras 77 y 78 se muestran los resultados de la segunda experiencia. En ambas especies la β -Cn fue hidrolizada casi en su totalidad tras 30 h de hidrólisis por los enzimas del cuajo (carreras número 3 de ambas Figuras). Los productos de degradación que aparecieron fueron esencialmente β -I, aunque también se formaron cantidades apreciables de β -II y β -III en ambas especies. Durante los períodos sucesivos de hidrólisis por acción de la plasmina, estos productos de degradación provenientes de la β -Cn fueron hidrolizados a su vez en otros, como muestra el descenso de sus intensidades ópticas respectivas, y la aparición de diferentes productos de degradación que se sitúan en la zona electroforética de las γ -Cn. En los electroforegramas pertenecientes a la β -Cn bovina aparecieron no menos de 6 productos de hidrólisis, mientras que en la β -Cn caprina sólo apareció uno. En ambos casos el producto predominantemente formado tuvo características electroforéticas similares al componente caseínico γ_1 .

Las bandas electroforéticas de mayor recorrido presentaron un patrón idéntico a los fragmentos N-terminales obtenidos en las hidrólisis de las β -Cn bovina y caprina por acción de la plasmina. Sin embargo, la movilidad electroforética de estos componentes en los hidrolizados caprinos, en conjunto, fue mayor que la observada en los hidrolizados obtenidos a partir de la β -Cn (ver Figura 52). Estos resultados sugieren un cambio en la especificidad de la plasmina al actuar sobre los productos de degradación de la β -Cn, diferente a la presentada al actuar sobre la proteína entera, quizás debido a una diferencia de estructura entre estos compuestos que hace disponibles otros puntos de hidrólisis. Estos productos deben conservar la zona fosforilada de la β -Cn al igual que los fragmentos N-terminales obtenidos a partir de la β -Cn, pero deben ser de talla más pequeña ya que tienen mayor movilidad. Estas bandas podrían corresponder a los polipéptidos β -Cn (f1-97) y (f1-99) ya que Visser y col. (1989) y Papoff y col. (1995) mostraron que los enlaces $\text{Lys}_{97}\text{-Val}_{98}$ y $\text{Lys}_{99}\text{-Glu}_{100}$ de la β -Cn bovina son también susceptibles a la acción de la plasmina.

Todos los cambios observados en los electroforegramas obtenidos en las hidrólisis de las caseínas caprina y bovina por la acción simultánea de los enzimas del cuajo y de la plasmina, y β -Cn caprina y bovina por la acción consecutiva de estos enzimas, hace pensar que la mayoría de los productos de hidrólisis primarios son susceptibles de sufrir fenómenos de proteólisis posteriores formándose nuevos productos de proteólisis de menor tamaño, algunos de ellos difíciles de observar en PAGE-urea.

CAPITULO V

V. ESTUDIO DE LA PROTEOLISIS EN QUESOS DE LECHE DE CABRA

V.1. ESTUDIO ELECTROFORETICO DE LA PROTEOLISIS PRIMARIA DE LA CASEINA EN QUESO DE CABRA

La proteólisis es considerada como el acontecimiento más importante durante el madurado de muchas variedades de queso (Fox, 1989). Aunque se han desarrollado diferentes esquemas en el fraccionamiento de péptidos en queso (Christensen y col., 1991), se han aislado, identificado y caracterizado muy pocos péptidos a partir de él.

La mayoría de los trabajos realizados en este campo dedican sus estudios al fraccionamiento de los péptidos solubles en agua, mientras que los insolubles han recibido muy poca atención, aún siendo los primeros péptidos que debemos conocer ya que serán los precursores de los productos de talla pequeña.

En estos últimos años ha tenido un gran desarrollo el estudio de las proteínas y péptidos del queso mediante el uso de geles de electroforesis. Creamer (1991) describe en una revisión bibliográfica los últimos avances en técnicas electroforéticas aplicadas al análisis del queso, en el seguimiento de la hidrólisis de la caseína.

Un ejemplo de técnicas de electroforesis aplicadas en el análisis de diferentes variedades de quesos europeos es el estudio realizado por Marcos y col. (1979), al evaluar el grado de madurado de estos quesos a través de la naturaleza de los productos de degradación visibles en el gel de electroforesis.

La proteólisis primaria que encontramos en el queso es el resultado de las acciones proteolíticas de los enzimas coagulantes y plasmina, fundamentalmente (Fox, 1989). Los resultados obtenidos en diferentes variedades de queso (Addeo y col., 1995; Carretero y col., 1994; McSweeney y col., 1994b) indican que la mayoría de los productos proteolíticos del queso detectables en PAGE-urea son originados por la acción de los enzimas coagulantes y plasmina, y que los resultados de hidrólisis *in vitro* obtenidos en la proteólisis de las β y α_{s1} -Cn por la acción de estos enzimas, pueden ser perfectamente extrapolados y comparables a los obtenidos en el queso.

El objetivo principal de este estudio fue caracterizar por electroforesis los péptidos insolubles en agua extraídos de la matriz proteica del queso, y establecer hasta qué punto los

resultados de los estudios de hidrólisis de las caseínas en solución pueden ser extrapolados a los obtenidos en diferentes variedades de queso de cabra.

En la Figura 79 aparecen los electroforegramas de diferentes quesos de cabra comercializados en diferentes establecimientos. Por orden de electroforegramas estos quesos fueron:

1. Queso de coagulación ácida, marca comercial *Belay* (Francia).
2. Queso de coagulación ácida, marca comercial *Chavroux* (Francia).
3. Queso fresco salado sin marca.
4. Queso semicurado, marca comercial *Llosa de Ranes* (Valencia).
5. Queso semicurado, marca comercial *Jumilla* (Murcia).
6. Queso semicurado, marca comercial *Corbà de Can Costa* (Girona).
7. Queso de Los Ibores (Extremadura).
8. Queso de leche de vaca semicurado ahumado, marca comercial *Pria Llanes* (Asturias).
9. Queso Buelles (Asturias).
10. Queso curado Serranía de Ronda (Málaga).
11. Queso semicurado Majorero (Canarias).
12. Queso semicurado, marca comercial *Blancafort* (Cataluña).
13. Queso *Cendrat del Montsec* (Cataluña).

Aunque la mayoría de quesos de cabra españoles pertenecen a la familia de quesos de pasta prensada no cocida, se han estudiado también varios quesos frescos de coagulación ácida o láctica de origen francés y un queso de pasta blanda y corteza enmohecida, de coagulación predominantemente láctica que es el *Cendrat del Montsec*, abarcando así la mayoría de familias más representativas de quesos de cabra.

En los electroforegramas podemos apreciar una serie de bandas que podemos agrupar en diferentes zonas electroforéticas, de acuerdo con las indicaciones dadas por Marcos y col. (1979) en el estudio y caracterización de una serie de quesos europeos en $\text{para}\kappa\text{-Cn}$, $\gamma\text{-Cn}$, $\beta\text{-Cn}$ residual, $\text{pre-}\beta$, $\alpha_s\text{-Cn}$ residuales y $\text{pre-}\alpha_s$. Estas zonas electroforéticas vienen esquematizadas en la Figura 80.

El electroforegrama correspondiente a la carrera 3 presentó un patrón electroforético bien diferente al resto de quesos debido a la mezcla con leche de vaca, visible en los geles

ya que la α_{s1} -Cn bovina presenta un recorrido mayor que su homóloga caprina. En la carrera 8 se ha introducido una muestra de queso de leche de vaca.

En la totalidad de las variedades de quesos estudiados el complejo caseínico α_s fue degradado más extensamente que la β -Cn. En la mayoría de las variedades de queso de cabra la α_{s1} -Cn desapareció por completo al igual que su producto inmediato de hidrólisis, mientras que en los quesos elaborados con mezcla de leche de vaca y cabra y de leche de vaca (carreras 3 y 8), se pudieron identificar estos componentes.

Estos resultados pueden explicarse teniendo en cuenta diferentes consideraciones:

1. Por una parte la mayor resistencia a la hidrólisis de la α_{s1} -Cn bovina, respecto a su homóloga caprina, al igual que ocurre en la hidrólisis de estas dos proteínas de forma aislada por acción del cuajo.
2. El polimorfismo genético de la α_{s1} -Cn caprina asociado a su nivel de síntesis proteica variable según la variante genética.

Dependiendo del genotipo predominante de α_{s1} -Cn en la leche de fabricación del queso y del nivel de proteólisis, tendremos más o menos cantidad de esta proteína y de sus productos de hidrólisis visibles por electroforesis.

En general las muestras correspondientes a los quesos de cabra contuvieron grandes cantidades de β -Cn intacta, pero por el contrario una cantidad escasa o nula de α_{s1} -Cn, lo que indica que el madurado de este tipo de queso lleva implícito un contenido reducido de α_{s1} -Cn en la leche de fabricación y/o procesos de proteólisis avanzados para esta proteína.

En las variedades estudiadas aparecieron un número variable de bandas con diferentes intensidades a nivel de la zona de la β -Cn.

En el queso de leche de vaca apareció en la zona electroforética de la β -Cn una banda intensa y de mayor recorrido, y una banda de menor recorrido e intensidad. Este patrón electroforético se explica por el polimorfismo que presenta esta proteína. Se han descrito 7 variantes genéticas para la β -Cn bovina. En geles alcalinos adicionados de urea estas variantes migran en el orden $A^1=A^2=A^3>B>D, E>C$ (Eigel y col., 1984). La banda electroforética de mayor intensidad correspondería a la variante A y la banda de menor intensidad y recorrido correspondería a la variante B, variantes genéticas más frecuentemente encontradas de la β -Cn bovina. La intensidad de las bandas depende del genotipo predominante para esta caseína en la leche de mezcla.

En los quesos de cabra en todos los casos se observó la aparición de dos bandas predominantes en la zona electroforética de la β -Cn, aunque también en algunas variedades (carreras 4, 5, 10, 11 y 12) aparecieron diferentes bandas de menor intensidad y recorrido en esta zona. En este caso no se trata de diferentes variantes genéticas, sino que la gran heterogeneidad observada en los geles es debida a niveles de fosforilación distintos para esta proteína.

La intensidad óptica observada en los geles para la β -Cn, y para cada una de las variedades de queso, varió dependiendo del grado de hidrólisis que presentó cada una.

Los resultados electroforéticos hasta ahora descritos nos proveen de una información comparativa entre las variedades de queso del grado de degradación de cada una de las fracciones caseínicas. Sin embargo, con el objeto de comparar los mecanismos de degradación de las caseínas en estas variedades es también necesario considerar el origen de los principales productos de degradación observados en los geles de electroforesis.

Las fuentes o substratos caseínicos susceptibles a la acción de los enzimas y que darán origen a los diferentes productos de degradación visibles por PAGE-urea son fundamentalmente las caseínas β , α_{s1} , α_{s2} y la $\text{para}\kappa$ -Cn.

La $\text{para}\kappa$ -Cn es un péptido que migra hacia el cátodo en condiciones alcalinas. En nuestros electroforegramas este péptido corresponde a la banda electroforética de menor recorrido. En este estudio como no se realizó un seguimiento durante la maduración del queso no se puede decir nada respecto a si este péptido es degradado posteriormente, tan sólo podemos decir que en algunas variedades se presentó en mayor (carrera 3) o menor (carrera 13) proporción.

La β -Cn puede presentar diferentes patrones de hidrólisis, según el/los enzima/s presente/s. Así los componentes caseínicos γ formados por la acción de la plasmina caprina pudieron ser identificados de los electroforegramas comparando sus movilidades con aquéllas que se obtuvieron a partir de la β -Cn y caseína entera caprina *in vitro*. En los electroforegramas de las variedades de quesos estudiados estos componentes fueron más o menos evidentes, y se produjeron en pequeña cantidad en las variedades de coagulación predominantemente ácida. Este hecho se puede explicar si tenemos en cuenta 2 consideraciones; por una parte el pH que desarrollan estas variedades de queso hasta finalizar la coagulación (pH 3.8-4.2), y por otra la propiedad que presenta la plasmina de desligarse

de la micela de caseína y pasar al suero a $\text{pH} \leq 4.6$ (Grufferty y Fox, 1988a) durante la producción del queso.

Las bandas de los productos proteolíticos obtenidos en solución por hidrólisis de la β -Cn con enzimas del cuajo también se detectaron en los perfiles electroforéticos de algunas de las variedades de queso. El producto β -I fue visible en mayor o menor proporción en todos los quesos. En el queso de leche de vaca (carrera 8) apareció como un solo péptido y en el resto de variedades como varios al incluir las zonas fosforiladas variables de la β -Cn. Las variedades de queso donde este péptido fue más difícil de apreciar, pero no por ello inexistente, fue precisamente en los quesos de coagulación predominantemente ácida (carreras 1, 2 y 13). Como ya se ha discutido en esta memoria este hecho fue observado en la hidrólisis *in vitro* de la β -Cn por el cuajo hidrolizada a pH ácidos extremos, donde se apreciaron cantidades superiores de β -II que de β -I. Esta observación se explicó en su momento por un fenómeno de hidrólisis rápida de β -I a β -II o por un cambio de conformación de la proteína a este pH que haría menos accesible los lugares de hidrólisis para producir β -I.

En las muestras estudiadas se puede observar dos bandas electroforéticas de intensidad óptica similar en la zona electroforética de la α_{s1} -Cn que corresponderían al polipéptido β -II. Este es el motivo por el cual las lecturas densitométricas cuantitativas realizadas en este tipo de quesos dan resultados erróneos al cuantificar diferentes productos de degradación que se solapan con proteínas intactas. En el de queso de leche de vaca, apareció una banda electroforética con movilidad coincidente con algún componente de la α_{s2} -Cn e igual movilidad que el péptido más rápido del conjunto β -II caprino. Este péptido presentó características similares al β -II obtenido al incubar la caseína entera bovina con cuajo. McSweeney y col. (1994b) describieron en queso Cheddar la aparición de un péptido de idéntica localización electroforética que identificaron como el fragmento β -Cn (f1-?). Los autores asociaron este péptido a algún componente de la proteosa peptona, sin embargo los resultados obtenidos en el estudio de hidrólisis de las caseínas bovinas en solución, relacionan los péptidos β -Cn (f1-105/107) pertenecientes a la fracción proteosa peptona, que se desarrollan entre las β y α_{s2} -Cn (apartado IV.1.2.), con un recorrido electroforético menor que el péptido observado en la muestra de queso. En cambio el péptido β -II bovino tiene una localización coincidente con algunas de las bandas pertenecientes a la α_{s2} -Cn, como se

muestra en la Figura 74, igual que sucede en la muestra de queso.

En la Figura 81 aparecen los electroforegramas obtenidos a partir de un queso de cabra de pasta prensada no cocida, madurado en 30 días y fabricados en el CeR de Tecnología de los Alimentos según se especifica en el apartado correspondiente de materiales y métodos. Se tomaron muestras a los 2, 7, 15, 21 y 30 días para realizar el análisis PAGE-urea.

En los electroforegramas podemos apreciar una serie de bandas que se pudieron identificar como: parak-Cn , diferentes componentes peptídicos en la zona de las $\gamma\text{-Cn}$, la $\beta\text{-Cn}$ residual y una serie de bandas que engloban la $\alpha\text{-Cn}$ residual y diferentes productos de degradación.

El electroforegrama correspondiente al queso prensado y salado (2 días) muestra que el complejo α_s ($\alpha_{s1} + \alpha_{s2}$) aún fue visible, sobre todo las bandas correspondientes a la $\alpha\text{-Cn}_{s2}$. Con una movilidad inmediata a la $\beta\text{-Cn}$ aparecieron 2 bandas electroforéticas con características y movilidades idénticas al péptido $\beta\text{-I}$ obtenido en la hidrólisis de la $\beta\text{-Cn}$ caprina por acción de los enzimas del cuajo (quimosina y pepsina).

En el siguiente estado de maduración (7 días) el complejo caseínico α_s fue hidrolizado en gran parte (sobre todo α_{s1}), visible en el electroforegrama por la pérdida de intensidad óptica. Sin embargo su producto primario de degradación no fue visible en este sistema electroforético quizás debido a que tras su formación fue rápidamente hidrolizado en otros productos de proteolisis de tamaño inferior.

En el período de maduración de 15 días los procesos de hidrólisis antes descritos se acentuaron, incluyendo también la proteolisis de la $\alpha_{s2}\text{-Cn}$.

Tras 21 días de maduración el patrón electroforético cambió de nuevo, acentuándose la formación de 2 péptidos de gran intensidad en la zona electroforética de la $\alpha_{s2}\text{-Cn}$. Los péptidos $\beta\text{-I}$ fueron visibles en todo momento, y en la zona electroforética de la $\alpha_{s1}\text{-Cn}$ aparecieron una serie de bandas antes inexistentes. El patrón electroforético correspondiente al estado de maduración de 30 días no tuvo grandes cambios respecto al de 21 días produciéndose sólo un incremento de la intensidad óptica en las bandas antes descritas. Las bandas que se situaron en la zona de la $\alpha_{s1}\text{-Cn}$ podrían corresponder a los péptidos $\beta\text{-II}$. Las bandas electroforéticas de gran intensidad que se situaron en la zona de la $\alpha_{s2}\text{-Cn}$ podrían corresponder a productos de degradación de esta misma proteína por acción de los enzimas

del cuajo.

V.2. PRODUCCION DE CUAJADAS LIBRES DE FERMENTOS Y COAGULANTES CON FLORA MICROBIANA CONTROLADA MEDIANTE EL USO DE ALTAS PRESIONES HIDROSTATICAS

Las altas presiones (100 a 1000 MPa) afectan a diversos componentes y sistemas biológicos. Se puede presurizar un material biológico en atmósfera gaseosa, en un líquido (presión hidrostática) o por ultracentrifugación. Los gases son fuertemente compresibles, lo cual provoca una variación de volumen importante muy difícil de controlar. Además los gases comprimidos son a veces explosivos presentando problemas de seguridad. La ultracentrifugación es costosa y sólo permite tratar pequeñas cantidades de producto a presiones inferiores a 200 MPa. El método elegido para realizar este proceso es la presión hidrostática, siendo el producto sumergido en agua o en otro líquido que transmite la presión (aceite, mezcla de agua y aceite soluble, etc.). Estos líquidos son casi incompresibles. El producto no debe entrar en contacto directo con el líquido, así que normalmente se acondiciona con un envoltorio plástico.

Durante el tratamiento la presión se ejerce instantánea y uniformemente a través de todo el material biológico, hablándose entonces de un proceso isostático. La Figura 82 muestra la diferencia básica entre la presión isostática y la uniaxial. No podemos utilizar la presión uniaxial, ya que en el caso de que el producto a presurizar sea sólido, éste sería aplastado. En el proceso de presurización hidrostática no existe un gradiente de presión, contrariamente al gradiente de temperatura que se produce cuando un material biológico es calentado por conducción. Así la duración del tratamiento a alta presión no se determina por el volumen o por la masa del producto a tratar.

En el tratamiento de alta presión generalmente ésta es ejercida por una bomba hidráulica mediante un pistón alimentada por un compresor de aire. Para llegar a presiones de 100 a 1000 MPa necesitamos un sistema multiplicador. El lugar donde se encuentra el líquido presurizado debe resistir estas presiones, y consiste generalmente en un cilindro de acero inoxidable y a veces se compone de distintos cilindros concéntricos. El mantenimiento de estas presiones durante un tiempo prolongado (de 30 a 60 min) no consume energía

suplementaria, consiguiéndose tal efecto por cierre de una llave alojada al lado del cilindro.

Podemos mantener el cilindro, el líquido y el producto a una temperatura determinada durante el ciclo de presión por utilización de collares eléctricos que rodeen el cilindro metálico o bien por la utilización de equipos de frío. La Figura 83 muestra un esquema de los componentes principales de un equipo de alta presión.

Los mecanismos básicos responsables de los fenómenos de desnaturalización proteica, de inactivación de enzimas y de destrucción de microorganismos por presurización, son sólo parcialmente conocidos todavía. Las altas presiones modifican ciertas propiedades fisicoquímicas del agua tales como la densidad y punto de fusión. Las presiones superiores a 150 MPa provocan la disociación y el desplegamiento parcial de las estructuras proteicas, debido a modificaciones en los puentes de hidrógeno, uniones electrostáticas e interacciones hidrofóbicas, pero sin afectar los enlaces covalentes. La destrucción de las células vegetativas probablemente se deba principalmente a alteraciones de la membrana celular. Las esporas bacterianas, por el contrario, son muy resistentes a la presión.

Se han publicado diferentes revisiones generales sobre la aplicación de las altas presiones hidrostáticas en los alimentos (Farkas, 1986; Hayashi, 1989; Hoover y col., 1989; Farr, 1990; Cheftel, 1991; Hoover, 1993).

El trabajo que a continuación se desarrolla muestra los resultados obtenidos en la presurización de diferentes cuajadas, producidas con el fin de obtener un método sencillo de estudio que nos permita cuantificar y calificar la contribución de diferentes enzimas importantes en el madurado del queso.

V.2.1. Tratamiento de la leche de fabricación

El estudio de la acción de enzimas en queso libre de fermento láctico, requiere la producción de una cuajada que no contenga microorganismos vivos o solamente en muy pequeña cantidad, pero en el último caso que no sean capaces de multiplicarse en el período de tiempo que dure el madurado del queso. Esto supone, no solamente una fabricación en condiciones asépticas, sino también que la leche no aporte microorganismos capaces de multiplicarse en períodos posteriores.

Con el fin de reducir en lo posible la presencia de microorganismos se escogieron animales con recuentos microbiológicos bajos en la leche de partida y se aplicó un tratamiento térmico (72°C, 15 s) en pasterizador tubular que nos permitiría obtener una leche de muy buena calidad. La presencia de flora bacteriana residual post-pasterización o bien de flora añadida durante la fabricación, no presentará problema alguno ya que durante el tratamiento de alta presión la eliminaremos casi en su totalidad.

La adición de los antibióticos a la leche de producción tiene como objeto la inhibición del desarrollo de diferentes formas resistentes a los tratamientos de pasterización y presurización como son las esporas. En una experiencia complementaria se chequeó la posible inhibición de los enzimas coagulantes y de la plasmina por el uso de los antibióticos, comprobándose que a las dosis utilizadas en la leche de fabricación no afectase las actividades enzimáticas.

La leche cruda de cabra utilizada durante las fabricaciones contuvo un máximo de 50000 bacterias totales y menos de 500 enterobacterias por mililitro. Después del tratamiento térmico el recuento total se redujo a ≤ 100 UFC/mL y ausencia de enterobacterias en todos los casos.

V.2.2. Técnica de fabricación de quesos

V.2.2.1. Quesos obtenidos por acidificación química

La Figura 6 presenta el esquema de fabricación de las cuajadas libres de fermentos (CLF) y coagulantes (CLFC). Entenderemos como cuajada el queso fresco justo salido de la salmuera sin madurar.

La falta de acidificación natural se resuelve mediante la adición de la glucono- δ -lactona (GDL) compuesto que se hidroliza en ácido glucónico en presencia de agua, al añadirse directamente a la cuajada que es obtenida a partir de un preensado manual.

Esta técnica, preconizada por Mabbit y col. (1955) y mejorada por O'Keeffe y col. (1975) para queso tipo Cheddar, se tuvo que adaptar a la tecnología del queso de cabra. Para ello se realizaron una serie de experiencias donde se ensayaron diferentes cantidades de GDL. Se probaron concentraciones del 1, 2, 3, 4, 8 y 12% (p/p) sobre la cuajada,

comprobándose el pH de estos quesos a las 24 h, en comparación al pH desarrollado en cuajadas adicionadas de flora láctica. Como se muestra en la Tabla 16 el pH final alcanzado por acidificación química que más se ajustó al obtenido mediante acidificación biológica se consiguió al utilizar la GDL al 3%, resultados comparables a los obtenidos por O'Keeffe y col. (1975).

En la Figura 84 se muestran las curvas de acidificación obtenidas por el fermento y por acidificación química (ácido láctico y GDL). Las curvas de acidificación que presentaron las cuajadas añadidas de fermentos y de GDL tuvieron prácticamente el mismo valor de pH a las 24 h de su fabricación, sin embargo los caminos seguidos para llegar a este pH final fueron diferentes. Aproximadamente a las 4 h de acidificación, los quesos añadidos de GDL habían alcanzado el pH final (pH 5.33), mientras que las cuajadas producidas con fermentos tardaron más de 10 h hasta alcanzarlo.

Los posibles problemas que nos podríamos encontrar en la fabricación de cuajadas acidificadas con GDL consistirían teóricamente en:

1. Diferencias en la composición de las cuajadas.
2. Una retención mayor de enzimas coagulantes en la cuajada debido al descenso más brusco de pH.
3. Un incremento en la actividad proteolítica del coagulante debido a que el pH óptimo de estos enzimas se alcanza más rápidamente.
4. Un incremento en la susceptibilidad de la micela de caseína a la proteolisis por desmineralización de la cuajada.

La Tabla 17 muestra la composición fisicoquímica de la cuajada acidificada mediante fermentos (CC) y con GDL (CLF) a las 24 h de su producción, de la cual se deduce que las cuajadas CC y CLF tuvieron una composición similar. Las pequeñas variaciones observadas podrían ser debidas a la adición de la GDL y a la retención de la lactosa, las cuales tienden a incrementar la capacidad de retención de agua, de ahí que sean un poco más húmedas. Resultados similares fueron obtenidos por Visser (1977) y O'Keeffe y col. (1978).

El parámetro más importante que determina el contenido de coagulante en el queso, a excepción de los de pasta cocida, es el pH en el desuerado (Creamer y col., 1985). Un incremento en los niveles de enzimas coagulantes retenidos tendrían diferentes consecuencias durante el madurado del queso. Los resultados obtenidos por O'Keeffe y col. (1975),

trabajando según la técnica de Mabbit y col. (1955), muestran que el incremento de proteólisis observado en este tipo de queso podría ser atribuida a la gran retención de enzimas coagulantes. Este fenómeno puede ser explicado por la utilización de HCl y GDL de forma directa en la leche de partida, que hace que el pH en el desuerado sea muy inferior y así se retengan una mayor proporción de enzimas coagulantes. En nuestras producciones al utilizar ácido láctico para estandarizar el pH que se alcanza con los fermentos y llegar al desuerado en un tiempo reducido, el pH de los dos tipos de cuajadas fueron prácticamente idénticos (pH 6.4). Los valores calculados de coagulante residual en nuestras cuajadas, corresponden aproximadamente al 9% del cuajo añadido, cantidad que puede considerarse normal y que concuerda con los intervalos descritos por Fox (1988) para otros quesos. Las diferencias observadas en la retención de coagulante entre la CC y la CLF (Tabla 17) pueden ser debidas a la mayor cantidad de suero retenido en estas últimas.

Los valores en nitrógeno no caseínico (NNC) y nitrógeno no proteico (NNP) muestran que las cuajadas modelo no sufrieron una proteólisis excesiva, siendo los valores de estos parámetros ligeramente inferiores a los obtenidos en las CC. Las diferencias observadas en las CC se pueden explicar por la presencia de las bacterias lácticas que colaboran en la producción de estas fracciones nitrogenadas. Otro parámetro que podría condicionar estas pequeñas diferencias es el pH óptimo de actuación de los enzimas del cuajo. Según nos muestran los electroforegramas de los ensayos realizados sobre caseínas enteras y diferentes fracciones caseínicas aisladas caprinas, éste se sitúa en ~ 5.8 para la hidrólisis de la caseína entera y en 5.8-6.6 y 5.8-6.2 para las α_{s1} y β -Cn, respectivamente (Capítulo III). El pH que desarrolló la CC se mantuvo durante un período de tiempo más prolongado en el intervalo óptimo de actuación de los enzimas del cuajo sobre los substratos caseínicos, mientras que la CLF pasó rápidamente del pH óptimo a un pH más ácido. Así las condiciones de pH que se dan en las CC parecen ser teóricamente más favorables a la proteólisis que las que presenta las CLF.

Fox (1970) mostró que las micelas de caseína preparadas con un bajo contenido en complejo fosfato cálcico coloidal (CFCC) eran más susceptibles a la proteólisis que las micelas intactas. Una bajada brusca de pH, como ocurre en el método propuesto por Mabbit y col. (1955), puede solubilizar hasta un 50% del CFCC durante el proceso de desuerado (O'Keeffe y col., 1975). Esto también ocurre en la producción de cuajadas de tipo ácido,

teniendo como consecuencia una desmineralización parcial de la cuajada. Los datos obtenidos para los contenidos en calcio y fósforo (Tabla 17) en los dos tipos de cuajadas fueron idénticos, indicando que las micelas de caseína no sufrieron desmineralización alguna.

Los valores encontrados de plasmina residual en estas cuajadas fueron comparables a los obtenidos en la CC.

Los patrones electroforéticos obtenidos por PAGE-urea de la fracción proteica insoluble fueron idénticos a los presentados en la CC (Figura 85, carreras 1 y 2) no observándose una proteolisis precoz o excesiva en las cuajadas de acidificación química. Estos resultados confirman que el enzima coagulante incorporado en las cuajadas fue aproximadamente el mismo en ambos tipos y que la CLF no sufrió fenómenos de desmineralización que la hicieran más vulnerable a la proteolisis. Las fracciones caseínicas β y α_2 aparecieron casi intactas como corresponde a un queso fresco justo después del salado, aunque el producto proteolítico β -I fue visible formándose en muy pequeñas concentraciones.

V.2.2.2. Quesos obtenidos por acidificación química y libres de coagulantes (CLFC)

La producción de este tipo de queso se realizó integrando las técnicas de O'Keeffe y col. (1975, 1977) para la producción de quesos libres de fermentos y coagulantes, tal y como se describe en el apartado correspondiente de materiales y métodos (Capítulo II).

El uso de estas dos técnicas nos permite fabricar quesos donde el único sistema proteolítico importante a considerar es la proteasa alcalina de la leche o plasmina.

La Tabla 17 muestra los resultados de composición para este tipo de queso y para una CC. De nuevo como ocurrió para las CLF, las diferencias observadas se deben a una mayor retención de agua. Sin embargo, en este tipo de cuajada este fenómeno se acentuó, quizás debido al uso de la pepsina porcina que da geles de poca consistencia y así difíciles de trabajar, arrastrando en el suero de quesería proteína y grasa (Green y Foster, 1974). Estos resultados concuerdan con los obtenidos por O'Keeffe y col. (1978).

La cuantificación de los enzimas coagulantes en la cuajada modelo mostró que la pepsina porcina fue inactivada en su totalidad en las condiciones ensayadas. La pepsina porcina es muy inestable a pH superiores a 6.0, y por lo tanto menos estable que los enzimas

del cuajo, lo que sugiere que podría ser inactivada totalmente o casi durante el proceso de madurado del queso (Green y Foster, 1974). La técnica utilizada en la producción de CLFC preconizada por O'Keeffe y col. (1977) aprovecha la característica de pH dependencia que presenta la pepsina porcina para eliminarla una vez concluida la coagulación. Sin embargo estos autores observaron por electroforesis la formación de α_{s1} -I, y justificaron estos resultados por la presencia de quimosina o enzimas coagulantes de igual estabilidad en las preparaciones de pepsina utilizadas, aunque no descartaron la posibilidad de la existencia de pepsina porcina residual ya que no realizaron una cuantificación del enzima. Majeed (1985) realizó una serie de experiencias obteniendo quesos tipo Cheddar acidificados con GDL y añadidos de pepsina porcina a diferentes pH. Los resultados mostraron que la cantidad de pepsina porcina retenida en el queso es dependiente del pH de la leche en la formación del gel. Por otra parte los análisis PAGE de los quesos mostraron que al incrementar la pepsina porcina también incrementaba la degradación de la α_{s1} -Cn. Sin embargo los quesos fabricados a pH 6.6 también sufrieron hidrólisis de la α_{s1} -Cn a lo largo de la maduración del queso, sin que se pudiera detectar pepsina residual alguna.

En efecto, parece ser que la degradación que se observa en la α_{s1} -Cn no debe ser atribuída únicamente a los enzimas coagulantes o los enzimas del fermento, como muestra los trabajos de Majeed (1985) y posiblemente otros factores y enzimas estén implicados en este proceso proteolítico. Algunos autores describen la existencia de una proteasa de carácter ácido propia de la leche y de especificidad similar a los enzimas del cuajo al producir productos proteolíticos idénticos a partir de las α_{s1} y β -Cn (Kaminogawa y col., 1980; Igoshi y Arima, 1993).

El estudio electroforético realizado en PAGE-urea (Figura 85, carreras 1 y 4) de la CLFC mostró un patrón muy similar a la CC, excepto en que en la CLFC no se observó el polipéptido β -I, quizás debido a la desnaturalización del enzima coagulante. El péptido de degradación para κ -Cn apareció en las CLFC pero con una intensidad inferior a la presentada en las CC.

V.2.2.3. Efecto de la presurización en las CLF y CLFC

Las condiciones de presurización (temperatura, presión, tiempo, etc.) fueron escogidas en base a experiencias preliminares que nos asegurasen un descenso importante en el número de microorganismos, y por otra parte no afectasen las actividades enzimáticas, principalmente a la de los enzimas coagulantes y plasmina.

La Figura 86 muestra dos de estas experiencias preliminares donde se presurizó cuajo animal, quimosina y pepsina bovinas en diferentes condiciones de presión (400, 450 y 500 MPa) a 2 y 10°C durante 10 min. La valoración de actividad enzimática se realizó midiendo el tiempo de coagulación por el método de Berridge modificado por Collin y col. (1977). Las gráficas dan a conocer que los tratamientos de presurización realizados no afectaron la actividad enzimática de la pepsina. La actividad enzimática de la quimosina se vio afectada a partir de los 450 MPa a 10°C y 500 MPa a 2°C. El cuajo de ternero fue la preparación enzimática más afectada por la presión a las dos temperaturas estudiadas. Sin embargo la diferencia entre la preparación enzimática control (sin presurizar) y la presurizada fue escasa cuando se realizó a 400 MPa y a 2°C, condiciones que se utilizaron posteriormente para presurizar el queso. Parece ser que la presurización tiene un efecto muy limitado sobre la pepsina y quimosina bovinas de forma aislada, pero cuando estos dos enzimas son presurizados conjuntamente, algún tipo de relación o reacción debe ocurrir entre ambos ya que la solución final pierde actividad.

La Tabla 18 muestra los resultados referentes a la actividad enzimática de la plasmina obtenidos de dos experiencias donde se presurizó leche de cabra a 400 y 500 MPa a 2°C, durante 10 min.

En las condiciones de presurización ensayadas la actividad enzimática correspondiente a la plasmina caprina no tuvo modificación alguna, por lo que se decidió utilizar las condiciones de 400 MPa, 2°C y 10 min.

Otros resultados obtenidos en la Unidad de Tecnología de los Alimentos muestran que estas condiciones de presurización son capaces de reducir los recuentos microbiológicos, realizados sobre VRBG (*Red Bile Glucose Agar*) de un queso fresco inoculado con 10^7 - 10^8 UFC/g de *E. coli*, a niveles de no detección, y sobre PCA (*Plate Count Agar*) a 10^2 UFC/g, siendo los microorganismos termorresistentes, algún *Micrococcus* y *Lactobacillus*, los

géneros más representativos encontrados y que se mostraron resistentes a las condiciones de presurización (Capellas y col., en prensa).

Los análisis microbiológicos realizados sobre las CLF y CLFC presurizados (CLFP y CLFCP, respectivamente) se resumen en la Tabla 19.

La leche de fabricación contuvo 100 UFC/mL como máximo, y al final de la fabricación y antes de presurizar, los quesos experimentales contuvieron 1300-1500 UFC/g. El aumento en el número de microorganismos puede ser explicado por el efecto de la concentración realizado en la transformación de leche a queso y, también a algún tipo de contaminación externa que pudiera darse en las diferentes etapas de la fabricación.

Después del tratamiento de presurización los análisis microbiológicos dieron recuentos en el límite de detección en medio VRBG y 100 UFC/g en medio PCA. Aunque no se realizó identificación ni caracterización de las colonias que crecieron en medio PCA, éstas deberían pertenecer a formas esporuladas y baroresistentes. La resistencia de los microorganismos a la presión es muy variable siendo las células en fase exponencial de crecimiento las menos resistentes. La temperatura, el pH y la composición del medio, influyen significativamente la resistencia a la presión. Las esporas bacterianas son mucho más resistentes a la presión que las células vegetativas, y la presurización no las destruye de forma significativa. Se sabe por ejemplo que el tratamiento de la leche cruda a 1030 MPa y a 10°C durante 10 min no destruye las esporas (ver Hoover y col., 1989).

Las bacterias gram negativas como *Campylobacter jejuni*, *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium* y *Yersinia enterocolitica* son destruidas a partir de 300 MPa, las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* y *Candida utilis* exigen al menos 400 MPa y las bacterias gram positivas como *Micrococcus*, *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus faecalis* al menos 600 MPa (Cheftel, 1991).

Quizás sea necesaria la adición de antibióticos si queremos obtener quesos donde los microorganismos que sobreviven a los tratamientos de pasteurización y presurización no crezcan o se desarrollen. El inconveniente principal que presenta la adición de antibióticos es la imposibilidad de que los quesos puedan ser examinados organolépticamente debido a su posible efecto tóxico.

En este momento se están realizando múltiples trabajos necesarios para determinar la cinética de destrucción de diversas esporas por tratamientos combinados presión-temperatura,

para precisar la influencia del medio (pH, contenido en agua, en azúcares, en sales, presencia de diferentes aditivos alimentarios o de ciertos gases). En nuestro caso en particular, la adición de lisozima en la leche de fabricación podría substituir los antibióticos ya que facilita la destrucción de por ejemplo *Bacillus cereus* durante la presurización, probablemente porque la lisozima provoca la germinación de una parte de las esporas. Sería también interesante estudiar el efecto de ciclos repetidos de presurización-despresurización para hacer germinar las esporas y así eliminar estos microorganismos residuales.

La Tabla 17 muestra los resultados de composición obtenidos para las cuajadas presurizadas. En general la composición de las cuajadas presurizadas fue similar a las no presurizadas.

El análisis de recuperación de enzimas coagulantes dio negativo de nuevo en las CLFCP, como era de esperar, y en las CLFP el valor de actividad enzimática se redujo sensiblemente respecto a la CLF aproximándose así al valor encontrado para la CC. En ambos tipos de cuajadas la presurización no afectó la actividad enzimática de la plasmina.

Los patrones electroforéticos correspondientes a las cuajadas presurizadas fueron idénticos a las no presurizadas (Figura 85, carreras 3 y 5).

Los resultados obtenidos en estas producciones muestran que la presurización es una técnica válida en la producción de cuajadas sin flora bacteriana. Sin embargo el uso de esta técnica combinada con diferentes aditivos de calidad alimentaria o bien el uso de ciclos repetidos de presurización, podría suprimir el uso de los antibióticos y abriría nuevos caminos en el estudio de las características sensoriales de estos quesos experimentales.

CONCLUSIONES
