



Universidad de Burgos

Departamento de Biotecnología y Ciencia de los Alimentos

Área de Bioquímica y Biología Molecular

Aplicación de la electroforesis capilar para el análisis
y seguimiento del grado de maduración de quesos
de oveja y mezcla de la provincia de Burgos

Tesis Doctoral de

Silvia M^a Albillos García

2003

ISBN: 978-84-96394-48-3
Depósito Legal: BU.-200-2007

Tesis Doctoral para optar al Grado de Doctora en Ciencias Químicas
realizada por:

Dña. SILVIA M^a ALBILLOS GARCÍA

Directoras de la Tesis Doctoral

**Dra. Dña. Natividad ORTEGA
SANTAMARÍA**

Profesora Titular de Universidad
Área de Bioquímica y Biología Molecular
Departamento de Biotecnología y
Ciencia de los Alimentos
Universidad de Burgos

**Dra. Dña. M^a Dolores BUSTO
NÚÑEZ**

Profesora Titular de Universidad
Área de Bioquímica y Biología Molecular
Departamento de Biotecnología y
Ciencia de los Alimentos
Universidad de Burgos

Deseo expresar mi profundo agradecimiento:

Al Dr. Manuel Pérez Mateos, por permitirme realizar la Tesis Doctoral en su área y admitirme en su grupo de investigación.

A mis directoras de Tesis, la Dra. Natividad Ortega Santamaría y la Dra. M^a Dolores Busto Núñez por la planificación y dirección de este trabajo, por el aliento y la ayuda prestados, que han hecho posible la culminación del mismo.

A la empresa Quesos Frías S.A. por su colaboración prestada al ofrecernos muestras de leche y queso.

Al Dr. Forina, por su amable intercambio de correos electrónicos para responder con prontitud a las dudas que le iba planteando.

A los compañeros del área de Bioquímica y Biología Molecular y a los que no son del área, por su amistad, por su apoyo y por su alegría que ha creado un ambiente en el trabajo que ha permitido que juntos vivamos muy buenos momentos.

A todos mis amigos, que no han dejado que cayera en el desaliento en ningún momento, por su apoyo moral y acompañamiento en este camino.

Y especialmente a mi familia, a quien dedico este trabajo.

*“No basta con adquirir
sabiduría, es preciso
además saber usarla”*

(Cicerón)

ÍNDICE DE CONTENIDOS

	<u>Pág.</u>
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. OBJETIVOS.....	7
1.2. PROTOCOLO EXPERIMENTAL.....	11
2. FUNDAMENTOS TEÓRICOS.....	15
2.1. CASEÍNAS DE LA LECHE.....	17
2.1.1. Composición global de la fracción proteica.....	20
2.1.2. Composición de la fracción caseínica.....	22
2.1.3. Estructura y propiedades de las caseínas.....	24
2.1.3.1. Caseína α_{s1}	24
2.1.3.2. Caseína α_{s2}	28
2.1.3.3. Caseína β	30
2.1.3.4. Caseína γ	32
2.1.3.5. Caseína κ	33
2.1.4. Modificaciones de las caseínas durante el proceso de maduración de quesos.....	37
2.1.4.1. Bioquímica de la maduración de quesos.....	37
2.1.4.2. Análisis y cuantificación de la <i>proteolisis</i> en quesos.....	42
2.2. ELECTROFORESIS CAPILAR (EC).....	49
2.2.1. Fundamentos de la electroforesis capilar.....	52
2.2.1.1. Modalidades de EC.....	55
2.2.2. Electroforesis capilar zonal (ECZ).....	56
2.2.2.1. Electroósmosis.....	59
2.2.2.2. Parámetros de la separación en ECZ.....	60
2.2.2.3. Inyección de la muestra en el capilar.....	64
2.2.3. Separación de proteínas mediante EC.....	66
2.3. DISEÑO DE EXPERIMENTOS.....	69
2.3.1. Diseño factorial 2^k	72

2.3.1.1.	Diseño 2^3	73
2.3.1.2.	Diseño general 2^k	74
2.3.1.3.	Adición de puntos centrales al diseño 2^k	75
2.3.2.	Diseño de superficies de respuesta.....	75
2.3.2.1.	Diseño para ajustar el modelo de primer orden.....	76
2.3.2.2.	Diseño para ajustar el modelo de segundo orden.....	77
2.3.3.	Aplicación del diseño experimental en la electroforesis capilar.....	78
2.4.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO MULTIVARIANTE.....	81
2.4.1.	Modelos de regresión.....	84
2.4.2.	Regresión lineal multivariante por mínimos cuadrados.....	86
2.4.3.	Regresión por mínimos cuadrados parciales (PLS).....	87
2.4.4.	Regresión lineal sobre componentes principales (PCR).....	89
3.	MATERIAL Y MÉTODOS.....	93
3.1.	ELECTROFORESIS CAPILAR.....	95
3.1.1.	Descripción de los capilares.....	97
3.1.2.	Soluciones tampón.....	98
3.1.3.	Preparación de la muestra.....	99
3.1.4.	Condiciones de separación.....	100
3.1.4.1.	Capilar de sílice fundida.....	100
3.1.4.1.1.	Electroforesis capilar en zona libre sin aditivo.....	100
3.1.4.1.2.	Electroforesis capilar en zona libre con HPMC.....	100
3.1.4.2.	Capilar neutro hidrofílicamente recubierto.....	101
3.2.	MUESTRAS DE CASEÍNAS Y PROCESOS DE OBTENCIÓN.....	103
3.2.1.	Caseínas purificadas.....	105
3.2.2.	Precipitación isoelectrica de las caseínas de la leche.....	106
3.2.3.	Extracción de caseínas del queso.....	107
3.3.	HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE CASEÍNAS.....	109
3.3.1.	Reactivos.....	111
3.3.2.	Hidrólisis enzimática de caseínas purificadas.....	112
3.3.3.	Hidrólisis enzimática de la fracción caseínica de los quesos.....	113

3.4. ESTUDIO QUIMIOMÉTRICO.....	115
3.4.1. Aplicación del diseño de experimentos.....	117
3.4.2. Aplicación del análisis estadístico multivariante.....	119
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	123
4.1. OPTIMIZACIÓN DE LA SEPARACIÓN DE CASEÍNAS POR EC.....	125
4.1.1. Capilar de sílice fundida.....	128
4.1.2. Capilar neutro hidrofílicamente recubierto.....	155
4.1.3. Estudio comparativo del potencial analítico de ambos capilares.....	160
4.1.3.1. Linealidad de la respuesta frente a la concentración de muestra.....	161
4.1.3.2. Repetitividad.....	164
4.1.3.3. Análisis de muestras de leche.....	168
4.2. ANÁLISIS DE LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE CASEÍNAS MEDIANTE EC.....	177
4.2.1. Hidrólisis de caseínas por plasmina.....	180
4.2.2. Hidrólisis de caseínas por quimosina o renina.....	188
4.2.3. Hidrólisis de caseínas por Neutrase®	199
4.3. ESTUDIO DE LA MADURACIÓN DE QUESOS MEDIANTE EC.....	209
4.3.1. Análisis mediante electroforesis capilar del estado de maduración de quesos de oveja.....	212
4.3.2. Análisis mediante electroforesis capilar del estado de maduración de quesos de mezcla.....	226
4.3.3. Predicción del tiempo de maduración de quesos de oveja y mezcla usando análisis estadístico multivariante.....	239
4.3.3.1. Correlación multivariante en quesos de oveja.....	240
4.3.3.2. Correlación multivariante en quesos mezcla.....	250
5. CONCLUSIONES.....	259
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	267

1. INTRODUCCIÓN

La producción quesera mundial ha crecido sostenidamente durante los últimos 23 años, superando en el año 2000 los 16 millones de toneladas de los que un 52,15% ha sido generado en el continente europeo. Desde 1980, el consumo de queso en el mundo ha ido aumentando a una tasa anual del 2% correspondiendo el mayor incremento al consumo de quesos “especiales” frente a los tradicionales obtenidos a partir de leche de vaca (Manterola, 1999).

La producción de quesos es un proceso muy antiguo, no obstante, el conocimiento de las reacciones que se suceden durante su manufactura es relativamente reciente. Estas reacciones enzimáticas y fisicoquímicas, que ocurren durante la maduración no se conocen todavía en profundidad, pero determinan las características de sabor, textura y apariencia del producto final (Fernández del Pozo *et al.*, 1988). A pesar de ello, tanto desde el punto de vista industrial como científico es muy interesante llegar a controlar el proceso, y si es posible a acelerarlo (Fernández-García y López-Fandiño, 1994). Desde el punto de vista económico supondría un ahorro considerable al permanecer los quesos menos tiempo inmovilizados (Kirby y Law, 1987). Para ello, resulta imprescindible el seguimiento e identificación de los principales componentes implicados en el proceso de maduración y que, en definitiva, son los responsables principales de la calidad final.

De todo lo expuesto, es evidente que la industria láctea esté interesada en el desarrollo de índices de maduración y calidad del queso que podrían complementar a la evaluación sensorial, siempre que se reconozca que dichos índices por sí solos no pueden usarse para evaluar la calidad (Ibañez y Barcina, 1994). Para la mayoría de las distintas variedades de quesos curados y semicurados, la proteólisis es uno de los índices de maduración más comúnmente utilizados (Farkye y Fox, 1990) y es útil en la evaluación de los

cultivos *starter* aplicados (Fox, 1989) ya que contribuyen en gran medida al aroma y textura desarrollados en los quesos (Guinee y Wilkinson, 1992).

Para el seguimiento de la maduración mediante la cuantificación de la proteólisis se han propuesto varios métodos, basados en el fraccionamiento y caracterización de los diferentes productos nitrogenados. Las caseínas y sus productos de hidrólisis han sido tradicionalmente analizados mediante diferentes técnicas analíticas: electroforesis en gel (Thompson *et al.*, 1964; Schmidt y Koops, 1965), isoelectroenfoque (Addeo *et al.*, 1983; Bovenhuis y Vertege, 1989; Braun *et al.*, 1990) y cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) de intercambio iónico (Andrews *et al.*, 1985), de interacciones hidrofóbicas (Chaplin, 1986) y en fase reversa (Visser *et al.*, 1991).

En los últimos años la electroforesis capilar (EC) se ha presentado como una técnica alternativa a la electroforesis tradicional en gel, y complementaria a la cromatografía líquida (HPLC) en el análisis de proteínas (Werner *et al.*, 1993). Las principales razones para el éxito de esta técnica han sido su alta eficacia y resolución, amplio rango de aplicaciones, corto tiempo de análisis, bajo consumo de disolventes y, además, el menor precio de los capilares utilizados en EC en comparación con las columnas de HPLC.

Existe un gran número de parámetros experimentales que afectan claramente a la selectividad y al rendimiento del método de electroforesis capilar. Convencionalmente, en el estudio de la separación y análisis de caseínas mediante EC, se determina el impacto de cada uno de estos parámetros manteniendo los demás constantes y se evalúa la respuesta en cuanto a resolución o tiempo de análisis. Esta táctica, aunque ampliamente utilizada, implica un gran número de análisis independientes. A diferencia de la metodología anterior, el “diseño de experimentos”, permite que varios factores puedan ser analizados de forma simultánea. Diseñar los experimentos previamente, tiene la ventaja de que reduce considerablemente el número de ensayos, mejora las posibles interpretaciones estadísticas y disminuye el tiempo total de análisis. Además, una evaluación estadística de los resultados de un

diseño de experimentos puede ofrecer información adicional acerca de la interacción entre los distintos factores (Massart *et al.*, 1988; Altria *et al.*, 1995).

Por otra parte, los métodos de correlación de tiempos de maduración con porcentajes residuales de caseínas o péptidos liberados a medida que avanza el proceso de hidrólisis, ofrecen en general pobres coeficientes de ajuste y escasa capacidad de predicción. La tendencia reciente, favorecida por la aparición de diversos paquetes estadísticos, es emplear métodos multivariantes que permiten agrupar las muestras en categorías, y ofrecen modelos de regresión capaces de cometer errores muy bajos en predicción, a su vez con buenos ajustes lineales a la matriz de datos (Brereton, 1990).

De acuerdo con lo expuesto, este trabajo de investigación se ha centrado en tres aspectos fundamentales:

- i) Optimización de las condiciones de separación de α_s -, β - y κ -caseína aplicando la técnica de electroforesis capilar (EC).
- ii) Identificación mediante EC de los productos de hidrólisis liberados por la acción sobre caseínas purificadas de enzimas de especial interés en la industria láctea: plasmina, renina y Neutrase[®].
- iii) Seguimiento electroforético de la proteólisis primaria en quesos de oveja y quesos mezcla a lo largo del tiempo de maduración. Predicción del grado de maduración de muestras de los distintos tipos de quesos.

En este sentido, se han perseguido los objetivos concretos recogidos en el subapartado 1.1 y se ha desarrollado el plan de trabajo indicado en el subapartado 1.2.

1.1. Objetivos

La realización del presente trabajo de Tesis Doctoral partió del planteamiento de los siguientes objetivos:

1. Analizar por electroforesis capilar mediante capilar de sílice fundida y capilar neutro hidrofílicamente recubierto, las caseínas purificadas α_s , β y κ .
 - 1.1. Optimizar las condiciones de separación aplicando la metodología de diseño de experimentos.
 - 1.2. Identificar y cuantificar las diferentes variantes genéticas de las caseínas bovinas.
 - 1.3. Estudiar el potencial analítico de ambos capilares: linealidad de la respuesta frente a la concentración, repetitividad y análisis de muestras de leche.
2. Realizar el estudio y seguimiento por EC de la acción proteolítica de enzimas de interés en la industria láctea (plasmina, renina y Neutrase[®]), sobre las caseínas de vaca purificadas.
3. Analizar mediante EC la fracción proteica insoluble a pH 4,6 de muestras de quesos de oveja y quesos mezcla (vaca y oveja) a diferentes tiempos de maduración.
 - 3.1. Predecir el grado de maduración de quesos de oveja y mezcla aplicando análisis multivariante.

De acuerdo con los objetivos señalados, se diseñó el plan experimental descrito en el apartado siguiente.

1.2. Protocolo Experimental

La realización de este trabajo se llevó a cabo de acuerdo con el siguiente protocolo experimental:

1. Separación de caseínas mediante electroforesis capilar

1.1. Electroforesis capilar en zona libre con el capilar de sílice fundida.

1.1.1. Optimización de los siguientes parámetros mediante diseño de experimentos:

- i) pH del tampón de separación
- ii) Voltaje aplicado
- iii) Concentración de urea en el tampón de separación
- iv) Concentración de NaOH para regenerar el capilar
- v) Concentración de hidroxipropilmetil celulosa (HPMC)

1.1.2. Estudio de la linealidad de la respuesta frente a la concentración y de las condiciones de repetitividad.

1.1.3. Análisis mediante EC en condiciones optimadas de caseínas procedentes de muestras de leche de vaca y oveja.

1.2. Electroforesis capilar con el capilar neutro hidrofílicamente recubierto.

1.2.1. Optimización de los siguientes parámetros mediante diseño de experimentos:

- i) Voltaje aplicado
- ii) Temperatura

1.2.2. Estudio de la linealidad de la respuesta frente a la concentración y de las condiciones de repetitividad.

1.2.3. Análisis mediante EC en condiciones optimadas de caseínas procedentes de muestras de leche de vaca y oveja.

2. Análisis de la hidrólisis enzimática de caseínas mediante EC

- 2.1. Hidrólisis con plasmina.
- 2.2. Hidrólisis con quimosina.
- 2.3. Hidrólisis con Neutrase[®].

3. Seguimiento mediante EC del proceso de maduración de quesos

- 3.1. Análisis mediante EC de muestras de queso de oveja de diferentes tiempos de maduración.
 - 3.1.1. Utilización del capilar de sílice fundida.
 - 3.1.2. Utilización del capilar neutro.
- 3.2. Análisis mediante EC de muestras de queso mezcla de diferentes tiempos de maduración.
 - 3.2.1. Utilización del capilar de sílice fundida.
 - 3.2.2. Utilización del capilar neutro.
- 3.3. Análisis estadístico multivariante de los electroferogramas de las distintas muestras de queso. Obtención de modelos de regresión.

2. *FUNDAMENTOS TEÓRICOS*

2.1. Caseínas de la Leche

Las proteínas de la leche son las proteínas animales que desde hace más tiempo y en mayor cantidad consume el hombre (Braconnot, 1830). Así mismo, debido a la facilidad con que se las puede aislar de la leche cruda, también son las proteínas mejor estudiadas e incluso se conoce la estructura primaria de su casi totalidad. Pero como estas proteínas presentan una gran diversidad de estructuras y propiedades físico-químicas y existen grandes variaciones entre especies, su descripción comparativa es muy complicada.

La leche de vaca es la mejor conocida y su producción es la más importante, porque se utiliza para reemplazar la leche materna y como alimento proteico esencial de los adultos. Además, la leche y sus derivados entran en la composición de numerosos alimentos domésticos o industriales y la citada tendencia sigue aumentando (Cheftel *et al.*, 1989). Asimismo, este sector se benefició del desarrollo de nuevas técnicas de fraccionamiento y transformación que mejoraron considerablemente las condiciones del consumo, conservación o incorporación.

Numerosas citas bibliográficas confirman la importancia de los estudios realizados sobre las proteínas de la leche. Los resultados de estos trabajos potencian el interés que actualmente suscitan las proteínas de la leche en el plano nutricional, biológico y tecnológico. No hay que olvidar que la producción lechera y sus industrias derivadas representan el sector más importante de la economía agroalimentaria en la Unión Europea.

2.1.1. COMPOSICIÓN GLOBAL DE LA FRACCIÓN PROTEICA

El contenido medio de proteínas en la leche de vaca es de 30-35 g/l (2,5%), lo que representa el 95% del nitrógeno total (Fig. 2.1). Para la leche de otras especies estos valores difieren, como es el caso de la leche de oveja que tiene un contenido proteico mayor (6%) (Richardson *et al.*, 1974). En torno al 80% de las proteínas, se encuentran bajo la forma de complejos macromoleculares, que se conocen con el nombre de micelas (Farrell *et al.*, 1997). Las caseínas están presentes fundamentalmente en esta forma y contienen hasta un 8% de constituyentes minerales (Ribadeau-Dumas, 1981). Entre estos últimos el calcio micelar representa el 27% del calcio total de la leche de vaca, con una concentración de 30 mM (1,2 g/l) frente a 50 mM para la leche de oveja (Richardson *et al.*, 1974). Las caseínas, a causa de su estructura macromolecular tan particular, son fácilmente aislables por centrifugación o precipitación isoelectrica a pH 4,6.

El contenido caseínico en la leche de oveja es de 4,6% en caseínas γ , 50,4% en β -caseína, 10,8% en κ -caseína y 34,2% en α_s -caseínas (Law *et al.*, 1992) por lo que se comprueba que tiene mucha menos cantidad de caseína α_s y bastante más β -caseína que la leche bovina.

La fracción no sedimentable, llamada “proteínas solubles” o “proteínas del lactosuero”, está constituida por proteínas globulares tales como la β -lactoglobulina y α -lactoalbúmina, así como inmunoglobulinas, seroalbúmina, enzimas, etc.

Un aspecto característico de las proteínas de la leche y, por tanto, también de las caseínas, es la heterogeneidad. Si las proteínas de la leche se someten a fraccionamiento electroforético (sobre gel de almidón o de poliacrilamida), en presencia de un agente disociante (urea) o reductor (2-mercaptoetanol), se pueden identificar varias fracciones. Una de las razones es que todas estas proteínas presentan polimorfismo genético.

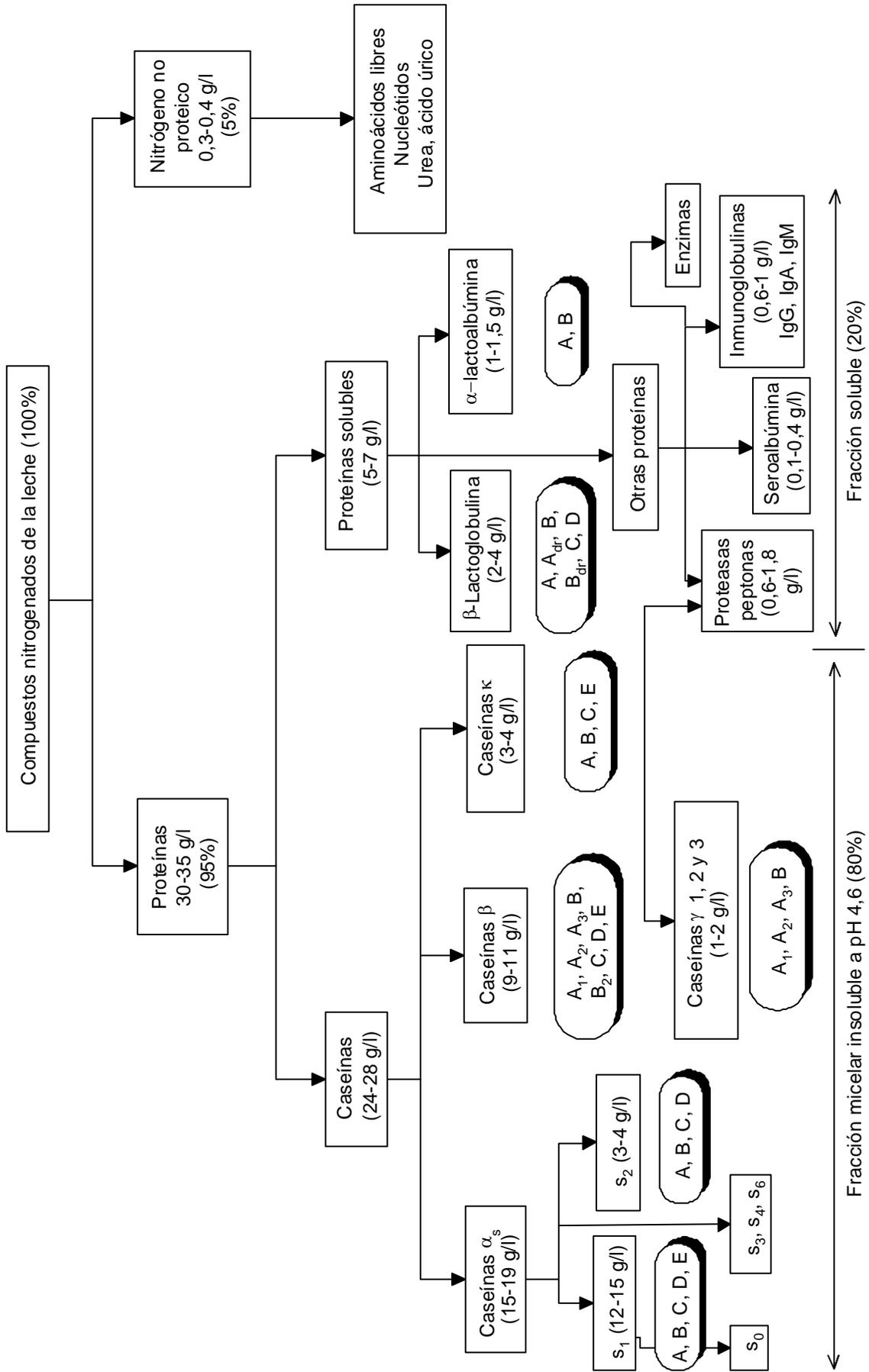


Fig. 2.1. Composición de la fracción nitrogenada de la leche de vaca. (Modificado de Cheftel *et al.*, 1989).

Para las variantes genéticas identificadas en la leche de vaca, las mutaciones por delección que llevan a la pérdida de aminoácidos tienen lugar en tan solo dos casos (α_{s1} A y α_{s2} D), mientras que para el resto de variantes, las mutaciones genéticas más frecuentes llevan a sustituciones de aminoácidos (Ng-Kwai-Hang y Grosclaude, 1992). Junto con el polimorfismo estructural, se ha encontrado cierta variabilidad alélica cuantitativa que lleva consigo diferencias en la expresión de las proteínas. Este fenómeno se ha descrito en vaca (Jakob y Puhán, 1992) y en cabra (Martin, 1993).

2.1.2. COMPOSICIÓN DE LA FRACCIÓN CASEÍNICA

La leche bovina contiene cuatro caseínas diferentes: α_{s1} , α_{s2} , β y κ caseína. Estas proteínas poseen un carácter ácido, ya que son ricas en ácido glutámico y aspártico (Tabla 2.1). Esta composición en aminoácidos, les confiere una hidrofobicidad media, ligeramente superior a la de la mayoría de las proteínas globulares. De hecho, como consecuencia de esta propiedad las caseínas pueden asociarse muy fácilmente en complejos de elevada masa molar.

En la caseína β , el contenido en prolina es acusadamente alto. Este aminoácido está repartido bastante regularmente a lo largo de la cadena peptídica, lo que hace improbable la presencia de estructuras ordenadas (hélice α o estructuras β), en cantidades apreciables. A su vez, es destacable que la caseína α_{s1} y la caseína β , no poseen cisteína, mientras que la caseína α_{s2} y sus derivados, así como la caseína κ contienen dos residuos por molécula.

La caseína κ contiene una parte glucídica compuesta de galactosa, N-acetilgalactosamina y ácido N-acetilneuramínico unida a la proteína mediante enlace O-glicosídico (Swaisgood, 1992).

Tabla 2.1. Composición de aminoácidos de las caseínas de la leche de vaca (Cheftel *et al.*, 1989).

Aminoácidos	CASEÍNAS			
	α_{s1} B r/mol ^a	α_{s2} A r/mol	β A ₂ r/mol	κ B r/mol
Asp/Asn	7/8	4/14	4/5	4/7
Tre	5	15	9	14
Ser	8	6	11	12
Ser P	8	11 ^b	5	1
Glu/Gln	24/15	25/15	18/21	13/14 ^c
Pro	17	10	35	20
Gli	9	2	5	2
Ala	9	8	5	15
1/Cis-SH	0	0	0	0
Cis/2	0	2	0	2
Val	11	14	19	11
Met	5	4	6	2
Ile	11	11	10	13
Leu	17	13	22	8
Tir	10	12	4	9
Fen	8	6	9	4
Lis	14	24	11	9
His	5	3	5	3
Arg	6	6	4	5
Trp	2	2	1	1
Total	199	207	209	169

^a Número de residuos por molécula

^b Valor para el compuesto minoritario más fosforilado (α_{s4}) de la familia α_{s2}

^c Sobre 13 residuos de Glu, uno de ellos está en posición N-terminal bajo forma ciclada (piroglutámico)

Por otra parte, algunas caseínas (γ_1 , γ_2 , γ_3), resultan de una proteólisis post-translacional de la caseína β debida, probablemente, a la acción de mínimas cantidades de plasmina de origen sanguíneo. Las proteasas pectonas encontradas en la fracción soluble constituyen la parte peptídica complementaria resultante de esta proteólisis limitada (Fig. 2.1).

Algunas proteínas, como resultado de modificaciones post-translacionales pueden tener varios niveles de fosforilación (caseína α_{s2}) (Brignon *et al.*, 1977) o de glicosilación (caseína κ) (Jollès y Fiat, 1979). En efecto, todas las caseínas de vaca admiten grupos fosfato en cantidad variable en el ámbito de los residuos de serina y en algún caso de treonina. Así, los constituyentes α_{s1} B, β A, y κ A ó B contienen respectivamente 8, 5 y 1 residuos fosfoseril y la α_{s2} contiene 13 (West, 1986). La familia de las caseínas α_{s2} A muestra una gran variabilidad de niveles de fosforilación (10 a 13 residuos fosforil por molécula) que tanto pueden proceder de la variabilidad de la actividad de fosfoquinasas, como de las fosfatasas. Las serinas admiten fosforilación en el ámbito de sitios específicos definidos por secuencias codificadas (Mercier, 1981).

2.1.3. ESTRUCTURA Y PROPIEDADES DE LAS CASEÍNAS

2.1.3.1. Caseína α_{s1}

La secuencia completa de aminoácidos de la caseína α_{s1} de vaca (Fig. 2.2) fue determinada por Mercier *et al.* en el año 1971. Al igual que en el resto de caseínas, la localización de las cargas y de las cadenas laterales hidrófobas es muy irregular. Esto le confiere a la molécula un comportamiento dipolar con un polo globular mucho más hidrófobo y un polo cargado. Se

pueden establecer así tres trozos hidrófobos, comprendidos entre los residuos 1-44, 30-113 y 132-199 y una parte muy fosforilada (residuos 41-80), que representa la casi totalidad de la carga negativa (-20,6) a pH 6,6. En esta región se detecta también la presencia de un noveno grupo ortofosfato en la caseína α_{s1} 9P (anteriormente denominada α_{s0}) y α_{s1} D.



(1) En la caseína α_{s0} , el residuo seril 41 está fosforilado.

Fig. 2.2. Estructura primaria de la caseína α_{s1} B bovina (Mercier *et al.*, 1971).

Se admite desde hace mucho tiempo que las caseínas presentan una estructura poco ordenada, porque son pobres en hélice α . Actualmente se considera que la caseína α_{s1} posee una parte de su molécula en estructura β y otra en curvatura β (giros β). Sin embargo, la estructura secundaria es lo

suficientemente abierta para permitir una entrada más fácil de proteasas en la molécula que en el caso de una proteína globular como es la α -lactoalbúmina.

Adicionalmente cierto número de determinaciones físicas, en presencia o no de agentes desnaturizantes o disociantes, indican claramente que la caseína α_{s1} de vaca no se comporta como una proteína globular. Esto se debe, sin duda, a la importancia de los grupos ácidos, fuertemente solvatados, que confieren a la molécula su comportamiento de proteína “naturalmente desnaturizada”.

En la α_{s1} 9P (caseína α_{s0}) la estructura primaria es exactamente igual a la de la caseína α_{s1} salvo, que el residuo seril 41 está fosforilado.

En la actualidad se conocen cinco variantes genéticas (A, B, C, D, E) para la caseína α_{s1} en leche de vaca (Ng-Kwai-Hang y Grosclaude, 1992; de Jong *et al.*, 1993).

Respecto a las caseínas α_s de leche de oveja, ya en 1976, Richardson y Creamer aislaron y caracterizaron lo que ellos denominaban caseína α_{s1} , α_{s2} y α_{s3} y a su vez determinaron sus pesos moleculares y la composición en aminoácidos de cada proteína. Comparando su composición se comprueba que son similares a la caseína α_{s1} de vaca, pero difieren especialmente en el contenido en Ala y Pro.

En 1966, King detectó la variante Welsh, denominada D por Chianese *et al.* (1996) en un intento de homogeneizar denominaciones con las de vaca. Esta variante no se encuentra presente en algunos rebaños como Dorset, Manchega y Segureña (Amigo *et al.*, 2000) siendo sin embargo frecuente en oveja Sarda.

Ferranti *et al.* (1995) demostraron que cada variante de α_{s1} de oveja (A, C y D), consistía en una mezcla de dos especies moleculares de 191 y 199 residuos, diferenciándose ambas en la eliminación del fragmento 141-148. También se vio que había heterogeneidad asociada a la fosforilación de la cadena proteica. Tanto para la forma larga como para la corta, la variante A contenía 9, 10 u 11 grupos fosfato, la C 8, 9 ó 10 y la D 6 ó 7.

Actualmente se admite la existencia de 5 variantes genéticas (A, B, C, D y E) en la caseína α_{s1} de oveja, de acuerdo a su velocidad electroforética creciente hacia el cátodo en pH alcalino (Chianese *et al.*, 1996), y detectadas mediante disc-PAGE electroforesis a pH alcalino, isoelectroenfoque en gel, electroforesis en gel en 2 dimensiones e inmunotransferencia con anticuerpos policlonales. Las variantes A, B, C y D han sido también detectadas mediante electroforesis capilar (EC) (Recio *et al.*, 1997d, 1997e). En la población de ovejas italianas estudiada, se vio que las variantes A y E eran poco frecuentes, mientras que las más comunes eran la B y C. La variante D (Welsh) aparecía con una periodicidad intermedia. A su vez, la caseína de cadena larga parece ser más abundante que la de cadena corta (80% frente a un 20%).

La variante α_{s1} A tiene el pI más bajo de todas, por lo que tiene mayor tiempo de migración en (EC) a pH ácido (Recio *et al.*, 1997d). Estos mismos autores a las formas con distinto nivel de fosforilación las denominan I, II y III y deducen el fenotipo en animales homocigóticos mediante la diferente intensidad de los tres picos anteriormente citados obtenidos mediante EC. Para la caseína α_{s1} A se detecta además un pico adicional con tiempo de migración mayor que la κ -caseína.

Más recientemente, aplicando técnicas de isoelectroenfoque en gel de poliacrilamida (PAGIF) y de inmunotransferencia se ha detectado otra variante nueva con genotipo FF en oveja Sarda (Pirisi *et al.*, 1999). En sus estudios, para cada genotipo encontraron 7 compuestos que se corresponden a la proteína completa de 199 residuos, junto a 6 especies que difieren en la delección de los segmentos 141-148 ó 110-117 ó Gln⁷⁸ o por combinación de dichas delecciones (Ferranti *et al.*, 1998). Finalmente parece destacable que la caseína α_{s1} I ovina es menos susceptible de ser atacada por la quimosina que su semejante bovina (Pirisi *et al.*, 1999).

2.1.3.2. Caseína α_{s2}

Esta caseína bovina fue secuenciada en su totalidad por Brignon *et al.* en 1977. De su estructura primaria (Fig. 2.3) se deduce que es la más hidrófila de todas las caseínas (tiene hidrofobicidad próxima a la de las proteínas globulares). Su menor hidrofobicidad se deriva de su alto nivel de fosforilación (10 a 13 residuos fosfoseril/mol) y es por esta razón, la más rica en residuos catiónicos. Los residuos fosfoseril están agrupados en tres polos (residuos 8-16, 56-61 y 129-133) mientras que las partes hidrófobas se limitan a las porciones 160-207 (secuencia del C-terminal) y 90-120 (secuencia central). Esta estructura sugiere que las interacciones electrostáticas son muy importantes y dependen del pH. Presenta así una gran sensibilidad a los iones Ca^{2+} .

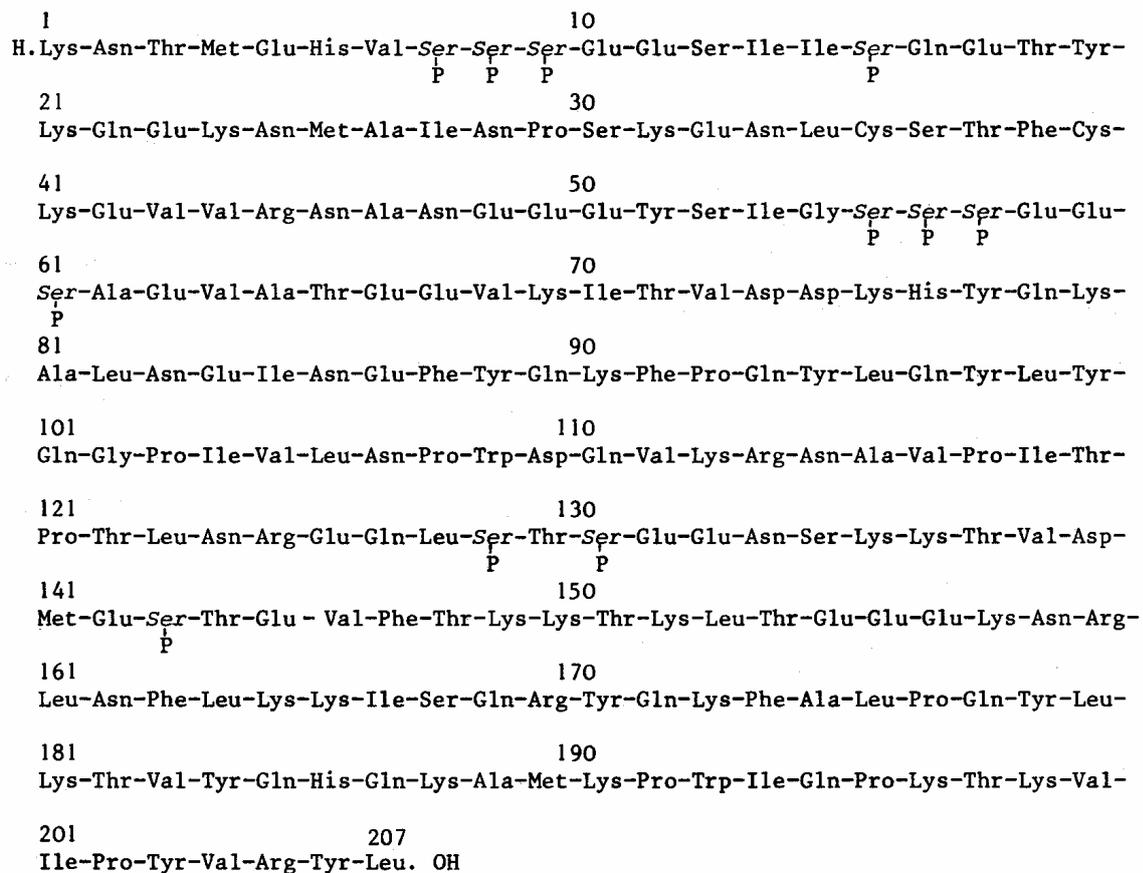


Fig. 2.3. Estructura primaria de la caseína α_{s2} bovina (Brignon *et al.*, 1977). Fosforilación posible de los residuos 3, 31, 66, 72, 130, 138 y 154.

En la actualidad se conocen cuatro variantes genéticas de caseína α_{s2} de vaca (A, B, C y D) (Ng-Kwai-Hang y Grosclaude, 1992; de Jong *et al.*, 1993). La variante D, detectada por Recio *et al.* (1997d) aplicando EC, tiene 9 aminoácidos menos que la A (50-58, 51-59 ó 52-60).

La caseína α_{s2} de vaca se diferencia de la de oveja en que tiene un residuo menos en su secuencia (hay deleción de Asn¹⁵) y 24 mutaciones de aminoácidos. Por tanto, la secuencia completa de la caseína de oveja contiene 208 residuos en la proteína madura (Boisnard y Petrissant, 1985).

La homología existente entre las caseínas α_{s2} de vaca y oveja es muy elevada, del 88%. Ambas tienen el mismo número de sitios potenciales de fosforilación (18 en total) estando situados en el mismo lugar en las dos proteínas: regiones 7-9; 57-59 y 129-131. En el caso concreto de la caseína de oveja hay 14 puntos primarios de posible fosforilación, siendo los 4 restantes secundarios (Ser⁸, Thr³⁸, Ser⁵⁷ y Ser¹²⁹) (Boisnard y Petrissant, 1985).

En 1991, Boisnard *et al.* encontraron dos formas no alélicas de α_{s2} ovina que diferían en la deleción interna de 9 aminoácidos de la cadena madura. Ambas formas, larga y corta, se presentaban dentro de las dos variantes genéticas normales de α_{s2} . Dichas variantes resultaban de la sustitución de Asn⁴⁹ por Asp⁴⁹ y Lys²⁰⁰ por Asn²⁰⁰.

Chianese *et al.* (1993) caracterizaron una nueva caseína α_{s2} en raza Manchega, que se expresa únicamente con una frecuencia del 5,5%, de mayor movilidad en PAGE alcalino y con un valor de pI menor calculado mediante isoelectroenfoque, siendo denominada como variante rápida (F). La α_{s2} -rápida tiene también movilidad más alta en PAGE ácido (López-Gálvez *et al.*, 1993) lo cual indica su menor peso molecular frente a la α_{s2} común debido probablemente a una deleción en la secuencia de aminoácidos. Esta proteína migra junto a la α_{s1} en SDS-PAGE y no se puede detectar en muestras de caseína completa.

2.1.3.3. Caseína β

En 1972, Ribadeau-Dumas *et al.* lograron secuenciar la estructura primaria de la caseína β (Fig. 2.4), más en concreto la variante genética A₂. Existen ocho variantes genéticas reconocidas para esta caseína (A₁, A₂, A₃, B, B₂, C, D, E) (Ng-Kwai-Hang y Grosclaude, 1992; de Jong *et al.*, 1993) siendo predominantes las variantes A₁, A₂ y B.



Fig. 2.4. Estructura primaria de la caseína β A₂ bovina (Ribadeau-Dumas *et al.*, 1972).

Se trata de la más hidrófoba de las caseínas; las partes fuertemente cargadas están separadas por un trozo muy largo hidrófobo, así la parte N-terminal (residuos 1-21) que contiene 4 de los 5 átomos de fósforo tiene una carga neta de $-1,2$ a pH 6,6, mientras que la parte hidrófoba no está cargada. La molécula presenta un carácter anfipolar muy marcado: parte N-terminal muy

polar (1/3 de la molécula) y parte C-terminal hidrófoba conteniendo las 2/3 partes restantes de la molécula. Esta caseína es la más activa superficialmente y se conoce su fuerte poder de adsorción a una gran variedad de interfases hidrofóbicas. Por otro lado, el alto contenido en residuos prolil regularmente repartidos presupone una estructura poco ordenada. Actualmente se sabe que la caseína β contiene un 10% de hélice α (97-103, 138-146), 13% de pliegue β (52-60, 77-87, 187-195) y 77% de estructura no ordenada.

En cuanto a la β -caseína de oveja, su secuencia fue completamente determinada por Richardson y Mercier en 1979. La caseína β_1 de oveja de 207 aminoácidos presenta una estructura primaria similar a la βA_2 de vaca (209 aminoácidos) salvo por la delección de Pro¹⁷⁹-Tyr¹⁸⁰, o bien Tyr¹⁸⁰-Pro¹⁸¹, y por la sustitución de otros 20 residuos de la cadena peptídica. El 20% de las sustituciones implican a grupos prolina siendo, a pesar de este hecho, el contenido total de este aminoácido en la β_1 de oveja (34 Pro) muy similar al de la βA_2 de vaca (35 Pro), suponiendo cerca del 16% del total de aminoácidos. Esto hace suponer para esta caseína de oveja unas características similares a la de vaca con una estructura altamente desordenada. La hidrofobicidad media de la β_1 ovina, en parámetro de Bigelow, es similar a la calculada para la βA_2 bovina siendo extremadamente hidrofóbica.

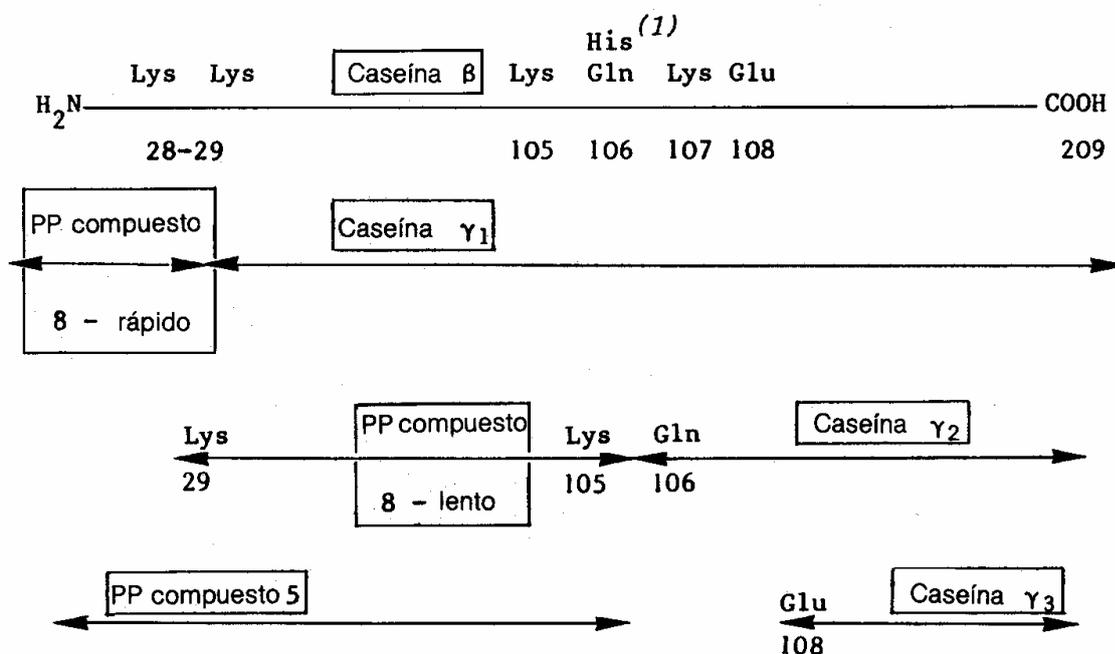
El grupo de 4 residuos de serina fosforilados y la naturaleza altamente cargada de la región N-terminal se conserva también en las caseínas ovinas. La sustitución de Ile¹² (en vaca) por Thr¹² (en oveja) le aporta un nuevo sitio de fosforilación de acuerdo con el código propuesto para la fosforilación de las caseínas (Mercier, 1981). Este sitio está sólo parcialmente fosforilado, ya que es sabido que los residuos Thr son intrínsecamente peores aceptores de grupos fosfato que los de Ser, de aquí la existencia de dos variantes polimórficas β_1 y β_2 en la leche de oveja. La variante β_2 con 5 grupos fosfato migrará antes en electroforesis capilar a pH ácido que la caseína β_1 que contiene 6 grupos fosfato (Recio *et al.*, 1997d).

Además del polimorfismo no genético mencionado, Chianese (1997) ha diferenciado entre tres variantes genéticas (A, B y C) mediante isoelectroenfoque en gel de muestras de oveja Sarda. La diferencia entre la variante A y C radica en la sustitución de Glu² por Gln². La secuencia de la variante B no está disponible hasta el momento.

En general, las caseínas β muestran menos diferencias entre especies que las caseínas α_s (Richardson y Mercier, 1979).

2.1.3.4. Caseína γ

Las caseínas γ provienen de la parte C-terminal resultado de la hidrólisis de la caseína β mientras que el complemento (parte N-terminal) está constituido de varias proteasaspeptonas (PP) (componentes 5,8 “rápido” y 8 “lento”) (Fig. 2.5) (Groves *et al.*, 1973; Andrews, 1979).



(1) Residuos 106: His para las caseínas BA₁, BA₂ B y C
Gln para la caseína BA₃

Fig. 2.5. Localización de las proteasaspeptonas en la β -caseína (Cheftel *et al.*, 1989).

Mediante estudios de electroforesis en condiciones ácidas, se detectaron cuatro formas polimorfas de caseína γ (A_1 , A_2 , A_3 y B), comprobándose que el tipo de γ -caseína estaba ligado a la variante genética de caseína β . Resultados similares se obtuvieron a pH alcalino (Ng-Kwai-Hang y Grosclaude, 1992; de Jong *et al.*, 1993).

Los mismos aminoácidos que diferenciaron las variantes genéticas de β -caseína (Fig. 2.4) permitían hacer la distinción entre las variantes de γ -caseína. Sin embargo, en la β -caseína C no se detectó formación de γ -caseína, siendo la posible explicación que la β -caseína C tiene sólo 4 átomos de fósforo en lugar de 5 y esta situación altera la conformación de la proteína lo suficiente como para que la proteólisis tan específica que da lugar a la γ -caseína no se lleve a cabo (Gordon y Groves, 1974).

2.1.3.5. Caseína κ

Como puede observarse en la (Fig. 2.6), la caseína κ de vaca no contiene más que un residuo fosforilado (Ser^{149}) y fija sólo algunos iones Ca^{2+} , por lo que su solubilidad no resulta afectada por dicha presencia. Al igual que la caseína β , posee carácter anfipolar, su parte N-terminal es hidrófoba, mientras que su parte C-terminal contiene una zona glucídica muy hidrófila (carga -10 ó -11 a pH 6,6). Las extremidades con tri o tetrasacáridos, (Fig. 2.7) (conteniendo el ácido N-acetilneuramínico), tienen por sí solas una carga negativa neta de -16 a -17 .



Fig. 2.6. Estructura primaria de las caseínas κ A y κ B (Jollès *et al.*, 1972; Mercier *et al.*, 1973).

Esta anfipolaridad se manifiesta sobre todo durante la coagulación enzimática de la leche por la quimosina o renina (EC 3.4.23.4), proteasa presente en el cuajo. La gran acción específica de esta enzima durante la reacción primaria de coagulación, se traduce por la hidrólisis de un solo enlace (bastante raro en las proteínas) entre los residuos Phe¹⁰⁵ y Met¹⁰⁶. El caseínoglicopéptido o glicomacropéptido (CGMP) liberado (106-169) contiene en su secuencia los residuos fosforilados (149) y glicosilados (131, 133, 135 ó 136) así como las sustituciones de aminoácidos de variantes A y B (136 y 148); es muy polar y soluble (Cherkaoui *et al.*, 1997). Por el contrario, la parte N-terminal (1-105) también llamada para-caseína κ , cargada positivamente a pH 6,6 es muy hidrófoba y poco soluble, y es la que contiene los dos residuos cisteinil (Cys¹¹ y Cys⁸⁸).

Al parecer, en electroforesis a pH alcalino, se han detectado otras dos variantes genéticas C y E que no se separarían en condiciones ácidas (Ng-Kwai-Hang y Grosclaude, 1992; de Jong *et al.*, 1993).

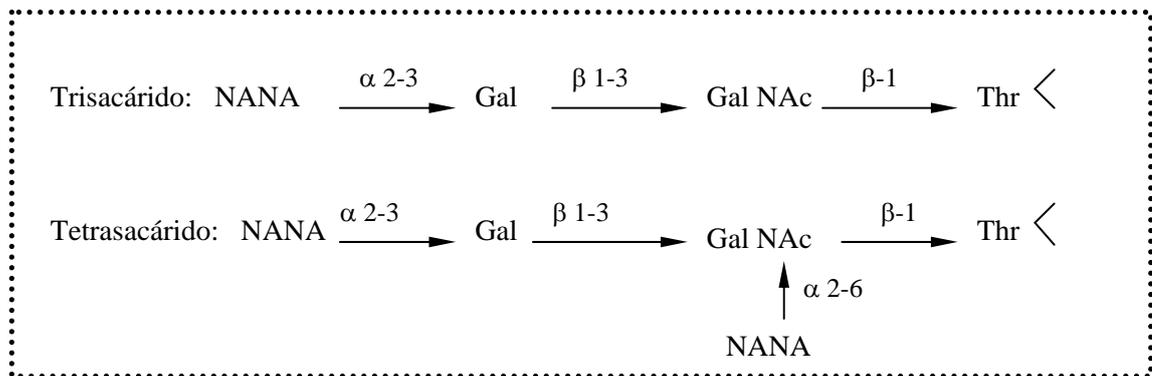


Fig. 2.7. Azúcares presentes en la κ -caseína.

La observación detallada de la secuencia de la caseína κ (Jollés *et al.*, 1972; Mercier *et al.*, 1973) es muy útil para comprender tanto la protección que le confiere a la micela frente a los iones Ca^{2+} como el fenómeno de coagulación por el cuajo. Se puede prever aproximadamente su estructura secundaria (Fig. 2.8) en la que se distinguen 5 regiones ordenadas en hélice α (23%), 7 regiones en pliegues β (31%) y 10 regiones en curvatura β (24% de “giros β ”).

Respecto a la caseína κ A de oveja, su estructura primaria difiere de la de vaca en 2 aminoácidos de más (171 en total, frente a los 169 en la de vaca) y en 26 sustituciones (Jollés *et al.*, 1974). La delección en la caseína de vaca corresponde a Val¹³²-His¹³³. De las sustituciones, 16 se dan en la zona del caseinoglicomacropéptido, región donde también tiene lugar la delección. La κ -caseína de oveja también tiene un residuo Cys¹⁰ adicional frente a su homóloga de vaca, con posible importancia estructural.

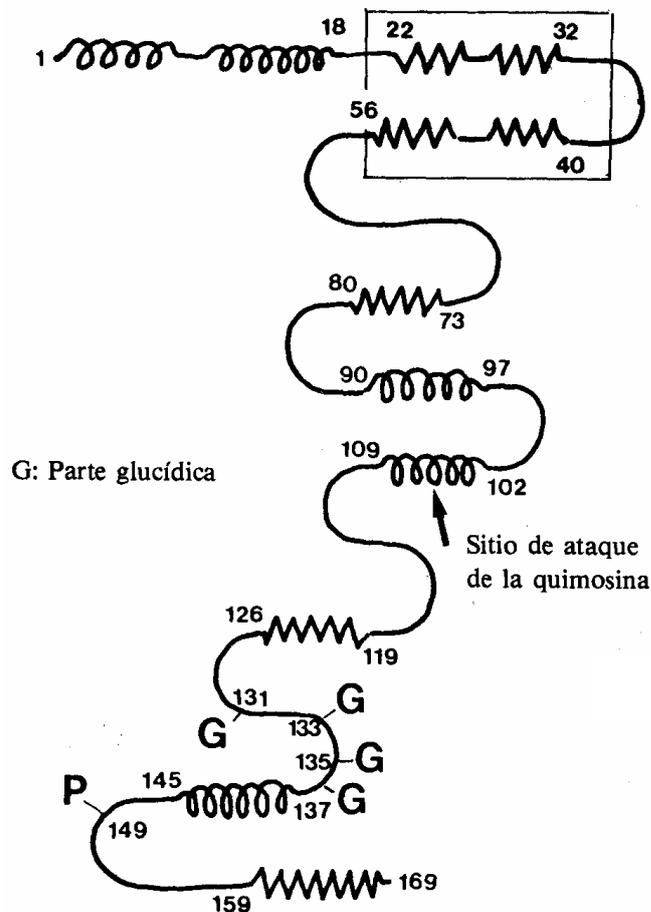


Fig. 2.8. Estructura espacial de la caseína κ (Cheftel *et al.*, 1989).

Otra característica de esta caseína de oveja, la cual comparte con la de vaca, es la repetición frecuente del mismo aminoácido. En la oveja se dan 14 duplicaciones así como repeticiones de trozos cortos de secuencia (Jollès *et al.*, 1974).

En la caseína de oveja, el punto de unión con los azúcares (Thr-N-acetilgalactosamina) por enlace O-glicosídico, se sitúa en posición 135, 137 ó 138; correspondiéndose la posición 135 con la 133 de la proteína de vaca. Esto le confiere polimorfismo no genético según el grado de glicosilación y fosforilación que posea (López-Gálvez *et al.*, 1994). Se ha encontrado que a pH alcalino, se observaban 5 bandas de idéntica composición en aminoácidos, pero

con diferente grado de glicosilación lo cual provoca distinta movilidad electroforética. Aún así, Addeo *et al.* (1992) han detectado la posibilidad de polimorfismo genético en la fracción κ de oveja, ya que obtienen bandas en los electroferogramas de intensidad semejante. Además, a nivel de DNA, se ha podido comprobar la existencia de polimorfismo en las cuatro principales caseínas ovinas (di Gregorio *et al.*, 1991).

Por otra parte, la caseína κ de oveja contiene galactosa, ácido N-acetilneuramínico, N-acetilgalactosamina (como la de vaca), y adicionalmente ácido N-glicolilneuramínico (Jollès y Fiat, 1979).

2.1.4. MODIFICACIONES DE LAS CASEÍNAS DURANTE EL PROCESO DE MADURACIÓN DE QUESOS

2.1.4.1. Bioquímica de la maduración de quesos

El primer paso en la elaboración del queso es la formación de la cuajada como resultado de dos procesos: el primero supone el ataque sobre la κ -caseína de las micelas de caseína por enzimas proteolíticas presentes en el cuajo, y el segundo, la coagulación de las micelas, las cuales han sido desnaturalizadas por el ataque enzimático. Este tratamiento de la reacción es quizás, excesivamente simplista, si se tiene en cuenta que el estadio secundario puede iniciarse antes de que la reacción enzimática haya finalizado. De hecho, cuando se haya degradado más del 85% de κ -caseína la leche puede empezar a cuajarse (Green *et al.*, 1978; Dalgleish, 1979).

Las micelas de caseína se pueden considerar como partículas, aproximadamente esféricas, compuestas de varios miles de moléculas individuales de los cuatro tipos de caseínas y, formando parte de su estructura,

fosfato de calcio en una de sus formas insolubles (Schmidt, 1982). Sin embargo, las diferentes caseínas no se encuentran igualmente distribuidas por la micela, en concreto, la κ -caseína está localizada principalmente sobre la superficie (McGam *et al.*, 1980; Donnelly *et al.*, 1984). En su posición natural sobre las micelas, la κ -caseína se une al resto de la micela vía la para- κ -caseína, con el macropéptido sobresaliendo en la solución. Esta mitad hidrofílica interacciona con las moléculas de disolvente, estabilizando a la micela (Holt, 1975; Walstra *et al.*, 1981). Los agentes coagulantes de la leche, escinden la κ -caseína en el punto de unión entre la para- κ -caseína y el macropéptido, que en el caso de κ -caseína bovina coincide con el enlace entre el residuo 105 de fenilalanina y el 106 de metionina. Cuando este hecho tiene lugar, el macropéptido se libera de la micela hacia el suero, su influencia estabilizante se pierde, y las micelas pueden comenzar a coagularse.

Las enzimas que pueden hidrolizar con éxito el enlace Phe-Met de la κ -caseína bovina, pertenecen al grupo de las proteasas ácidas. Las enzimas de esta clase, tradicionalmente utilizadas en la manufactura de queso, son la quimosina y la pepsina, extraídas del estómago de terneros y de vacas adultas, respectivamente. En los últimos años, por razones económicas, religiosas o culturales, se han utilizado enzimas de origen microbiano o de origen vegetal como la cardosina, del cardo *Cynara cardunculus*, empleada para elaborar quesos de oveja (Macedo *et al.*, 1996).

Durante la maduración de los quesos, tienen lugar tres reacciones bioquímicas primarias; *glicolisis*, *proteolisis* y *lipolisis*. Estas reacciones son las principales responsables del cambio que afecta al cuerpo, textura y *flavor* básico de este alimento. Además sucede una serie de cambios secundarios que son los principales responsables de las características más concretas del *flavor* del queso y que también modifican la textura del mismo. En la actualidad la Bioquímica de los sucesos primarios se conoce bastante bien, mientras que las reacciones secundarias sólo se comprenden en términos generales que, a pesar

de estar siendo fruto de numerosos estudios, entrañan la dificultad de ser de muy diversas características para cada tipo de queso.

De las tres reacciones primarias, *la proteolisis* es el suceso más complejo y probablemente el más importante para el desarrollo del *flavor* y la textura. La proteolisis contribuye a la maduración del queso en al menos cuatro formas: (1) por contribución directa al *flavor* liberando aminoácidos y péptidos, algunos de los cuales pueden producir defectos de sabor, como por ejemplo amargor, o bien indirectamente vía catabolismo de los aminoácidos para formar aminas, ácidos, tioles, tioésteres, etc.; (2) mayor liberación de compuestos sápidos durante la masticación; (3) cambios en el pH vía la formación de NH_3 ; (4) cambios en la textura debidos a la ruptura de la estructura proteica, aumento del pH y mayor cantidad de agua enlazada por los nuevos grupos amino y carboxilo formados (Fox *et al.*, 1993). En la Fig. 2.9 se muestran los diferentes estadios de la contribución de la proteolisis en el proceso de maduración de quesos (Law, 2001).

Los agentes implicados en el proceso de maduración son: (1) cuajo o sustituto del mismo (quimosina, pepsina o proteinasas microbianas), (2) proteinasas endógenas de la leche (plasmina) especialmente importantes en quesos elaborados con leche cruda, (3) bacterias *starter* o iniciadoras y sus enzimas (liberadas después de la muerte y lisis de las células) que pueden ser mesófilas (*Lactococcus* y *Leuconostoc*) o termófilas (*Lactobacillus* y *Sreptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*) (4) enzimas procedentes de *starters* secundarios (bacterias ácido propiónicas, *Brevibacterium linens*, levaduras y hongos como *Penicillium roqueforti* y *P. candidum*) que son de especial importancia en algunas variedades y (5) bacterias no iniciadoras, es decir, organismos que o bien sobreviven a la pasteurización o tienen acceso posterior a la leche o a la cuajada durante la manufactura y tras su muerte y lisis liberan sus sistemas enzimáticos (Fox *et al.*, 1993).

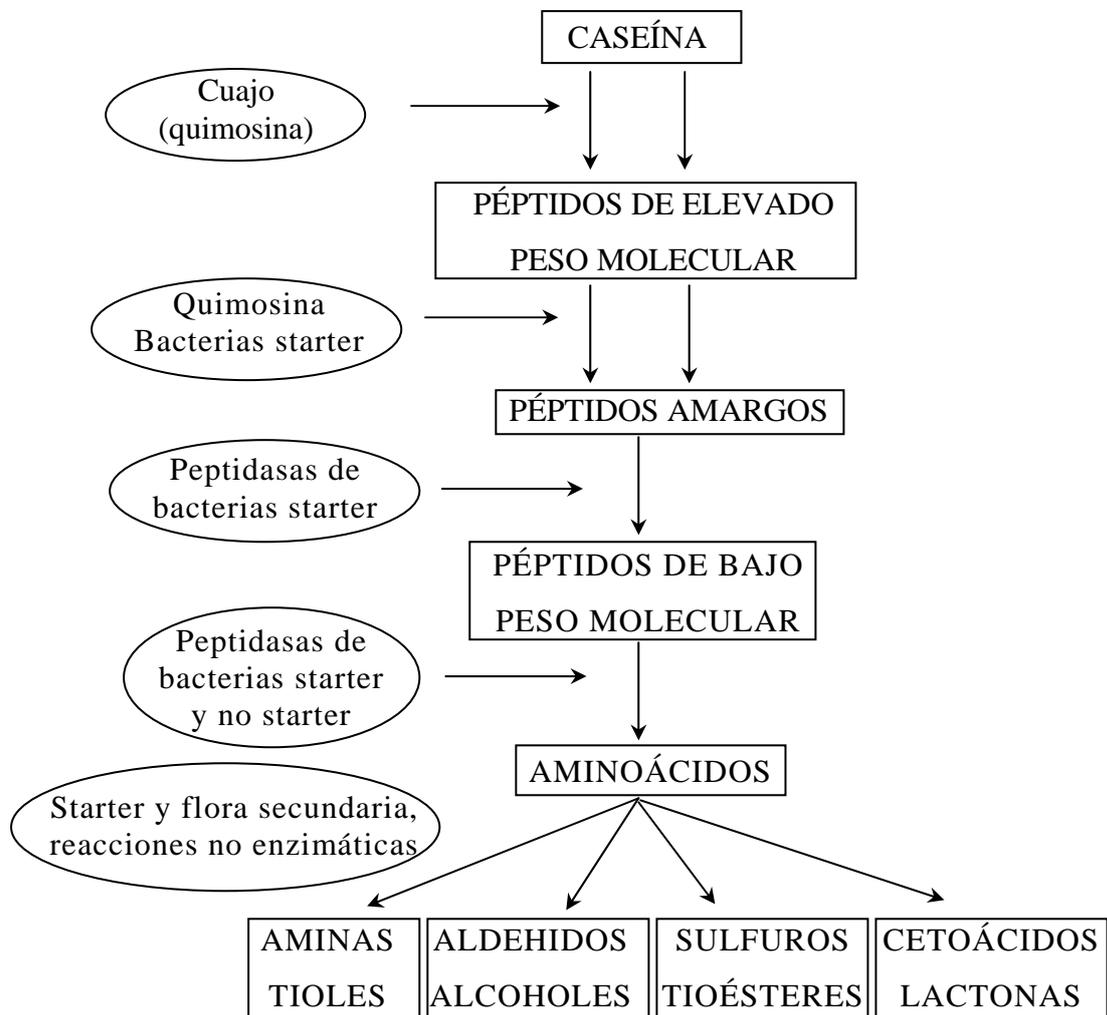


Fig. 2.9. Degradación de caseínas durante la maduración del queso implicando proteasas de varias fuentes (Law, 2001).

El cuajo retenido en la cuajada no llega al 6% en la mayoría de los casos (Fox *et al.*, 1993) y es dependiente del tipo de cuajo y de la temperatura de cocción de la pasta. La proporción de quimosina retenida se ve influenciada por el pH en el momento del desuerado, siendo mayor a pH más bajo. La proteólisis debida al cuajo, se considera responsable del ablandamiento de la textura vía la hidrólisis de la caseína α_{s1} para producir I- α_{s1} . Sin embargo, parece ser que la para- κ -caseína es resistente al ataque por quimosina. La acción secundaria del cuajo influye en el *flavor* de tres modos diferentes:

- Producción de péptidos de tamaño adecuado que influyen en el aroma y sabor, aunque un exceso en el proceso de proteolisis puede conllevar graves defectos en el queso por liberación de péptidos amargos.
- Los péptidos formados a partir del cuajo, sirven a su vez de sustrato para las proteasas y peptidasas microbianas que dan lugar a péptidos de cadena corta y aminoácidos.
- La alteración de la textura del queso, parece influir en la liberación de compuestos aromáticos durante la masticación que proceden de la proteolisis, glicolisis y lipolisis y de cambios metabólicos secundarios.

Por otra parte, la quimosina va a hidrolizar mucho más lentamente a la caseína β , si bien la hidrólisis de esta proteína tiene lugar por la presencia de plasmina endógena (Exterkate y Alting, 1995). La pasteurización aumenta la actividad de la plasmina en la leche, posiblemente por inactivación de los inhibidores de la plasmina o aumentando el grado de activación del plasminógeno (Fox y Stepaniak, 1993), aunque no hay consenso en este aspecto ya que otros autores (Benfeldt *et al.*, 1997) afirman que el aumento de la temperatura y su mantenimiento en el tiempo reduce la actividad de la plasmina por inactivación térmica del sistema de activación del plasminógeno y por interacción de dicho sistema con la β -lactoglobulina.

Los principales productos de la hidrólisis de las caseínas se recogen en la Tabla 2.2, incluyendo la caseína de procedencia, así como la proteasa implicada en su liberación y el fragmento que se libera.

Tabla 2.2. Productos mayoritarios de la hidrólisis de las caseínas presentes en el queso (Fox *et al.*, 1993).

Caseína	Proteasa	Fragmento	Nombre común
κ -caseína	quimosina	1→105	para- κ -caseína
α_{s1} -caseína	quimosina	24/25 →109	caseína-I- α_{s1}
β -caseína	plasmina	29→209	γ_1 -caseína
		106→209	γ_2 -caseína
		108→209	γ_3 -caseína

Además de la quimosina y plasmina, enzimas que degradan mayoritariamente a las caseínas, están también presentes durante la producción del queso diversas proteasas y una gran cantidad de peptidasas, como aminopeptidasas, dipeptidasas, tripeptidasas, endopeptidasas, y prolin-peptidasas encargadas de hidrolizar los fragmentos que se van formando y liberar aminoácidos. Los aminoácidos producidos por estas acciones enzimáticas, además de contribuir de forma directa al aroma del queso, también son precursores de otros compuesto volátiles (aminas, amonio, ácidos, cetoácidos, carbonilos, alcoholes, otros aminoácidos, H₂S, (CH₃)₂S, metanotiol y tioésteres) que matizan el *flavor* del mismo (Sousa *et al.*, 2001).

2.1.4.2. Análisis y cuantificación de la *proteolisis* en quesos

El empleo de leches pasteurizadas, tratamiento que lleva a la destrucción de bacterias beneficiosas para la elaboración de quesos, ha llevado a la necesidad de conocer más en profundidad el proceso de maduración y los agentes implicados en el mismo para producir mejoras controladas en el *flavor* de las distintas variedades. A su vez, el control sobre los procesos bioquímicos que dan lugar a las características propias de cada queso, permitiría una mayor homogeneidad en el producto y un posible control sobre la aceleración de la

producción. Es por tanto de interés poder cuantificar de algún modo el proceso de maduración.

El seguimiento analítico del proceso de maduración de quesos, así como su aceleración, son cuestiones de especial interés para la industria láctea, lo que se ve reflejado en numerosos trabajos y revisiones sobre el tema (El Soda y Pandian, 1991; El Soda, 1993; Fox *et al.*, 1995; McSweeney y Fox, 1997; Law, 2001; Sousa *et al.*, 2001).

Las técnicas empleadas para determinar la proteólisis en un queso se pueden encuadrar en dos categorías generales: (A) métodos no específicos que determinan el N soluble total o extractable en disolventes (capaces de detectar el grado global de proteólisis y la contribución a la misma de varios agentes proteolíticos) y (B) métodos específicos que son capaces de resolver los péptidos individuales o fragmentos de hidrólisis. Al permitir la posterior identificación de los péptidos, los métodos específicos han recibido más atención en los últimos tiempos dado su mayor interés.

Entre los métodos no específicos descritos por McSweeney y Fox (1997), pueden destacarse:

1. *Extracción / Métodos de solubilidad.* Basados en el aumento del N al avanzar la proteólisis. Entre ellos cabe citar:
 - Estudio de la fase acuosa por presión hidráulica / centrifugación.
 - Solubilización en urea de proteínas y péptidos grandes.
 - Nitrógeno soluble en agua.
 - Extracción con soluciones salinas (CaCl₂, NaCl, etc.).
 - Extracción / Fraccionamiento mediante disolventes orgánicos (cloroformo-metanol, etanol, butanol, etc.).
 - Fraccionamiento con ácido tricloroacético (TCA) ó ácidos trifluoroacéticos.
 - Solubilidad en ácido fosfotúngstico y técnicas similares (ácidos 5-sulfosalicílico y pícrico).

2. *Técnicas de fraccionamiento basadas en la masa molecular.* Dentro de las cuales hay que incluir la diálisis, ultrafiltración y cromatografía de exclusión molecular.
3. *Técnicas para cuantificar el N en las fracciones.* Macro-Kjeldahl, absorbancia al UV a 280 nm, reactivo Folin-Ciocalteau, método de Lowry, método de Bradford con azul de Coomassie o eritrosina.
4. *Métodos basados en la liberación de compuestos o grupos reactivos.* Formación de amonio, de tirosina y triptófano solubles, enlace con colorantes, valoración ácido/base, métodos colorimétricos y fluorimétricos de grupos amino libres y técnicas enzimáticas.

En lo que respecta a los métodos específicos cabe decir que han recibido y siguen recibiendo una atención creciente en nuestros días debido al mayor interés que tiene la detección de los péptidos formados durante la maduración. Las técnicas capaces de resolver péptidos engloban la electroforesis en sus diversas variantes y las técnicas cromatográficas. Tienen la desventaja de ser métodos que requieren del uso de instrumental más caro, si bien tienen un potencial analítico mucho mayor.

Dentro de las técnicas electroforéticas, destacan diversos estudios realizados en *geles de almidón* aplicados por vez primera al queso por Melachouris y Tuckey (1966) y en *geles de poliacrilamida* (PAGE) por Ledford *et al.* (1966). Esta última técnica ha sido empleada de forma estándar en muchos laboratorios, bien en su variante ácida o alcalina o en presencia de SDS en el tampón. Como se puede constatar, varios autores han revisado la literatura al respecto de esta última técnica (Strange *et al.*, 1992; McSweeney y Fox, 1993; Fox *et al.*, 1995) pudiendo verificarse que la electroforesis en gel es empleada no sólo para la detección de péptidos originados en la elaboración de quesos, sino que existe también algún estudio sobre la predicción de tiempos de maduración en quesos analizados con PAGE junto con otras medidas no

específicas empleando análisis estadístico multivariante (García-Ruiz *et al.*, 1998).

Para la identificación de los péptidos tras la electroforesis, se han empleado técnicas de tinción y análisis por densitometría en gran número de trabajos, así como electrotransferencia o inmunotransferencia con anticuerpos policlonales (Chianese *et al.*, 1992; Chianese *et al.*, 1996; Gaiaschi *et al.*, 2000; García-Risco *et al.*, 2000).

Otra técnica como el IEF ha sido de utilidad para determinar el polimorfismo genético de las caseínas (Creamer, 1991; Strange *et al.*, 1992; Pérez-Rodríguez *et al.*, 1998).

Además, señalar que otros autores han empleado electroforesis en dos dimensiones SDS-PAGE junto con isoelectroenfoque (IEF) para estudiar la proteólisis en queso Camembert (Trieu-Cuot y Gripon, 1982), si bien esta técnica implica largos tiempos de procesado y tiene problemas de reproducibilidad (Creamer, 1991).

Otra técnica empleada ha sido la descrita por Girardet *et al.* (1994) como *cromatografía electroforética de alta resolución* (HPEC), que suponía la utilización de una columna rellena de gel a la que aplicaba un campo eléctrico.

En la última década para el estudio de la leche y el queso se ha utilizado el potencial de la *electroforesis capilar* (EC) para resolver péptidos y proteínas. Así por ejemplo, los primeros trabajos en que se determinaron las proteínas de la leche mediante EC fueron los de Chen y Zang (1992) a pH básico y de Jong *et al.* (1993) a pH ácido. Este último ha sido el punto de partida de diversos trabajos dirigidos a mejorar las condiciones de separación de las caseínas.

La electroforesis capilar ha sido empleada en diversos estudios sobre caseínas de la leche de diferentes especies, como por ejemplo, la diferente distribución de las caseínas a lo largo del periodo de lactación en leche de cabra

(García-Ruiz *et al.*, 2000), la validación del método de EC en el análisis de caseínas de leche de oveja (Izco *et al.*, 1999a) o la detección y cuantificación en mezclas de leches de oveja, vaca y cabra muy útil para detectar adulteraciones (Molina *et al.*, 1999). También se han descrito métodos para la determinación de proteínas de lactosuero conjuntamente con caseínas y para- κ -caseína en leche y productos lácteos (Miralles *et al.*, 2000a, 2001), así como la detección de las diferentes variantes genéticas presentes en diversas especies (Recio *et al.*, 1997d, 2001). En ninguno de los trabajos mencionados se utilizó el diseño de experimentos para la optimación de las condiciones de separación.

Además, la EC se ha mostrado como una técnica útil tanto en el estudio de la hidrólisis de caseínas (Kristiansen *et al.*, 1994; Otte *et al.*, 1997; Recio *et al.*, 1997a; Righetti *et al.*, 1997). Como en la evaluación del proceso de maduración de quesos de vaca, oveja y cabra y sus productos derivados, tanto referidos a la fracción proteica insoluble a pH 4,6 (Izawa *et al.*, 1997; Otte *et al.*, 1997; Recio *et al.*, 1997a; Gouldsworthy *et al.*, 1999; Izco *et al.*, 1999b; Otte *et al.*, 1999; Molina *et al.*, 2000; Irigoyen *et al.*, 2000; Strickland *et al.*, 2001; Molina *et al.*, 2002), como a la fracción soluble en agua (Molina *et al.*, 1998; Pripp *et al.*, 1999a, 1999b; Sørensen y Benfeldt, 2001) y en etanol al 20% (Herrero-Martínez *et al.*, 2000).

En cuanto a las técnicas de cromatografía, su uso se inició con *cromatografía en papel* para estudiar aminoácidos libres (década de los 50) y péptidos del queso, pasando por *cromatografía en capa fina* en sílica gel (Kuchroo y Fox, 1982), por *columnas cromatográficas* de sílica gel (Visser *et al.*, 1975), hasta las formas más usadas actualmente de intercambio iónico (Creamer y Richardson, 1974; Breen, 1992; McSweeney *et al.*, 1994b), exclusión molecular (Breen *et al.*, 1995) o cromatografía de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC) (Le Bars y Gripon, 1989; González de Llano *et al.*, 1991; McSweeney *et al.*, 1993), técnica de gran valor para resolver péptidos del queso de la fracción soluble en agua. Existen algunos estudios en HPLC en dos dimensiones (Lagerwerf *et al.*, 1995) acoplado un sistema de intercambio

iónico con fase reversa, pero necesita de gran equipamiento y mucho tiempo para su análisis. También son abundantes los estudios mediante *cromatografía líquida rápida de proteínas* o FPLC, entre otros (Andrews *et al.*, 1985; Papoff *et al.*, 1993; Law, 1993; Law *et al.*, 1994; Brown *et al.*, 1995; Ward y Bastian, 1996). Finalmente indicar que ha sido utilizada la *cromatografía de gases* para detectar aminoácidos libres en el queso.

2.2. Electroforesis Capilar

La complejidad y diversidad de los alimentos genera una gran demanda de técnicas que puedan ser utilizadas en el análisis de los mismos. Un método de análisis ideal debe ser “robusto”, altamente selectivo y aplicable a un amplio rango de sistemas alimenticios.

La selectividad de las técnicas analíticas, puede conseguirse por medio de la utilización de detectores selectivos o mediante una separación eficiente. Así, por ejemplo, utilizar un detector electroquímico en la técnica de HPLC, puede ser un camino adecuado para conseguir una alta selectividad. Otra alternativa posible para alcanzar un alto poder de resolución sería la aplicación de una técnica de separación eficaz como la electroforesis capilar (EC) (Lindeberg, 1996).

Estudios comparativos entre EC, HPLC y cromatografía con fluidos supercríticos (SFC) (Steuer *et al.*, 1990) y, entre EC y HPLC (Issaq *et al.*, 1991) han conducido a reconocer que las principales ventajas de la aplicación de la técnica de electroforesis capilar son; la eficacia en las separaciones, el bajo consumo de disolvente y su fácil automatización. No obstante, aparecen limitaciones, sobre todo en la detección de muestras de concentración elevada.

En los últimos años, la electroforesis capilar se presenta como una técnica alternativa a la electroforesis tradicional en gel y complementaria a la cromatografía líquida, para el análisis de una gran variedad de compuestos presentes en los alimentos (Zeece, 1992).

2.2.1. FUNDAMENTOS DE LA ELECTROFORESIS CAPILAR

La electroforesis es una técnica de separación que se basa en la migración diferencial (en sentido y velocidad) de partículas cargadas (analitos) en un campo eléctrico establecido al efecto, es decir, en un gradiente de potencial (Landers, 1997). Estas partículas cargadas pueden ser muy variadas: iones simples o complejos, macromoléculas, coloides o materia corpuscular, bien células vivas como bacterias o hematíes, o materia inerte como arcilla.

Un hecho conocido es que cuando a una solución que contiene moléculas cargadas se le aplica un campo eléctrico, estas moléculas comenzarán a moverse, dependiendo su movilidad de su relación carga-tamaño. El tamaño de una molécula está determinado por su peso molecular, por su estructura tridimensional y por el grado de solvatación. Haciendo un balance entre las fuerzas de electromovilidad y de fricción, la movilidad electroforética debida al potencial eléctrico aplicado (μ_{pe}) puede ser expresada como:

$$\mu_{pe} = q / 6\pi\eta r$$

donde q es la carga neta, η la viscosidad y r es el radio iónico. La aplicación del campo eléctrico y la diferencia en la movilidad electroforética hará que los aniones migren hacia el polo positivo (ánodo) y los cationes hacia el polo negativo (cátodo) en igual cantidad. Además los iones pequeños migrarán a mayor velocidad que los de mayor tamaño a igualdad de carga. Por lo tanto, moléculas cargadas podrán separarse en un campo eléctrico de acuerdo con su movilidad intrínseca.

Al igual que en las separaciones cromatográficas, la eficacia de la separación puede ser expresada por el número de platos teóricos (N). En el caso de la electroforesis capilar, N está relacionado con el voltaje (V), con la movilidad (μ) y con el coeficiente de difusión del soluto (D), de acuerdo con la siguiente ecuación (Jorgenson y Lukacs, 1981):

$$N = \mu V / 2D$$

De la ecuación anterior puede deducirse fácilmente, que la aplicación de voltajes altos favorece la eficacia de la separación, pero en la práctica existe una limitación debida al calentamiento por efecto Joule, que tiene lugar cuando una corriente eléctrica pasa a través de un medio. La aplicación de altos voltajes será adecuada sólo cuando el calor producido pueda ser disipado eficientemente, ya que procesos de convección térmica conducirían a la mezcla de zonas que de otra manera deberían encontrarse separadas. Este hecho hace que las formas tradicionales de electroforesis presenten varias desventajas, siendo la más obvia la velocidad de separación, que está fundamentalmente limitada por el efecto Joule, pudiéndose contrarrestar el efecto convectivo utilizando medios estabilizados como la celulosa, el papel o geles de agar y acrilamida (Vesterberg, 1989). Sin embargo, desde una perspectiva metodológica, el proceso completo implica una serie de tareas incómodas, que llevan su tiempo, desde la fundición del gel, preparación y pinchado de las muestras, resolución electroforética de las especies iónicas/moleculares, hasta el punto final en que el gel es teñido, desteñido y se obtienen resultados.

Otros problemas incluyen la reproducibilidad, particularmente con análisis en dos dimensiones, diferencias entre las tinciones según el analito, lo cual hace difícil conseguir una buena precisión cuantitativa y la complejidad del proceso metodológico implicado en la electroforesis en gel, que lo hace prácticamente imposible de automatizar.

El uso de capilares, como un canal de electromigración para la separación de analitos, incluyendo macromoléculas biológicas, está asociado con varias ventajas por encima de los métodos sólidos estándares de separación. En particular, las características físicas de los capilares estrechos perforados los hace ideales para la electroforesis. A este respecto, los capilares de sílice fundida empleados en EC tienen un diámetro interno (d.i.) típico de 20 a 100 μm (375 μm de diámetro externo), longitudes de 20 a 100 cm, y están externamente recubiertos por una sustancia polimérica, poliimida, que confiere

al capilar una enorme flexibilidad, el cual de otro modo sería tremendamente frágil (Fig. 2.10).

La elevada relación entre superficie-volumen en un capilar con estas dimensiones, permite una eficaz disipación del calentamiento Joule generado por campos aplicados altos. Como resultado de esta habilidad para disipar el calor, las separaciones electroforéticas se pueden llevar a cabo fácilmente a 30.000 voltios, controlando el calor generado, mediante la utilización de un refrigerante activo sobre la pared externa del capilar (Knox, 1988).

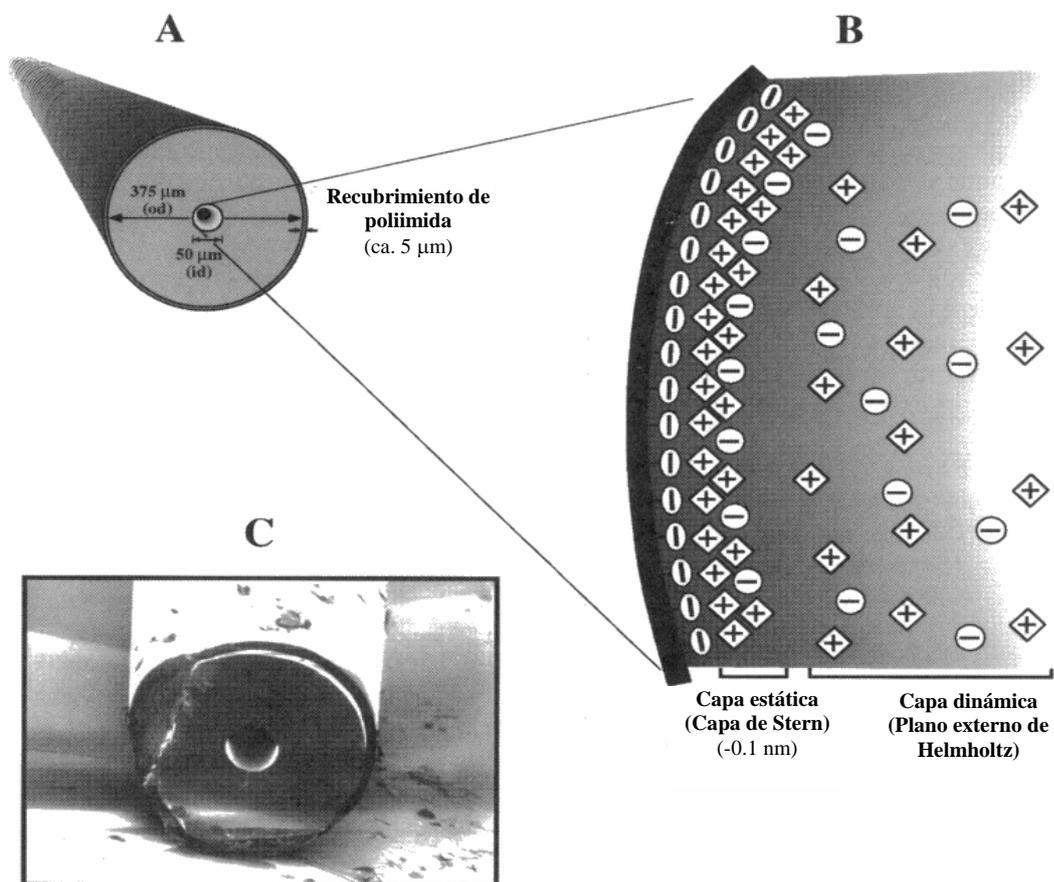


Fig. 2.10. A. Diagrama de la estructura del capilar. B. Ilustración de la doble capa iónica. C. Microfotografía del capilar por microscopía electrónica (x170).

Además de la capacidad de evitar el efecto Joule, el uso de capilares para electroforesis se asocia a muchas ventajas. Con capilares típicos de EC, las

pequeñas dimensiones rinden volúmenes totales en columna del orden de microlitros, por lo tanto, se requiere el uso de tampón en cantidad de tan sólo mililitros. Por consiguiente, considerando los escasos requerimientos en cuanto a muestra y reactivos (tampón), el tiempo rápido de análisis y la posibilidad de empleo de campos eléctricos elevados (30.000 voltios), está claro que la EC tiene un elevado potencial para dar solución a un número diverso de problemas analíticos.

2.2.1.1. Modalidades de EC

La EC se ha diversificado del mismo modo en que lo hicieron las técnicas de electroforesis en gel. Esto ha dado como resultado una familia de formas especializadas que colectivamente constituyen la “Electroforesis Capilar”. Las principales modalidades de EC que han sido desarrolladas y están siendo explotadas actualmente incluyen:

- *Electroforesis capilar en zona libre* (ECZ), (“capillary zone electrophoresis”, CZE), también denominada como EC en solución libre.
- *Cromatografía capilar micelar electrocinética* (MEKC): técnica que permite separar compuestos neutros y de movilidad electroforética similar (Terabe *et al.*, 1985).
- *Isoelectroenfoque capilar* (CIEF): permite separar moléculas en bandas según el punto isoeléctrico de las mismas sobre un gradiente de pH (Hjertén, 1985).
- *Electroforesis capilar en gel* (CGE): empleo de capilares, con paredes recubiertas y rellenos de una matriz polimérica reemplazable (Hjertén, 1983).

- *Isotacoforesis capilar* (CITP) (técnica de preconcentración en el capilar): técnica que implica el movimiento de las moléculas cargadas en un campo eléctrico y que está definido por la movilidad del ión de movimiento más rápido (Foret *et al.*, 1993).

ECZ es la más universal de las técnicas y se ha mostrado útil para la separación de un amplio conjunto de analitos de variado tamaño y carácter. La tabla siguiente (Tabla 2.3) muestra una referencia de las diferentes modalidades de electroforesis empleadas en el análisis de diversas clases de muestras.

Tabla 2.3. Modalidades de EC utilizadas en la separación de diferentes clases de analitos.

Iones ^a	Moléculas ^a	Péptidos	Proteínas	Oligonucleótidos	DNA
		ECZ	ECZ		
ECZ	MEKC	ITP	CGE	ECZ	
ITP	ECZ	MEKC	CIEF	MEKC	CGE
	ITP	CIEF	ITP		
		CGE			

^a Iones y moléculas de bajo peso molecular.

2.2.2. ELECTROFORESIS CAPILAR ZONAL

En la Fig. 2.11 se representa un diagrama de un instrumento de EC. Los componentes básicos incluyen un administrador de alto voltaje (0 a 60 kV), un capilar recubierto de poliimida con un diámetro interno $\leq 200 \mu\text{m}$, dos recipientes para el tampón que se pueden acoplar con el capilar, los electrodos conectados a la fuente de alimentación y el detector.

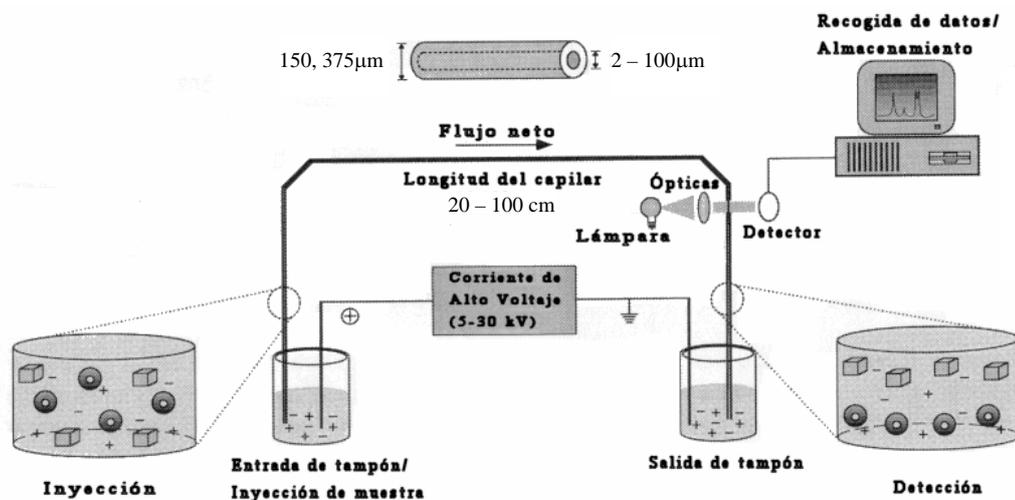


Fig. 2.11. Esquema general de un sistema de EC.

Para obtener un funcionamiento eficaz y reproducibilidad en las separaciones, es necesario que el sistema presente algún mecanismo para mantener el capilar termostataado,

Para realizar una separación en electroforesis capilar en zona libre, el capilar se rellena con un tampón de separación apropiado al pH deseado y la muestra se introduce en la entrada del mismo. Ambos extremos del capilar y los electrodos de la fuente de alto voltaje se sitúan en los recipientes con tampón y se aplican hasta 30.000 V al sistema. Las especies iónicas en la muestra migran con una movilidad electroforética (dirección y velocidad) determinada por su carga y masa, y eventualmente pasan al detector donde la información se recoge y se almacena en un sistema de adquisición y análisis de datos.

Con ECZ, la polaridad normal se considera del ánodo al cátodo: [(+)-detector-(-)] como se muestra en la Fig. 2.12. Los analitos avanzan a medida que se procede a la separación electroforética, y se separan de acuerdo con sus movilidades electroforéticas individuales y pasan el detector como “zonas de analitos”, de aquí el nombre de la técnica. El hecho de que, bajo las condiciones apropiadas, todas las especies (positivas, negativas y neutras)

pasen a través del detector, indica que está implicada otra fuerza diferente de la electroforética. Si el campo aplicado fuese la única fuerza actuando sobre los iones, las sustancias catiónicas (carga neta positiva) pasarían por el detector, mientras que los componentes neutros quedarían a la entrada estáticos y las sustancias aniónicas (carga negativa) serían alejadas del detector. Afortunadamente, hay otra fuerza “el flujo electroosmótico” (EOF, “electroosmotic flow”), que lleva el movimiento de todos los componentes en el capilar hacia el detector cuando se aplica un campo eléctrico. El EOF juega un papel principal en muchas de las modalidades de EC y, muy especialmente, en ECZ.

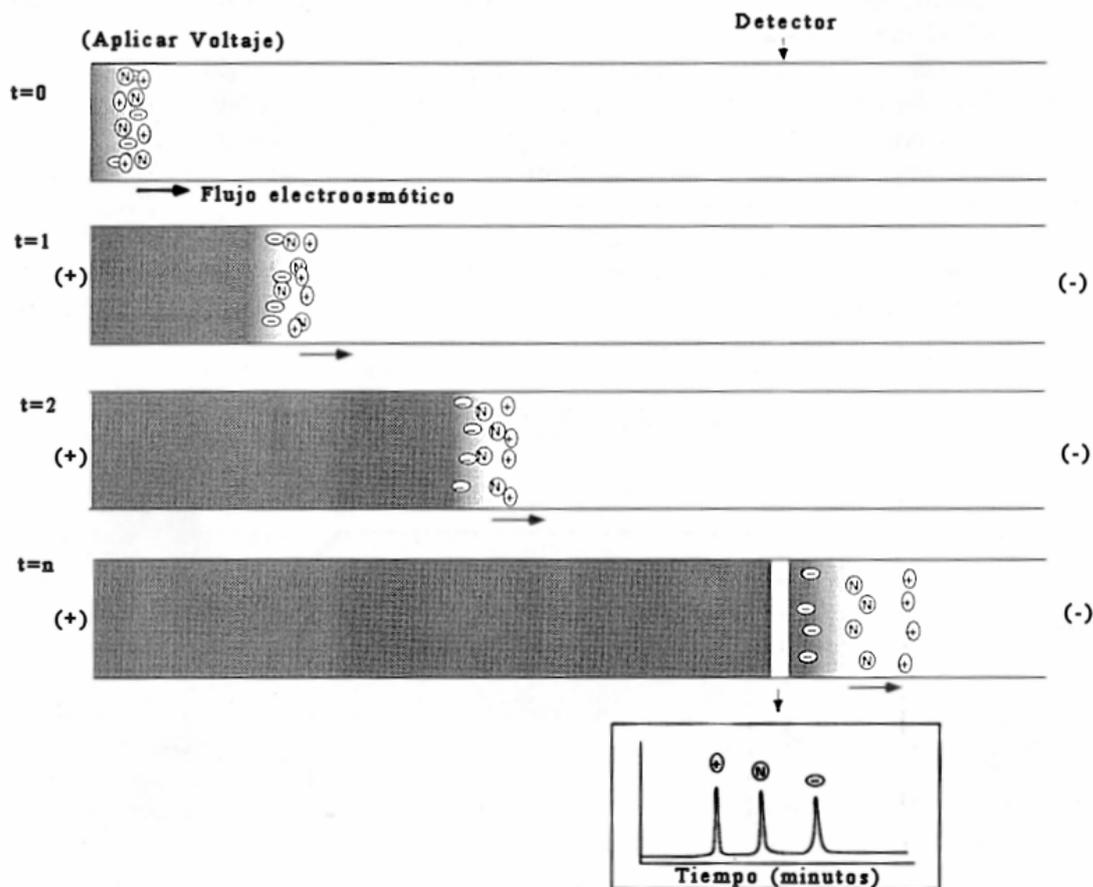


Fig. 2.12. Movilidad de las moléculas cargadas y no cargadas en un campo aplicado.

2.2.2.1. Electroósmosis

El flujo electroosmótico fue identificado por primera vez por Helmholtz, en 1879, al aplicar un campo eléctrico a un tubo de cristal en posición horizontal que contenía una solución salina acuosa. Le interesó el carácter iónico de la pared interna del tubo y el movimiento de los iones, encontrando que la sílice aportaba una capa de cargas negativas a la superficie interior del tubo, la cual, bajo la aplicación de un campo eléctrico, llevaba a un movimiento neto del fluido hacia el cátodo.

Como continuación de los trabajos pioneros de Helmholtz, ya se han establecido los principios básicos que gobiernan el EOF. Según se puede apreciar en la Fig. 2.10, los grupos silanol ionizados (SiO^-) de la pared capilar atraen las especies catiónicas del tampón. Obviamente, el pH del tampón determinará la fracción de grupos silanol que están ionizados.

La capa iónica que se forma, tiene una densidad de carga positiva que decrece exponencialmente al aumentar la distancia a la pared del capilar. La doble capa formada, próxima a la superficie se denomina “Capa interior Helmholtz” o “Capa Stern” y es esencialmente estática. Una capa más difusa se forma hacia el interior y se denomina “Plano exterior Helmholtz” (PEH).

Bajo un campo aplicado, los cationes en el PEH migran en la dirección del cátodo llevando el agua de hidratación tras de sí. Debido a la naturaleza cohesiva de los enlaces de hidrógeno de las aguas de hidratación con las moléculas de agua del conjunto de la solución, el tampón se ve empujado hacia el cátodo. Este EOF actúa como un mecanismo bomba que impulsa todas las moléculas (catiónicas, neutras o aniónicas) hacia el detector con una separación que depende finalmente de las diferencias de migración electroforética de los analitos.

Suponiendo que el EOF es adecuado pero no demasiado fuerte, las respectivas movilidades electroforéticas de los analitos llevan a la formación de zonas discretas en el momento que pasan por delante del detector. Si el EOF es

demasiado lento, el fenómeno de difusión se encarga de que las zonas de los analitos se ensanchen y de que algunos analitos no alcancen el detector en un intervalo de tiempo razonable.

Como se ha indicado antes, el EOF es dependiente del pH y puede ser muy fuerte. En este caso, la separación será inadecuada. La inclusión del EOF en el cálculo de la velocidad es esencial:

$$v_i = \mu_{ap} E = (\mu_{pe} + \mu_{eo}) E$$

donde μ_{ap} es la movilidad debida al potencial eléctrico aplicado, μ_{eo} la movilidad debida al flujo electroosmótico y E el campo eléctrico.

2.2.2.2. Parámetros de la separación en ECZ

En cualquier separación mediante la técnica de electroforesis capilar en zona libre, se deben tener en cuenta una serie de parámetros que afectan a la separación, tanto en tiempo, como en resolución:

i) Polaridad de los electrodos

Establecer la polaridad de los electrodos es de crucial importancia en ECZ y obviamente una de las primeras consideraciones a tener en cuenta antes del análisis. La polaridad normal para EC es del ánodo hacia el cátodo. De esta manera, el EOF va hacia el cátodo.

Si se invierte la polaridad, esto es desde el cátodo hacia el ánodo, el sentido del flujo electroosmótico es alejándose del detector y sólo los analitos negativamente cargados con movilidad electroforética mayor que el EOF, pasarán por el detector. Este segundo modo se emplea sólo con capilares recubiertos con sustancias que invierten el flujo electroosmótico (porque invierten la carga neta de la pared interior del capilar) y cuando todos los analitos están cargados negativamente (DNA o complejos SDS-proteína).

ii) Voltaje aplicado

Un incremento en el voltaje provoca varios efectos; aumenta la migración de la muestra y el flujo electroosmótico, acorta el tiempo de análisis, produce picos más agudos y mejora la resolución. Aunque, estas ventajas se pueden perder si la fuerza iónica de la matriz de la muestra es mucho mayor que la del tampón de separación, de manera que el efecto Joule no se pueda disipar de modo efectivo. El calentamiento por efecto Joule del capilar hace que disminuya la viscosidad de la solución. Esto lleva a un aumento del EOF, de la movilidad de los iones y de la difusión de los analitos, lo que resulta finalmente en un ensanchamiento de la banda (McLaughlin *et al.*, 1992).

iii) Temperatura del capilar

Las separaciones se deben llevar a cabo inicialmente con el capilar termostataado a una temperatura próxima a la ambiental. Sin embargo, se puede aumentar en casi todos los aparatos comerciales hasta casi 60°C sin excesivo incremento de la corriente con la mayoría de tampones. Cuando se aumenta la temperatura, usando el mismo voltaje, la viscosidad del tampón disminuye y esto lleva a un aumento de la movilidad electroforética del analito y a tiempos de separación más cortos. Efectos no deseados de esta práctica son cambios en el pH del tampón, ensanchamiento de las bandas debido al incremento de la difusión, y posible desnaturalización térmica de la muestra.

iv) Longitud del capilar

Es recomendable comenzar las separaciones con capilares cortos (20 a 50 cm hasta el detector) para obtener tiempos breves de análisis. La longitud del capilar se puede incrementar para mejorar la resolución, especialmente con analitos que tienen diferencias muy sutiles en sus movilidades electroforéticas. Aumentar la longitud del capilar permite que dichas especies se puedan separar. Otra consecuencia que se desprende del alargamiento es la posibilidad de utilización de voltajes mayores, ya que la fuerza del campo eléctrico a un

voltaje constante se ve disminuida. El límite práctico en la longitud de los capilares está en los 100 cm.

v) Soluciones tampón

La elección del tampón es de gran importancia para obtener éxito en la separación de los analitos. Una vez que se ha elegido la longitud de onda óptima para la detección, se debe elegir un buen tampón que no interfiera en la detección de los analitos de interés, que mantenga su solubilidad y la capacidad tamponante a lo largo del análisis para producir una separación favorable.

Se pueden utilizar una gran variedad de electrolitos para las separaciones en EC. Así para separaciones a pH bajo, se suelen utilizar soluciones de fosfato, acetato, formiato y citrato. Para tampones de pH básico el Tris, Tricine y borato son electrolitos aceptables.

El tipo de tampón utilizado, viene condicionado por el pH pero, a igualdad de pH y concentración, la elección del tampón puede variar drásticamente la resolución.

En cuanto a la concentración de los tampones, indicar que el uso de una determinada concentración viene restringida por parámetros como la longitud del capilar y su diámetro interno, el campo eléctrico aplicado y la eficacia del sistema de refrigeración del capilar. Generalmente, el uso de tampones de fuerza iónica moderadamente alta es deseable para suprimir los efectos de intercambio iónico entre los iones del analito con los grupos silanol de la pared capilar. De cualquier modo, la corriente asociada con concentraciones de tampón por encima de 100 mM suele superar la capacidad de termostatar del aparato a elevados voltajes. Tampones con mayor problemática a este respecto son aquellos que poseen especies de elevada movilidad como el cloruro, citrato y sulfato. El tampón borato en el intervalo de pH de 7 a 9 ha demostrado ser excelente para concentraciones tan altas como 500 mM (Chen *et al.*, 1992).

A veces se emplean aditivos que añadidos al tampón consiguen potenciar la selectividad en una separación. Los aditivos (Tabla 2.4) suelen ser multifuncionales, ya que no sólo suprimen las interacciones analito-pared capilar, sino que también afectan a la solubilidad del analito.

Tabla 2.4. Aditivos comunes en EC y sus efectos (Oda y Landers, 1997).

Aditivo	Ejemplo	Función
Sales inorgánicas	NaCl, CaCl ₂ , K ₂ SO ₄	Modificación del EOF
		Cambios conformacionales en proteínas
Disolventes orgánicos	Metanol, acetonitrilo, etilenglicol	Hidratación de proteínas
		Modificación del EOF
Aditivos orgánicos	Urea	Solubilización de analitos
		Solvatación de los analitos
Ácidos sulfónicos	Hexano, heptano, octano, o análogos del nonano	Modificación del EOF
		Solubilización de proteínas
Aminas divalentes	Diaminoalcanos, Bromuro de hexametonio	Desnaturalización de oligonucleótidos
		Emparejamiento de los iones analito
Surfactantes catiónicos	Bromuro de dodeciltrimetilamonio (DTAB)	Interacciones hidrofóbicas
		Modificación del EOF
Derivados de celulosa	Hidroxietilcelulosa, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa	Neutralización de carga
		Interacción analitos
Surfactantes catiónicos	Bromuro de dodeciltrimetilamonio (DTAB)	Inversión de carga en pared capilar
		Interacción hidrofóbica
Derivados de celulosa	Hidroxietilcelulosa, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa	Reducción del EOF
		Aporte de medio tamiz

Incrementar la fuerza iónica del tampón produce un aumento del grosor de la doble capa iónica, y tiene como efecto la disminución del EOF, y por tanto se incrementa el tiempo de análisis. Una ventaja de aumentar la fuerza iónica es, además de mejorar la capacidad tamponante, que se logra disminuir las interacciones analito-pared capilar y analito-analito. Esto se demostró en una separación de fragmentos de DNA con y sin seroalbúmina bovina (SAB) (Landers *et al.*, 1993). El efecto neto en la separación será una mejora en la resolución, siempre y cuando se pueda refrigerar y no se produzcan procesos no deseados de disociación de los analitos. Un modo de aumentar la fuerza iónica sin aumentar el efecto Joule es el empleo de aditivos zwitteriónicos (betaína o sarcosina) (Bushey y Jorgenson, 1989).

Existe un método de recubrimiento dinámico de la pared capilar mediante materiales que alteran la viscosidad de la solución en la pared. Hjerten (1985), sugirió que el EOF es inversamente dependiente de la viscosidad de la solución en la doble capa. Si la viscosidad alcanzara el infinito, el EOF caería hasta cero. Así, polímeros que se adsorben a la pared capilar, reducen o eliminan el EOF, y evitan que las proteínas se adsorban ya que se bloquea el acceso a los silanos reactivos. Varios derivados de celulosa (Bruin *et al.*, 1989; Zhu *et al.*, 1989), y compuestos polihidroxi y polivinilalcoholes (Gilges *et al.*, 1992; Schomberg *et al.*, 1994) se han usado con diversos resultados para la separación de péptidos y proteínas.

2.2.2.3. Inyección de la muestra en el capilar

Como resultado de las dimensiones del capilar empleado en EC, el volumen total dentro del mismo es del orden de los microlitros. Si tenemos en cuenta la regla empírica seguida en cromatografía de restringir el volumen entre un 1-5% del volumen total del capilar, estamos hablando de volúmenes de muestra del rango de nanolitros si se quiere evitar sobrecarga (Aebersold y Morrison, 1990). La tecnología para la introducción o “inyección” o “cargado”

de pequeños volúmenes de muestra en un capilar converge en tres métodos aceptables: hidrostáticamente, por gravedad o electrocinéticamente.

- Con inyección *hidrostática*, se opera por inmersión de la entrada del capilar en un vial que contiene la muestra y se introduce bien presurizando dicho vial que contiene el extremo de entrada del capilar o bien aplicando vacío al vial de salida del capilar.
- La introducción de la muestra por *gravedad*, es más común en sistemas no comerciales, se basa en el efecto sifón de la muestra hacia el capilar cuando se eleva el extremo de entrada del capilar con respecto al de salida.
- Con introducción *electrocinética*, el extremo de entrada del capilar se sumerge en la muestra, y el de salida en el tampón de separación mientras se aplica un voltaje bajo (1-10 kV) durante 1-99 s dependiendo de la longitud del capilar y de su diámetro interno.

La inyección electrocinética tiene el inconveniente de que la cantidad de muestra introducida en el capilar depende de una serie de parámetros, los más importantes de los cuales son la movilidad electroforética de los componentes de la muestra y el EOF. Otros parámetros que pueden influir son el tampón (tipo, fuerza iónica y pH) y la composición de la matriz de la muestra. El modo electrocinético puede falsear la introducción de muestra; entran en el capilar preferentemente los compuestos con mayor movilidad electroforética. Pero este modo tiene sus ventajas si el analito de interés está en pequeño porcentaje en la muestra, pero tiene una movilidad mucho más elevada que el resto de componentes. O en el caso de utilizar matrices polimerizadas o entrecruzadas, donde la inyección a presión no se puede emplear.

2.2.3. SEPARACIÓN DE PROTEÍNAS MEDIANTE EC

La teoría de Debye-Huckel-Henry sobre la movilidad electroforética, en el caso de proteínas, tiene poco valor predictivo. Para las proteínas, no se puede predecir ninguna de las variables intervinientes en dicha ecuación. Además, aunque se pudiese calcular esta μ , deberían tenerse muy en cuenta las interacciones de la proteína con la pared del capilar que a menudo juegan un papel demasiado importante.

Para un capilar perforado de sílice fundida, se cumplen las siguientes ecuaciones:



$$K = [\text{SiO}^-] [\text{H}^+] / [\text{SiOH}]_s$$

donde s representa los grupos silanol sólidos. La ecuación muestra la desprotonación de la superficie del cristal para formar aniones silicato. El pK del equilibrio de esta reacción está entre 4,5 y 5, y es dependiente de las condiciones de la superficie del cristal y del tampón empleado (Tsuda, 1994).

Así, por debajo de valores de pH 4, los silanoles estarán protonados y muchas proteínas no se adherirán al cristal electrostáticamente. De cualquier modo, puede tener lugar adsorción hidrofóbica, y esto también depende de la proteína y del tampón.

A valores de pH por encima de 8, las proteínas catiónicas se adsorberán iónicamente. Para pH entre 4 y 8, el EOF varía considerablemente y esto influye en el tiempo de migración de las proteínas (Tsuda, 1994). Para EC en sílice fundida no tratada, es mejor correr la electroforesis a pH por debajo de 4 o de algún modo por encima del pI de la proteína donde la proteína no es catiónica.

En la EC de proteínas los tampones juegan un papel esencial, ya que tienen influencia sobre las formas, tamaños y cargas de estas moléculas, y

porque pueden interactuar con ellas. Por ejemplo, si la sílice está bañada con un tampón fosfato, se forma un fosfosilanol. Este tampón ha demostrado su efecto favorable en la separación de eritropoyetina humana recombinante (Tran *et al.*, 1991).

En el análisis de proteínas en EC se emplean con frecuencia aditivos disueltos en los medios tamponantes correspondientes (Oda y Landers, 1997). Estos aditivos pueden desempeñar varias funciones para minimizar las interacciones entre la proteína y la pared del capilar, o entre proteínas, o para mantener la solubilidad proteica. Muchos aditivos se adsorben a la pared del capilar, y modifican el EOF del sistema tamponante. Se suelen utilizar, surfactantes, sustancias zwitteriónicas, polímeros hidrofílicos, modificadores orgánicos, selectores quirales, iones metálicos, sustancias que potencien los puentes de hidrógeno, agentes complejantes y aminas cuaternarias.

Actualmente se conoce que no hay modo eficaz de predecir la movilidad electroforética de una proteína. Esta es la razón por la que los factores que contribuyen a la migración proteica sean desconocidos. Sin embargo, es razonable concluir que la movilidad electroforética de una proteína, es función de su tamaño molecular y de su carga neta y ambos parámetros son función de la estructura tridimensional de la misma. Hoy en día, no es posible predecir de modo ajustado la estructura tridimensional de las proteínas al nivel necesario para determinar tanto su tamaño como su carga.

En 1994, Gao *et al.* emplearon EC para determinar la carga neta efectiva de una proteína en solución mediante estudio de los tiempos de migración de varias especies derivatizadas de la proteína de interés. Se basaron en la teoría de que la estructura terciaria de las proteínas, que viene condicionada por su secuencia de aminoácidos, modifica la carga neta proteica.

La suma de todas las cargas que soporta la proteína, incluye las contribuciones de componentes electrostáticos tales como aminoácidos e iones metálicos y cofactores cargados. Estas cargas totales están a menudo apantalladas en cierta medida por el microambiente del grupo cargado, por

asociación de la proteína con contraiones en solución. La carga neta efectiva de la proteína es menor que la carga total. De hecho, es la carga neta efectiva de una proteína en un tampón particular a un pH determinado la que influye sobre la migración de la proteína en EC.

2.3. Diseño de Experimentos

En cualquier procedimiento en el que se trata de obtener una respuesta relacionada con varios factores de interés, es de gran utilidad conocer y controlar el modo en que intervienen dichos parámetros o variables experimentales en el proceso (Massart *et al.*, 1988).

Uno de los métodos que existen para llevar a cabo la optimación de variables experimentales es el *diseño de experimentos*, que consiste en una serie de pruebas en las cuales se introducen cambios deliberados en los factores que se pretenden optimar, de manera que sea posible observar los efectos producidos en la variable respuesta. El diseño experimental permite optimar las variables que intervienen en numerosas técnicas instrumentales como cromatografías, espectrofotometrías, técnicas electroquímicas, etc.

Se denomina *efecto de un factor* el cambio en la respuesta producido por un cambio en el *nivel del factor* (valor concreto). Hay casos en que existe interacción entre los factores y cuando esto ocurre, los diseños factoriales son más eficaces que la optimación de cada factor por separado, la cual no permitiría detectar las interacciones entre factores y llevaría a conclusiones engañosas. Por *diseño factorial* se entiende aquel en el que se investigan todas las posibles combinaciones de los niveles de los factores en cada ensayo completo o réplica del experimento. Los diseños factoriales son particularmente útiles en las primeras etapas del trabajo experimental y permiten estimar los efectos de un factor en diversos niveles de los otros factores, produciendo conclusiones que son válidas sobre toda la extensión de las condiciones experimentales. Son ampliamente utilizados para estudiar el efecto conjunto de varios factores sobre una respuesta (Box y Hunter, 1978).

Una vez elegido un modelo se hace imprescindible interpretarlo, y para ello se realiza el análisis de la varianza (ANOVA). La interpretación de los

resultados obtenidos con este método depende del tipo de factores utilizados en el diseño: fijos, aleatorios o mixtos.

Para realizar un diseño factorial general se seleccionan un número fijo de niveles para cada una de las variables de un conjunto y luego se hacen experimentos con todas las combinaciones posibles. Si hay l_1 niveles para la primera variable, l_2 para la segunda, ..., y l_k para la k -ésima, el conjunto de todas las $l_1 \times l_2 \times \dots \times l_k$ condiciones experimentales constituye el diseño factorial.

Vale la pena destacar los diseños de tipo factorial en los que la variable tiene únicamente dos niveles. Estos diseños requieren relativamente pocos experimentos por cada factor, y a pesar de que no permiten explorar exhaustivamente una amplia región del espacio de los factores, pueden indicar tendencias y así determinar una dirección favorable para realizar futuros experimentos (Cobb, 1998).

A menudo no sólo se pretende conocer cuáles son las variables que intervienen en un proceso y sus interacciones, sino también los valores de dichas variables para los cuales la variable respuesta es máxima. Para este objetivo se utiliza la metodología de las *superficies de respuesta* (Massart *et al.*, 1988).

2.3.1. DISEÑO FACTORIAL 2^k

Los diseños factoriales son ampliamente utilizados en experimentos en los que intervienen varios factores para estudiar el efecto conjunto de éstos sobre una respuesta. Sin embargo, existen varios casos especiales del diseño factorial general que resultan importantes porque se usan ampliamente en el trabajo de investigación, y porque constituyen la base para otros diseños de gran valor práctico.

El más importante de estos casos especiales ocurre cuando se tienen k factores, cada uno con dos niveles. Estos niveles pueden ser cuantitativos como sería el caso de dos valores de temperatura, presión o tiempo. También pueden ser cualitativos como sería el caso de dos máquinas, dos operadores, los niveles “superior” e “inferior” de un factor o, quizás, la ausencia o presencia de un factor. Una réplica completa del diseño requiere que se recopilen $2 \times 2 \times \dots \times 2 = 2^k$ observaciones y se conoce como diseño factorial 2^k .

A continuación se describen métodos para el análisis de este tipo de diseños. Para ellos se supone: (i) que los factores son fijos, (ii) que los diseños son completamente aleatorizados, y (iii) que se satisface la suposición usual de normalidad.

El diseño 2^k es particularmente útil en las primeras fases del trabajo experimental, cuando es probable que haya muchos factores por investigar. Conlleva el menor número de experimentos con los cuales pueden estudiarse k factores en un diseño factorial completo. Debido a que sólo hay dos niveles por cada factor, debe suponerse que la respuesta es aproximadamente lineal en el intervalo de los niveles elegidos de los factores (Otto, 1999).

2.3.1.1. Diseño 2^3

Consta de tres factores, A, B y C, cada uno con dos niveles. Arbitrariamente, los niveles del factor pueden llamarse “inferior” y “superior”, y son representados por los signos (-) y (+).

En la Fig. 2.13, se representan gráficamente mediante un cubo, las ocho posibles combinaciones de tratamiento para este diseño. Por convenio, el efecto de un factor se denota por la letra latina mayúscula, mientras que las combinaciones de tratamientos en el diseño suelen representarse por letras minúsculas. En la Fig. 2.13 se aprecia que el nivel superior de cualquier factor de una combinación de tratamientos está representado por la presencia de la letra minúscula correspondiente, mientras que la ausencia de esta última

representa el nivel inferior del factor. Por convenio, (1) se usa para representar a los factores en el nivel inferior. El orden estándar de las combinaciones de tratamientos sería (1), a, b, ab, c, ac, bc y abc.

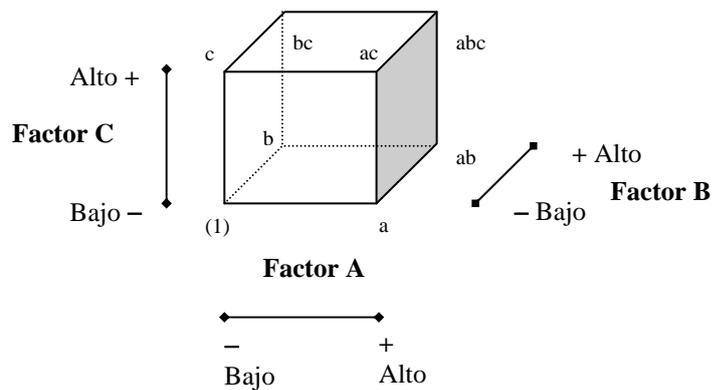


Fig. 2.13. Representación de las combinaciones de tratamientos en el diseño 2^3 .

Entre las ocho combinaciones de tratamientos en el diseño 2^3 existen siete grados de libertad, tres se asocian con los efectos principales A, B y C, y cuatro asociados con interacciones (AB, AC, BC y ABC), uno para cada una. El *efecto promedio de un factor* es el cambio en la respuesta producido por un cambio en el nivel de dicho factor, promediado sobre los niveles de los demás factores. El efecto de la interacción AB es la diferencia entre los efectos promedio de A a los dos niveles de B. Por convenio, la mitad de esta diferencia se denomina interacción AB. La interacción ABC se define como la diferencia promedio entre la interacción AB para los dos niveles distintos de C.

2.3.1.2. Diseño general 2^k

El método de análisis anterior puede generalizarse para el caso de un diseño factorial 2^k . Éste consta de k factores, cada uno con dos niveles. El modelo estadístico de diseño 2^k incluye k efectos principales, interacciones de dos factores, de tres factores..., y una interacción de k factores. En otras palabras, el modelo completo del diseño tiene $2^k - 1$ efectos (Cobb, 1998).

En muchos experimentos que implican diseños 2^k se examina la magnitud y la dirección de los efectos de los factores para determinar qué variable es probable que sea más importante, empleándose el análisis de la varianza para confirmar esta interpretación.

2.3.1.3. Adición de puntos centrales al diseño 2^k

Los diseños factoriales de dos niveles parten con la suposición de linealidad en los efectos de los factores. Esta, es innecesaria, y el sistema 2^k funciona bien incluso cuando la suposición de linealidad se cumpla sólo de manera aproximada. Sin embargo, la réplica de ciertos puntos protegerá contra la curvatura además de permitir obtener estimaciones de error independientes. Este es el objetivo de la adición de puntos centrales al diseño 2^k , para lo cual se hacen n réplicas.

Un motivo importante para agregar las réplicas en el centro del diseño es que los puntos centrales no influyen en las estimaciones usuales que se hacen en un diseño 2^k . Es decir, no tienen influencia sobre los coeficientes de regresión. Además no se alteran las propiedades de ortogonalidad del diseño (Massart *et al.*, 1988).

2.3.2. DISEÑO DE SUPERFICIES DE RESPUESTA

Para modelar y analizar problemas en los cuales una respuesta de interés está influenciada por varias variables, y para optimar esta respuesta, se usan una serie de técnicas matemáticas y estadísticas. A partir de la ecuación obtenida, mediante el análisis de la regresión de los datos experimentales, se construyen estas superficies de respuesta. La respuesta se representa como una superficie sólida en un espacio tridimensional (Otto, 1999). Para visualizar

mejor la forma de una superficie de respuesta, a menudo y si el número de dimensiones lo permite, se usan los contornos de dichas superficies.

En la mayoría de los problemas de los métodos de superficies de respuesta, la forma de la relación entre la respuesta y las variables independientes se desconoce. Por lo general se emplea un polinomio de orden bajo sobre alguna región de las variables independientes.

Si la respuesta se describe adecuadamente por una función lineal de las variables independientes, la función de aproximación es un modelo de primer orden. Si existe curvatura en el sistema debe utilizarse un polinomio de orden superior, por ejemplo de segundo orden. Este modelo polinomial funciona muy bien en regiones relativamente pequeñas de las variables independientes.

El método de superficie de respuesta es una técnica secuencial. A menudo, cuando se considera un punto sobre la superficie de respuesta alejado del óptimo, el polinomio de primer grado es apropiado porque existe poca curvatura en el sistema. En este caso, el objetivo es guiar al experimentador, rápida y eficientemente a las cercanías del punto óptimo. Una vez que se ha determinado la región del punto óptimo, puede emplearse un modelo más elaborado, como por ejemplo una superficie de respuesta de segundo grado, y realizar un análisis para localizar el óptimo. Este método asegura cuando menos un óptimo relativo (Otto, 1999).

2.3.2.1. Diseño para ajustar el modelo de primer orden

Supongamos que se desea ajustar el modelo de primer orden de k variables:

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \varepsilon$$

Son precisamente la clase de diseños *ortogonales* de primer orden los que minimizan la varianza de los coeficientes de regresión $\{\beta_i\}$. Un diseño es

ortogonal si los elementos fuera de la diagonal de la matriz $(X'X)$ son iguales a cero. Esto implica que la suma de los productos cruzados de la columna de la matriz X es igual a cero.

Esta clase de diseños ortogonales de primer orden incluye diseños factoriales 2^k y fracciones de la serie 2^k , en los que los efectos principales no son alias entre sí. Al usar estos diseños se considera que los k factores se codifican a los niveles estandarizados ± 1 (Massart *et al.*, 1988).

Por otra parte, un diseño ortogonal de primer orden es un diseño rotatorio. Se dice que un diseño experimental es *rotatorio o giratorio* si la varianza de la respuesta predicha y , en algún punto x , es función sólo de la distancia al punto desde el centro del diseño y no es función de la dirección. Además, un diseño con esta propiedad dejará sin cambio la varianza de y cuando el diseño se haga rotar alrededor del centro $(0, 0, \dots, 0)$; de aquí su nombre de diseño rotatorio.

La rotabilidad es una propiedad muy importante en la elección de un diseño de superficie de respuesta. Dado que la finalidad de la MSR (Método de Superficie Respuesta) es la optimación, y se desconoce la localización del óptimo antes de llevar a cabo el experimento, tiene sentido usar un diseño que proporcione estimaciones igualmente precisas en todas direcciones (Cobb, 1998).

Para el modelo de primer orden, la ortogonalidad es la propiedad de diseño óptima ya que minimiza la varianza de los coeficientes de regresión.

2.3.2.2. Diseño para ajustar el modelo de segundo orden

Un diseño experimental para ajustar un modelo de segundo orden debe tener por lo menos tres niveles de cada factor.

El diseño central compuesto consiste en un factorial o factorial fraccionario 2^k aumentado por 2^k puntos axiales $(0 \pm \alpha, 0, 0, \dots, 0)$, $(0, 0 \pm \alpha, 0, \dots, 0)$,

$(0,0,0\pm\alpha,\dots,0)$ y n_o puntos centrales (Massart *et al.*, 1988). El diseño central compuesto es probablemente el diseño experimental más utilizado para ajustar superficies de respuesta de segundo orden. Se convierte en rotatorio mediante la elección de α , que se define como $\alpha=(n_f)^{1/4}$, donde n_f es el número de puntos en la porción factorial del diseño.

Mediante la elección del número de puntos centrales n_o , se puede controlar el signo del diseño central compuesto para que sea ortogonal o bien de precisión uniforme. En un diseño de precisión uniforme, la varianza en el origen es igual a la varianza a una distancia unitaria del mismo.

Una variante del diseño central compuesto es el diseño central compuesto centrado en las caras, en el cual $\alpha=1$. En este diseño los puntos estrella o axiales se localizan en los centros de las caras del cubo (Box *et al.*, 1989).

2.3.3. APLICACIÓN DEL DISEÑO EXPERIMENTAL EN LA ELECTROFORESIS CAPILAR

Varios diseños experimentales quimiométricos han sido empleados tanto para la exploración u optimación de los métodos de EC, como para la confirmación de la robustez de dichos métodos, ya sea completos, central compuestos, fraccionados o Plackett-Burman (Altria *et al.*, 1995).

Los diseños factoriales han sido empleados con éxito para detectar el impacto de todas las variables, junto con sus posibles interacciones. Rogan *et al.* (1994) emplearon un diseño experimental Plackett-Burman para optimar una separación quiral de enantiómeros de clenbuterol mediante EC. También se ha empleado este tipo de diseño en la separación de cuatro ésteres de testosterona mediante electroforesis capilar micelar electrocinética (Vindevogel y Sandra, 1991).

Por su parte, los diseños centrales compuestos, han sido empleados en la optimización de las condiciones de separación quiral de la droga amlodipina (Fell *et al.*, 1995), asegurando la robustez desde el comienzo de la aplicación del método. También se ha estudiado con diseño central compuesto la composición electrolítica para la resolución de siete corticosteroides (Jumppanen *et al.*, 1994).

La utilización de diseños fraccionados ha permitido determinar la robustez de los métodos de análisis en EC, detectando los parámetros clave y aplicando posteriormente un diseño capaz de calcular una superficie de respuesta que permita señalar las condiciones límites de trabajo, de acuerdo con las posibilidades del sistema de EC. Concretamente se ha aplicado en la determinación de los niveles de impurezas en un fármaco (Altria y Filbey, 1994).

Por tanto, las posibilidades de empleo de los diseños de experimentos son múltiples y tienen aplicaciones en muy diversos campos analíticos entre los que se encuentra la electroforesis capilar.

2.4. Análisis estadístico multivariante

Dada la complejidad del proceso bioquímico implicado en la maduración de los quesos, son necesarios tanto métodos objetivos para su estudio, como la reducción de la dimensión de los datos que permita una interpretación adecuada, junto con un examen sensorial o visual más tradicional del perfil proteolítico (Pripp *et al.*, 2000b). Bajo este punto de vista, la aproximación estadística multivariante como herramienta para evaluar los perfiles de los cromatogramas y de identificación de algunos péptidos, ha sido recomendada para comprender la complejidad de la proteólisis durante la maduración del queso (Ardö y Madsen, 1998). Con esta idea, varios han sido los autores que han empleado algunas de estas técnicas estadísticas o quimiométricas (componentes principales, análisis discriminante, análisis cluster jerárquico para modelado de los datos, regresión por componentes principales, regresión por mínimos cuadrados parciales) para relacionar parámetros muy diversos estudiados en el queso con los procesos de maduración o con procesos de fabricación (García Ruiz *et al.*, 1998; Frau *et al.*, 1999; Pripp *et al.*, 2000a, 2000b; Benfeldt y Sørensen, 2001; Skeie *et al.*, 2001; Poveda *et al.*, 2003). Destacar los estudios realizados por Pripp *et al.* (1999a) sobre la clasificación de tres variedades de quesos noruegos mediante la aplicación de análisis por componentes principales de los datos obtenidos a partir de las fracciones solubles en etanol al 70% y ácido tricloroacético al 0,5%. O por ejemplo, los trabajos de Sørensen y Benfeldt (2001), en los cuales se analizaban, también mediante componentes principales, quesos tipo Danbo procedentes de dos lecherías diferentes.

El análisis estadístico multivariante también ha sido utilizado en el estudio del proceso de maduración de quesos. Así, O'Shea *et al.* (1996) aplicaron el análisis de componentes principales (PCA) para examinar la maduración de queso Cheddar de diferentes tiempos de curación y calidad con

los perfiles de péptidos obtenidos mediante HPLC. Bendfeldt *et al.* (1997) aplicaron la técnica de regresión mediante mínimos cuadrados parciales (PLS) para estudiar el efecto del tratamiento térmico de la leche en la elaboración de quesos Danbo sobre la acción de la plasmina y el proceso de maduración. Posteriormente Bendfeldt y Sørensen (2001) estudiaron la proteólisis, en muestras de queso Danbo elaborado con leche sometida a diferentes tratamientos térmicos, mediante PCA de los perfiles de péptidos solubles a pH 4,6 obtenidos por RP-HPLC. Sin embargo, en bibliografía podemos encontrar sólo una publicación en la que se aplica el análisis estadístico multivariante en la evaluación del perfil electroforético obtenido mediante EC para el seguimiento de la proteólisis que experimentan los quesos durante su maduración. Este trabajo ha sido realizado por Herrero-Martínez *et al.* (2000) dondel se muestra cómo a partir del análisis mediante EC de la fracción soluble en etanol-agua de quesos mezcla de vaca, oveja y cabra, era posible determinar el tiempo de maduración de estos quesos.

Por todo lo expuesto, en este trabajo de Tesis Doctoral, se ha planteado la utilización del análisis estadístico multivariante con objeto de predecir el tiempo de maduración de quesos de oveja y mezcla (oveja y vaca) a partir del análisis del perfil de péptidos insolubles a pH 4,6 obtenido mediante EC. Concretamente en este trabajo se han utilizado dos modelos de regresión, la regresión por mínimos cuadrados parciales (PLS) y la regresión lineal sobre componentes principales (PCR), los cuales se describen a continuación.

2.4.1. MODELOS DE REGRESIÓN

El avance creciente de las técnicas instrumentales permite obtener gran cantidad de información de una misma muestra experimental, por ejemplo, los registros de diferentes áreas de picos en cromatografía o electroforesis capilar. Se dispone en estos casos de “n” variables relacionadas entre sí y con la

muestra cuya información es de interés valorada conjuntamente, puesto que define mejor la muestra analizada que cada variable por separado. Aunque por ese mismo motivo, la correlación existente entre las variables supone gran redundancia de información. Estas dos ideas, justifican el uso de modelos multivariantes, pero son a su vez causa de dificultades que se resuelven introduciendo modelos flexibles (*soft modelling*) que consisten en la transformación de las medidas originales (Ortiz y Sarabia, 1994).

En muchos problemas, por tanto, se dispone de dos o más variables relacionadas e interesa modelar y explorar esas relaciones. Simplificando el planteamiento, se considera una variable respuesta y , que depende de p variables predictoras, x_1, x_2, \dots, x_p . Construir una regresión supone modelar la variable respuesta como función de las variables predictoras usando la información contenida en los datos experimentales, también llamado conjunto de entrenamiento o aprendizaje, escritos de forma matricial. La relación entre esas variables está caracterizada por un modelo matemático de regresión que consta de una parte determinista o funcional f (modelo funcional) y una parte aleatoria ε (modelo aleatorio).

$$y = f(x_1, x_2, \dots, x_p) + \varepsilon$$

En general, esta relación funcional será desconocida, por ello se emplea el conjunto de aprendizaje para especificar la forma funcional de f , la distribución de ε como variable aleatoria y el criterio de ajuste, es decir, la manera de evaluar la “distancia” entre los valores experimentales y_i y los calculados con el modelo, \hat{y}_i (Massart *et al.*, 1988).

Dentro de este marco global, se desarrolla a continuación la regresión lineal por mínimos cuadrados como método adecuado para obtener buenas estimaciones de los coeficientes.

2.4.2. REGRESIÓN LINEAL MULTIVARIANTE POR MÍNIMOS CUADRADOS

La forma funcional elegida en este caso, es una función lineal en los parámetros, de manera que un modelo de regresión lineal múltiple relaciona la respuesta y con p variables predictoras x_j ($j = 1, \dots, p$) del modo:

$$y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \dots + \beta_p x_p + \varepsilon$$

donde los parámetros β_j , $j = 1, \dots, p$, son los coeficientes de la regresión. Supuesto que se tienen $n > p$ observaciones de la respuesta, y_1, \dots, y_n , el modelo se describe como:

$$y_i = \beta_0 + \beta_1 x_{i1} + \dots + \beta_p x_{ip} + \varepsilon_i = \beta_0 + \sum_{j=1}^p \beta_j x_{ij} + \varepsilon_i \quad i = 1, 2, \dots, n$$

o en su notación matricial, $\mathbf{Y} = \mathbf{X}\boldsymbol{\beta} + \boldsymbol{\varepsilon}$ con:

$$\mathbf{Y} = \begin{pmatrix} y_1 \\ y_2 \\ \vdots \\ y_n \end{pmatrix}, \quad \mathbf{X} = \begin{pmatrix} 1 & x_{11} & x_{12} & \cdots & x_{1p} \\ 1 & x_{21} & x_{22} & \cdots & x_{2p} \\ \vdots & & \vdots & & \vdots \\ 1 & x_{n1} & x_{n2} & \cdots & x_{np} \end{pmatrix}, \quad \boldsymbol{\beta} = \begin{pmatrix} \beta_0 \\ \beta_1 \\ \vdots \\ \beta_p \end{pmatrix}, \quad \boldsymbol{\varepsilon} = \begin{pmatrix} \varepsilon_1 \\ \varepsilon_2 \\ \vdots \\ \varepsilon_n \end{pmatrix}$$

Se asume que el error ε en el modelo es una variable aleatoria. Usando el método de mínimos cuadrados, se calculan los β_j de manera que la suma de cuadrados de los errores ε_i sea mínima (Draper y Smith, 1981).

La suma de cuadrados del error en predicción (PRESS), proporciona un escalado de los residuos bastante útil. Para calcular PRESS, se selecciona una observación, por ejemplo la i -ésima. Se ajusta el modelo con las $n-1$ restantes y se usa este modelo ajustado para predecir el valor y_i de la observación retirada, que se denota como \hat{y}_i . El error en predicción para el punto i es entonces $\hat{\varepsilon}_i = y_i - \hat{y}_i$. Repitiendo el procedimiento para cada $i = 1, \dots, n$, se obtienen

$\hat{\varepsilon}_1, \dots, \hat{\varepsilon}_n$, a partir de los cuales se define PRESS como la suma de cuadrados de todos ellos:

$$PRESS = \sum_{i=1}^n (\hat{\varepsilon}_i)^2 = \sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2$$

Con esto se utiliza cada posible conjunto de $n-1$ observaciones como conjunto de estimación para ajustar el modelo y cada observación sucesivamente como un conjunto de predicción (Wold, 1978).

Otro parámetro que indica la calidad del ajuste es el error medio en predicción calculado mediante validación cruzada (RMSEP). Se define a partir de PRESS como la relación siguiente:

$$RMSEP = \left(\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2 / n \right)^{1/2}$$

Siendo n el número total de muestras.

2.4.3. REGRESIÓN POR MÍNIMOS CUADRADOS PARCIALES (PLS)

En la regresión por mínimos cuadrados parciales (*Partial Least Squares* o PLS) se proporciona una secuencia de modelos con número creciente de nuevas variables, denominadas variables latentes. Entre dichas nuevas variables hay que seleccionar las correspondientes para construir un modelo adecuado mediante validación cruzada (*crossvalidation*) (Wold, 1966).

Para construir el modelo PLS se parte de dos bloques de variables determinadas sobre n objetos: el bloque de las variables predictoras (matriz X) y el de las respuestas (matriz Y). PLS modela cada una de estas matrices mediante k variables latentes, estableciendo una condición que liga a las

variables latentes determinadas en el bloque X y en el bloque Y, consistente en obligar a que exista una relación lineal entre la primera variable latente del bloque X y la primera del bloque Y. La ligadura impuesta a la primera variable latente del bloque X con relación a la primera del bloque Y, hace que se pondere la dirección de mayor varianza en las predictoras y respuesta con la de mayor correlación entre ambas. Esto permite conseguir una situación intermedia entre la regresión ordinaria por mínimos cuadrados (OLS) en la cual se busca la máxima correlación entre predictoras y respuesta sin tener en cuenta la estructura latente y la regresión lineal sobre componentes principales (PCR) que como se discutirá en el siguiente apartado, únicamente tiene en cuenta la estructura latente de las predictoras con independencia de la respuesta (Otto, 1999).

Un parámetro de interés para evaluar un modelo PLS numéricamente es el poder modelante de las variables. Es una medida de la contribución de una variable al modelo PLS construido. Se mide mediante la desviación típica de la variable que queda corregida en el modelo PLS. El poder modelante permite seleccionar variables eliminando aquellas que no sobrepasen un determinado umbral (se suele tomar 0,25) y rehaciendo el modelo PLS con las restantes (Forina *et al.*, 2000).

Para llevar a cabo la validación del modelo PLS, se suele seguir el método de validación cruzada, que consiste en dividir el conjunto de todos los objetos en g grupos distintos de tamaño aproximadamente igual, también llamados *grupos de cancelación*. Sucesivamente, cada uno de esos grupos toma la función de conjunto de evaluación del modelo, de manera que se construye el modelo con los objetos restantes y se evalúa la suma de cuadrados residual. Repitiendo el proceso g veces se tiene que todos los objetos han sido evaluados una sola vez. La cantidad así obtenida es PRESS, el valor de la suma de cuadrados del error en predicción.

Cuando la relación entre objetos/variables es grande o hay objetos anómalos, se suele emplear el procedimiento de *validación cruzada completa*

que consiste en calcular, para cada número de variables latentes, la varianza explicada por el modelo y la varianza explicada en predicción. Si al añadir la j -ésima variable latente, la variabilidad explicada en predicción disminuye, eso será índice de que esa variable está incluyendo la variabilidad debida a objetos anómalos o no relacionada con la respuesta. Cuando esto ocurra se tomará el modelo con $j-1$ variables latentes (Lanteri, 1992).

2.4.4. REGRESIÓN LINEAL SOBRE COMPONENTES PRINCIPALES (PCR)

En todo el apartado se supondrá que las variables han sido autoescaladas (es decir, se ha restado su media y dividido su desviación típica) para evitar una distorsión artificial en la nube de puntos que forman los objetos del conjunto de entrenamiento en el espacio de las p variables predictoras.

Lo esencial de este tipo de regresión es que se sustituyen las variables predictoras x_1, x_2, \dots, x_p por otras que se llaman componentes principales (CP) y que son combinaciones lineales de las variables originales. Los coeficientes de las combinaciones lineales que definen las componentes principales se llaman pesos o *loadings*, de manera que la i -ésima componente principal se escribe como: $CP_i = l_{i0} + l_{i1}x_1 + l_{i2}x_2 + \dots + l_{ip}x_p$. Así, el *loading* l_{ij} indica la contribución de la variable x_j en la construcción de la i -ésima componente principal. En la nueva base de autovectores, $\mathbf{l}_i = (l_{i1}, l_{i2}, \dots, l_{ip})^t$ para $i = 1 \dots p$, los puntos muestrales tendrán unas nuevas coordenadas llamadas *scores*.

Las componentes principales se construyen de manera que verifiquen dos propiedades interesantes: seguir la dirección de máxima variación y ser ortogonales. Para ello, la primera componente principal se construye para que siga la dirección de máxima variabilidad de los datos (la máxima elongación de la nube de puntos determinada por las p variables originales). Formalmente,

equivale a determinar los valores de los *loadings* l_{ij} con la condición de que sea máxima la varianza de la primera componente CP_1 .

La segunda componente se construye de forma que siga, de entre las direcciones ortogonales (incorreladas) a la primera componente, aquella de máxima varianza, es decir, es la variable incorrelada con la primera que explica el mayor porcentaje de varianza no explicada por la primera. Formalmente está caracterizada por correlación nula o $\text{Corr}(CP_1, CP_2) = 0$ y $\text{Var}(CP_2)$ máxima. De este modo se construyen las sucesivas componentes principales CP_3, \dots, CP_p en número igual a la dimensión del espacio, incorreladas con las anteriores y de varianza máxima (Hotelling, 1933; Rao, 1964).

Con las nuevas variables o componentes principales, la regresión para la variable respuesta sería:

$$Y = \alpha_0 + \alpha_1 CP_1 + \dots + \alpha_p CP_p$$

La primera ventaja a destacar de esta regresión, por mínimos cuadrados sobre las componentes principales (PCR), es que las variables son incorreladas entre sí por construcción, con lo que el modelo es más estable. Otra ventaja es que, dado que las componentes principales explican fracciones decrecientes e independientes de la varianza encerrada por las variables predictoras, puede considerarse que las últimas componentes no son informativas ya que presumiblemente estarán vinculadas al ruido de fondo del problema estudiado. (Meloun *et al.*, 1992). De modo que si sólo se consideran las k primeras componentes, el modelo de regresión sesgado sería:

$$Y = \alpha_0 + \alpha_1 CP_1 + \dots + \alpha_k CP_k$$

Mediante este procedimiento, se usan todas las variables predictoras, ya que las componentes principales son combinación lineal de todas ellas, pero se ordena su capacidad descriptora de los datos experimentales. Además, se introduce un filtrado al seleccionar sólo las componentes principales que se creen portadoras de la información relevante.

El número de componentes a considerar, k , que controla el sesgo del modelo teniendo en cuenta criterios numéricos, sería el aportado mediante validación cruzada (*crossvalidation*) con el cual se busca el valor de k para el que se alcanza el mínimo valor de la suma de cuadrados del error en predicción PRESS (Wold, 1978).

Una desventaja de PCR es la posibilidad de que variables predictoras con varianza grande no estén relacionadas con la respuesta que se trata de modelar, mientras que otras con poca varianza pueden estar muy correlacionadas con la respuesta. En ese caso, el modelo elegirá las de mayor varianza y rechazará las de varianza pequeña, que serían las de interés. Esto provocaría un subajuste del modelo, mientras que la regresión lineal ordinaria por mínimos cuadrados tiende a provocar el efecto contrario, un sobreajuste.

Una solución a los problemas de la matriz del diseño y de la selección de las variables con gran varianza no correlacionadas con la respuesta de interés se obtiene utilizando la regresión por mínimos cuadrados parciales, PLS (Partial Least Squares), que a la vez que busca las direcciones de máxima varianza, evita las que no están correlacionadas con la respuesta (Brereton, 1990).

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Electroforesis Capilar

El análisis de las caseínas mediante electroforesis capilar fue realizado en un sistema P/ACETM System 2200 de Beckman Instruments, Inc. (Fullerton, CA, USA), controlado mediante el software System Gold (versión 810).

3.1.1. DESCRIPCIÓN DE LOS CAPILARES

En este estudio se utilizaron dos tipos de capilares: uno sin recubrimiento interior y otro hidrofílicamente recubierto.

El capilar sin recubrimiento interior era de sílice fundida eCapTM (Beckman Coulter, Inc.) con un diámetro interno de 75 μm y 375 μm de diámetro externo. En la superficie exterior poseía un recubrimiento de poliimida que aportaba flexibilidad a la estructura. Su longitud era de 57 cm con una ventana para el detector UV (214 nm) situada a 50 cm de su inicio. La regeneración de capilares nuevos implicaba un lavado previo de diez minutos con HCl 1 N.

El capilar neutro hidrofílicamente recubierto eCapTM (Beckman Coulter, Inc.) llevaba una capa de poliacrilamida en la superficie interior ligada a los grupos silanol propios de la estructura de sílice, la cual neutralizaba las cargas del capilar eliminando a su vez el flujo electroosmótico. El diámetro interno era de 75 μm , con 375 μm de diámetro externo y una longitud total de 57 cm (50 cm hasta la ventana). Para la puesta a punto de capilares de estas características, la recomendación es lavar el capilar durante aproximadamente 30 min con HCl 0,1 N, seguido de un lavado con agua y un equilibrado con el tampón de separación correspondiente.

3.1.2. SOLUCIONES TAMPÓN

En el desarrollo del presente trabajo se utilizaron diferentes tampones de separación, los cuales se describen a continuación. En todos los casos las disoluciones tampón eran filtradas dos veces consecutivas utilizando filtros de membrana de 0,45 y 0,22 μm (HAWP y GSWP de Millipore, respectivamente).

T.1. *Tampón universal de Theorell y Stenhangen (citrato-fosfato-borato/HCl)* (Diem y Lentner, 1975): en 343 ml de NaOH 0,025 N se disolvían 87,56 mg de ácido cítrico monohidratado, 28,2 μl de ácido ortofosfórico del 85%, 88,5 mg de ácido ortobórico cristalizado, enrasándose finalmente el volumen a 1 litro (Sol. A). Por otra parte, se preparaba una disolución de HCl 0,1 N (Sol. B). Para ajustar el pH de las diferentes soluciones tampón utilizadas se mezclaban las disoluciones anteriores en la siguiente proporción:

- *pH 2,50*: 20 ml Sol. A + 62,95 ml Sol. B + 17,05 ml H₂O
- *pH 6,25*: 20 ml Sol. A + 38,40 ml Sol. B + 41,60 ml H₂O
- *pH 10,0*: 20 ml Sol. A + 18,10 ml Sol. B + 61,90 ml H₂O

Para evitar una posible formación de micelas de caseína durante la separación electroforética, se adicionaba urea en el tampón de separación, siendo necesario ajustar de nuevo el pH con unas gotas de HCl concentrado. De hecho, uno de los objetivos de este trabajo fue la optimización de la concentración de este agente disociante, por lo que fue necesario preparar soluciones de urea a diferentes concentraciones.

T.2. *Tampón fosfato 50 mM*: se disolvían 847,7 μl de ácido ortofosfórico del 85% en 250 ml de una solución de urea, cuya concentración variaba dependiendo del experimento, ya que era una de las variables a optimar en este estudio. Finalmente, el pH era ajustado con NaOH 2 M hasta el valor deseado.

T.3. Tampón fosfato 50 mM con HPMC: en 250 ml de una solución de urea se disolvían 847,7 μ l de ácido orto-fosfórico del 85%, y la cantidad correspondiente de hidroxipropilmetil celulosa (HPMC) (0,03; 0,04 ó 0,05%, p/v). En las separaciones donde se utilizaba este tampón de separación se optimaba la concentración del aditivo polimérico (HPMC). Finalmente, el pH era ajustado con NaOH 2 M hasta el valor deseado.

T.4. Tampón de carrera cítrico-citrato: en 25 ml de una solución 6 M de urea (9,009 g) se disolvían 1,681 g de ácido cítrico monohidrato (0,32 M), 0,147 g de citrato de sodio dihidrato (0,020 M) y 12,5 mg de hidroxipropilmetil celulosa (HPMC) (0,05%, p/v) ajustándose finalmente el pH a un valor de 3,0.

T.5. Tampón de lavado cítrico-citrato: en 25 ml de una solución 6 M de urea (9,009 g) se disolvían 1,681 g de ácido cítrico monohidrato (0,32 M), 0,147 g de citrato de sodio dihidrato (0,02 M) y 0,219 g de ácido morfolino propanosulfónico (MOPS) (0,042 M). Finalmente el pH de la solución se ajustaba a 3,0 con unas gotas de HCl o NaOH concentrados.

3.1.3. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Las muestras se preparaban según describe Otte *et al.* (1997). Así, para disociar las caseínas y los productos insolubles de su hidrólisis, todas las muestras se disolvían en el tampón de muestra que consistía en una solución de tampón fosfato 10 mM (pH 8), el cual contenía urea 8 M, ditiotreitól (DTT) 10 mM, y como marcador el tripéptido Lys-Tyr-Lys 1 mM. Las muestras se mantenían al menos 1 h a temperatura ambiente antes de ser filtradas a través de filtros de membrana de 0,22 μ m (Millex-GV₁₃, Millipore).

3.1.4. CONDICIONES DE SEPARACIÓN

La inyección de la muestra en el capilar se realizaba hidrodinámicamente a presión (0,5 psi) durante 5 segundos en el extremo anódico y la separación se llevaba a cabo del ánodo al cátodo.

3.1.4.1. Capilar de sílice fundida

La migración se llevaba a cabo a 23°C. Una de las variables a optimar fue el voltaje aplicado en el capilar. Su valor era constante y oscilaba entre 15-30 kV, dependiendo de las condiciones del diseño experimental.

3.1.4.1.1. Electroforesis capilar en zona libre sin aditivo

Los tampones de separación utilizados fueron el tampón universal (T.1) y el tampón fosfato (T.2), dependiendo de si el diseño experimental se centraba en un amplio rango de pH (2,5-10) o en un intervalo de pH ácido (2-3), respectivamente.

Entre sucesivas carreras electroforéticas el capilar se lavaba primero con H₂O Milli-Q durante 2 min, seguido de una disolución de NaOH cuya concentración oscilaba entre 0,03 y 1,00 M durante 2 min, se secaba con N₂ durante aproximadamente 2 min y, por último, se equilibraba con el tampón de separación correspondiente durante 4 min.

En estas condiciones se conseguía una separación satisfactoria en 40 min.

3.1.4.1.2. Electroforesis capilar en zona libre con HPMC

La migración de las proteínas en este caso se realizaba con el tampón fosfato (T.3) que contenía HPMC durante un tiempo de 50 min.

Entre diferentes carreras el capilar se lavaba con tampón de separación durante 5 min (Otte *et al.*, 1997). Además, era necesario después de cada bloque

de experimentos lavar exhaustivamente el capilar con HCl 1 M y H₂O Milli-Q y equilibrar con el tampón de separación. Este lavado debía prolongarse hasta que la línea base se estabilizara.

3.1.4.2. Capilar neutro hidrofílicamente recubierto

La separación con este capilar se llevaba a cabo durante 60 min y a temperatura y voltaje constantes. Los valores de temperatura y voltaje oscilaban entre 23 - 45°C y 18,5 - 30 kV, respectivamente.

Los tampones empleados fueron el tampón citrato (T.4) para correr las muestras, que contenía un 0,05% (p/v) de HPMC, y el tampón citrato (T.5) para efectuar el lavado del capilar entre carreras consecutivas. Ambos tampones a un valor de pH de 3,0.

El correcto mantenimiento del capilar era imprescindible para conseguir la repetitividad entre carreras sucesivas. Se llevaba a cabo con HCl 0,1 N (2 min), seguido de un lavado con H₂O (2 min) y finalmente con tampón de lavado (5 min) con el fin de equilibrar el capilar. Cabe indicar que al utilizar un capilar nuevo era necesario realizar un lavado exhaustivo con HCl (0,1 N), seguido de H₂O durante varias horas para que el capilar pudiera ser operativo.

3.2. Muestras de Caseínas y Procesos de Obtención

Las muestras de caseínas utilizadas en este trabajo fueron de tres orígenes diferentes:

- Caseínas purificadas (calidad Sigma).
- Caseínas aisladas de leche.
- Caseínas extraídas de quesos.

3.2.1. CASEÍNAS PURIFICADAS

Se seleccionaron tres caseínas bovinas purificadas calidad Sigma:

- α_s -Caseína (C-6780), obtenida a partir de leche de vaca mediante electroforesis y purificada por cromatografía. Aproximadamente 85% de pureza. Se presenta en polvo liofilizado.
- β -Caseína (C-6905), obtenida mediante electroforesis a partir de leche de vaca. Pureza mínima de un 90%. Liofilizada y libre de sales.
- κ -Caseína (C-0406), obtenida a partir de leche de vaca por electroforesis. Mínimo un 80% de pureza. Se presenta en polvo liofilizado.

3.2.2. PRECIPITACIÓN ISOELÉCTRICA DE LAS CASEÍNAS DE LA LECHE

Las muestras de leche utilizadas en este trabajo fueron de dos tipos: (i) leche entera uperizada U.H.T. (N° Código 131048) en recipiente tipo Tetra Brick (de la empresa Quesos Frías S.A.) y (ii) muestras de leche de vaca y de oveja suministradas por la empresa Quesos Frías S.A., empleadas en la fabricación de quesos de oveja y mezcla.

Tras una amplia revisión bibliográfica se seleccionó, para la extracción de caseínas a partir de muestras de leche, el método descrito por Recio *et al.* (1996a; 1997a). Sin embargo, el proceso de extracción desarrollado en este trabajo implicaba pequeñas modificaciones en la etapa de lavado de las caseínas con respecto al método descrito por los autores citados.

El protocolo experimental suponía, la precipitación de las caseínas por adición de HCl 2 M a las muestras de leche hasta alcanzar el punto isoeléctrico de estas proteínas (pH 4,6). A continuación, el precipitado era separado por centrifugación a 3500 rpm durante 15 min a 20°C, y lavado una vez con tampón acetato de sodio 1 M (pH 4,6) y tres veces con una solución de diclorometano/tampón acetato de sodio 1 M (pH 4,6) (1/1, v/v), con objeto de eliminar la grasa presente en la muestra. Finalmente, la fracción proteica obtenida era congelada a -20°C, liofilizada y almacenada a temperatura de congelación hasta su utilización.

Se analizaron muestras de caseínas de leche de vaca y de oveja en concentraciones de 10 mg ml⁻¹, y mezcla de ambas caseínas a la misma concentración y en la proporción (1/1).

3.2.3. EXTRACCIÓN DE CASEÍNAS DEL QUESO

Se utilizaron muestras de queso “Frías” de oveja (elaborado con leche cruda de oveja), y queso curado “Condestable de Castilla” (elaborado con mezcla de leche pasteurizada de vaca y leche cruda de oveja) suministradas todas ellas por la empresa Quesos Frías S.A. Se disponía de información sobre el tiempo exacto de curación de cada muestra.

Los *quesos “Frías” de oveja* son productos de artesanía elaborados con leche de oveja de los páramos Burgaleses. Estos quesos, de exquisito paladar y sabor noble, son un fiel reflejo del tradicional y viejo quehacer artesano. Se ofrecen en piezas de aproximadamente 3,2 Kg, (Nº Código 101911). Son elaborados con leche cruda de oveja, tienen corteza oscura y cincho. La pasta es de ojos irregulares y color marfil. Su curación aproximada en el momento de la venta es de 9 meses. Los quesos suministrados para este estudio tenían los siguientes tiempos de maduración: 0, 14, 42, 69, 102 y 139 días.

El “**Condestable de Castilla**” es un queso de aroma y sabor característicos Tiene corteza clara y cincho, pasta con pequeñas oquedades de color marfil. Se presenta al consumidor en estado de unos 6 meses de curación, con un peso medio de 3,2 Kg, (Nº Código 103410). En este estudio, se trabajó con *quesos mezcla* de diferente grado de maduración (pasta reciente o de 0 días, 16, 44, 73, 100, 133 y 167 días).

El proceso seguido para la extracción de las caseínas presentes en los quesos suponía mezclar 5 g de queso (de la parte central), con 30 ml de agua Milli-Q en un tubo de ensayo de 50 ml. Esta mezcla era homogeneizada a 8000 rpm con un homogeneizador de varilla Ultra-Turrax T25, obteniéndose una pasta a la cual se adicionaba HCl 2 M hasta un valor de pH 4,6. El precipitado obtenido era separado por centrifugación a 3500 rpm durante 15 min a 20°C, y lavado según se describe en el apdo. 3.2.2. Por último, las muestras de caseínas obtenidas eran congeladas, liofilizadas y almacenadas hasta su análisis mediante EC.

3.3. Hidrólisis Enzimática de Caseínas

Las caseínas se hidrolizaron utilizando tres enzimas: renina de estómago de ternera, plasmina de plasma bovino y la preparación comercial Neutrase[®] de *Bacillus subtilis* (Novozyme, Bagsværd, Dinamarca).

3.3.1. REACTIVOS

R.1. *Ácido acético 0,5 M*: 7,15 ml de ácido acético (99,8% de pureza y densidad 1,052 g cm⁻³) se diluían hasta un volumen de 250 ml con H₂O Milli-Q.

R.2. *Tampón fosfato 0,01; 0,05 y 0,075 M*: se disolvían 1,361; 6,805 y 10,207 g de KH₂PO₄, respectivamente, en 1 l de agua Milli-Q (Sol. A). Por otra parte se disolvían 1,781; 8,602 y 13,354 g de Na₂HPO₄·2H₂O, respectivamente, en 1 l de agua Milli-Q (Sol. B). Para ajustar el pH de la solución tampón al valor deseado se mezclaban las soluciones anteriores en las siguientes proporciones:

- *pH 6,2* 41,05 ml de Sol. A + 8,50 ml de Sol. B
- *pH 7,0* 20,65 ml de Sol. A + 29,35 ml de Sol. B
- *pH 7,5* 8,125 ml de Sol. A + 41,875 ml de Sol. B

R.3. *Renina al 0,003; 0,004 y 0,008% (p/v)*: 1,5; 2,0 y 4,0 mg de renina (Sigma) se disolvían en 50 ml de tampón fosfato 0,075 M a pH 6,2.

R.4. *Plasmina al 0,003; 0,008 y 0,04% (p/v)*: 1,5; 4,0 y 20,0 mg de plasmina (Sigma) se disolvían en 50 ml de tampón fosfato 0,05 M a pH 7,0.

R.5. *Neutrase*[®] al 0,003% (v/v): 1,5 µl de *Neutrase*[®] (Novozyme) se disolvían en 50 ml de tampón fosfato 0,01 M a pH 7,0.

3.3.2. HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE CASEÍNAS PURIFICADAS

El procedimiento suponía mezclar en un tubo Eppendorf 0,5 ml de solución enzimática al 0,003% (R.3-R.5) con 0,5 ml de solución de caseínas (15 mg ml⁻¹, preparadas en el mismo tampón que la enzima correspondiente). La mezcla se incubaba a 37°C durante diferentes tiempos (15, 30, 45, 60 y 90 min). Transcurrido el periodo de incubación, la reacción enzimática se paralizaba por tratamiento en un baño de agua a 85°C, durante 10 min. A continuación, las muestras eran centrifugadas (Biofuge 13, Heraeus Sepatech) a 2600 rpm durante 20 min a 4°C. El pH del sobrenadante se ajustaba con ayuda de un pH-metro de punción a un valor de 4,6 con ácido acético 0,5 M (R.1). Al cabo de 1 h se centrifugan las muestras a 2600 rpm a 4°C durante 20 min. El sobrenadante era descartado, y el precipitado se disolvía en 0,66 ml de tampón de muestra (apto. 3.1.2) para su análisis por electroforesis capilar.

Todas las muestras se realizaban por duplicado, y además, se incluía un blanco donde la solución enzimática era sustituida por la solución tampón correspondiente.

Cuando los hidrolizados eran analizados mediante el capilar neutro, la concentración de caseínas era de 20 mg ml⁻¹. No obstante, con objeto de comparar los resultados obtenidos por ambos capilares, se mantuvo la misma proporción de las concentraciones de enzima/sustrato.

También se procedió a extraer la para-κ-caseína para su análisis mediante actuación de renina sobre κ-caseína, simplemente recogiendo el precipitado y redisolviéndolo en tampón de muestra.

3.3.3. HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE LA FRACCIÓN CASEÍNICA DE LOS QUESOS

Con objeto de una mejor identificación de los productos de hidrólisis de las caseínas en el queso, se llevó a cabo un ataque enzimático mediante plasmina y renina sobre caseínas extraídas de los quesos (apto. 3.2.3). Para este estudio se emplearon únicamente quesos de 0 días de maduración.

El procedimiento experimental de hidrólisis era similar al descrito en el apartado 3.3.2. con la salvedad de que en este caso se empleaba una concentración de la fracción caseínica de 20 mg ml^{-1} . En cuanto a las enzimas se trabajó a dos concentraciones y dos tiempos diferentes para cada una:

- plasmina al 0,008% ($0,08 \text{ mg ml}^{-1}$) durante 90 min y al 0,04% ($0,4 \text{ mg ml}^{-1}$) durante 240 min.
- renina al 0,004% ($0,04 \text{ mg ml}^{-1}$) durante 90 min y al 0,008% ($0,08 \text{ mg ml}^{-1}$) durante 120 min.

La incubación se efectuó a 37°C y se finalizó la acción enzimática por calentamiento a 85°C durante 10 min. Posteriormente se ajustaba el pH hasta punto isoeléctrico y tras una hora se centrifugaba a 2600 rpm a 4°C durante 20 min. Se descartaba el sobrenadante y la fracción caseínica reprecipitada se disolvía en tampón de muestra (apto. 3.1.2.) para su posterior análisis mediante EC.

3.4. Estudio Quimiométrico

Con objeto de realizar un planteamiento adecuado de la optimación de variables experimentales y de su análisis estadístico posterior, se procedió a utilizar la metodología del *diseño de experimentos*. Por otro lado, la *regresión multivariante* permitía aprovechar toda la información retenida en los electroferogramas para hacer buenas correlaciones con el tiempo de maduración. Ambas técnicas, consideradas parte de la Quimiometría tienen gran potencial para resolver de forma adecuada problemas prácticos.

3.4.1. APLICACIÓN DEL DISEÑO DE EXPERIMENTOS

En el presente trabajo se optimaron las condiciones de separación por electroforesis capilar de caseínas α_s , β y κ , mediante un diseño de experimentos. Para ello, y utilizando el programa estadístico Statgraphics Plus 4.0 para Windows, se procedía a crear un diseño con las variables a estudiar como factores experimentales, el cual permitía en principio estimar o seleccionar los efectos importantes y, a ser posible, eliminar algún factor no determinante. Posteriormente, se creaba otro diseño que permitía evaluar superficies de respuesta. A este respecto, el propio programa estadístico ofrece la posibilidad de aleatorizar los experimentos presentando una hoja de trabajo apropiada con las condiciones experimentales. Además, permite la estimación de los grados de libertad para el error, para lo cual se hicieron cuatro réplicas en el punto central del diseño.

Una vez obtenidos los resultados, en este caso la resolución entre las diversas caseínas, se introducían en la hoja de trabajo correspondiente y se procedía a su estudio mediante la estimación de los efectos y de sus

interacciones: i) el análisis de la varianza (ANOVA), para conocer la significatividad estadística de los efectos, ii) los coeficientes de regresión del modelo matemático propuesto, iii) existencia de fallo de ajuste en el modelo, iv) predicciones sobre otros puntos experimentales y v) optimación de la respuesta.

Se emplearon ayudas *gráficas*, como el diagrama Pareto, el diagrama de los efectos principales así como de sus interacciones, el gráfico de la probabilidad normal de los efectos, las superficies de respuesta, y el diagrama de diagnóstico (representaciones de los residuos) para comprobar la idoneidad del modelo.

En un diseño de experimentos, el ANOVA reparte la variabilidad en la respuesta en partes separadas para cada uno de los efectos. Posteriormente comprueba la significatividad estadística de cada efecto por comparación de la media de cuadrados frente a una estimación del error experimental. Para ello, calcula la distribución F de Snédecor (F-Ratio en las tablas) como el cociente entre la media de cuadrados (MS) del factor o varianza explicada por el factor y la media de cuadrados del error (MSE), que es la varianza inexplicada o del error, y la compara con valores tabulados de F_α tales que el nivel de significación $p(F > F_\alpha) = \alpha = 0,05$, es decir, a un nivel de confianza de 95% (Arnaiz, 1986).

El *coeficiente* r^2 da una idea del grado de ajuste del modelo indicando el porcentaje de variabilidad de la respuesta explicado. El coeficiente r^2 ajustado con los grados de libertad es más adecuado para comparar modelos con diferente número de variables independientes.

El *test de fallo de ajuste* se realizaba a cada diseño experimental con la finalidad de determinar si el modelo propuesto era correcto. Las hipótesis que se contrastaban eran: i) hipótesis nula (el modelo matemático supuesto se ajustaba adecuadamente a los datos experimentales); ii) hipótesis alternativa (el modelo no se ajustaba a los datos). El criterio de decisión se estableció a través

del estadístico F de Snédecor correspondiente (F_o), rechazándose la hipótesis de idoneidad del modelo (hipótesis nula) si $F_o > F$ de Snédecor tabulada (con $\alpha = 0,05$). Si la hipótesis nula no se rechazaba, no existía razón aparente para dudar de la adecuación del modelo matemático propuesto.

En cada diseño se realizaba un test *estadístico de Durbin-Watson* a los residuos para determinar si existía correlación significativa debida al orden en que se realizaban los experimentos.

Para estos tratamientos se calcularon los parámetros que se indican a continuación:

Suma de cuadrados (SS) de los factores y del error, así como la media de cuadrados de los factores (MS) y del error (MSE).

Estadístico F de Snédecor (F) relativo al análisis de la varianza o (ANOVA) para dos o más factores y su posible interacción con un nivel de confianza del 95% ($\alpha = 0,05$).

Nivel de significación (p) del ANOVA para cada factor y para la interacción entre los factores, que a un nivel de confianza del 95% indica que hay efecto significativo del factor si $p \leq 0,05$, y que no lo hay si $p > 0,05$ (Arnaiz, 1986).

3.4.2. APLICACIÓN DEL ANÁLISIS ESTADÍSTICO MULTIVARIANTE

Las áreas de pico obtenidas a partir de los electroferogramas de muestras de los diferentes tipos de quesos analizados, se procesaron estadísticamente mediante el programa PARVUS 3.0 (Forina, M., Lanteri, S. y Armanino, C.; Departamento de Química y Tecnología Farmacéutica y Alimentaria de la Universidad de Génova).

Dicho programa es un paquete extensible para análisis exploratorio de datos, clasificación y regresión. Mediante este paquete estadístico se realizaron los análisis por componentes principales (PCA), así como las regresiones sesgadas por mínimos cuadrados parciales con validación cruzada (PLSC) y por componentes principales (PCR).

Para la regresión por PLSC se empleó el autoescalado (es decir, se restó la media y se dividió por la desviación estándar) y la validación cruzada, para obtener como resultados los valores predichos de la respuesta (Y) y las nuevas variables latentes. Se efectuó la validación eligiendo tantos grupos de cancelación como muestras existentes en el conjunto de modelado (*leave one out*). Los valores de R^2 , porcentaje de varianza explicada en predicción y el error medio en predicción (RMSEP), (tal y como se ha definido en el apto. 2.4.2) se emplearon tanto para determinar el número adecuado de variables latentes a considerar como para validar el modelo.

El análisis por componentes principales (PCA) se hizo autoescalando los datos originales. A partir de las nuevas matrices de datos, PARVUS obtenía los pesos (*loadings*) de cada variable original en las nuevas variables calculadas o componentes principales y los *scores* o valores que tenían las muestras originales en el nuevo sistema de variables. Posteriormente se aplicaba el algoritmo correspondiente para calcular la regresión sobre componentes principales (PCR). La validación del método de regresión se efectuaba calculando el coeficiente de ajuste del modelo, R^2 y estudiando el coeficiente de variación del error medio en predicción o RMSEP. Adicionalmente, se emplearon los diagramas *biplot*, que representan conjuntamente sobre los autovectores de las nuevas componentes principales tanto los *loadings* como los *scores* y permiten otorgar propiedades o características concretas a cada componente principal.

Una alternativa que permite validar los resultados obtenidos mediante el cálculo anteriormente descrito para PCR, es la propuesta en el propio manual de PARVUS (Forina *et al.*, 2000) y que consiste en aplicar únicamente al bloque X

el autoescalado o centrado en su caso, para pasar a calcular mediante el algoritmo NIPALS las componentes principales. A continuación se adiciona el bloque Y (o respuesta) al fichero de los *scores* para de este modo ejecutar el programa STEPREG, que permite identificar paso a paso las componentes significativas en la predicción. Con las componentes elegidas se efectúa la regresión mediante MULTIREG con el fin de obtener los coeficientes para las componentes principales en la regresión, el coeficiente de ajuste R^2 , el porcentaje de varianza explicada en predicción y el error medio en predicción, entre otros parámetros de interés.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Optimaci3n de la separaci3n de caseínas por EC

En la década de los 90, se ha venido realizando un número creciente de estudios con relación al análisis de caseínas mediante la técnica de electroforesis capilar (EC) (Chen y Zang, 1992; de Jong *et al.*, 1993; Kanning *et al.*, 1993; Kristiansen *et al.*, 1994; Otte *et al.*, 1997; Recio *et al.*, 1997a; 1997b; 1997c; 1997d; 1997e; Molina *et al.*, 1999). De entre éstos, se pueden destacar los de Kristiansen *et al.* (1994) que demostraron que las cuatro caseínas mayoritarias podían separarse a pH neutro utilizando un capilar sin tratar y que un incremento del pH o la utilización de modificadores del tampón de separación y el uso de capilares recubiertos afectaba positivamente a las separaciones. Por su parte, de Jong *et al.* (1993), trabajando con capilares recubiertos, consiguieron separar las proteínas de la leche utilizando aditivos poliméricos y valores de pH ácidos. A partir de estos trabajos, Otte *et al.* (1997) lograron separar las cuatro caseínas mayoritarias de la leche, tanto en capilares recubiertos como en capilares sin tratar, utilizando tampón fosfato a pH 2,5 como tampón de separación e hidroxipropilmetil celulosa 0,05% como aditivo.

No obstante, en toda la bibliografía revisada, la determinación de las condiciones de separación se realizaba optimando cada parámetro por separado, lo cual no permitía detectar las posibles interacciones entre los distintos factores en estudio. Por esta razón, en el presente trabajo de investigación, se planteó la optimación de los principales parámetros de separación de una mezcla de caseínas bovinas de calidad Sigma (α_s , β y κ) mediante electroforesis capilar utilizando un diseño de experimentos. Para ello, se seleccionaron dos capilares: uno de sílice fundida y otro neutro hidrofílicamente recubierto haciéndose un estudio comparativo del potencial analítico de ambos.

4.1.1. CAPILAR DE SÍLICE FUNDIDA

Probablemente la forma más simple de electroforesis capilar sea la electroforesis zonal (ECZ). Lo más característico y significativo de esta técnica, es el hecho de que el capilar se rellena sólo con la solución tampón. Sin embargo, la electroforesis zonal para la separación de proteínas puede ser también la forma de EC más complicada como consecuencia de la propia estructura de las proteínas. En la composición de una proteína se encuentran aminoácidos hidrófilos e hidrófobos, algunos cargados a un pH determinado y otros sin carga a cualquier pH. Además, como consecuencia de la estructura terciaria de las proteínas, éstas difieren unas de otras tanto en la forma como en el tamaño.

En 1986, Lauer y McManigil proporcionaron el primer ejemplo de separación con éxito de proteínas mediante ECZ utilizando capilares no tratados de sílice fundida. La separación de proteínas mediante esta técnica presenta la desventaja de la adsorción de las proteínas sobre la superficie de sílice, la cual se encuentra cargada negativamente, dando lugar a picos anchos y en ocasiones a una pobre cuantificación (Novotny *et al.*, 1990). No obstante, estos problemas se pueden resolver utilizando tampones a valores de pH superiores al pI de la proteína (Lauer y McManigill, 1986), soluciones tampón de elevada fuerza iónica (Chen *et al.*, 1992; Chen y Zang, 1992), capilares tratados (Towns y Regnier, 1991), o mediante la utilización de aditivos en el tampón de separación (Emmer *et al.*, 1991; Muijelaar *et al.*, 1992).

En este apartado, se aborda la optimización de las condiciones de separación de caseínas α_s , β y κ mediante ECZ en un capilar de sílice fundida, aplicando un diseño de experimentos.

El primer paso del proceso es establecer el criterio que defina la calidad del análisis. Criterios típicos utilizados en ECZ son los valores de resolución, eficiencia y tiempo de carrera necesario para conseguir la mejor separación en

poco tiempo. Concretamente, la variable respuesta seleccionada en este trabajo para evaluar el modelo fue la resolución entre dos picos, R_s , definida como:

$$R_s = \frac{2(tm_2 - tm_1)}{(w_1 + w_2)}$$

representando, tm los tiempos de migración y w la anchura de cada uno de los picos seleccionados. Se consideró que los picos estaban resueltos para valores de $R_s \geq 1,5$.

La optimación en la resolución entre picos se llevó a cabo en sucesivas etapas mediante diseño de experimentos.

- **1^{er} Diseño: Factorial 2⁴**

Con objeto de conocer los parámetros más apropiados y determinar el dominio experimental, se realizaron una serie de experimentos previos, seleccionando cuatro factores electroforéticos:

- A:** pH del tampón de carrera
- B:** Voltaje aplicado
- C:** Concentración de urea en el tampón de separación
- D:** Concentración de NaOH para el lavado del capilar

En este *primer diseño*, se empleó un diseño factorial 2⁴ para estudiar el efecto conjunto de todos los factores sobre la respuesta, así como el “peso” o efecto de cada factor por separado. Dada la gran diversidad de condiciones de separación que aparecen en la bibliografía para resolver caseínas mediante EC, en esta primera aproximación, se consideró un amplio intervalo en los valores de cada factor, teniendo además en cuenta las limitaciones experimentales (caso del voltaje) (Tabla 4.1).

Tabla 4.1. Nivel de los factores en la optimación de la separación de caseínas mediante EC con el capilar de sílice fundida; diseño factorial 2^4 (*primer diseño*).

Nivel	A pH	B Voltaje (kV)	C [Urea] (M)	D [NaOH] (M)
-1	2,50	5,0	0	0,050
0	6,25	17,5	3	0,525
1	10,00	30,0	6	1,000

En este diseño, el tampón de carrera utilizado fue un tampón universal que abarcaba todo el rango de valores de pH con objeto de no introducir una nueva variable o factor experimental como sería la composición del mismo.

Como consecuencia de la complejidad de la muestra y de las diferentes condiciones de trabajo, en este *primer diseño* no fue posible cuantificar la resolución de los picos en determinadas condiciones de operación (voltajes de separación muy bajos), dado que los tiempos de migración de algunos experimentos eran superiores al de carrera (30 min). No obstante, este diseño fue de utilidad para establecer los valores de los factores en un intervalo más estrecho en el siguiente diseño experimental.

Se consideraron como valores adecuados los de pH más ácido tal y como se aprecia en la Fig. 4.1. Para ello se reajustaron los niveles del siguiente diseño tomando valores de pH entre 2 y 3, con objeto de que las caseínas estuvieran totalmente protonadas pero sin desnaturalizar, voltajes no excesivamente elevados, evitando así trabajar al límite del sistema de EC, y las concentraciones de urea y NaOH que proporcionaban mejores separaciones según los ensayos previos.

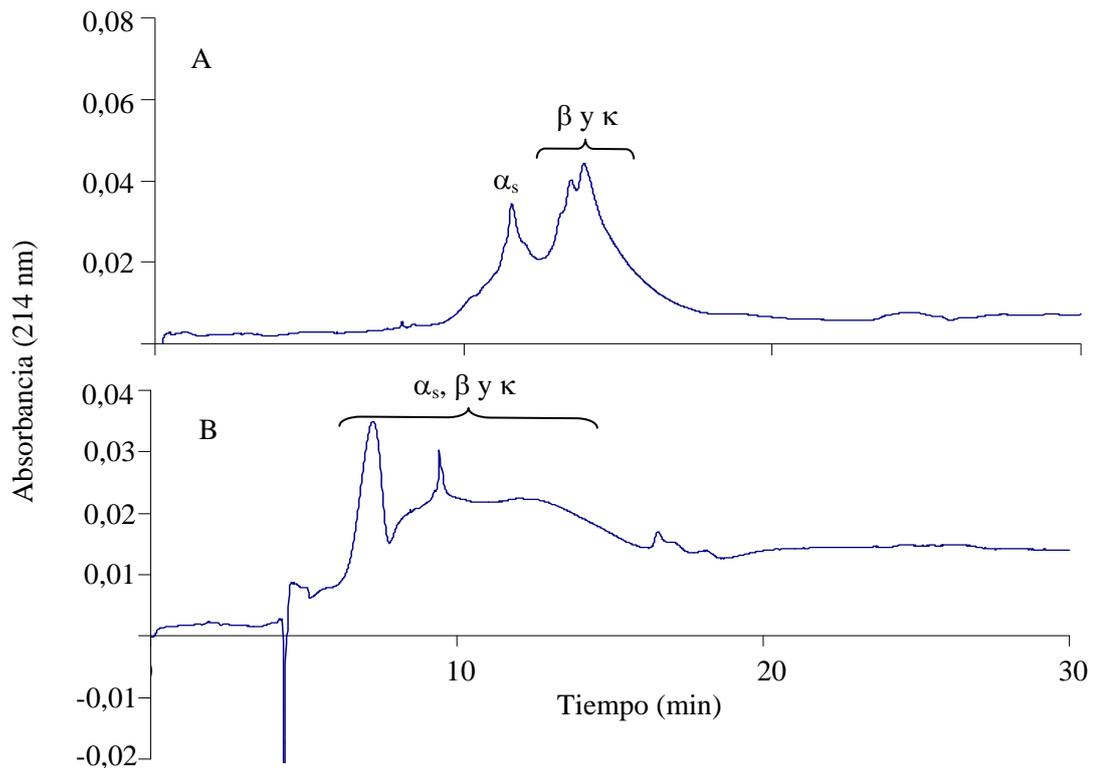


Fig. 4.1. Electroferogramas de separación de caseínas en el *primer diseño*. Condiciones de separación: capilar de sílice fundida con lavado de NaOH 0,05M. A) 30 kV ($\sim 183 \mu\text{A}$), tampón universal a pH 2,5 con urea 6M. B) 30 kV ($\sim 14 \mu\text{A}$), tampón universal a pH 10,0 con urea 6M.

- **2º Diseño: Factorial 2^4 + estrella**

Considerando los ensayos previos, en este paso experimental se trabajó en un rango de pH ácido. El tampón de carrera utilizado en este segundo bloque de experimentos fue el tampón fosfato, ya que junto con los tampones acetato, formiato y citrato, es el más utilizado para llevar a cabo separaciones a valores bajos de pH (Moring, 1996).

En este *segundo diseño* se seleccionó un diseño central compuesto 2^4 (factorial 2^4 con estrella) y 4 puntos centrales que permitían la estimación del error experimental. En la Tabla 4.2 se detallan los niveles de los factores para este diseño. El diseño era “rotable”, es decir, los modelos fijados permitían estimar la respuesta con igual precisión en todos los puntos de la región

experimental que equidistaban del centro del mismo. Además, cabe señalar que las correspondientes carreras se realizaban de forma aleatoria.

Tabla 4.2. Nivel de los factores en la optimación de la separación de caseínas mediante EC con el capilar de sílice fundida; diseño central compuesto 2^4 (*segundo diseño*).

Nivel	A pH	B Voltaje (kV)	C [Urea] (M)	D [NaOH] (M)
-1	2,50	15	5	0,03
0	2,75	20	6	0,05
1	3,00	25	7	0,07

Se tomó como variable respuesta la resolución entre el pico mayoritario de la α_s -caseína y la β -caseína. La κ -caseína aparecía como un pico ancho que se superponía con los picos correspondientes a las otras dos.

En la Tabla 4.3 se detallan los valores obtenidos para la respuesta con el presente diseño experimental junto a las condiciones de operación correspondientes. Adicionalmente, en la Fig. 4.2, se muestran dos de los electroferogramas de mayor (A) y menor resolución (B) de este *segundo diseño* y que además presentaban tiempos de carrera no excesivamente largos en los cuales se podían apreciar todas las caseínas.

A partir de los resultados obtenidos se estudiaron los efectos de los factores y sus interacciones a través del diagrama de Pareto (Fig. 4.3) para la variable respuesta. En esta representación, la longitud de cada barra es proporcional al efecto estandarizado (efecto estimado dividido por su error estándar), pudiendo emplearse la línea vertical para juzgar qué efectos son estadísticamente significativos a un valor de 95% de confianza. Del análisis de este diagrama se deducía que el mayor efecto sobre la respuesta lo ejercían las interacciones AC y BC, donde A era el pH del tampón de carrera, B era el

Tabla 4.3. Valores de la variable respuesta en la optimación de la separación de caseínas mediante EC con el capilar de sílice fundida; diseño central compuesto 2^4 (segundo diseño).

Experimento	pH	Voltaje (kV)	[Urea] (M)	[NaOH] (M)	Resolución
1	3,00	15	5,0	0,07	0,000
2	2,50	25	5,0	0,07	0,557
3	2,75	20	6,0	0,01	1,545
4	3,00	15	7,0	0,03	0,000
5	2,50	15	7,0	0,03	0,000
6	2,50	25	7,0	0,07	1,384
7	3,00	25	5,0	0,07	0,000
8	3,00	25	5,0	0,03	0,000
9	2,75	20	4,0	0,05	0,000
10	2,25	20	6,0	0,05	3,050
11	2,50	25	5,0	0,03	1,286
12	2,75	20	8,0	0,05	2,973
13	3,00	15	7,0	0,07	0,000
14	3,00	15	5,0	0,03	0,000
15	2,50	25	7,0	0,03	3,466
16	2,75	30	6,0	0,05	1,942
17	2,50	15	5,0	0,03	5,189
18	2,50	15	5,0	0,07	4,933
19	2,50	15	7,0	0,07	0,000
20	2,75	20	6,0	0,09	3,698
21	3,25	20	6,0	0,05	2,866
22	2,75	10	6,0	0,05	0,000
23	2,75	20	6,0	0,05	3,227
24	2,75	20	6,0	0,05	3,803
25	2,75	20	6,0	0,05	4,000
26	2,75	20	6,0	0,05	3,848
27	2,75	20	6,0	0,05	3,683

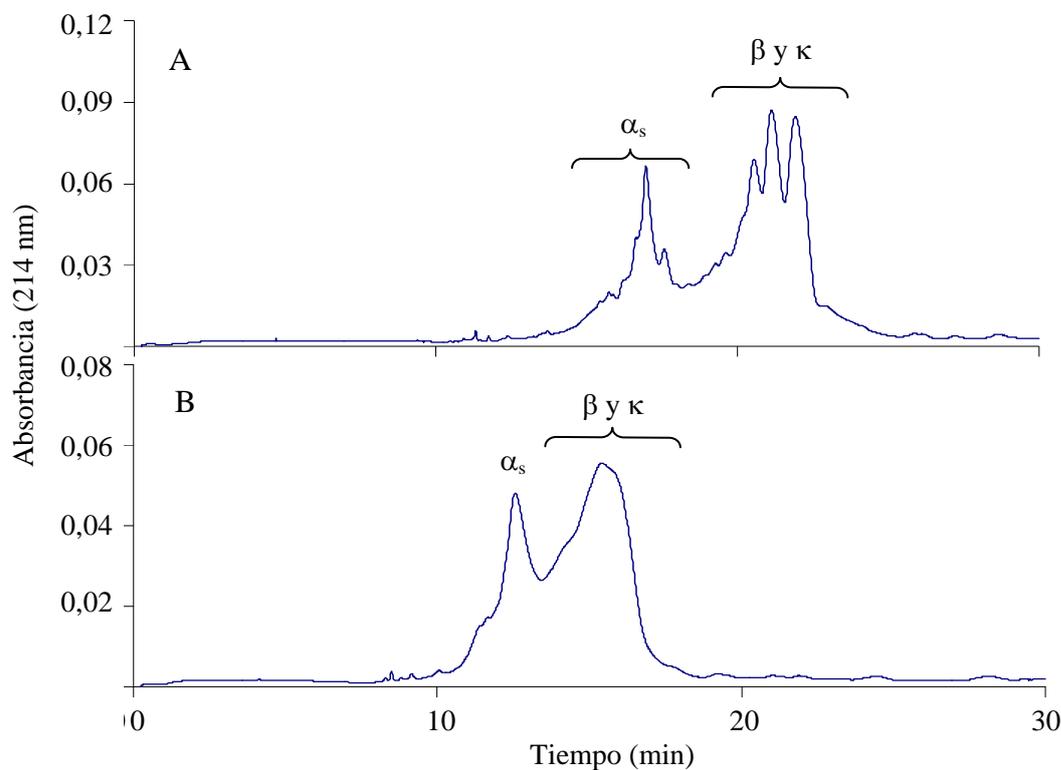


Fig. 4.2. Electroferogramas de la separación de caseínas en el *segundo diseño*. Condiciones de separación: capilar de sílice fundida. A) 20 kV ($\sim 117 \mu\text{A}$), tampón fosfato 50mM a pH 2,25 con urea 6M; lavado con NaOH 0,05M. B) 25 kV ($\sim 80 \mu\text{A}$), tampón fosfato 50mM a pH 2,5 con urea 5M; lavado con NaOH 0,07M.

voltaje aplicado y C la concentración de urea utilizada. Sin embargo, la concentración de NaOH, no era un factor influyente en el rango estudiado ni como factor individual, ni en sus interacciones con otros factores. De hecho, McCormick (1988) demostró que los iones fosfato a valores de pH bajos, reaccionan con los grupos silanol formando un éster fosfato (Si-O-HPO_4) dando lugar a capilares parcialmente desactivados. La eliminación de estos grupos fosfato de la superficie del capilar se puede conseguir lavando con una solución de NaOH (McCormick, 1988). Sin embargo, los lavados con esta solución alcalina pueden desorganizar la uniformidad de las paredes del capilar con lo que sería necesario un equilibrado posterior con el tampón de separación correspondiente. Como consecuencia de este último lavado, la concentración de la solución de NaOH no afectaba de manera ostensible a la respuesta. Aun

siendo esto así, el mantenimiento y lavado del capilar juega un papel crítico en la reproducibilidad de los resultados obtenidos en EC. Por lo tanto, después de cada carrera la superficie del capilar debía ser regenerada y limpiada de cualquier material adsorbido mediante lavado con NaOH. Se fijó la concentración de NaOH para posteriores estudios en 0,05 M.

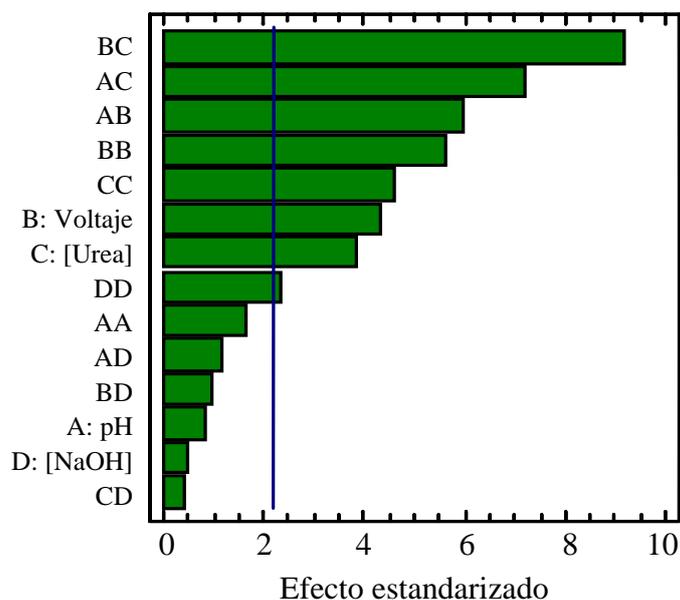


Fig. 4.3. Diagrama de Pareto estandarizado para el diseño central compuesto 2^4 (segundo diseño).

En el diagrama de las interacciones (Fig. 4.4), se puede apreciar la variación en la respuesta frente a la modificación de cada par de factores. El eje X representa el nivel del primer factor en la interacción (de bajo a alto), y el + ó -, el nivel alto o bajo respectivamente del segundo factor. En la figura se observa que la mayor variación tiene lugar para las interacciones BC, AC y AB. Así, por ejemplo, en la interacción BC, para el nivel bajo de C (urea 5 M) se obtiene una mejor resolución a nivel también bajo de B (voltaje 15 kV), observándose también una mejora en la resolución entre los picos cuando se toma tanto el nivel alto de C (urea 7 M) como el de B (voltaje 25 kV).

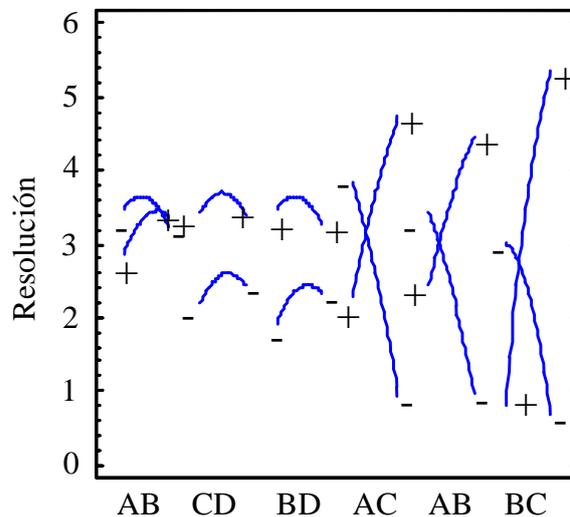


Fig. 4.4. Efecto de las interacciones sobre la resolución para el diseño central compuesto 2^4 (segundo diseño).

El análisis de la varianza o ANOVA (Tabla 4.4) se realizó por comparación entre las F de Snédecor (ver apdo. 3.4.1) $F_{calculada}$ y $F_{tabulada}$ (probabilidades actuales $p < 0,05$). Considerando los factores cuyo valor de p es menor de 0,05, es decir, aquellos que son significativamente diferentes de cero al 95% de confianza, pueden determinarse los factores más influyentes y las interacciones que existen entre ellos. Este estudio confirmaba lo obtenido en el diagrama de Pareto (Fig. 4.3). Además, realizado el test correspondiente, se deduce que no existía fallo de ajuste, luego se podía considerar que el modelo matemático al que se habían ajustado los datos experimentales era correcto. Como se puede apreciar del coeficiente de regresión r^2 (94,29%), el modelo explicaba un porcentaje muy elevado de la varianza de los datos.

Tabla 4.4. Análisis de la varianza en la optimación de la separación de caseínas mediante EC con el capilar de sílice fundida para el diseño central compuesto 2⁴ (segundo diseño).

Fuente	S.S. ^a	G.L. ^b	M.S. ^c	F-Ratio	p ^d
A: pH	0,24579	1	0,24579	0,61	0,4495
B: Voltaje	7,17932	1	7,17932	17,85	0,0012
C: [Urea]	5,69812	1	5,69812	14,17	0,0027
D: [NaOH]	0,06052	1	0,06052	0,15	0,7049
AA	0,99758	1	0,99758	2,48	0,1413
AB	13,95220	1	13,95220	34,69	0,0001
AC	20,30630	1	20,30630	50,48	0,0000
AD	0,49515	1	0,49515	1,23	0,2890
BB	12,28520	1	12,28520	30,54	0,0001
BC	33,22560	1	33,22560	82,60	0,0000
BD	0,31723	1	0,31722	0,79	0,3920
CC	8,14995	1	8,14995	20,26	0,0007
CD	0,05507	1	0,05507	0,14	0,7178
DD	2,02556	1	2,02556	5,04	0,0445
Fallo de Ajuste	4,48125	8	0,560156	6,48	0,0544
Error Puro	0,34579	4	0,086446		
Total (corr.)	84,54874	26			

^a S.S.: suma de cuadrados.^b G.L.: grados de libertad.^c M.S.: media de cuadrados. M.S. = S.S./ G.L.^d p: nivel de significación. $r^2 = 94,29\%$ r^2 (ajustado con los grados de libertad) = 87,63%

Por otra parte, observando la Fig. 4.5 en la que se representa la distribución normal de los residuos (diferencias entre los valores observados experimentalmente y los valores calculados mediante la ecuación obtenida con el diseño de experimentos), se puede determinar fácilmente que éstos siguen claramente dicha distribución ya que se aproximan a una línea recta y no se aprecian residuos que indiquen efectos asociados únicamente a ruido.

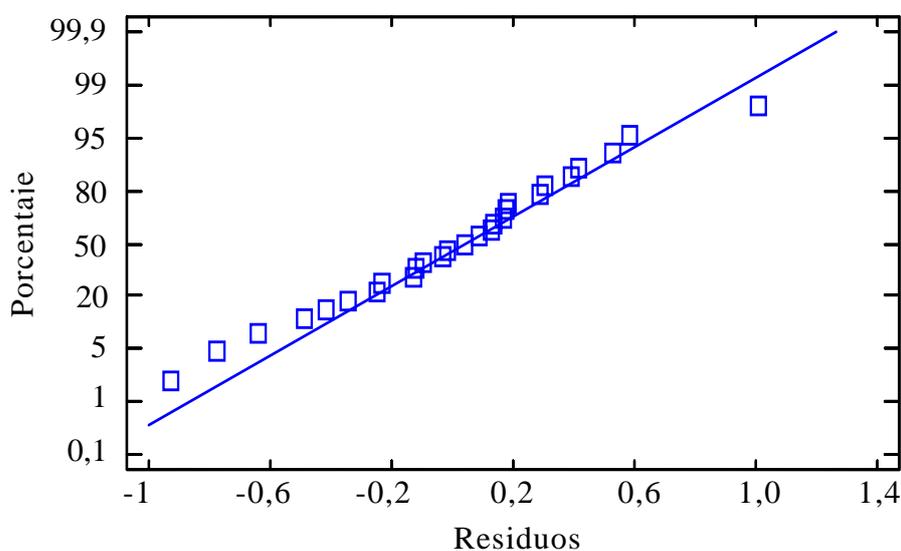


Fig. 4.5. Diagrama de distribución normal de los residuos en el diseño central compuesto 2^4 (*segundo diseño*).

De los resultados obtenidos en este *segundo diseño*, se procedió al desarrollo de un *tercer diseño* de experimentos con una concentración de NaOH de regeneración del capilar fija de 0,05 M y como factores el pH del tampón de carrera (A), el voltaje aplicado (B) y la concentración de urea en el tampón de separación (C).

- **3^{er} Diseño: Factorial 2^3 + estrella**

Se seleccionó para este *tercer diseño* un factorial 2^3 con estrella, o diseño central compuesto 2^3 , con 4 puntos complementarios en el centro, detallándose en la Tabla 4.5 los valores de los niveles alto (+1), bajo (-1) y central (0) de las

variables influyentes. Dichos valores fueron definidos por las condiciones que el diseño precedente señalaba como adecuadas para mejorar la resolución.

Tabla 4.5. Niveles de los factores en la optimación de la separación de caseínas mediante EC con el capilar de sílice fundida; diseño central compuesto 2^3 (*tercer diseño*).

Nivel	A pH	B Voltaje (kV)	C [Urea] (M)
-1	2,25	18,0	5,50
0	2,42	20,5	6,05
1	2,60	23,0	6,60

En los electroferogramas obtenidos para este *tercer diseño*, salvo en un caso, se observó que la resolución correspondiente al pico mayoritario de la α_s -caseína y la β -caseína era superior a 1,5 y, por tanto, podían considerarse resueltos estos dos picos. Por otra parte, se comprobó que no era posible separar la κ -caseína de la caseína β , si bien, dependiendo de las condiciones de operación se lograba diferenciar las distintas variantes polimórficas de la β -caseína (A_1 , A_2 y B). Por ello, se consideró como variable respuesta la resolución entre los dos primeros picos de la β -caseína (variantes B y A_1), obteniéndose los resultados que se detallan en la Tabla 4.6 (se eliminó el experimento realizado a menor voltaje como consecuencia de los elevados tiempos de migración).

Por su parte, y a pesar de que las mejores resoluciones se lograban con el tampón a pH 2,13 y 2,25 según se desprende de la Tabla 4.6, hay que desechar valores de pH tan ácidos debido a las características experimentales de mayor inestabilidad de la corriente durante las carreras.

Tabla 4.6. Valores de la variable respuesta en la optimación de la separación de caseínas mediante EC con el capilar de sílice fundida; diseño central compuesto 2^4 (*tercer diseño*).

Experimento	A	B	C	Resolución
	pH	Voltaje (kV)	[Urea] (M)	
1	2,72	20,50	6,05	0,354
2	2,42	24,70	6,05	0,348
3	2,42	20,50	6,97	0,611
4	2,25	23,00	5,50	0,451
5	2,60	23,00	6,60	0,357
6	2,60	23,00	5,50	0,274
7	2,42	20,50	5,12	0,373
8	2,25	18,00	6,60	0,864
9	2,13	20,50	6,05	1,014
10	2,60	18,00	5,50	0,324
11	2,25	18,00	5,50	0,579
12	2,60	18,00	6,60	0,462
13	2,25	23,00	6,60	0,791
14	2,42	20,50	6,05	0,444
15	2,42	20,50	6,05	0,475
16	2,42	20,50	6,05	0,487
17	2,42	20,50	6,05	0,516

Del análisis de la varianza (Tabla 4.7) y del diagrama de Pareto (Fig. 4.6) se deducía que de los tres factores que intervenían en el diseño, la influencia del voltaje en la respuesta en el rango estudiado era pequeña, afectando únicamente al tiempo de migración de los picos, pero no a la resolución. Las interacciones AB y BC, donde A es el pH del tampón de separación, B es el voltaje aplicado y C la concentración de urea, no influían en la respuesta, pero sí lo hacía la interacción AC y el cuadrado del factor pH.

Tabla 4.7. Análisis de la varianza en la optimación de la separación de caseínas mediante EC en un capilar de sílice fundida para el diseño central compuesto 2^3 (tercer diseño).

Fuente	S.S. ^a	G.L. ^b	M.S. ^c	F-Ratio	p ^d
A: pH	0,414063	1	0,414063	203,38	0,0000
B: Voltaje	0,014566	1	0,014566	7,15	0,0318
C: [Urea]	0,113729	1	0,113729	55,86	0,0001
AA	0,056136	1	0,056136	27,57	0,0012
AB	0,000264	1	0,000264	0,13	0,7291
AC	0,020402	1	0,020402	10,02	0,0158
BB	0,007082	1	0,007082	3,48	0,1044
BC	0,000000	1	0,000000	0,00	1,0000
CC	0,000001	1	0,000001	0,00	0,9828
Fallo de Ajuste	0,011586	4	0,002896	3,26	0,1795
Error Puro	0,002665	3	0,000888		
Total (corr.)	0,668064	16			

^a S.S.: suma de cuadrados.

^b G.L.: grados de libertad.

^c M.S.: media de cuadrados. $M.S. = S.S. / G.L.$

^d p: nivel de significación.

$r^2 = 97,87\%$

r^2 (ajustado con los grados de libertad) = 95,12%

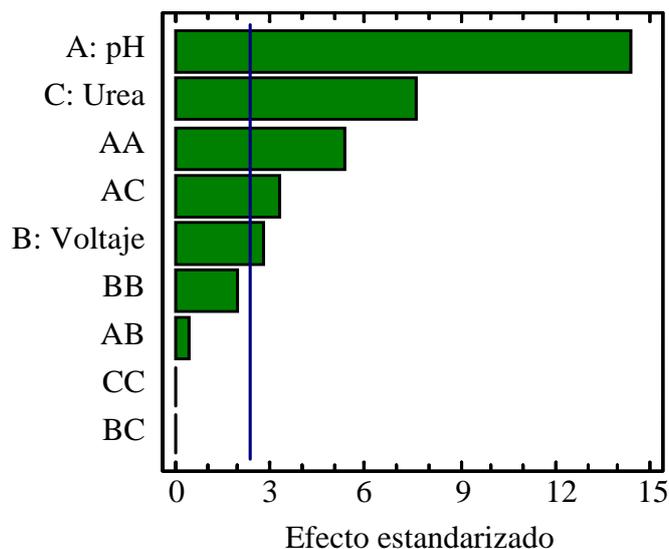


Fig. 4.6. Diagrama de Pareto estandarizado para el diseño central compuesto 2^3 (*tercer diseño*).

En la tabla del ANOVA para este diseño experimental (Tabla 4.7) se observa que no existía fallo de ajuste en el diseño, con una probabilidad del 95%, lo que indicaba que el modelo matemático se correspondía con la superficie respuesta. La varianza de los datos explicada (r^2) mediante este modelo era superior al 95%, indicando una excelente aproximación.

En las superficies de respuesta (Fig. 4.7) se representa en el eje Z el valor de la resolución (respuesta) frente a un par de factores (ejes X e Y), manteniendo el resto de los factores constantes. De estos diagramas, se deduce la dirección hacia la que hay que moverse sobre dicha superficie para optimar los factores y lograr un máximo en la variable respuesta. Así, del análisis de estas figuras se deducía que al disminuir el pH del tampón de separación la resolución se veía mejorada. No obstante, en condiciones extremadamente ácidas la intensidad de corriente presentaba fluctuaciones importantes, además de una posible degradación de las caseínas, por lo que se seleccionó un valor de pH de 2,42 que se encontraba en torno al óptimo. Para este valor de pH la concentración de urea y potencial más adecuados según el modelo matemático obtenido, fueron 6,97 M y 20,5 kV, respectivamente.

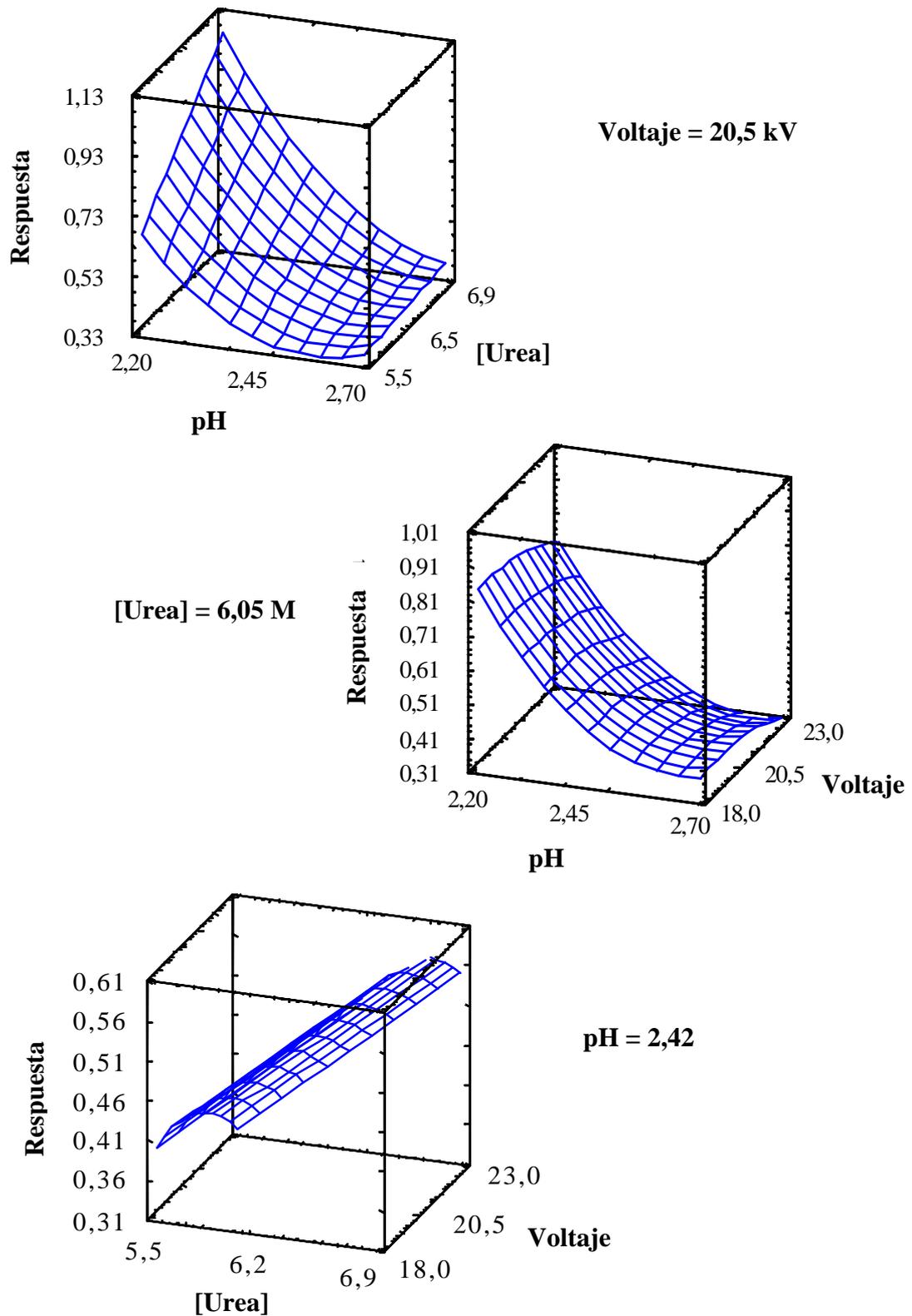


Fig. 4.7. Diagramas de superficie de respuesta estimada para la resolución entre β -caseína A₁ y A₂ (tercer diseño).

El electroferograma obtenido en estas condiciones optimadas (Fig. 4.8) mostraba completa resolución entre las caseínas α_s y el grupo formado por las distintas variantes genéticas de caseínas β . Sin embargo, no se lograba diferenciar la caseína κ de las caseínas β . Como consecuencia de estos resultados fue necesaria una revisión de los factores experimentales seleccionados hasta el momento con objeto de reorientar la investigación.

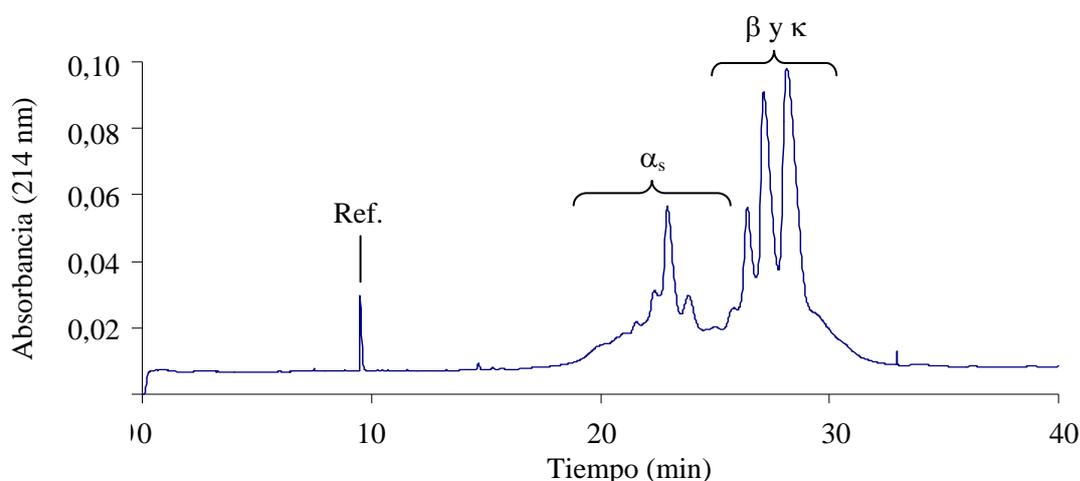


Fig. 4.8. Electroferograma de la separación de caseínas en el *tercer diseño*. Condiciones de separación: capilar de sílice fundida 20,5 kV ($\sim 100 \mu\text{A}$), tampón fosfato 50 mM a pH 2,425 con urea 6,97 M. Ref: compuesto de referencia, Lys-Tyr-Lys.

- **4º Diseño: Factorial 2^3 + estrella**

Estudios previos han mostrado que es posible una buena separación analítica de las proteínas mayoritarias de la leche mediante electroforesis capilar en condiciones ácidas utilizando aditivos poliméricos, como por ejemplo, hidroxipropilmetil celulosa (HPMC) (de Jong *et al.*, 1993; Otte *et al.*, 1997). En este sentido, siguiendo la metodología previamente descrita, se incluyó como factor electroforético la concentración de HPMC (C); junto con el pH del tampón de carrera (A) y el voltaje aplicado (B). La concentración de urea se fijó en 6 M, tal y como indicaba el óptimo del estudio previo.

Los valores de estos factores electroforéticos en este *cuarto diseño* se detallan en la Tabla 4.8. Como en los estudios previos se seleccionó un diseño central compuesto (14 experimentos más 4 réplicas en el punto central) y que permitía su evaluación mediante la obtención de una superficie de respuesta.

Tabla 4.8. Nivel de los factores en la optimación de caseínas mediante EC con el capilar de sílice fundida; diseño central compuesto 2^3 (*cuarto diseño*).

Nivel	A pH	B Voltaje (kV)	C [HPMC] (%, p/v)
-1	2,25	20,0	0,03
0	2,42	23,5	0,04
1	2,60	27,0	0,05

Teniendo fijada la concentración de urea, se procedió en este *cuarto diseño* a hacer una aproximación o *screening* para determinar la superficie de respuesta que se ajustaba mejor a los datos experimentales. En este sentido y tras haber incluido como nuevo factor la concentración de HPMC, se consideró apropiado un estudio del voltaje en un intervalo más amplio que el utilizado en el diseño anterior, incluyendo valores superiores a los 23 kV, tal y como se planteó en el *primer diseño*.

Se seleccionó como variable respuesta la resolución entre el pico mayoritario de la κ -caseína y el pico correspondiente a la variante genética B de la caseína β . No obstante, hay que señalar que en ocasiones se apreciaba un solapamiento de ambos picos, lo cual se traducía en valores de resolución 0 (Tabla 4.9).

Tabla 4.9. Valores de la variable respuesta en la optimación de la separación de caseínas mediante EC con el capilar de sílice fundida; diseño central compuesto 2^3 (*cuarto diseño*).

Experimento	A	B	C	Resolución
	pH	Voltaje (kV)	[HPMC] (% p/v)	
1	2,72	23,50	0,0400	0,796
2	2,60	20,00	0,0300	0,861
3	2,25	20,00	0,0500	0,000
4	2,25	20,00	0,0300	0,000
5	2,60	20,00	0,0500	0,865
6	2,42	17,61	0,0400	0,483
7	2,42	23,50	0,0568	0,476
8	2,13	23,50	0,0400	0,000
9	2,25	27,00	0,0500	0,000
10	2,42	23,50	0,0232	0,339
11	2,42	29,38	0,0400	0,068
12	2,60	27,00	0,0300	0,472
13	2,25	27,00	0,0300	0,000
14	2,60	27,00	0,0500	0,470
15	2,42	23,50	0,0400	0,219
16	2,42	23,50	0,0400	0,167
17	2,42	23,50	0,0400	0,243
18	2,42	23,50	0,0400	0,168

En la Fig. 4.9 se muestra uno de los electroferogramas obtenidos en esta etapa, pudiéndose observar una mejor resolución entre las distintas caseínas en estudio en comparación con los resultados obtenidos en la etapa anterior, donde no fue posible la resolución de los picos correspondientes a la caseína κ y β . Por tanto, es evidente la importancia de incluir un aditivo del tipo derivado de celulosa con efecto modificador sobre el flujo electroosmótico (EOF) y efecto

tamiz de separación. El empleo de este aditivo, aportaba el recubrimiento de tipo dinámico sobre la pared interna del capilar, lográndose en la práctica la eliminación del EOF y evitando que las proteínas se adsorbieran sobre la superficie por estar bloqueado el acceso a los silanos reactivos. Esto permitía una mejora notable en la resolución.

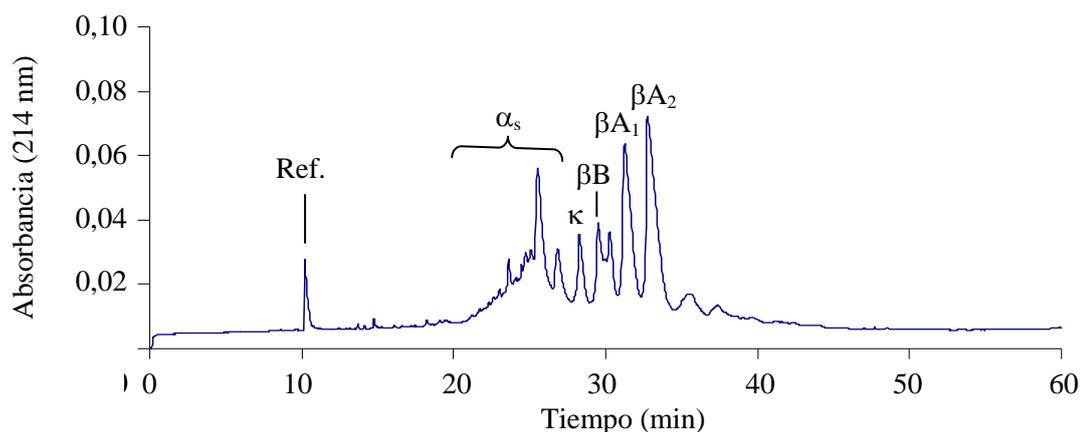


Fig. 4.9. Electroferograma de la separación de caseína en el *cuarto diseño*. Condiciones de separación: capilar de sílice fundida, 20 kV ($\sim 43 \mu\text{A}$), tampón fosfato 50 mM a pH 2,6 con urea 6 M y HPMC 0,05% (p/v). Ref: compuesto de referencia, Lys-Tyr-Lys.

Aunque la inclusión del factor HPMC en el diseño mejoraba la resolución, del análisis del diagrama de Pareto estandarizado (Fig. 4.10) se deducía que la variación de su concentración no era importante en el intervalo estudiado, ya que el factor C ([HPMC]) no era significativo al nivel del 95%, aunque sí lo era el cuadrado de dicho factor. Sin embargo, su efecto no era tan determinante como el peso que tenía el factor A (pH) de efecto máximo, el B (voltaje), o la interacción AB. De hecho, ésta era la única interacción que poseía un efecto considerable, pues como se observaba en el diagrama de las interacciones (Fig. 4.11) ambas curvas no eran paralelas. Además, en la tabla del ANOVA (Tabla 4.10) se podía comprobar que no existía fallo de ajuste en el modelo ya que para este test el valor de p estaba por encima de 0,05 al 95% de confianza.

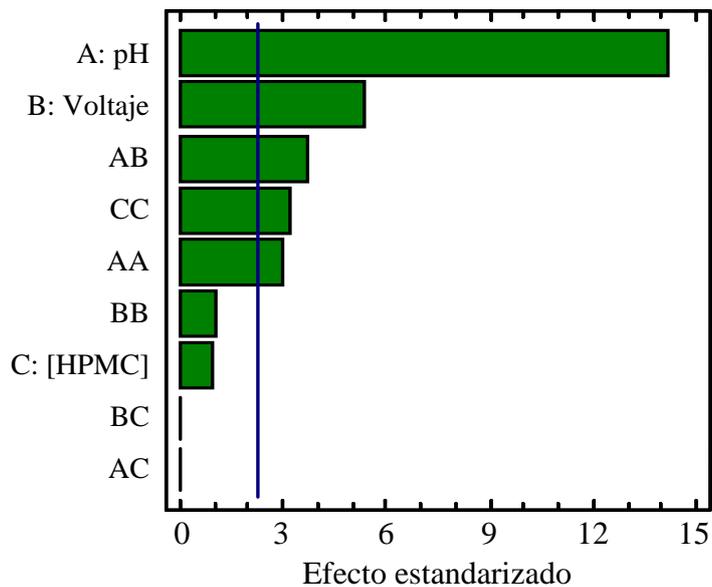


Fig. 4.10. Diagrama de Pareto estandarizado para el diseño central compuesto 2^3 (*cuarto diseño*).

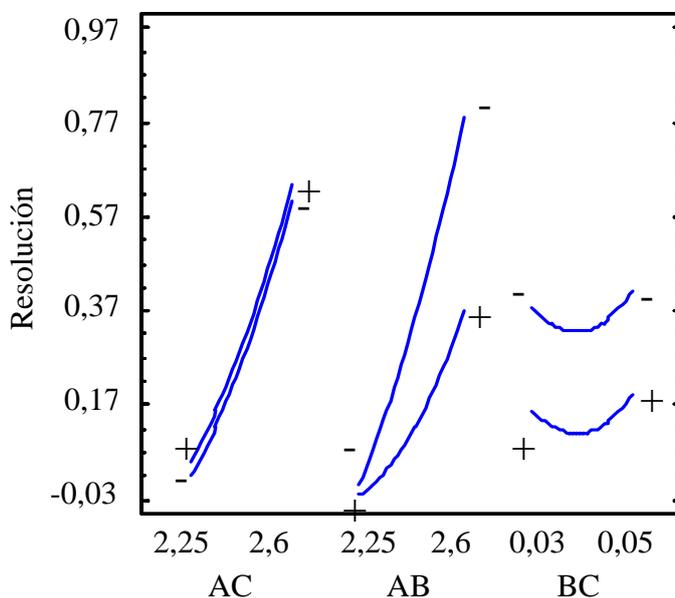


Fig. 4.11. Efecto de las interacciones sobre la resolución en el diseño central compuesto 2^3 (*cuarto diseño*).

Tabla 4.10. Análisis de la varianza en la optimación de la separación de caseínas mediante EC con el capilar de sílice fundida; diseño central compuesto 2^3 (cuarto diseño).

Fuente	S.S. ^a	G.L. ^b	M.S. ^c	F-Ratio	p ^d
A: pH	1,17551	1	1,17551	199,05	0,0000
B: Voltaje	0,16081	1	0,16081	27,23	0,0008
C: [HPMC]	0,00395	1	0,00395	0,67	0,4368
AA	0,04916	1	0,04916	8,32	0,0203
AB	0,07683	1	0,07683	13,01	0,0069
AC	5 E-7	1	5 E-7	0,00	0,9929
BB	0,00458	1	0,00458	0,78	0,4041
BC	4,5 E-6	1	4,5 E-6	0,00	0,9787
CC	0,05460	1	0,05460	9,25	0,0160
Fallo de Ajuste	0,04292	5	0,008584	5,96	0,0863
Error Puro	0,00432	3	0,001440		
Total (corr.)	1,550320	17			

^a S.S.: suma de cuadrados.

^b G.L.: grados de libertad.

^c M.S.: media de cuadrados. M.S. = S.S./ G.L.

^d p: nivel de significación.

$r^2 = 96,95\%$

r^2 (ajustado con los grados de libertad) = 93,52%

En el diagrama de la Fig. 4.12 se puede estudiar la tendencia de los datos experimentales (observados) frente a los datos predichos por el modelo teórico. La cercanía de los puntos hacia la diagonal indica que el modelo es adecuado para predecir los datos observados. Tampoco se detectaban anomalías como podría ser la separación de la diagonal a medida que el valor de la respuesta aumentaba (“heterocedasticidad”) o la presencia de puntos anómalos (*outliers*).

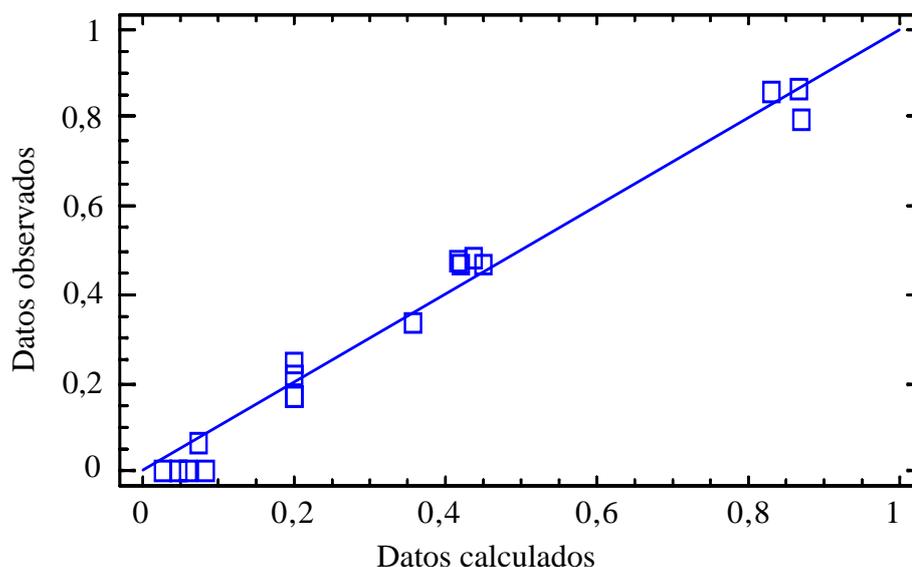


Fig. 4.12. Representación del diagrama de diagnóstico para el diseño central compuesto 2^3 (*cuarto diseño*).

Los resultados obtenidos en este *cuarto diseño* llevaron a fijar la concentración de HPMC en 0,05% (p/v) y a realizar en la siguiente etapa un diseño del tipo factorial 3^2 tomando como factores el pH y el voltaje, con tres niveles cada uno.

- **5° Diseño: Factorial 3^2**

Este diseño permite la obtención de una superficie de respuesta con la realización de 14 experimentos en total, siendo 5 de ellos réplicas en el centro. La selección de un diseño factorial 3^2 tiene por finalidad poder estudiar los efectos de dos factores en más de dos niveles y determinar una superficie de respuesta en un área más limitada. El objetivo era fijar las mejores condiciones de pH y de voltaje para la separación. Los niveles bajo, central y alto para los factores electroforéticos se detallan en la Tabla 4.11. Los resultados obtenidos, considerando como variable respuesta la resolución entre el pico mayoritario de κ -caseína y el correspondiente a la variante genética B de caseína β , se recogen en la Tabla 4.12.

Tabla 4.11. Nivel de los factores en la optimación de la separación de caseínas mediante EC con el capilar de sílice fundida; diseño factorial 3^2 (*quinto diseño*).

Nivel	A pH	B Voltaje (kV)
-1	2,6	17,0
0	2,8	18,5
1	3,0	20,0

Tabla 4.12 Valores de la variable respuesta en la optimación de la separación de caseínas mediante EC con el capilar de sílice fundida; diseño factorial 3^2 (*quinto diseño*).

Experimento	A pH	B Voltaje (kV)	Resolución
1	3,0	17,0	1,215
2	2,6	20,0	0,707
3	2,8	17,0	0,951
4	2,8	20,0	0,942
5	3,0	18,5	1,237
6	3,0	20,0	1,255
7	2,6	17,0	0,698
8	2,6	18,5	0,718
9	2,8	18,5	0,855
10	2,8	18,5	0,854
11	2,8	18,5	0,855
12	2,8	18,5	0,856
13	2,8	18,5	0,855
14	2,8	18,5	0,856

Del estudio de los efectos, tanto por medio del ANOVA (Tabla 4.13) como en el diagrama de Pareto estandarizado (Fig. 4.13), se concluía que el pH era el factor que más afectaba en la resolución. Este hecho es concordante con las modificaciones que sufren las caseínas en su carga eléctrica cuando se modifica el pH, y las variaciones en el flujo electroosmótico. Se descartaba la existencia de diferentes grados de asociación puesto que el empleo de urea en elevada concentración en el tampón evitaba que esta situación se produjera. Además, se podía apreciar un escaso efecto del voltaje en el intervalo de valores estudiados. Sin embargo, comparando todos los electroferogramas, se apreciaba una clara tendencia a obtener picos más estrechos y a menores tiempos de retención cuanto mayor era el voltaje empleado, si bien es cierto que a costa de una ligera pérdida de resolución.

Tabla 4.13. Análisis de la varianza en la optimación de la separación de caseínas mediante EC con el capilar de sílice fundida; diseño factorial 3^2 (*quinto diseño*).

Fuente	S.S. ^a	G.L. ^b	M.S. ^c	F-Ratio	p ^d
A: pH	0,418176	1	0,418176	444,34	0,0000
B: Voltaje	0,000266	1	0,000266	0,28	0,6090
AA	0,016075	1	0,016075	17,08	0,0033
AB	0,000240	1	0,000240	0,26	0,6270
BB	0,005566	1	0,005566	5,91	0,0411
Fallo de Ajuste	0,008642	3	0,002880	5,25	0,0528
Error Puro	0,002744	5	0,000548		
Total (corr.)	0,461939	13			

^a S.S.: suma de cuadrados.

^b G.L.: grados de libertad.

^c M.S.: media de cuadrados. $M.S. = S.S. / G.L.$

^d p: nivel de significación.

$$r^2 = 98,37\%$$

$$r^2 \text{ (ajustado con los grados de libertad)} = 97,36\%$$

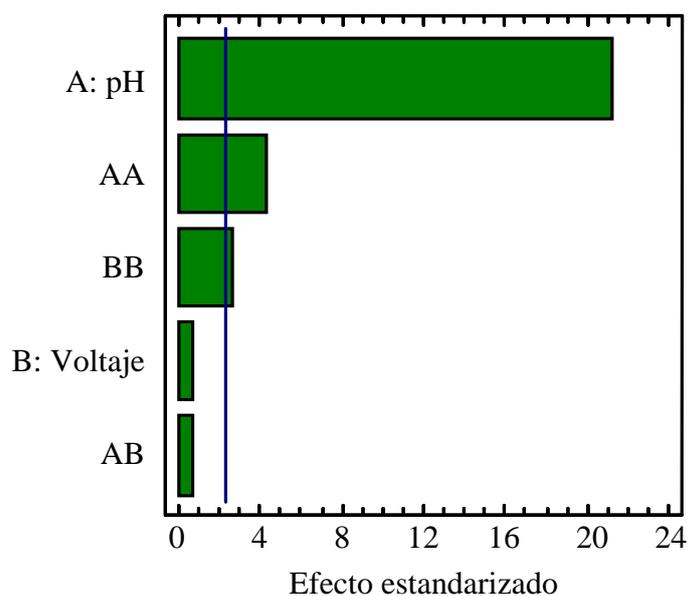


Fig. 4.13. Diagrama de Pareto estandarizado para el diseño factorial 3^2 con HPMC (*quinto diseño*).

Un diseño factorial del tipo 3^2 proporciona suficientes datos para fijar una expresión de segundo grado. En este sentido, la siguiente ecuación polinomial de segundo orden explica los resultados obtenidos en este *quinto diseño*:

$$Y = 19,90 - 9,69 A - 0,79 B + 1,88 A^2 + 0,026 AB + 0,019 B^2$$

donde Y representa la respuesta experimental, A el pH del tampón de separación y B el voltaje aplicado. El análisis estadístico del modelo (ver Tabla 4.13) mostraba que los coeficientes de correlación (r^2) y los valores de los coeficientes ajustados a los grados de libertad (r^2_{adj}) eran de 0,9837 y 0,9736, respectivamente, indicando una buena capacidad de ajuste del modelo.

La superficie de respuesta (Fig. 4.14) ha sido utilizada para determinar las condiciones óptimas de separación. Así, observando dicha figura se confirmaba la tendencia a un valor de pH de 3 en el tampón de separación con aditivo polimérico HPMC y un rango de voltaje entre 17 y 20 kV. Dado que la variación en la respuesta no era excesivamente desigual para ambos valores de

voltaje, se optó por elegir un valor intermedio de 18,5 kV. Por tanto, las condiciones finales, bajo las cuales era posible la separación de α_s -, β - y κ -caseína, serían las siguientes (Ortega *et al.*, 2003):

pH del tampón de separación: 3,0

Voltaje aplicado: 18,5 kV

Concentración de HPMC: 0,05% (p/v)

Concentración de urea: 6 M

La Fig. 4.15 muestra la separación entre las caseínas en las mejores condiciones de resolución para este diseño.

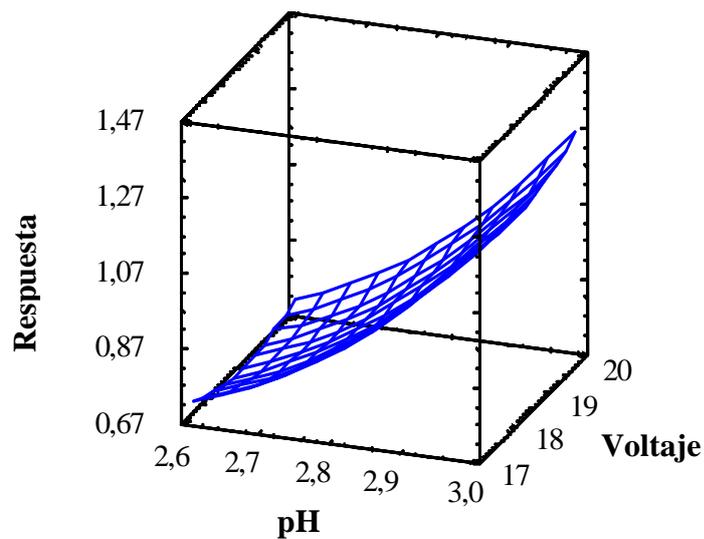


Fig. 4.14. Diagrama de superficie de respuesta para la resolución entre κ -caseína y β -caseína B (quinto diseño).

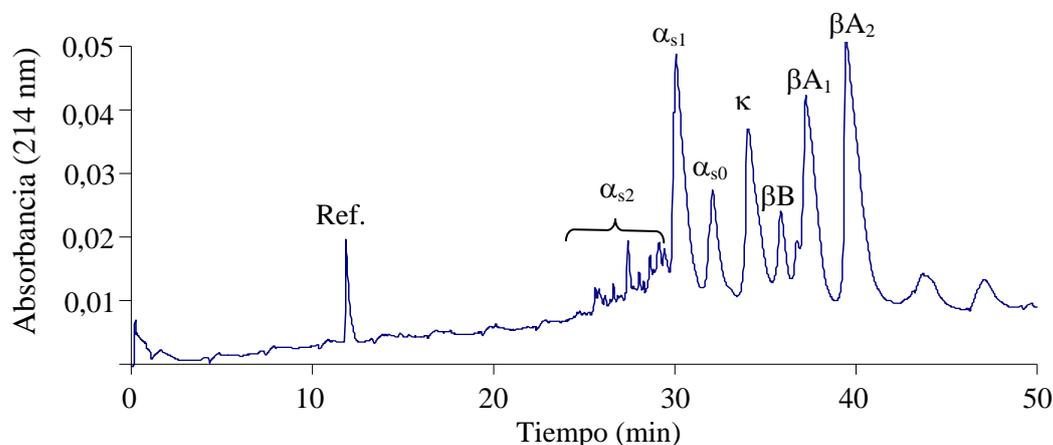


Fig. 4.15. Electroferograma de la separación de caseínas en el *quinto diseño*. Condiciones de separación: capilar de sílice fundida, 18,5 kV ($\sim 35 \mu\text{A}$), tampón fosfato 50 mM a pH 3,0 con urea 6 M y HPMC 0,05% (p/v). Ref: compuesto de referencia, Lys-Tyr-Lys.

4.1.2. CAPILAR NEUTRO HIDROFÍLICAMENTE RECUBIERTO

Dada la evidencia de que las condiciones de separación óptimas alcanzadas con el capilar sin tratar implicaban una tendencia a reducir el flujo electroosmótico, y por consiguiente, la adsorción de las proteínas al capilar, se planteó el estudio de la separación mediante el empleo de un capilar neutro hidrofílicamente recubierto.

El capilar era de Beckman Coulter[®] recubierto por una capa de poliacrilamida ligada a los grupos silanol, que aseguraba un flujo electroosmótico cero y una carga interior de las paredes nula. Capilares similares, aunque de otras casas comerciales, han sido empleados con éxito en el análisis de caseínas por otros autores (Chen *et al.*, 1992; de Jong *et al.*, 1993; Recio *et al.*, 1997a; 1997d; 1997e; Gouldsworthy *et al.*, 1999; Strickland *et al.*, 2001).

Valorando las nuevas condiciones de trabajo, se planteó una optimización de la separación considerando únicamente dos factores:

A: Voltaje de separación

B: Temperatura

El pH del tampón de separación se mantuvo en un valor de 3 con objeto de lograr una total protonación de las caseínas sin afectar gravemente a la separación.

Se llevó a cabo un diseño factorial 3^2 mediante el cual se estudiaban dos factores en tres niveles diferentes y con 4 réplicas en el punto central. Los niveles para los factores electroforéticos se detallan en la Tabla 4.14. Este diseño implicó la realización de 13 experimentos para lograr obtener una superficie de respuesta. Las réplicas se realizaron en el punto central del diseño (24,25 kV y 34°C), permitiendo tener 7 grados de libertad para estimar el error.

Tabla 4.14. Nivel de los factores para la optimación de la separación de caseínas mediante EC con el capilar neutro.

Nivel	A Voltaje (kV)	B Temperatura (°C)
-1	18,50	23
0	24,25	34
1	30,00	45

La variable respuesta en este diseño fue la resolución entre el pico mayoritario de κ -caseína y el correspondiente a la variante genética B de caseína β , detallándose en la Tabla 4.15 los resultados obtenidos.

Tabla 4.15. Valores de la variable respuesta en la optimación de la separación de caseínas mediante EC con el capilar neutro; diseño factorial 3^2 .

Experimento	A	B	Resolución
	Voltaje (kV)	Temperatura (°C)	
1	30,00	23	1,234
2	24,25	34	1,019
3	24,25	23	1,258
4	18,50	45	0,545
5	18,50	34	1,042
6	30,00	34	0,885
7	18,50	23	1,301
8	30,00	45	0,000
9	24,25	45	0,280
10	24,25	34	1,001
11	24,25	34	1,012
12	24,25	34	1,020
13	24,25	34	1,052

Del estudio del ANOVA (Tabla 4.16) se dedujo que no existía fallo de ajuste en el modelo al nivel de confianza del 95%, obteniéndose un coeficiente de regresión muy elevado del 98,93%. Por otra parte, el factor con mayor efecto sobre la variable respuesta era la temperatura, aunque tanto el voltaje, como la interacción temperatura-voltaje tenían peso sobre la resolución. Esto puede apreciarse gráficamente mediante la observación del diagrama de Pareto (Fig. 4.16).

Tabla 4.16. Análisis de la varianza en la optimación de la separación de caseínas mediante EC con el capilar neutro; diseño factorial 3^2 .

Fuente	S.S. ^a	G.L. ^b	M.S. ^c	F-Ratio	p ^d
A: Voltaje	0,09856	1	0,09856	272,49	0,0001
B: Temperatura	1,46817	1	1,46817	4059,08	0,0000
AA	0,00235	1	0,00235	6,49	0,0635
AB	0,05712	1	0,05712	157,92	0,0002
BB	0,13815	1	0,13815	381,96	0,0000
Fallo de Ajuste	0,00984	3	0,00328	9,07	0,0595
Error Puro	0,00145	4	0,00036		
Total (corr.)	1,81554	12			

^a S.S.: suma de cuadrados.

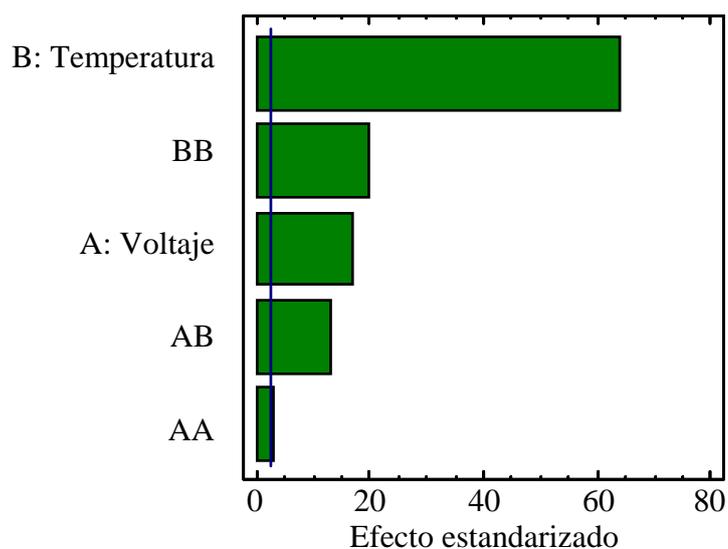
^b G.L.: grados de libertad.

^c M.S.: media de cuadrados. $M.S. = S.S./ G.L.$

^d p: nivel de significación.

$r^2 = 99,38\%$

r^2 (ajustado con los grados de libertad) = 98,93%

**Fig. 4.16.** Diagrama de Pareto estandarizado para la optimación en la separación de caseínas mediante EC con el capilar neutro; diseño factorial 3^2 .

El modelo matemático que describía la separación y relacionaba la resolución (Y) con las variables voltaje (A) y temperatura (B) era el siguiente:

$$Y = - 1,13 + 0,085 A + 0,13 B - 8,81 \cdot 10^{-4} A^2 - 1,89 \cdot 10^{-3} AB - 1,85 \cdot 10^{-3} B^2$$

La superficie de respuesta permitió detectar la dirección hacia la que habría que moverse para optimar los factores y lograr un máximo en la respuesta. Por ello, a partir de la Fig. 4.17, fue posible determinar el óptimo de la separación de caseínas en EC con el capilar neutro dentro del intervalo estudiado, así como hacer una predicción para encontrar el óptimo en la cual la resolución tomaría un valor máximo:

Voltaje aplicado: 25,09 kV

Temperatura: 21°C

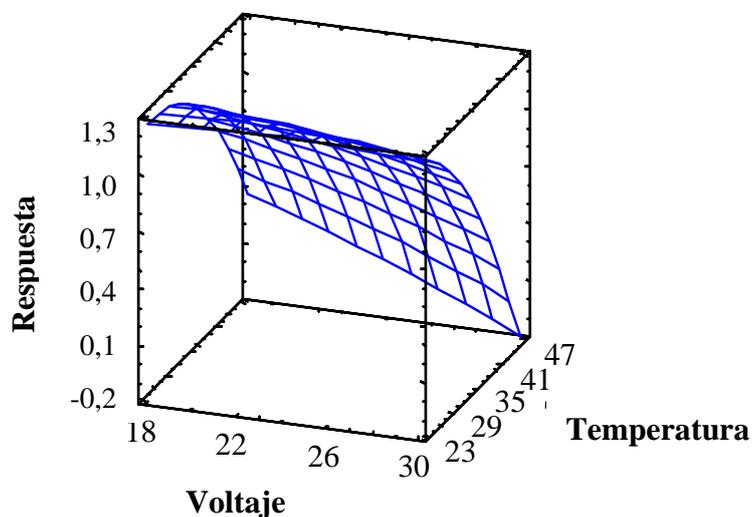


Fig. 4.17. Diagrama de superficie de respuesta para la resolución entre κ -caseína y β -caseína B en la separación de caseínas mediante EC con el capilar neutro; diseño factorial 3^2 .

El electroferograma obtenido se muestra en la Fig. 4.18, pudiéndose apreciar una mejora en la calidad de la separación frente a la utilización del capilar de sílice fundida sin recubrimiento (ver Fig. 4.15).

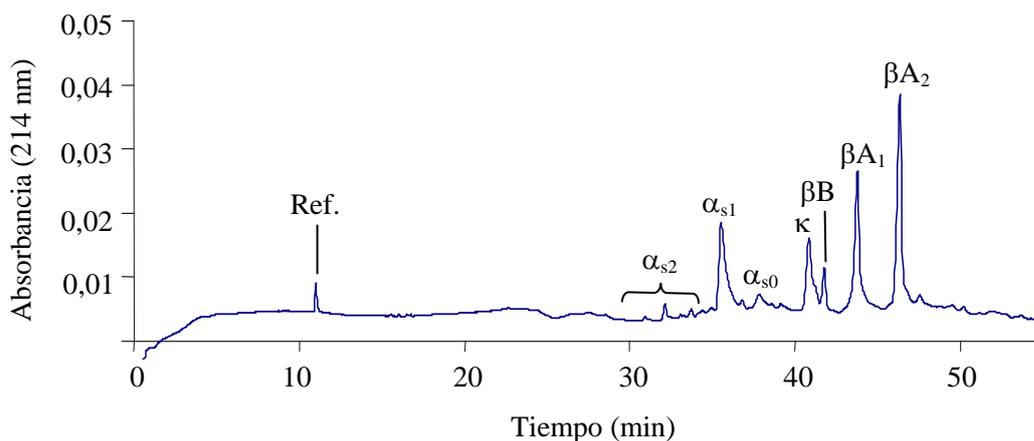


Fig. 4.18. Electroferograma de la separación de caseínas. Condiciones de separación: capilar neutro, 25,09 kV ($\sim 50 \mu\text{A}$), tampón fosfato a pH 3 con urea 6 M y HPMC 0,05% a 21°C. Ref: compuesto de referencia, Lys-Tyr-Lys.

4.1.3. ESTUDIO COMPARATIVO DEL POTENCIAL ANALÍTICO DE AMBOS CAPILARES

Determinadas las condiciones óptimas de separación para cada uno de los capilares en estudio, se procedió a la comparación de su potencial analítico. Concretamente, se realizó un estudio de la linealidad, repetitividad y precisión del método. Finalmente, se aplicaron las condiciones óptimas al análisis de muestras de leche de vaca y oveja.

4.1.3.1. Linealidad de la respuesta frente a la concentración de muestra

La evaluación de la linealidad del método supuso la realización de una curva de calibrado, lo cual implicaba el análisis de muestras de caseínas a diferentes concentraciones, y la posterior cuantificación del área de cada pico por integración del electroferograma mediante el programa “System Gold” (versión 810). El estudio se llevó a cabo en muestras que contenían una mezcla de caseínas patrón (α_s , β y κ) en la proporción 1:1:1, siendo analizadas las muestras por triplicado a cada concentración.

Los electroferogramas en el análisis con el capilar de sílice fundida permitieron la identificación y posterior cuantificación de las siguientes caseínas: α_{s0} , α_{s1} , κ , βB , βA_1 , y βA_2 . Los resultados obtenidos demostraron que entre la concentración de caseína y el área de pico existía una correlación lineal (Tabla 4.17 y Fig. 4.19). No obstante, es interesante señalar que debido a la pérdida de resolución por ensanchamiento de los picos y a las limitaciones de integración de áreas del programa empleado, cuando la mezcla era analizada el rango de concentraciones para el cual se mantenía este comportamiento era de 0-10 mg ml⁻¹.

Tabla 4.17. Datos de la regresión lineal de las curvas de calibrado del método en EC con el capilar de sílice fundida ensayados con una mezcla de caseínas purificadas (1:1:1)^a.

	CASEÍNA					
	α_{s1}	α_{s0}	βB	βA_1	βA_2	κ
Pendiente	5,351 ±0,382	1,496 ±0,084	0,570 ±0,045	3,498 ±0,227	6,043 ±0,398	2,606 ±0,122
Ordenada en el origen	-2,152 ±2,358	-0,010 ±0,518	0,569 ±0,278	2,364 ±1,404	1,593 ±2,455	1,860 ±0,956
Coefficiente de correlación	0,9116	0,9436	0,8939	0,9255	0,9239	0,9658

^a Intervalo de concentraciones: 0-10 mg ml⁻¹

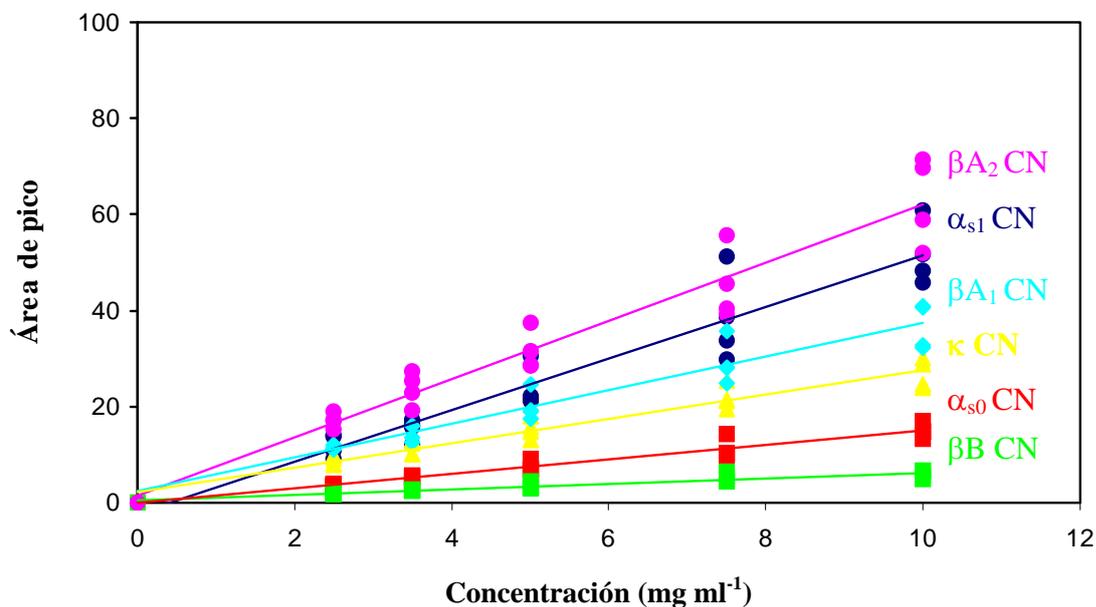


Fig. 4.19. Curvas de calibrado ensayadas mediante EC con el capilar de sílice fundida para una mezcla de caseínas purificadas (1:1:1).

Por otra parte, los datos de la Tabla 4.18, representados en la Fig. 4.20, demuestran que la respuesta en el análisis de las caseínas mediante EC con el capilar neutro también presentaba un comportamiento lineal frente a la concentración de muestra. Además, el mayor potencial de resolución de este capilar permitía cuantificar la caseína α_{s2} , así como la utilización de un intervalo de concentraciones más amplio (0-30 mg ml⁻¹) para el cual, tal y como se ha comentado, la respuesta era lineal. No obstante, es necesario indicar que en el caso de la κ -caseína (al igual que sucedía con el capilar de sílice fundida) no fue posible su cuantificación para concentraciones superiores a 10 mg ml⁻¹.

Tabla 4.18. Datos de la regresión lineal de las curvas de calibrado del método de EC con el capilar neutro, ensayadas con una mezcla de caseínas purificadas (1:1:1)^a.

	CASEÍNA						
	α_{s2}	α_{s1}	α_{s0}	βB	βA_1	βA_2	κ
Pendiente	0,114 $\pm 0,005$	1,078 $\pm 0,030$	0,349 $\pm 0,012$	0,144 $\pm 0,004$	0,918 $\pm 0,029$	1,686 $\pm 0,034$	0,443 $\pm 0,039$
Ordenada en el origen	0,316 $\pm 0,091$	-0,324 $\pm 0,533$	-0,544 $\pm 0,209$	0,085 $\pm 0,079$	0,347 $\pm 0,523$	-1,123 $\pm 0,598$	0,190 $\pm 0,246$
Coefficiente de correlación	0,9606	0,9845	0,9774	0,9807	0,9796	0,9920	0,9410

^a Intervalo de concentraciones: 0-30 mg ml⁻¹; k-caseína (0-10 mg ml⁻¹)

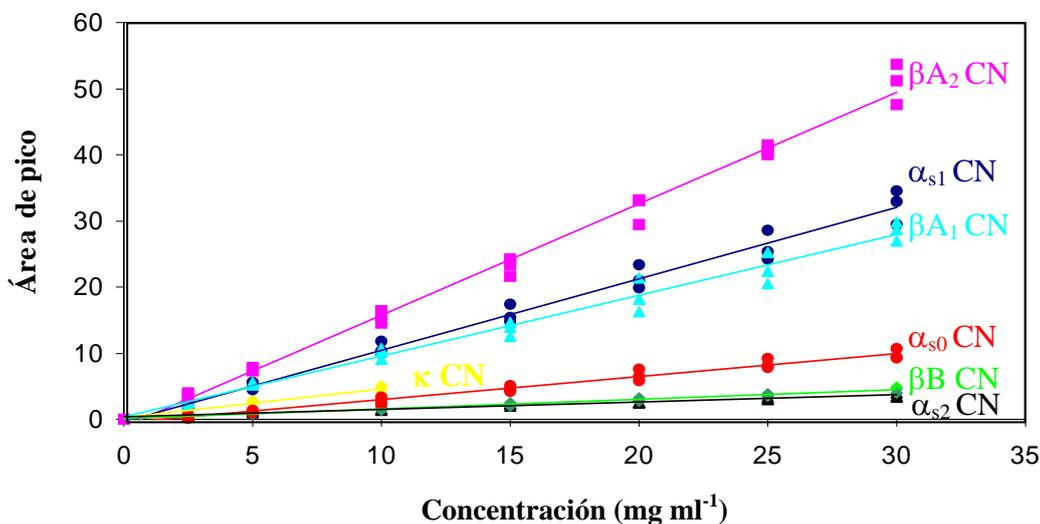


Fig. 4.20. Curvas de calibrado ensayadas mediante EC con el capilar neutro para una mezcla de caseínas purificadas (1:1:1).

4.1.3.2. Repetitividad

Conocido el comportamiento lineal del método en estudio, el siguiente paso fue la determinación de la repetitividad o fiabilidad del mismo. En este sentido, se realizaron diez réplicas de forma continua de una misma muestra en las condiciones óptimas de separación para cada uno de los capilares. Los parámetros estudiados fueron los tiempos de retención absolutos y relativos (referidos al tripéptido utilizado como compuesto de referencia), las áreas normalizadas con respecto al tiempo de retención y las áreas corregidas. Este último parámetro se calculaba multiplicando el área por la velocidad de migración (longitud hasta el detector en cm dividido por el tiempo de migración en segundos) corrigiendo así la posible distorsión debida a la detección en columna que utiliza este método, por la que el área está directamente relacionada con el tiempo de retención.

La dispersión de los datos o estimación de la precisión del método, para el análisis mediante EC con el capilar de sílice fundida y el neutro, se recoge mediante la desviación estándar relativa (expresada en %) en las Tabla 4.19 y Tabla 4.20, respectivamente.

Los valores de desviación estándar relativa (RSD) para el tiempo de migración con el capilar de sílice fundida oscilaban entre el 0,95 y el 1,17% y entre el 0,36 y el 0,41% para el capilar neutro. Si bien la repetitividad con ambos capilares era buena, la eliminación total del flujo electroosmótico al utilizar el capilar neutro provocaba una disminución de la variabilidad en el tiempo de migración. Por otra parte, indicar que los valores calculados en este trabajo eran inferiores a los obtenidos por Otte *et al.* (1997), quienes encontraron valores de la RSD del 1,9% en el tiempo de migración de caseínas analizadas mediante EC utilizando capilares con y sin recubrimiento.

Tabla 4.19. Estudio de la repetitividad expresada como la desviación estándar relativa (SDR) de los tiempos de migración y las áreas de pico de una mezcla de caseínas purificadas (1:1:1) utilizando el capilar de sílice fundida.^a

Parámetro	α_{s1} -CN		α_{s0} -CN		κ -CN		β -CN B		β -CN A ₁		β -CN A ₂	
	Media	RSD	Media	RSD	Media	RSD	Media	RSD	Media	RSD	Media	RSD
Tiempo de migración (min)	28,844 ±0,30	1,04	30,725 ±0,29	0,95	32,988 ±0,34	1,03	34,692 ±0,37	1,06	35,977 ±0,40	1,12	38,053 ±0,45	1,17
Tiempo de migración relativo ^b	2,488 ±0,02	0,63	2,650 ±0,01	0,54	2,845 ±0,02	0,63	0,199 ±0,02	0,64	3,102 ±0,02	0,71	3,282 ±0,02	0,76
Área de pico	30,868 ±1,87	6,06	10,904 ±0,67	6,18	20,988 ±0,88	4,20	6,040 ±0,27	4,51	33,622 ±1,83	5,44	48,988 ±2,76	5,63
Área corregida ^c	53,534 ±3,66	6,83	17,742 ±1,01	5,71	31,813 ±1,36	4,26	8,705 ±0,37	4,24	46,720 ±2,33	4,99	64,356 ±3,27	5,07
Área normalizada ^d	1,070 ±0,07	6,83	0,350 ±0,02	5,71	0,640 ±0,03	4,26	0,170 ±0,01	4,24	0,930 ±0,05	5,00	1,290 ±0,07	5,07

^a número de muestras = 10

^b Referido al compuesto de referencia (Lys-Tyr-Lys)

^c Área de pico multiplicada por la velocidad de migración

^d Área de pico dividida por el tiempo de migración

Tabla 4.20. Estudio de la repetitividad expresada como la desviación estándar relativa (SDR) de los tiempos de migración y las áreas de pico de una mezcla de caseínas purificadas (1:1:1) utilizando el capilar neutro.^a

Parámetro	α_{s2} -CN		α_{s1} -CN		α_{s0} -CN		κ -CN		β -CN B		β -CN A ₁		β -CN A ₂	
	Media	RSD	Media	RSD	Media	RSD	Media	RSD	Media	RSD	Media	RSD	Media	RSD
Tiempo de migración (min)														
	32,064 ±0,13	0,39	35,442 ±0,14	0,39	37,757 ±0,15	0,41	40,750 ±0,15	0,36	41,665 ±0,15	0,37	43,668 ±0,16	0,37	46,233 ±0,17	0,38
Tiempo de migración relativo^b														
	2,920 ±0,02	0,55	3,227 ±0,02	0,55	3,438 ±0,02	0,57	3,711 ±0,02	0,52	3,794 ±0,02	0,53	3,977 ±0,02	0,52	4,210 ±0,02	0,53
Área de pico														
	0,444 ±0,03	7,36	6,376 ±0,09	1,40	0,849 ±0,03	4,02	4,414 ±0,06	1,48	1,252 ±0,04	3,21	7,292 ±0,36	4,89	10,194 ±0,18	1,74
Área corregida^c														
	0,691 ±0,05	7,26	8,982 ±0,12	1,31	1,122 ±0,05	4,56	5,416 ±0,07	1,34	1,502 ±0,04	3,00	8,348 ±0,39	4,69	11,024 ±0,16	1,47
Área normalizada^d														
	0,014± 0,00	7,26	0,180 ±0,00	1,31	0,022 ±0,00	4,56	0,108 ±0,00	1,34	0,030 ±0,00	3,00	0,167 ±0,01	4,69	0,220 ±0,00	1,47

^a número de muestras = 10

^b Referido al compuesto de referencia (Lys-Tyr-Lys)

^c Área de pico multiplicada por la velocidad de migración

^d Área de pico dividida por el tiempo de migración

Con relación a la repetitividad en el área de pico indicar que los resultados obtenidos eran ligeramente peores a los encontrados para el tiempo de migración. Concretamente, el análisis de caseínas mediante el capilar de sílice fundida rendía valores de RSD, para el área de pico, que oscilaban entre el 4,20 y 6,19%, dependiendo de la caseína analizada (Tabla 4.19). No obstante, estos valores eran a su vez, ligeramente inferiores a los calculados por Otte *et al.* (1997) utilizando un capilar sin recubrimiento.

Sin embargo, la utilización del capilar neutro mejoraba considerablemente los resultados. De hecho, a excepción de la RSD para el área de pico de los resultados obtenidos en la cuantificación de la caseína α_{s2} (7,37%), los valores calculados en la separación con el capilar neutro se encontraban entre el 1,45 y el 4,89% (Tabla 4.20). Estos resultados son inferiores a los obtenidos por Otte *et al.* (1997) al analizar caseínas mediante EC usando un capilar hidrofílicamente recubierto, y similares a los publicados por otros autores como por ejemplo, de Jong *et al.* (1993) (2-4%), Izco *et al.* (1999a) (2-3%) y Strickland *et al.* (2001) (2,49-2,65%). Además, indicar que el resultado obtenido al analizar la caseína α_{s2} era probablemente consecuencia de su complicada cuantificación al no ser un solo pico definido. No obstante, a pesar de ser elevado este valor, era menor que el encontrado por Chen y Zhang (1992) quienes analizando la caseína α_{s2} en diferentes condiciones analíticas obtuvieron valores de la desviación estándar relativa de hasta un 11,29%.

En resumen, la repetitividad en los dos métodos estudiados era buena, si bien se mejoraban ligeramente los resultados cuando la separación de caseínas se realizaba mediante el capilar neutro.

4.1.3.3. Análisis de muestras de leche

Dentro del estudio comparativo de los dos capilares se analizaron mediante ambos métodos muestras de caseínas extraídas de leche de vaca y de oveja. No obstante, previo al análisis de estas muestras, resultaba de especial interés la discusión sobre la identificación de los picos en los electroferogramas utilizando muestras de caseínas purificadas. Así, en la Fig. 4.21 se muestran los resultados obtenidos en la separación de α_s -, β - y κ -caseína con el capilar neutro, dada su mayor resolución.

La identificación de cada uno de los picos se realizó por comparación del patrón de separación de caseínas que se muestra en la figura, con el obtenido por otros autores (de Jong *et al.*, 1993; Otte *et al.*, 1997), sugiriéndose la siguiente asignación de picos:

- ✓ El grupo de picos que aparecen desde los 27,46 – 34,50 min de tiempo de migración corresponderían a la caseína α_{s2} .
- ✓ Los picos a 34,80 y 36,80 min de tiempo de migración corresponderían a las caseínas α_{s1} y α_{s0} , respectivamente.
- ✓ Las caseínas βA_1 y A_2 tendrían tiempos de migración de 40,47 y 42,73 min, respectivamente.
- ✓ La caseína β en su variante genética B se correspondería con el pico a tiempo 38,70 min.
- ✓ El pico de 37,73 min de tiempo de migración correspondería a la κ -caseína.

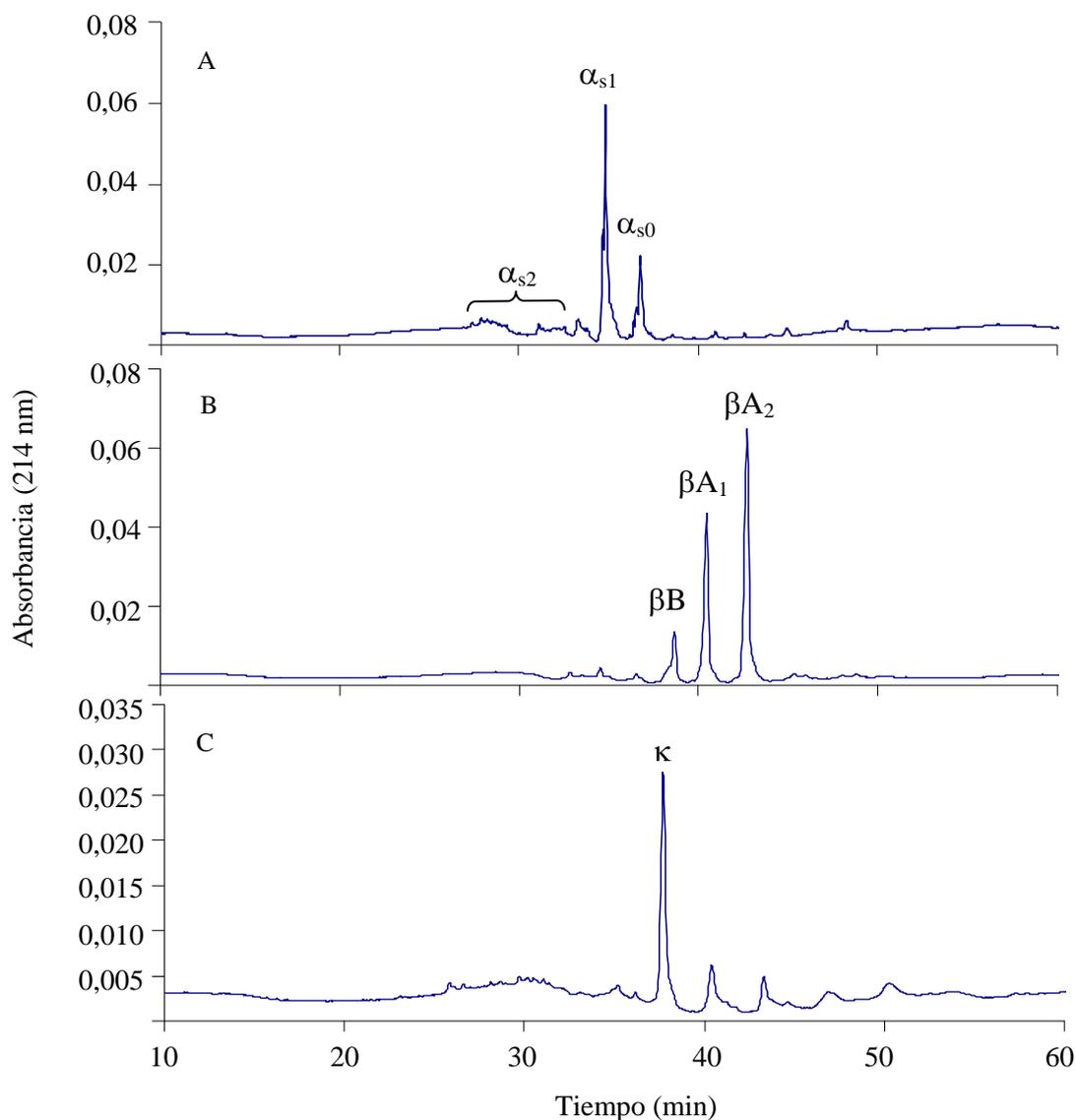


Fig. 4.21. Electroferogramas de α_s -caseína (A), β -caseína (B) y κ -caseína (C). Condiciones de separación: capilar neutro, 25,09 kV ($\sim 50 \mu\text{A}$), tampón fosfato a pH 3 con urea 6 M y HPMC 0,05% (p/v) a 21°C.

Se puede observar que la caseína α_{s2} se ha separado en un grupo numeroso de picos, los cuales migran entre los 27,46 y 34,50 min (Fig. 4.21 (A)). Este hecho era consistente con la existencia de cuatro estados de fosforilación de esta proteína que contiene 10 ó 13 grupos fosfato (Swaisgood, 1992). El resto de picos pueden surgir por la presencia de dímeros formados por la unión mediante puente disulfuro de las distintas variantes con diferente número de grupos fosfato (Hoagland *et al.*, 1971; Rasmussen *et al.*, 1992), cuando estos dímeros están sólo parcialmente reducidos por adición de

DTE (Rasmussen y Petersen, 1991). El hecho de que ésta sea la primera caseína en alcanzar el cátodo (velocidad de migración más elevada), está relacionado con su mayor contenido en aminoácidos de tipo catiónico (cargados positivamente a pH 3). Así la caseína α_{s2} posee un total de 33 residuos de aminoácidos catiónicos, frente a los 25, 20 y 14 que contienen las caseínas α_{s1} , βA_2 y κ , respectivamente.

En el electroferograma correspondiente a la caseína α_s (Fig. 4.21 (A)) se observan además dos picos mayoritarios que se corresponderían con las caseínas α_{s1} y α_{s0} . La distancia entre el pico de la caseína α_{s1} (34,80 min) y el siguiente (36,80 min) era similar a la distancia entre los dos picos mayores de α_{s2} , los cuales difieren sólo en un grupo fosfato. Por tanto, el pico a tiempo de migración de 36,80 min, se correspondería a la caseína α_{s0} (caseína α_{s1} , 9P), la cual contiene un grupo fosfato más que la caseína α_{s1} (caseína α_{s1} , 8P) (Swaisgood, 1992).

La caseína β estándar (Fig. 4.21 (B)) ha sido preparada también a partir de leche entera por lo que debería contener diferentes variantes genéticas, siendo la A_1 y A_2 las variantes dominantes. La migración de los picos mayoritarios de la caseína β a 40,47 y 42,73 min coinciden según Otte *et al.* (1997) con las variantes A_1 y A_2 , respectivamente. Puede observarse que con el método de separación utilizado, las dos variantes genéticas mayoritarias de la caseína β han sido separadas, y que la A_1 migra antes que la A_2 . La variante A_1 contiene His (en vez de Pro) en la posición 67, la cual se encuentra positivamente cargada por debajo de pH 6, dándole una mayor movilidad a valores bajos de pH. Este hecho contrasta con el análisis a valores altos de pH, donde las dos variantes de la caseína β poseen la misma carga neta y, por tanto, migran en la misma zona (Kristiansen *et al.*, 1994).

Por otra parte, considerando la estructura primaria, era de esperar que la variante genética B minoritaria de la caseína β , migrase antes que la variante A_1 ya que posee 2 aminoácidos catiónicos más que esta última, y que la variante A_3

lo hiciera después de la A_2 . Por tanto, el pico que aparecía por delante de la caseína A_1 representaría la variante B de la caseína β . La caseína β C tendría un comportamiento análogo a la variante B de hallarse presente en la muestra. El resto de los fragmentos anteriores a la caseína β B, parecían impurezas de caseína α_s .

La caseína κ se separaba en una serie de componentes, de los cuales aproximadamente el 70% tenía un tiempo de migración de 37,73 min (Fig. 4.21 (C)). La caseína κ era preparada a partir de leche entera y, por lo tanto, debería contener las variantes genéticas A y B en aproximadamente igual proporción (Swaisgood, 1992). Sin embargo, en la Fig. 4.21 (C) sólo era visible un pico dominante, lo cual se encontraba en concordancia con la completa protonación a pH 3 del residuo Asp 148 en la variante A y, por consiguiente, tendría similar carga neta que la variante B (Ala¹⁴⁸). El resto de picos no puede suponerse que sean multímeros de la caseína κ , ya que éstos se reducen totalmente en presencia de DTE 9 mM (Rasmussen y Petersen, 1991). Es más probable que estos picos representen formas glicosiladas de κ -caseína, las cuales contienen ácido N-acetil neuramínico, puesto que Otte *et al.* (1995) demostraron que la parte C-terminal de la caseína κ , que contenía este carbohidrato altamente cargado, tenía un tiempo de migración mayor a pH 2,5 que la parte C-terminal sin carbohidrato o con un carbohidrato neutro.

Es interesante destacar que la caseína κ presentaba tiempos de migración menores que cualquier variante de caseína β . Para analizar este dato se deben tener en cuenta dos circunstancias: 1) su menor número de grupos fosfato (1P para la caseína κ y 5P la caseína β) y 2) el hecho de que la caseína β tenga un contenido superior en residuos de tipo básico cargados positivamente a pH 3,0 lo cual haría que migrase antes que la κ -caseína. Este hecho indicaba que también deberían ser tenidas en cuenta las cargas aportadas por los restos glicosilados de la caseína κ , tal y como se ha comentado anteriormente, y que la diferencia de tamaño también era influyente en esta separación (169 aminoácidos de la κ -caseína frente a los 209 aminoácidos de la caseína β). No

obstante, el binomio tamaño-carga hace que los tiempos de migración sean bastante próximos y que se produzca una cierta superposición o solapamiento de los picos de ambas caseínas según las condiciones de separación.

Las muestras de leche de la empresa Quesos Frías S.A., tanto de vaca como de oveja, fueron analizadas con ambos capilares con objeto de comparar la diferente capacidad de resolución de los dos capilares estudiados.

La Fig. 4.22 muestra los electroferogramas obtenidos para la separación de caseínas de vaca mediante el capilar de sílice fundida (A) y mediante el capilar neutro (B).

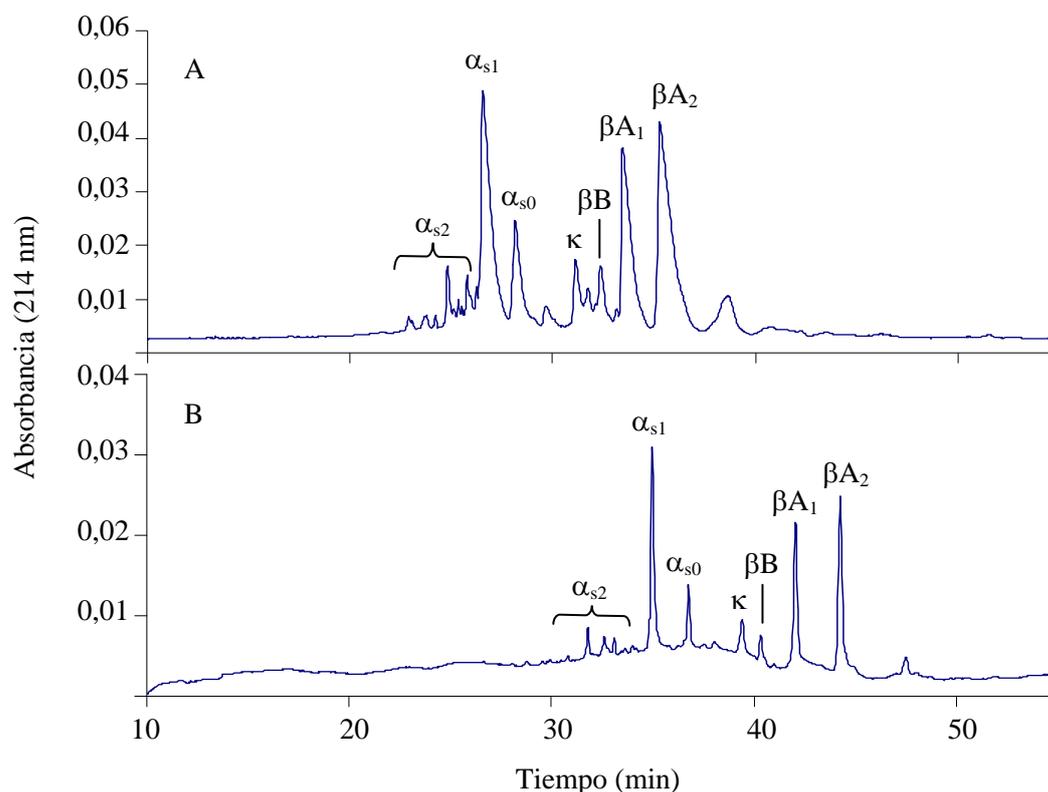


Fig. 4.22. Electroferogramas de muestras de leche de vaca de Frías. Condiciones de separación: A) Capilar de sílice fundida, 18,5 kV ($\sim 35 \mu\text{A}$), tampón fosfato 50 mM, pH 3 con urea 6 M y HPMC 0,05% (p/v). B) Capilar neutro, 25,09 kV ($\sim 50 \mu\text{A}$), tampón fosfato 50 mM, pH 3 con urea 6 M y HPMC 0,05% (p/v) a 21°C.

En ambos casos fue posible la identificación de las caseínas presentes en la muestra, si bien, puede apreciarse claramente una mayor resolución de las caseínas con el capilar neutro, además de picos considerablemente más estrechos. Estos resultados son probablemente debidos a que la muestra no era adsorbida a la pared interior del capilar, como ya se ha indicado con anterioridad. Sin embargo, con dicho capilar, se observaba un desplazamiento de los picos hacia tiempos de migración mayores lo cual estaba relacionado con el hecho de la anulación del flujo electroosmótico.

Los electroferogramas obtenidos al analizar caseínas de leche de oveja con los dos capilares se muestran en la Fig. 4.23. En este caso, dada la carencia de patrones de caseínas de oveja, se procedió a la identificación de los picos por comparación con los resultados obtenidos por otros autores, concretamente por Cattaneo *et al.* (1996) y Recio *et al.* (1997d; 1997e).

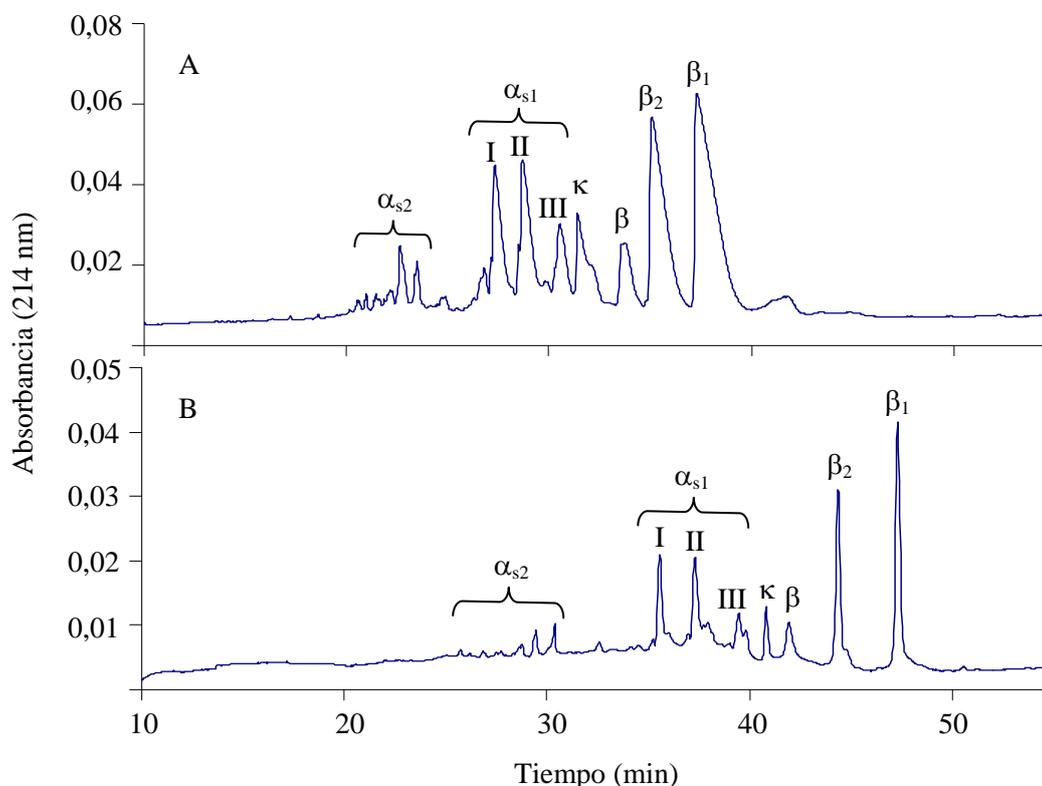


Fig. 4.23. Electroferogramas de muestras de leche de oveja de Frías. Condiciones de separación: A) Capilar de sílice fundida, 18,5 kV ($\sim 35 \mu\text{A}$), tampón fosfato 50 mM, pH 3 con urea 6 M y HPMC 0,05% (p/v). B) Capilar neutro, 25,09 kV ($\sim 50 \mu\text{A}$), tampón fosfato 50 mM, pH 3 con urea 6 M y HPMC 0,05% (p/v) a 21°C.

En primer lugar indicar que el orden de migración obtenido para las caseínas de oveja ($\alpha_{s2} < \alpha_{s1} < \kappa < \beta$) concuerda con el obtenido a pH 4 en PAGE por Chianese *et al.* (1992) y López-Gálvez (1993).

La caseína α_{s2} migra como un grupo de 8 ó 9 picos mayoritarios que se corresponderían con algunas de las 18 posibles formas de fosforilación (Boisnard y Petrissant, 1985), con las dos variantes genéticas o con las dos formas no alélicas larga y corta (Boisnard *et al.*, 1991).

La determinación de las caseínas α_{s1} indica la presencia de tres caseínas con niveles de fosforilación diferentes: I, II y III. La variante D (Welsh) migra a tiempos menores debido a su menor contenido en grupos fosfato (6 ó 7) y está ausente en las muestras analizadas en este trabajo. Según estudios realizados por Recio *et al.* (1997e) y Amigo *et al.* (2000) se puede deducir el fenotipo de una muestra en EC por la intensidad de las formas con diferente nivel de fosforilación I, II y III. En nuestro caso, podría considerarse que se dispone de la variante homocigótica CC para la caseína α_{s1} . Para confirmar este aspecto, sería necesario realizar detallados estudios genéticos a las ovejas. Por otra parte, cabe destacar que se apreciaba un cierto desdoblamiento de los picos I, II y III, lo cual se explica por la presencia de dos especies moleculares de 191 y 199 residuos que aportan variabilidad no alélica (Ferranti *et al.*, 1995).

La caseína κ tiene posibilidades de polimorfismo no genético debido a diferentes grados de glicosilación y fosforilación (López-Gálvez *et al.*, 1994). Además, en el ámbito de DNA, se conoce la existencia de polimorfismo para esta caseína (di Gregorio *et al.*, 1991). En el electroferograma de la Fig. 4.23, únicamente se detecta un pico correspondiente a κ -caseína, no descartándose que otras formas pudieran quedar solapadas con otras caseínas.

En cuanto a la caseína β se pudo detectar tanto la variante β_1 como la β_2 . Ambas difieren en el número de grupos fosfato teniendo la β_1 6 en total (uno más que la β_2), lo cual justifica su desplazamiento más lento en EC. Respecto al

pico anterior a la variante β_2 , algunos autores, previo fraccionamiento mediante FPLC, lo han identificado también como β -caseína (Recio *et al.*, 1997d) por lo que en este caso se adopta dicha nomenclatura.

Para finalizar este estudio se analizaron mezclas de caseínas procedentes de vaca y oveja (proporción 1:1) (Fig. 4.24), ya que los resultados obtenidos serán de utilidad al discutir posteriormente el proceso de maduración de quesos elaborados con ambos tipos de leche.

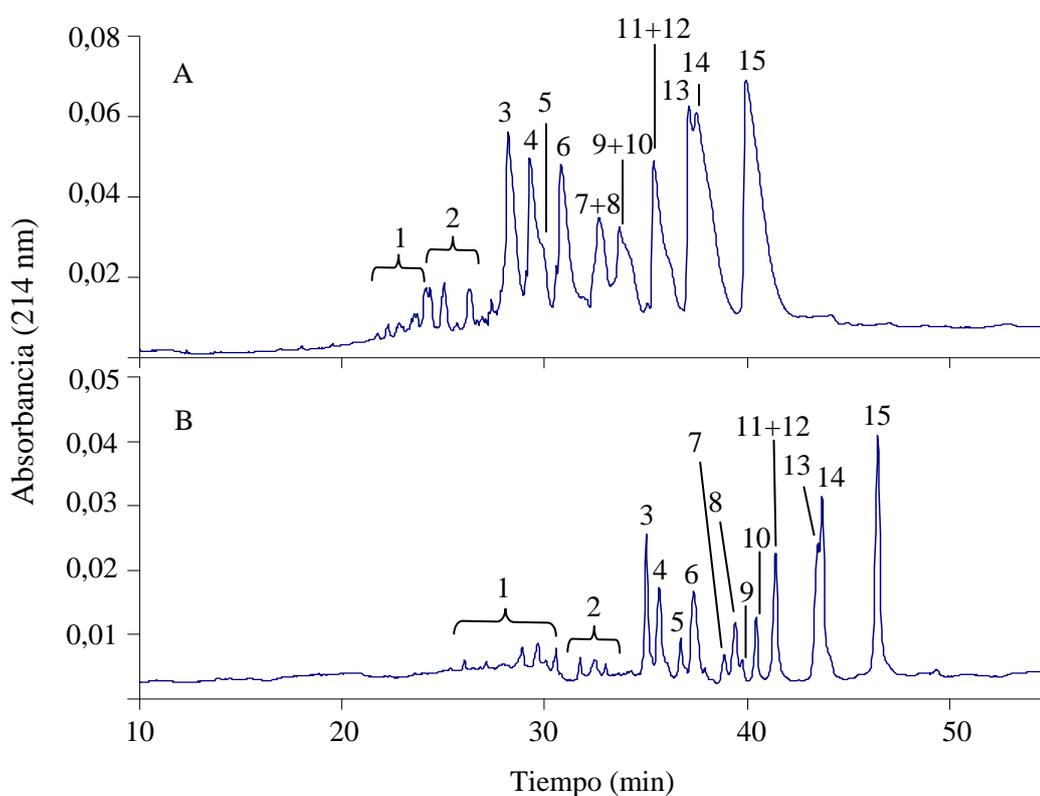


Fig. 4.24. Electroferogramas de muestras de leche de vaca (v) y oveja (o) de Frías. Condiciones de separación: A) Capilar de sílice fundida, 18,5 kV ($\sim 35 \mu\text{A}$), tampón fosfato 50 mM, pH 3 con urea 6 M y HPMC 0,05% (p/v). B) Capilar neutro, 25,09 kV ($\sim 50 \mu\text{A}$), tampón fosfato 50 mM, pH 3 con urea 6 M y HPMC 0,05% (p/v) a 21°C. Identificación de picos: 1: o- α_{s2} ; 2: v- α_{s2} ; 3: v- α_{s1} ; 4: o- α_{s1} -I; 5: v- α_{s0} ; 6: o- α_{s1} -II; 7: v- κ ; 8: o- α_{s1} -III; 9: v- βB ; 10: o- κ ; 11: o- β ; 12: v- βA_1 ; 13: v- βA_2 ; 14: o- β_2 ; 15: o- β_1 .

En los electroferogramas obtenidos se podía observar que en la separación de caseínas de oveja y vaca mediante el capilar neutro, sólo aparecía un pico en el que se solapaban dos caseínas, concretamente la β de oveja y la βA_1 de vaca (Fig. 4.24 (B)) a diferencia de lo que sucedía con el capilar de sílice fundida donde se solapaban seis caseínas, dos a dos, en tres picos diferentes (Fig. 4.24 (A)).

Por otra parte, dado que las caseínas α_{s2} de ambas especies tienen el mismo número de sitios potenciales de fosforilación, el orden de migración de cada una de ellas, era debido probablemente a las 24 mutaciones de aminoácidos que las diferencian (Richardson y Creamer, 1976; Boissard y Petrissant, 1985).

Con respecto a la caseína κ de oveja indicar que migraba más tarde que la de vaca, por ser más larga (posee dos residuos más), y por la diferente composición en azúcares (López-Gálvez *et al.*, 1994). Además, posee un residuo de Cys adicional frente a la de vaca, aspecto que puede variar de manera importante su estructura y por consiguiente su tiempo de migración (Jollès *et al.*, 1974).

Por último, señalar que los picos correspondientes a las caseínas β migraban en el orden esperado, puesto que aunque la β_1 de oveja tiene dos aminoácidos menos que la βA_2 de vaca posee un grupo fosfato más, lo cual unido al tipo de sustituciones que presenta en veinte residuos producirían su retraso (Richardson y Mercier, 1979).

4.2. Análisis de la hidrólisis enzimática de caseínas mediante EC

En el presente apartado se procedió a la identificación mediante EC de los principales productos de degradación liberados por la acción de diferentes agentes proteolíticos de importancia en la industria láctea, ya que pueden afectar a sus propiedades y a las de los productos lácteos elaborados, además de jugar un papel importante durante la maduración de los quesos (Farkye y Fox, 1992). Concretamente, se estudió la acción de plasmina (EC 3.4.21.7), quimosina o renina (EC 3.4.23.4) y del preparado comercial Neutrase[®] (Novozyme) sobre muestras purificadas de caseínas α_s , β y κ , a diferentes tiempos de incubación (ver apto. 3.3). No obstante, en las siguientes gráficas únicamente se incluyen aquellos tiempos significativos para el estudio de la hidrólisis enzimática de cada caseína analizada.

El análisis de la hidrólisis enzimática de caseínas se realizó paralelamente con los dos capilares objeto de estudio en el apartado anterior: (i) capilar de sílice fundida y (ii) capilar neutro, en las condiciones óptimas previamente descritas (ver apdo. 4.1).

En el desarrollo de los resultados obtenidos en este apartado experimental y teniendo en cuenta la linealidad de la respuesta frente a la concentración, fue posible la cuantificación del porcentaje de hidrólisis, determinando el área de cada pico antes y después del tratamiento enzimático. Si bien indicar, que para la realización de estos cálculos se seleccionaron los electroferogramas obtenidos con el capilar neutro dada la mayor resolución que presentaba este método.

4.2.1. HIDRÓLISIS DE CASEÍNAS POR PLASMINA

En la leche bovina la actividad proteolítica se debe a la acción de una proteasa alcalina de origen sanguíneo, la plasmina. Esta enzima es parcialmente resistente al tratamiento UHT (Recio *et al.*, 1996a; 1996b) y también soporta la pasteurización (Driessen y Van der Waals, 1978).

La plasmina es una serin-proteasa, similar a la tripsina en su actividad y características. La plasmina hidroliza los enlaces peptídicos por el extremo carboxilo de residuos de Lys y Arg (Kitchen, 1985), con preferencia por la Lys. La enzima de la leche bovina es muy activa en el intervalo de valores de pH 7,5-8,0 y a temperatura de 37°C (Kaminogawa *et al.*, 1972; Fox, 1981), pero como indica su actividad en varios tipos de quesos, esta enzima es estable y activa en un amplio intervalo de pH (Bastian y Brown, 1996).

En las Fig. 4.25 y Fig. 4.26 se muestran los resultados de la hidrólisis de la caseína α_s por la acción específica de la plasmina analizadas con los capilares de sílice fundida y neutro, respectivamente. Los electroferogramas mostraban que la caseína α_{s2} era hidrolizada después de 30 min de incubación, siendo sus productos de degradación solubles a valores de pH 4,6. La hidrólisis de esta caseína está justificada por su alto contenido en residuos de Lys, los cuales son sensibles al ataque enzimático de la plasmina, siendo ocho los posibles enlaces atacados (Le Bars y Gripon, 1989). Sin embargo, eran necesarios tiempos de hidrólisis mayores (90 min) para observar un 24,1% de degradación para la caseína α_{s1} y un 17,7% para la α_{s0} . Este dato indicaba que la caseína α_{s1} iba siendo hidrolizada a lo largo del tiempo. De hecho, el pequeño pico detectado a tiempo de migración de 27,2 min con el capilar de sílice y de 29,3 min con el neutro, podría corresponderse con el pico denominado α_sP por Recio *et al.* (1997a), el cual posiblemente procedería de la hidrólisis de la caseína α_{s1} , y se formaría siempre que la caseína α_{s2} haya sido completamente hidrolizada. Sin embargo, no fueron detectados más picos en los electroferogramas ya que la hidrólisis de la caseína α_{s1} rinde una serie de

péptidos solubles a pH 4,6 (Recio *et al.*, 1997a). Los productos de la hidrólisis de esta caseína por plasmina representan un grupo heterogéneo de péptidos denominados con el término de caseína λ (Aimutis y Eigel, 1982). Recientemente Addeo *et al.* (1995) han aislado el péptido caseína α_{s1} f(80-199) que deriva de la degradación de esta caseína por plasmina.

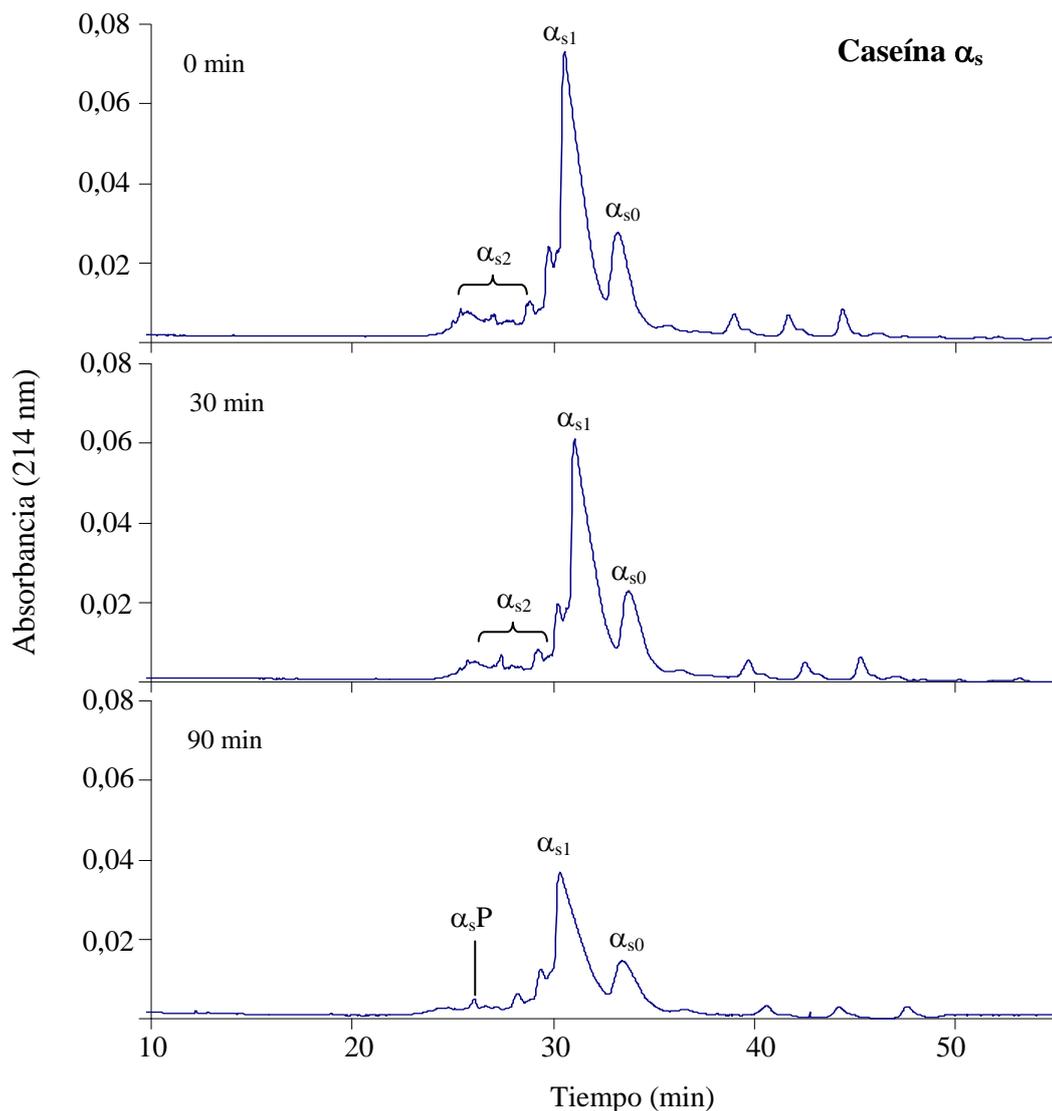


Fig. 4.25. Electroferogramas de caseína α_s tratada con plasmina a diferentes tiempos de incubación. Condiciones de separación: capilar de sílice fundida, 18,5 kV ($\sim 35 \mu\text{A}$), tampón fosfato 50 mM, pH 3 con urea 6 M y HPMC 0,05% (p/v).

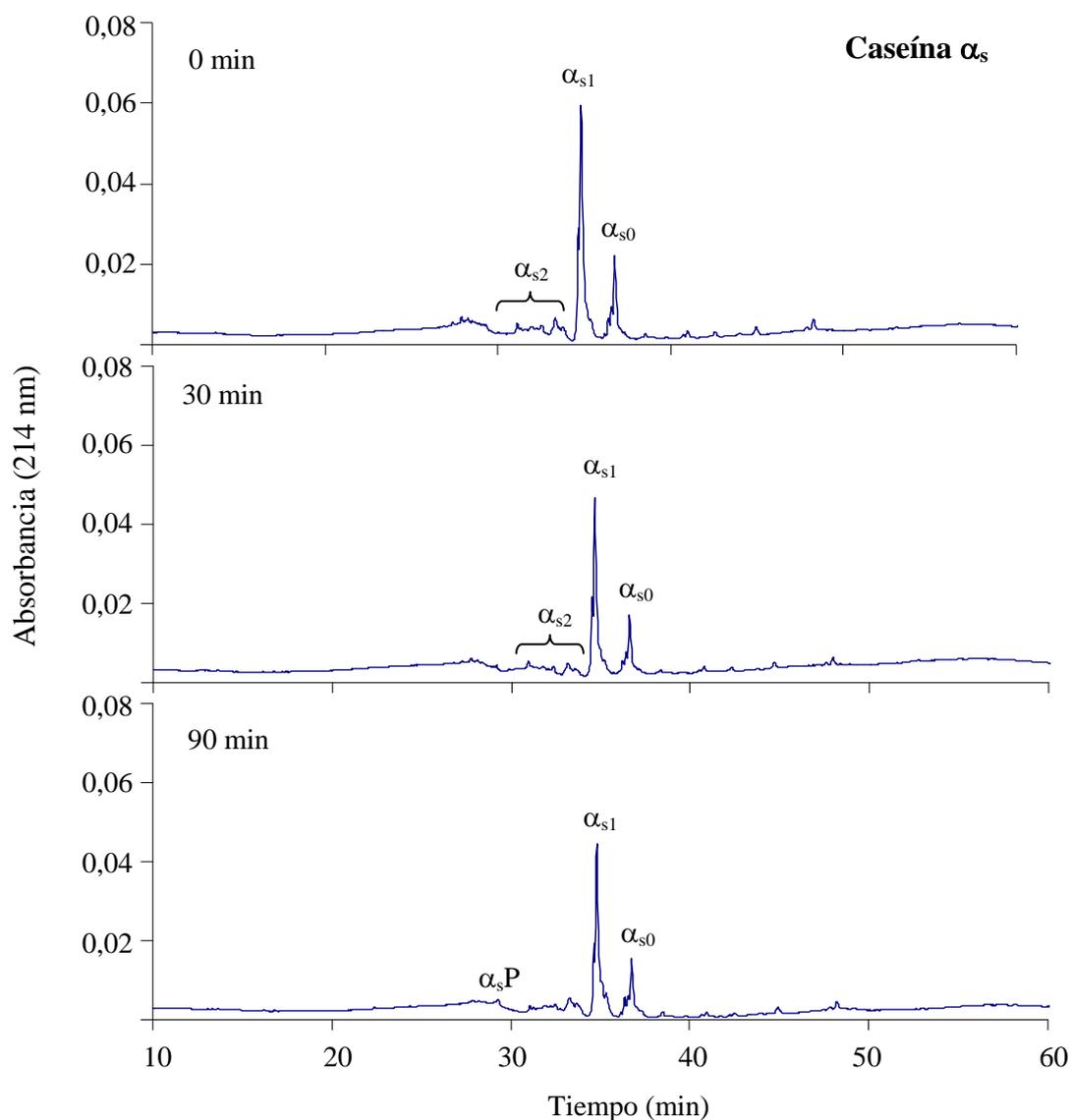


Fig. 4.26. Electroferogramas de hidrólisis de caseína α_s tratada con plasmina a diferentes tiempos de incubación. Condiciones de separación: capilar neutro, 25,09 kV ($\sim 50 \mu\text{A}$), tampón fosfato 50 mM, pH 3 con urea 6 M y HPMC 0,05% (p/v) a 21°C.

Con respecto a la hidrólisis de caseína β (Fig. 4.27 y Fig. 4.28), cabe destacar que a los 30 min de reacción se apreciaban claramente los péptidos resultantes del ataque enzimático, con velocidades de migración mayores que la variante B, observándose a los 90 min de incubación perfiles muy semejantes en ambos capilares.

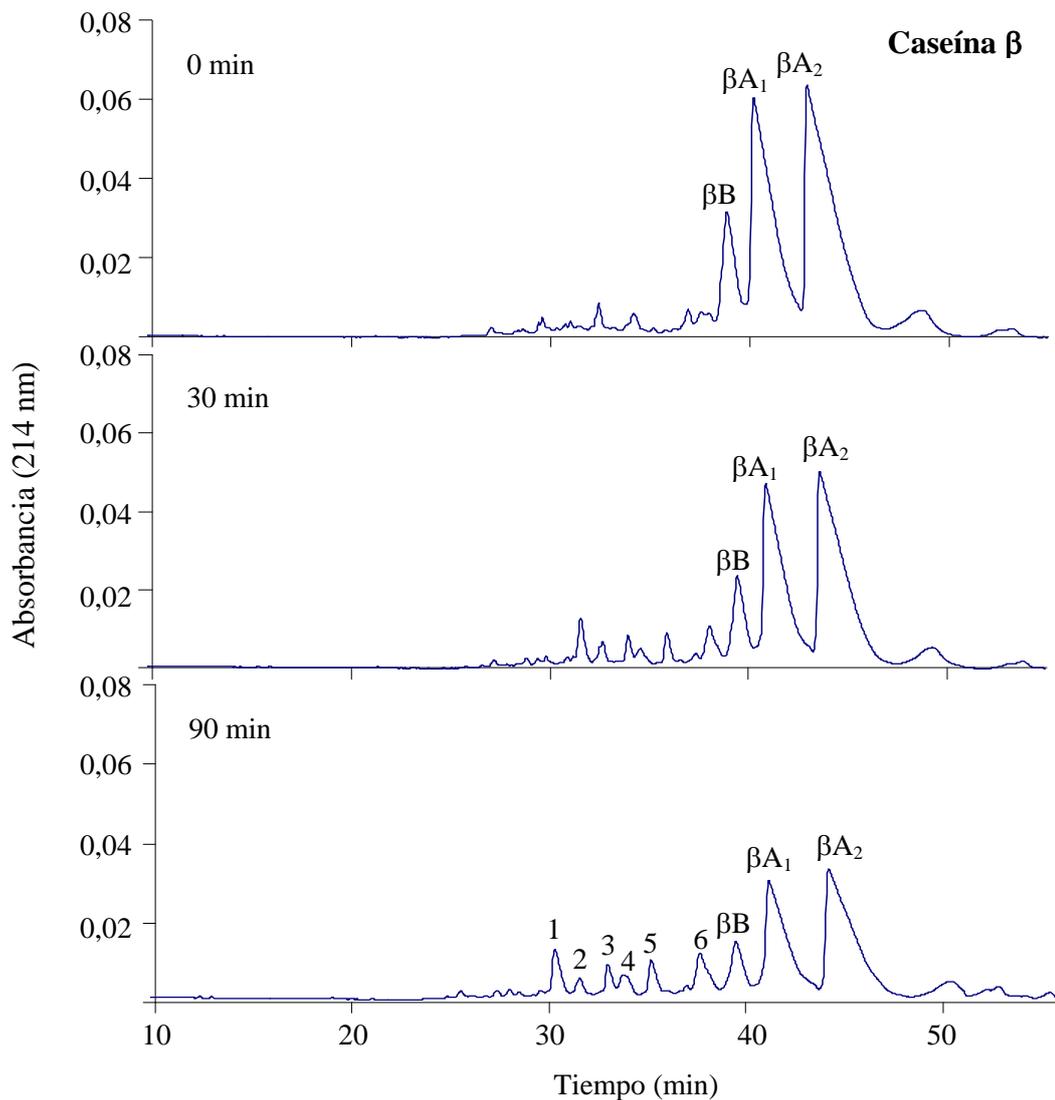


Fig. 4.27. Electroferogramas de caseína β tratada con plasmina a diferentes tiempos de incubación. Condiciones de separación: capilar de sílice fundida, 18,5 kV ($\sim 35 \mu A$), tampón fosfato 50 mM, pH 3 con urea 6 M y HPMC 0,05% (p/v). Identificación de picos: 1: $\gamma_2 A$; 2: $\gamma_1 B$; 3: $\gamma_1 A_1$; 4: $\gamma_3 B$; 5: $\gamma_1 A_1$; 6: $\gamma_3 A$.

La acción de la plasmina sobre caseína β libera una serie de péptidos que se denominan caseínas γ (Swaisgood, 1992). La fracción de γ -caseína está compuesta por γ_1 , γ_2 y γ_3 , que se corresponden con los fragmentos de caseína β f(29-209), f(106-209) y f(108-209), respectivamente. La caseína γ_2 contiene His y Lys en las posiciones 106 y 107, las cuales están cargadas positivamente a valores de pH bajos, y por tanto, tienen una mayor movilidad en las

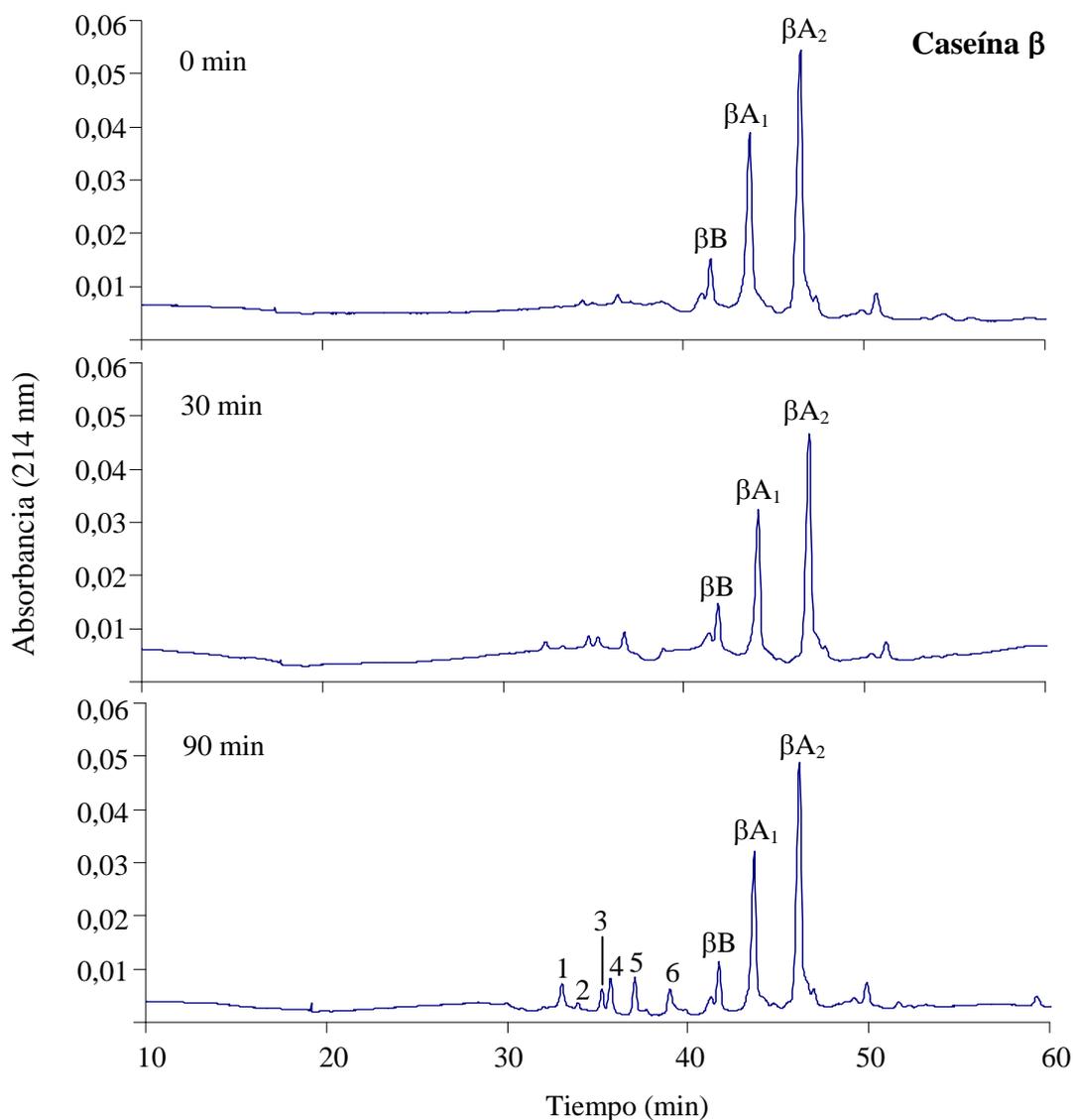


Fig. 4.28. Electroferogramas de caseína β tratada con plasmina a diferentes tiempos de incubación. Condiciones de separación: capilar neutro, 25,09 kV ($\sim 50 \mu A$), tampón fosfato 50 mM, pH 3 con urea 6 M y HPMC 0,05% (p/v) a 21°C. Identificación de picos: 1: γ_2A ; 2: γ_1B ; 3: γ_1A_1 ; 4: γ_3B ; 5: γ_1A_1 ; 6: γ_3A .

condiciones de operación que el resto de caseínas γ . En consecuencia, el orden de migración de las caseínas γ debería ser $\gamma_2 < \gamma_1 < \gamma_3$ (Otte *et al.*, 1997).

Por otra parte, es necesario tener en cuenta que en la muestra de caseína β se detectó la presencia de tres variantes genéticas A_1 , A_2 y B . Las caseínas βA_1 y A_2 se diferencian en la posición 67 (His y Pro, respectivamente). Esta

posición sólo aparece en la caseína γ_1 , por lo que la acción de la plasmina dará lugar a dos caseínas γ_1 diferentes, una por cada una de las caseínas β (γ_1A_1 y γ_1A_2), y sólo una γ_2 y γ_3 . Las diferencias entre la caseína β B y A₂ se encuentran en las posiciones 67 (His y Pro, respectivamente) y 122 (Arg y Ser, respectivamente). Por tanto, la acción de esta enzima sobre la caseína β B dará lugar a tres caseínas γ distintas a las anteriores, γ_1B , γ_2B y γ_3B . En resumen, la acción de plasmina sobre la caseína β rendiría 7 caseínas γ distintas.

Considerando tanto la carga neta, como el tamaño de estos péptidos, así como diferentes referencias bibliográficas (Otte *et al.*, 1997; Recio *et al.*, 1997a; Miralles *et al.*, 2000b; Molina *et al.*, 2000, 2002), ha sido posible la identificación de seis de estos péptidos (γ_2A , γ_1B , γ_1A_1 , γ_3B , γ_1A_2 y γ_3A) en los electroferogramas de las Fig. 4.27 y Fig. 4.28. En las condiciones de trabajo no fue posible identificar la caseína γ_2B , cuyo tiempo de migración debería ser inferior al de la caseína γ_2A como consecuencia de su mayor movilidad por la presencia de un residuo de Arg en la posición 122.

Los electroferogramas correspondientes a la hidrólisis de caseína κ (Fig. 4.29) indicaban que la plasmina no presentaba actividad hacia esta proteína. No obstante, en la bibliografía aparecen discrepancias sobre si la plasmina puede o no hidrolizar a la κ -caseína (Chen y Ledford, 1971; Andrews y Alichanidis, 1983), argumentándose estos resultados como una consecuencia de las condiciones medioambientales y/o a la concentración de enzima y de sustrato utilizadas (Crufferty y Fox, 1988).

Los resultados obtenidos hasta el momento, son concordantes con el hecho de que en las leches bovinas las caseínas β y α_{s2} resultan rápidamente hidrolizadas por plasmina (Snoeren y Van Riel, 1979), la caseína α_{s1} mucho más lentamente (Crufferty y Fox, 1988), mientras que la caseína κ y las proteínas del lactosuero son muy resistentes a la acción enzimática de esta proteasa (Eigel, 1977).

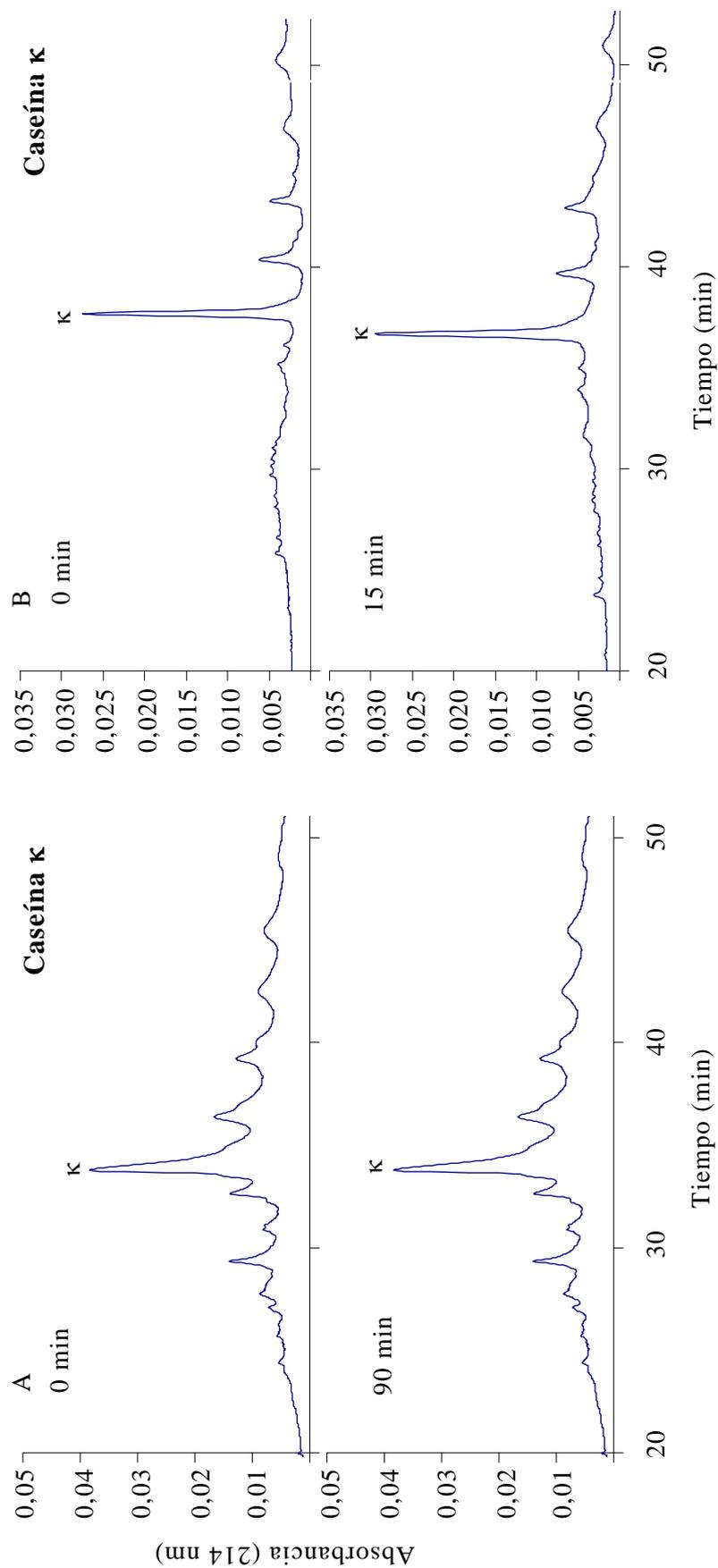


Fig. 4.29. Electroferogramas de caseína κ tratada con plasmina a diferentes tiempos de incubación. Condiciones de separación:
A) Capilar de sílice fundida, 18,5 kV (~35 μ A), tampón fosfato 50 mM, pH 3 con urea 6 M y HPMC 0,05% (p/v).
B) Capilar neutro, 25,09 kV (~50 μ A), tampón fosfato 50 mM, pH 3 con urea 6 M y HPMC 0,05% (p/v) a 21°C.

No obstante, cuando una mezcla de caseínas (α_s , β y κ) era tratada con plasmina, en las condiciones de separación utilizadas, únicamente fue posible la identificación de alguna de las caseínas γ con el capilar neutro, concretamente las caseínas γ_2A , γ_1B , γ_1A_2 y γ_3A (Fig. 4.30). El resto de las caseínas γ migran en la zona de la caseína α_{s1} lo cual impide su detección. Resultados similares refleja el trabajo de Recio *et al.* (1997a) en el que, partiendo de variantes genéticas escogidas, sólo se detectaban cuatro de las caseínas γ resultantes. No fue posible identificar otros fragmentos fruto de la acción hidrolítica de la plasmina, salvo el fragmento α_sP mencionado anteriormente, debido a que muchos de estos productos liberados son solubles a pH 4,6.

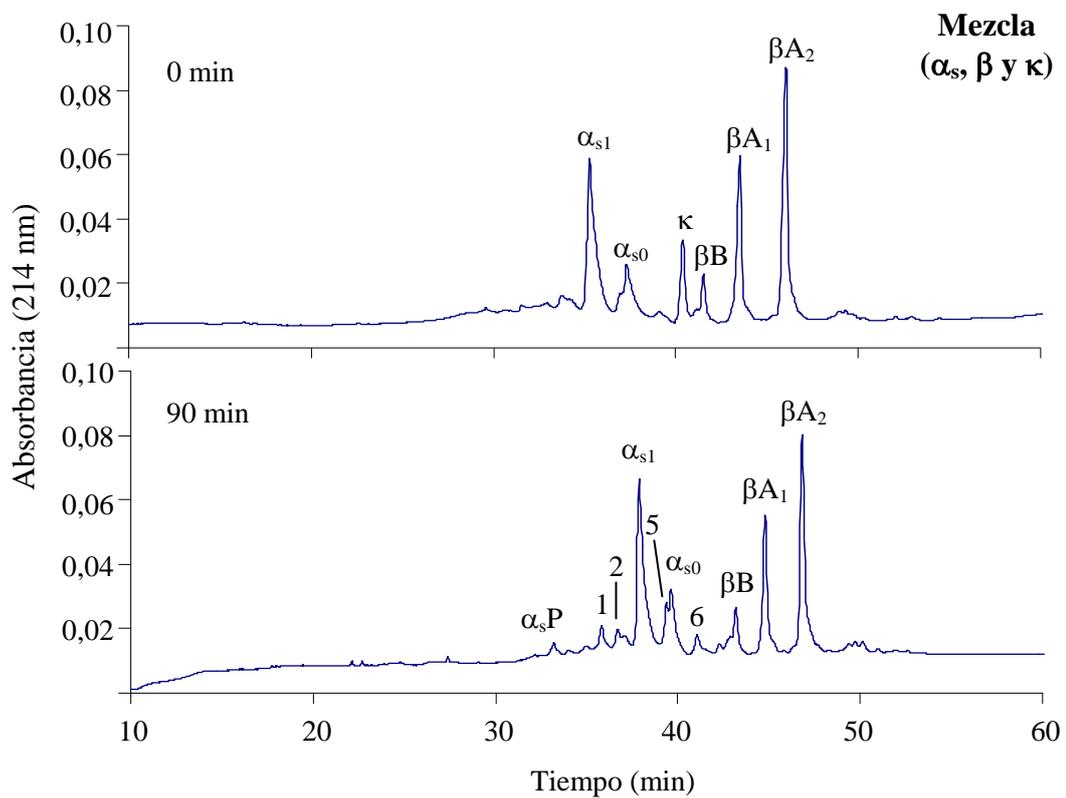


Fig. 4.30. Electroferogramas de mezcla de caseínas α_s , β y κ (1:1:1) tratadas con plasmina a diferentes tiempos de incubación. Condiciones de separación: capilar neutro, 25,09 kV ($\sim 50 \mu A$), tampón fosfato 50 mM, pH 3 con urea 6 M y HPMC 0,05% (p/v) a 21°C. Identificación de picos: 1: γ_2A ; 2: γ_1B ; 5: γ_1A_1 ; 6: γ_3A .

4.2.2. HIDRÓLISIS DE CASEÍNAS POR QUIMOSINA O RENINA

En el proceso de elaboración de queso tiene lugar la precipitación y recuperación de las caseínas por desestabilización de las micelas al producirse la ruptura de la κ -caseína. Esta precipitación puede llevarse a cabo enzimáticamente, siendo la enzima más utilizada en este proceso industrial la quimosina. Dicha enzima se extrae a partir del cuarto estómago de los terneros sin destetar, siendo una de sus propiedades más importantes su capacidad para precipitar las caseínas sin promover un nivel de proteolisis elevado. Su presencia en el queso se explica por transferencia desde la cuajada ya sea parcialmente ligada a las caseínas o parcialmente disuelta en la humedad residual del queso (Visser y van den Berg, 2002).

La quimosina es una aspartil-proteasa que pertenece al grupo de las proteasas ácidas, presentando una actividad enzimática máxima a valores de pH cercanos a 3,5. Sin embargo, en el cuajado de la leche el pH se encuentra generalmente en torno a pH 5,5-6,5. Con respecto a su estabilidad, hay que indicar que esta enzima es muy estable a valores de pH próximos a 5 pero, por el contrario, a pH 3,5 sufre un proceso de autólisis, mientras que a pH superiores a 6 es rápidamente desnaturalizada. En cuanto a la especificidad de sustrato de la renina no ha sido estudiada de forma extensiva, pero parece muy similar a la de la pepsina (Whitaker, 1994). Respecto a su efectividad sobre las caseínas en el queso se han determinado diferencias frente a la hidrólisis llevada a cabo en leche o modelos proteicos. Esto es debido a las distintas condiciones ambientales de actuación, ya que en el queso el pH se reduce a 5,2 con una temperatura de 8°C, se añade sal hasta alcanzar un 5% de humedad y las caseínas se encuentran en estado agregado (Fox y Guiney, 1973).

Los electroferogramas obtenidos con el capilar de sílice fundida y neutro para la hidrólisis de caseínas α_s con quimosina se detallan en las Fig. 4.31 y Fig. 4.32, respectivamente. En ellos puede comprobarse cómo a medida que se

incrementaba el tiempo de hidrólisis, disminuía la intensidad de los picos correspondientes a las caseínas α_{s1} y α_{s0} .

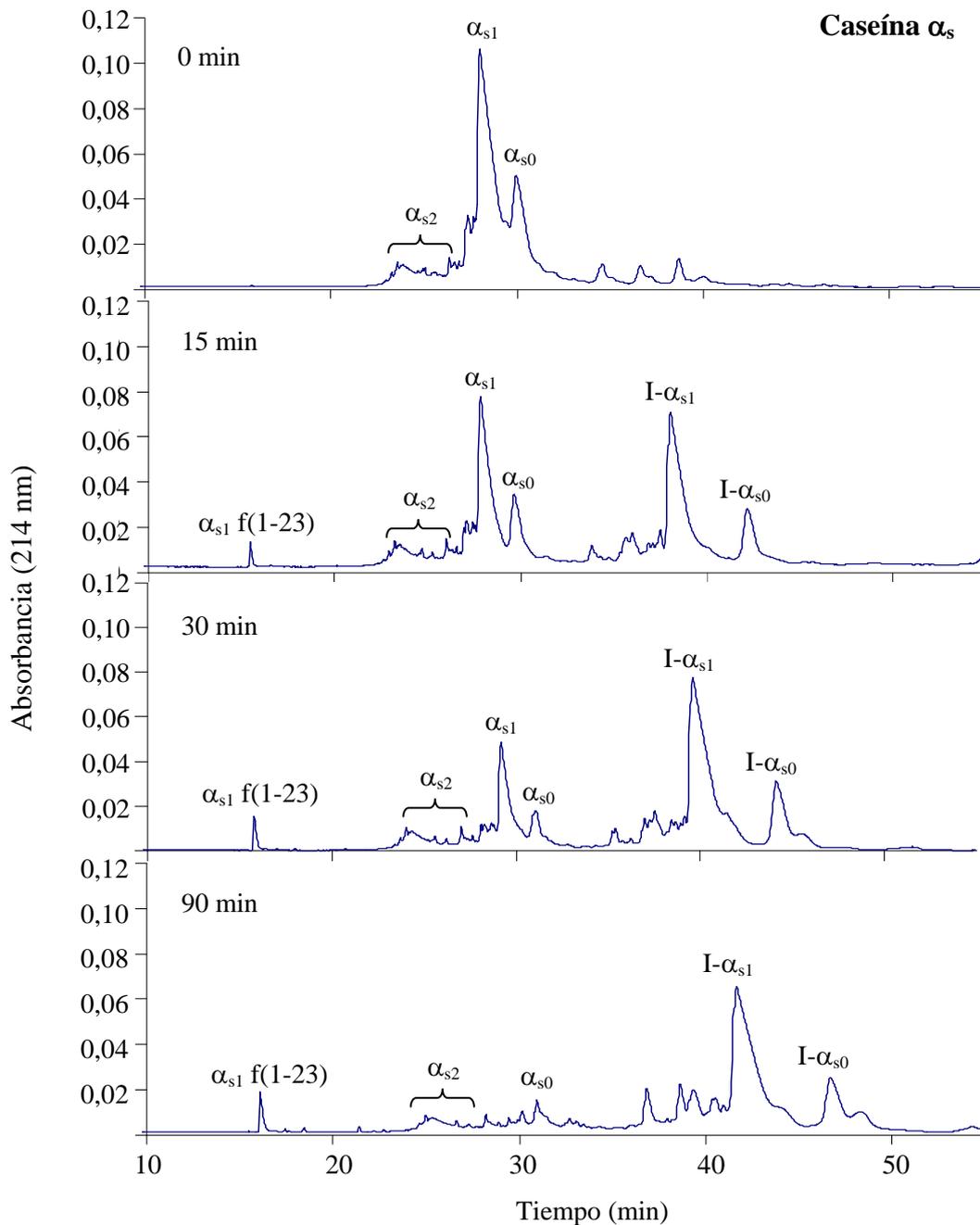


Fig. 4.31. Electroferogramas de caseína α_s tratada con renina a diferentes tiempos de incubación. Condiciones de separación: capilar de sílice fundida, 18,5 kV ($\sim 35 \mu\text{A}$), tampón fosfato 50 mM, pH 3 con urea 6 M y HPMC 0,05% (p/v).

Concretamente, a los 30 min de incubación los porcentajes de hidrólisis, en el caso del capilar neutro, eran del 76,9 y 81,2%, respectivamente, mientras que después de 90 min ambas caseínas habían sido casi totalmente degradadas. La caseína α_{s1} , tanto en solución como en el queso, es rápidamente hidrolizada por la quimosina en los lugares carboxílicos de los enlaces peptídicos Phe²³-Phe²⁴ o Phe²⁴-Val²⁵, para originar los péptidos f(1-23/24) y f(24/25-199), denominado este último caseína-I- α_{s1} (Kristiansen *et al.*, 1994).

Paralelamente a la degradación de las caseínas α_{s1} y α_{s0} , aparecían dos nuevos picos a tiempos de migración superiores de aproximadamente 42 y 47 min para el capilar de sílice fundida y de 47 y 52 min para el capilar neutro, los cuales probablemente representen el fragmento C-terminal f(24/25-199) de las caseínas α_{s1} y α_{s0} , (caseína-I- α_{s1} y caseína-I- α_{s0}) (Otte *et al.*, 1997), respectivamente. Además, a un tiempo de migración de 16,5 min en el capilar de sílice fundida y de 17,2 min en el neutro se detectaba un pequeño pico, que podría corresponderse al péptido f(1-23/24) de la caseína α_{s1} . Esta ruptura es de gran importancia en los primeros momentos de la maduración de la mayoría de los quesos, y es responsable del ablandamiento de la textura de los mismos (Creamer y Olson, 1982).

Lo anteriormente expuesto concuerda con el incremento observado en el área de pico de las caseínas I- α_{s1} y I- α_{s0} a medida que aumentaba el tiempo de hidrólisis, siendo máximo para un tiempo de incubación de 45 min, para el cual puede considerarse total la degradación de las caseínas α_{s1} y α_{s0} . A partir de los 60 min de incubación ambas caseínas, I- α_{s1} y I- α_{s0} , comienzan a hidrolizarse, indicando que pasarían a ser sustratos preferentes de la enzima, lo cual se ve acompañado por un ligero incremento en los pequeños picos que migran en la zona comprendida entre la caseína α_{s0} y el fragmento I- α_{s1} (entre 40 y 47 min en el capilar neutro). De hecho, hay evidencias de que la caseína-I- α_{s1} es hidrolizada por la quimosina durante la maduración del queso rindiendo productos de una elevada movilidad electroforética en PAGE-urea a pH alcalino (McSweeney *et al.*, 1993). Por tanto, los picos minoritarios que aparecen en el

electroferograma, podrían representar estos péptidos insolubles a pH 4,6 y de bajo peso molecular producto de la hidrólisis de la caseína-I- α_s .

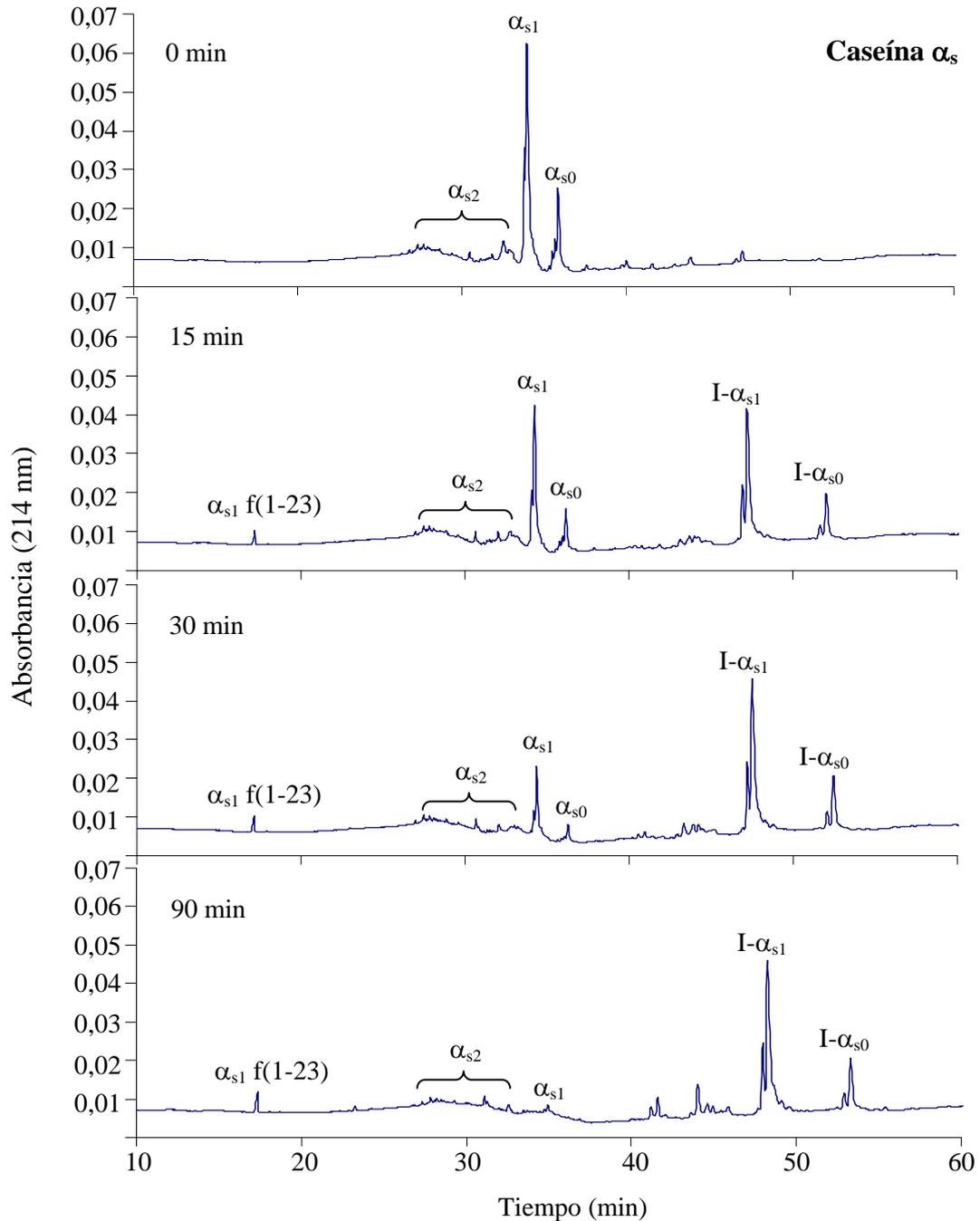


Fig. 4.32. Electroferogramas de hidrólisis de caseína α_s tratada con renina a diferentes tiempos de incubación. Condiciones de separación: capilar neutro, 25,09 kV ($\sim 50 \mu\text{A}$), tampón fosfato 50 mM, pH 3 con urea 6 M y HPMC 0,05% (p/v) a 21°C.

Por otra parte, es importante señalar que con el capilar neutro, las señales electroforéticas correspondientes a las caseínas I- α_{s1} y I- α_{s0} se mostraban como un doble pico (Fig. 4.32). Este hecho puede ser indicativo de la coexistencia de dos variantes genéticas no detectadas con anterioridad mediante el análisis con el capilar de sílice fundida y viene a confirmar la detección de dos picos para la caseína α_{s1} y α_{s0} que se apuntaban como un hombro del pico principal en la Fig. 4.18 para el capilar neutro. En trabajos con variantes genéticas conocidas de caseínas de vaca, Recio *et al.* (1997a; 1997d) detectaron también un leve desdoblamiento del pico correspondiente a las caseínas α_{s1} y α_{s0} al analizar las variantes heterocigóticas BC para ambas caseínas, mientras que obtenían un único pico al estudiar caseínas BB.

En contraste con la intensa hidrólisis sufrida por las caseínas α_{s1} y α_{s0} , la caseína α_{s2} no era accesible a la acción de la renina, incluso a tiempos largos de tratamiento (90 min). Este resultado concuerda con lo expuesto por Kristiansen *et al.* (1994), quienes mostraron que la caseína α_{s2} era bastante resistente a la hidrólisis por quimosina. No obstante, no existe una clara uniformidad de criterio entre los distintos autores, señalándose también el enlace Phe⁸⁸-Tyr⁸⁹ de la caseína α_{s2} como punto potencial de hidrólisis por la quimosina (McSweeney *et al.*, 1994a). Lo cierto, es que la actuación de esta enzima se ve restringida a las regiones hidrófobas de la molécula.

Los electroferogramas correspondientes a los productos de degradación liberados de la β -caseína por acción de la renina, se detallan en las Fig. 4.33 y Fig. 4.34. Del análisis de ambas figuras se observa la mayor resolución del capilar neutro para resolver estas muestras. De hecho, no se pudieron identificar con exactitud los fragmentos liberados a 90 minutos en el capilar de sílice fundida.

La hidrólisis de β caseína B, A₁ y A₂ era bastante rápida puesto que en tan solo 30 min de incubación se alcanzaba un 86,6; 81,7 y 81,8% de hidrólisis respectivamente, siendo a los 45 min del 94,9; 92,1 y 92,1%. Como resultado de esta hidrólisis se detectaron siete nuevos picos (1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7) (Fig. 4.34).

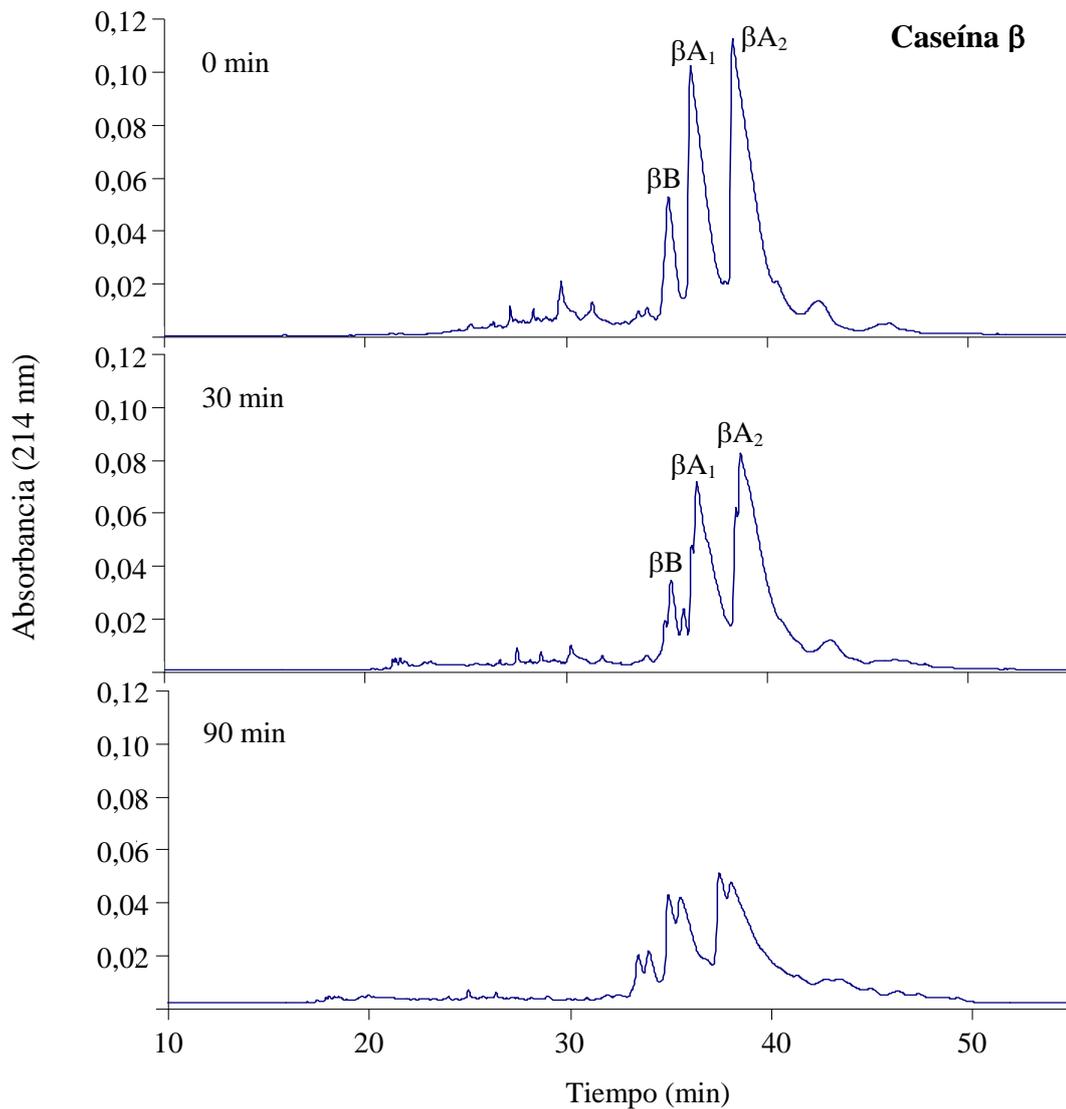


Fig. 4.33. Electroferogramas de caseína β tratada con renina a diferentes tiempos de incubación. Condiciones de separación: capilar de sílice fundida, 18,5 kV ($\sim 35 \mu A$), tampón fosfato 50 mM, pH 3 con urea 6 M y HPMC 0,05%.

La β -caseína en solución es hidrolizada secuencialmente en los sitios Leu^{192} - Tyr^{193} , Ala^{189} - Phe^{190} , Leu^{163} - Ser^{164} y Leu^{139} - Leu^{140} , para dar lugar a los péptidos β -I', β -I'', β -II y β -III, respectivamente (Fox *et al.*, 1993), siendo el enlace entre los residuos 192-193 el más fácilmente hidrolizable (Macedo *et al.*, 1996; Visser y van den Berg, 2002). El enlace 127-128 también se hidroliza para formar el péptido β -IV a pH reducido (Visser y Slangen, 1977; Fox *et al.*, 1993). Estas distintas reacciones son secuenciales más que competitivas, y parece imposible la formación directa de caseína- β -III a partir de caseína β sin

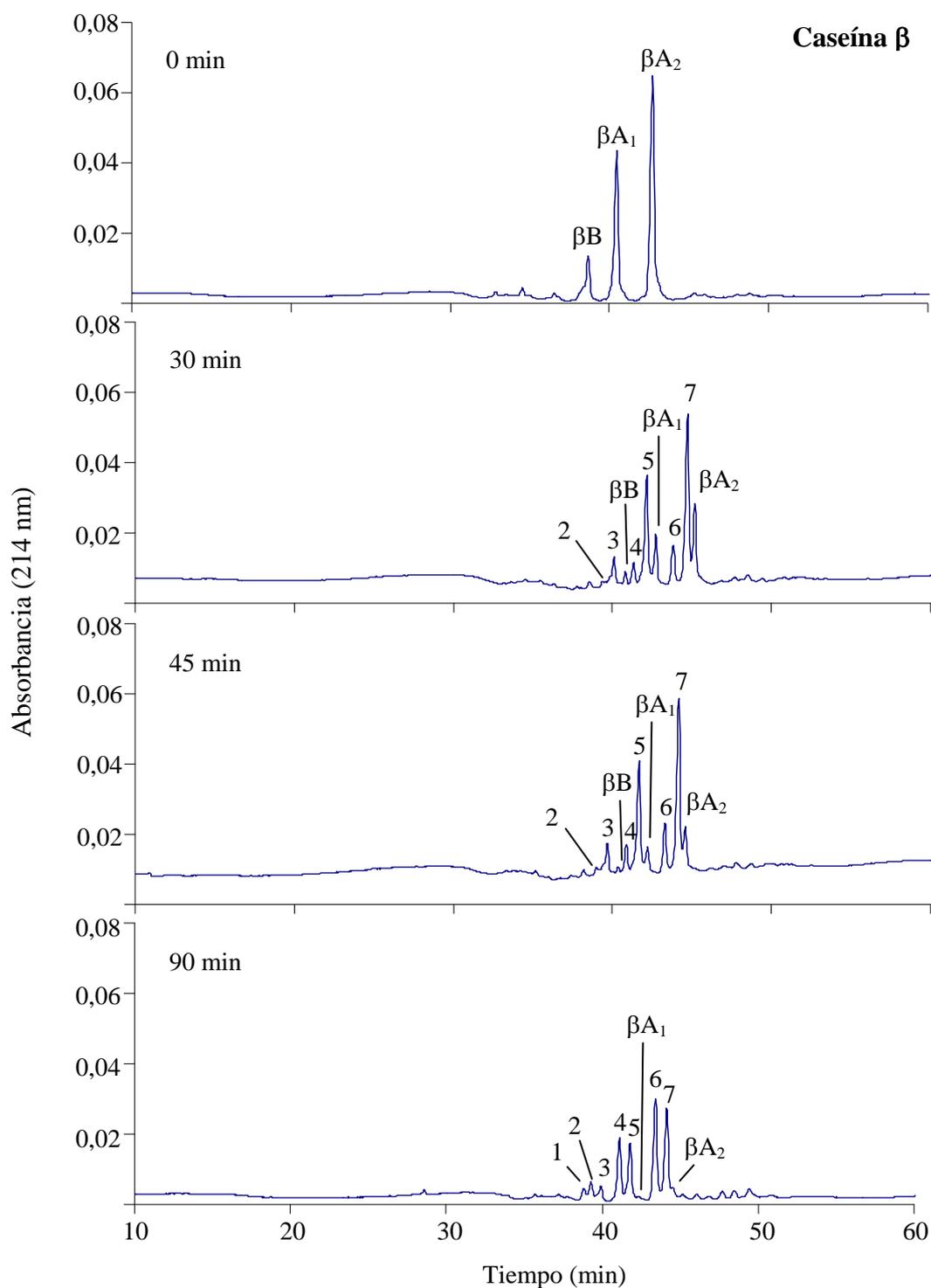


Fig. 4.34. Electroferogramas de caseína β tratada con renina a diferentes tiempos de incubación. Condiciones de separación: capilar neutro, 25,09 kV ($\sim 50 \mu A$), tampón fosfato 50 mM, pH 3 con urea 6 M y HPMC 0,05% (p/v) a 21°C. Identificación de picos: 1,2,3: productos de degradación de βB ; 4: $\beta\text{-I}'A_1$; 5: $\beta\text{-I}'A_1$; 6: $\beta\text{-I}''A_2$; 7: $\beta\text{-I}'A_2$.

la formación de los péptidos intermediarios β -I y β -II. La explicación podría ser que la conformación de la caseína β , hace inaccesibles los enlaces al ataque primario.

El análisis de los electroferogramas de la Fig. 4.34 muestra que a medida que tiene lugar la degradación de las caseínas β A₁ y A₂ se incrementa el tamaño de los picos denominados 5 y 7. A tiempos de incubación superiores a los 45 min se observaba una disminución del área de pico de ambos fragmentos a medida que aumentaba la de los picos denominados 4 y 6. Por tanto, según lo expuesto en el párrafo anterior, es posible que los péptidos nombrados en el electroferograma como 5 y 7 se correspondan con la caseína- β -I' o fragmento f(1-192), mientras que los picos 4 y 6 con la caseína- β -I'' o fragmento f(1-189) de las variantes genéticas A₁ y A₂, respectivamente. Además, los péptidos β -I' y β -I'' difieren de la caseína β completa en 17 y 20 residuos de aminoácidos, lo que explicaría los tiempos de migración menores para estos fragmentos frente a la caseína- β , a pesar de que ésta contiene un residuo de Arg más que estaría cargado positivamente a pH ácido. Esto viene a demostrar que en la velocidad de migración no solo influye la carga global, sino la relación carga/tamaño.

En relación con la caseína β B se observa en los electroferogramas (Fig. 4.34) que era totalmente hidrolizada por la quimosina tras 90 min de incubación, dando lugar a la aparición de tres picos denominados 1, 2 y 3 en el electroferograma.

Destacar también la aparición de cierto número de fragmentos a tiempos de migración superiores al de la caseína β A₂, que corresponderían a otros productos de hidrólisis que en menor proporción se iban formando para tiempos de incubación prolongados.

Sin embargo, y a pesar de estos resultados, la quimosina no parece atacar la β -caseína durante la maduración del queso quizás como consecuencia de la baja actividad de agua o por el estado inmovilizado de la caseína β en este producto lácteo (Dalglish, 1987). La región muy hidrofóbica C-terminal sufre

reacciones dependientes de la temperatura de tipo hidrofóbico haciendo que los enlaces susceptibles de hidrólisis queden inaccesibles a la quimosina. También la presencia de NaCl al 5% tiene fuerte efecto inhibitor sobre esta enzima (Fox y Stepaniak, 1993).

Con respecto a la hidrólisis de caseína κ por acción de la quimosina, la Fig. 4.35 muestra cómo esta proteína era totalmente hidrolizada al cabo de 15 minutos de incubación. De hecho, la renina hidroliza específica y rápidamente el enlace Phe¹⁰⁵-Met¹⁰⁶ (Van Hooydonk *et al.*, 1984) dando lugar a la formación de la para- κ -caseína y de un caseinomacropéptido (CMP). No obstante, en el electroferograma no se detectaba ningún pico, dado que la para- κ -caseína es insoluble y se elimina según se ha indicado en el protocolo experimental correspondiente (apdo. 3.3.2) después de la desnaturalización de la proteína y el CMP es soluble a pH 4,6.

El estudio de la hidrólisis de una mezcla de caseínas α_s , β y κ (Fig. 4.36) demostraba de nuevo el mayor poder de resolución del capilar neutro. Se podía comprobar la rápida desaparición de la caseína κ , junto con una mayor hidrólisis de las caseínas α_s (tanto α_{s1} como α_{s0}) frente a las caseínas β . Para los 90 min de incubación, se observaba que la hidrólisis de caseína β B, A₁ y A₂ era únicamente de 76,2; 64,3 y 65,4% respectivamente, se detectaba la presencia del péptido f(1-23/24) complementario a la formación del fragmento I- α_{s1} , apreciado con claridad, al igual que el péptido I- α_{s0} . Otro aspecto a destacar en la hidrólisis de la mezcla de caseínas es la formación de los péptidos β -I' (picos 5 y 7), frente a la escasa formación de β -I'' (picos 4 y 6), debida a la fuerte competencia con las caseínas β A₁, A₂ y B.

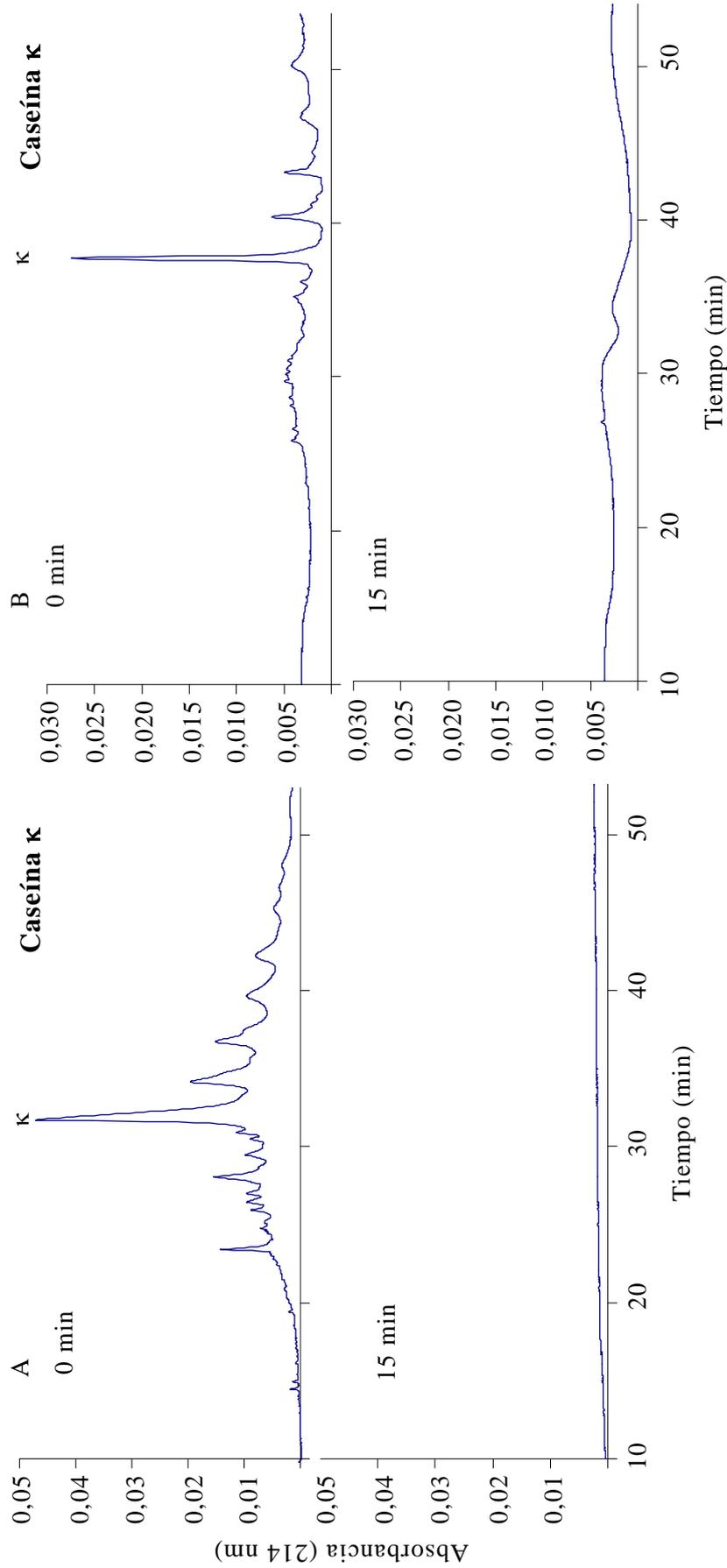


Fig. 4.35. Electroferogramas de caseína κ tratada con renina a diferentes tiempos de incubación. Condiciones de separación:
A) Capilar de sílice fundida, 18,5 kV ($\sim 35 \mu\text{A}$), tampón fosfato 50 mM, pH 3 con urea 6 M y HPMC 0,05% (p/v).
B) Capilar neutro, 25,09 kV ($\sim 50 \mu\text{A}$), tampón fosfato 50 mM, pH 3 con urea 6 M y HPMC 0,05% (p/v) a 21°C.

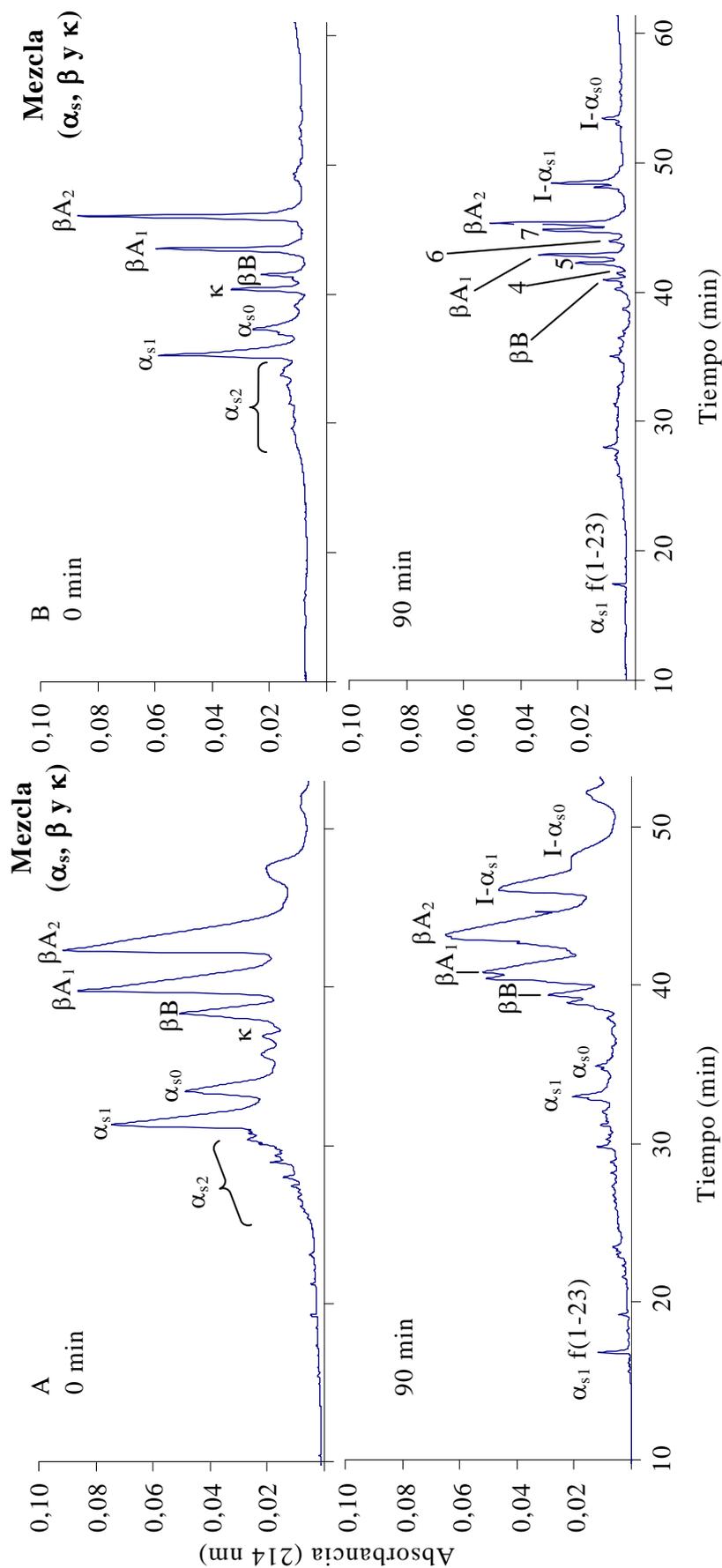


Fig. 4.36. Electroferogramas de mezcla de caseínas α_s , β y κ (1:1:1) tratada con renina a diferentes tiempos de incubación. Condiciones de separación: A) Capilar de sílice fundida, 18,5 kV (~35 μ A), tampón fosfato 50 mM, pH 3 con urea 6 M y HPMC 0,05% (p/v). B) Capilar neutro, 25,09 kV (~50 μ A), tampón fosfato 50 mM, pH 3 con urea 6 M y HPMC 0,05% (p/v) a 21°C. Identificación de picos: 4: β -I'A₁; 5: β -I'A₁; 6: β -I'A₂; 7: β -I'A₂.

4.2.3. HIDRÓLISIS DE CASEÍNAS POR NEUTRASE®

El preparado enzimático comercial denominado Neutrase® (*Novozyme*) es una proteasa neutra producida por *Bacillus subtilis*, que se aplica frecuentemente a la leche o a la cuajada con objeto de acelerar la maduración de quesos, tales como por ejemplo, queso tipo Cheddar (Guinee *et al.*, 1991), queso Edam (Pahkala *et al.*, 1985), queso Manchego (López-Fandiño *et al.*, 1991; Picon *et al.*, 1995; 1997), queso Gouda (Skeie *et al.*, 1995) o queso Ras (Ezzat, 1990).

Los productos de degradación de las caseínas α_s , resultantes de su tratamiento con Neutrase® a diferentes tiempos, se detallan en los electroferogramas de las Fig. 4.37 y Fig. 4.38 obtenidas con el capilar de sílice fundida y neutro, respectivamente.

Del análisis de los resultados con ambos capilares se detectaban productos de hidrólisis similares, si bien con el capilar neutro se observaba duplicidad en alguno de los picos, posiblemente fruto de la presencia de variantes genéticas BC para las caseínas α_{s1} y α_{s0} , tal y como se ha comentado con anterioridad. El porcentaje de hidrólisis a los 15 min de incubación era de 42,4 y 53,2% para α_{s1} y α_{s0} , respectivamente, y a los 45 min de 82,1 y 84,6%. Los tiempos de migración de alguno de los productos de la hidrólisis eran comparables a los que se obtenían cuando se estudiaba la hidrólisis con renina, lo cual hace suponer que podría tratarse de los mismos productos, concretamente del fragmento I- α_{s1} y I- α_{s0} . No obstante, la menor especificidad de este preparado enzimático daría lugar a la liberación de otra serie de productos de difícil identificación que eran detectados a tiempo de migración entre las caseínas α_s y I- α_{s1} .

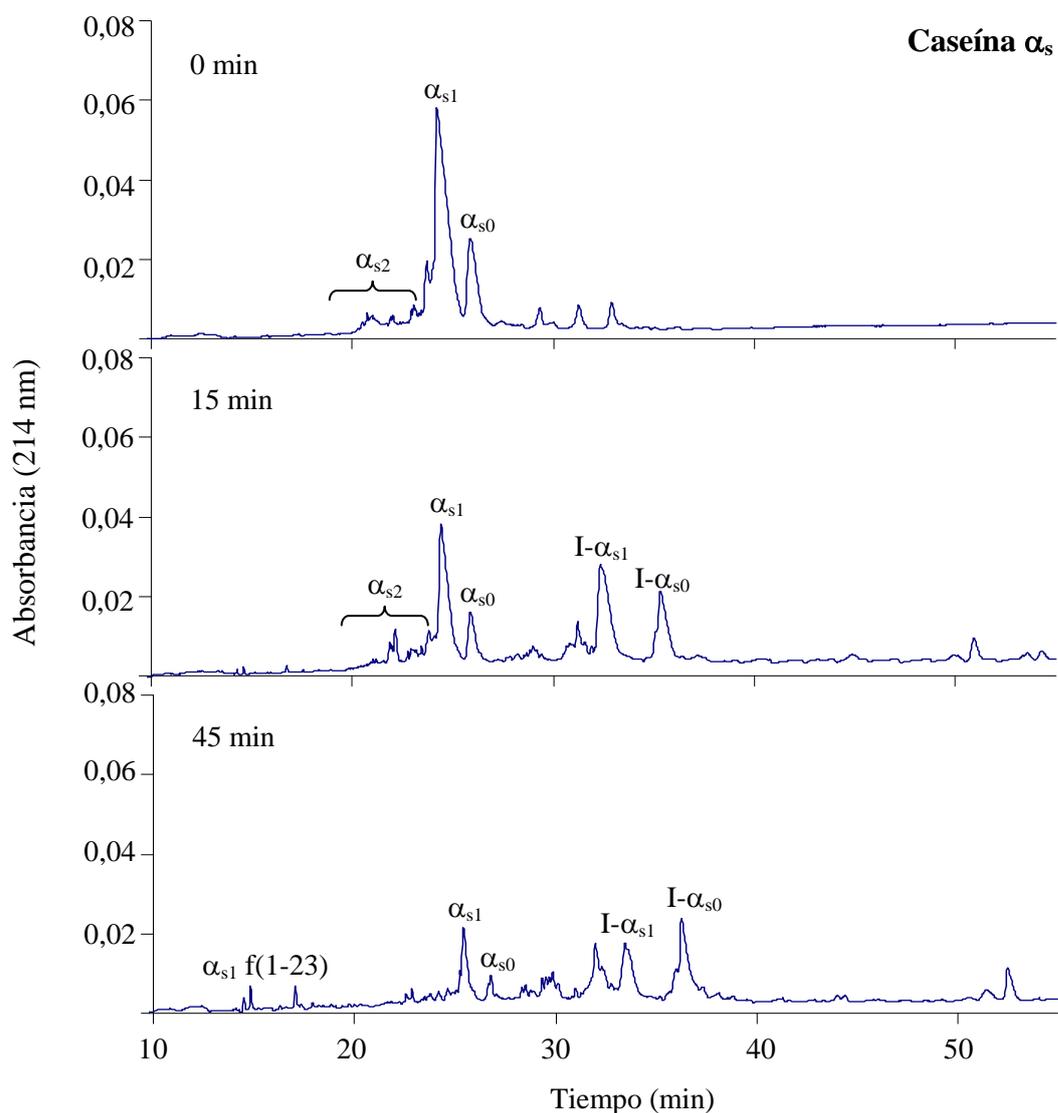


Fig. 4.37. Electroferogramas de caseína α_s tratada con Neutrase[®] a distintos tiempos de incubación. Condiciones de separación: capilar de sílice fundida, 18,5 kV ($\sim 35 \mu\text{A}$), tampón fosfato 50 mM, pH 3 con urea 6 M y HPMC 0,05% (p/v).

Por otra parte, a un tiempo de migración de 15 min en el capilar de sílice fundida y aproximadamente de 20 min en el capilar neutro, aparecían una serie de fragmentos, alguno de los cuales podría corresponderse al péptido $\alpha_{s1} f(1-23/24)$. No obstante, para la identificación de estos fragmentos, sería preciso realizar estudios complementarios mediante otras técnicas analíticas tras su recogida selectiva, como por ejemplo análisis de su secuencia de

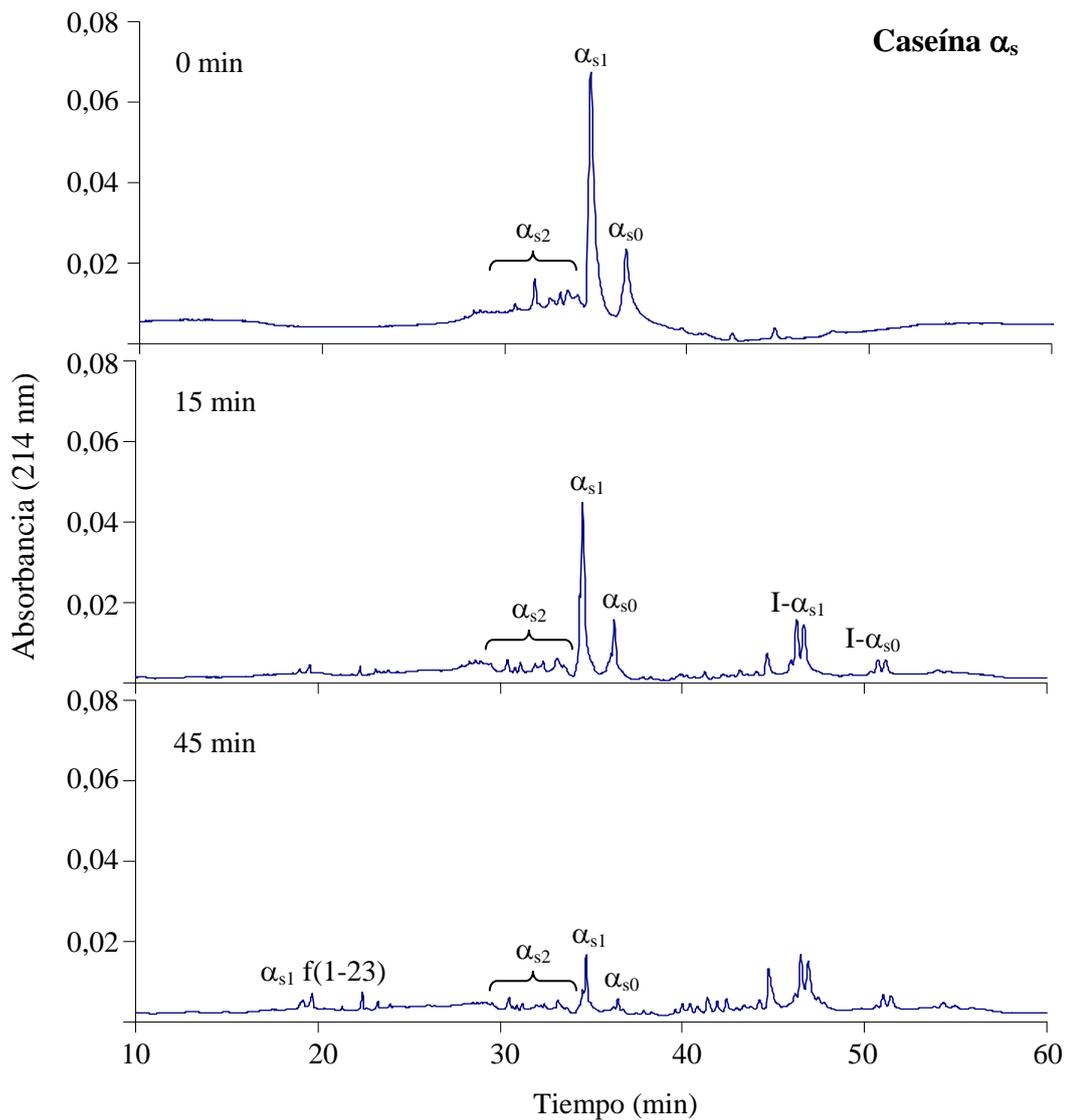


Fig. 4.38. Electroferogramas de caseína α_s tratada con Neutrase[®] a distintos tiempos de incubación. Condiciones de separación: capilar neutro, 25,09 kV ($\sim 50 \mu\text{A}$), tampón fosfato 50 mM, pH 3 con urea 6 M y HPMC 0,05% (p/v) a 21°C.

aminoácidos, estudio de su espectro de masas, o cálculo de su peso molecular con patrones de masas moleculares en electroforesis en gel, entre otras.

Estos resultados contrastan con los estudios de Fernández-García *et al.* (1994) que constataron que la adición de esta proteasa neutra en la manufactura de queso tipo Manchego no potenciaba la hidrólisis de α_s -caseínas ovinas o bovinas en el queso, lo cual concordaba con los datos publicados previamente

sobre queso Manchego (Núñez *et al.*, 1991) y queso Cheddar (Law y Wigmore, 1983). Por el contrario, la caseína α_{s1} bovina sí era hidrolizada por este preparado enzimático en modelos proteicos (López-Fandiño *et al.*, 1991) y así mismo Picón *et al.* (1995) observaron una hidrólisis extensiva durante las primeras 24 horas de la caseína α_{s1} en la fabricación de queso Manchego con adición de Neutrase[®] encapsulada en liposomas.

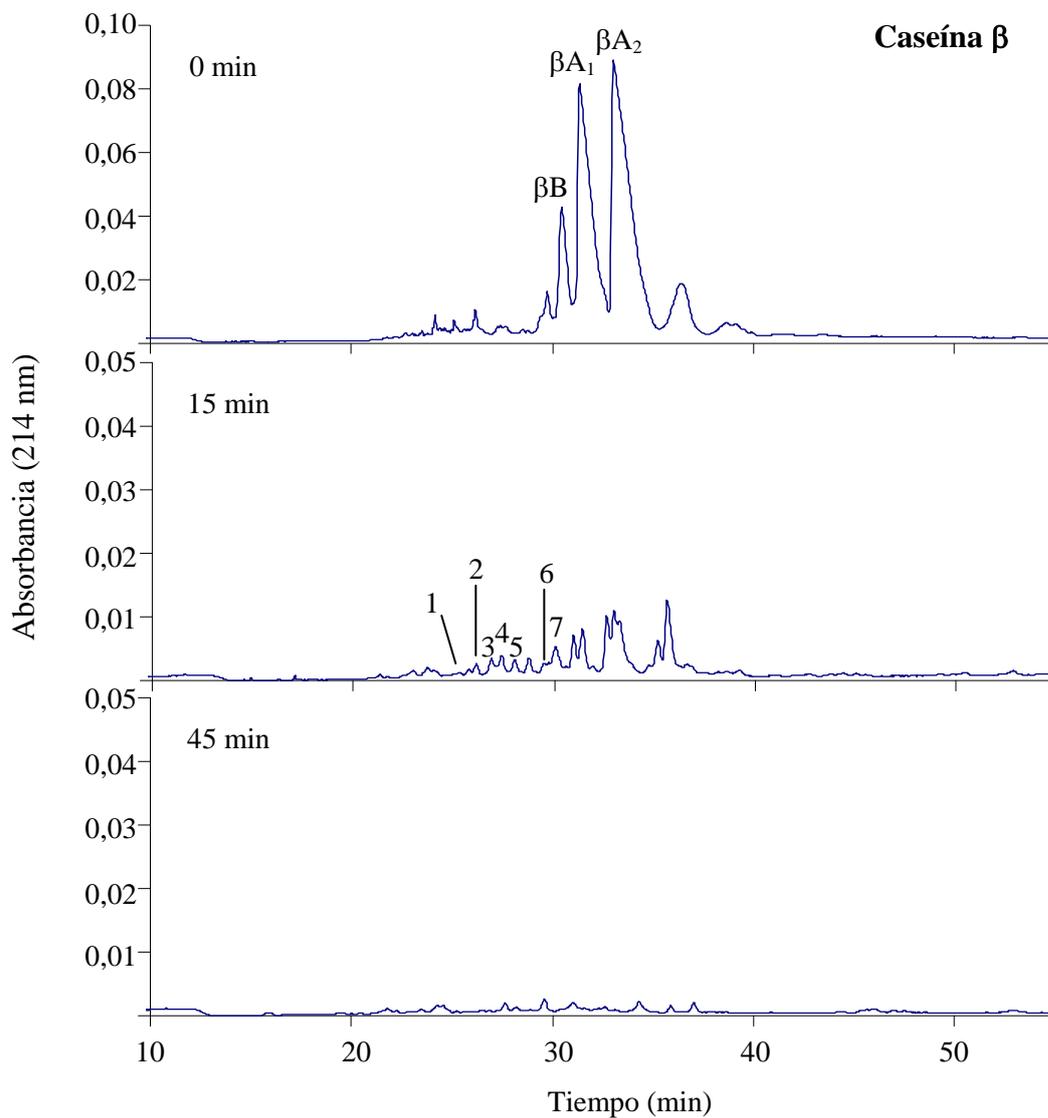


Fig. 4.39. Electroferogramas de caseína β tratada con Neutrase[®] a distintos tiempos de incubación. Condiciones de separación: capilar de sílice fundida, 18,5 kV ($\sim 35 \mu A$), tampón fosfato 50 mM, pH 3 con urea 6 M y HPMC 0,05% (p/v). Identificación de picos: 1: γ_2A ; 2: γ_1B ; 3: γ_1A_1 ; 4: γ_3B ; 5: γ_1A_2 ; 6: γ_3A ; 7: no identificado.

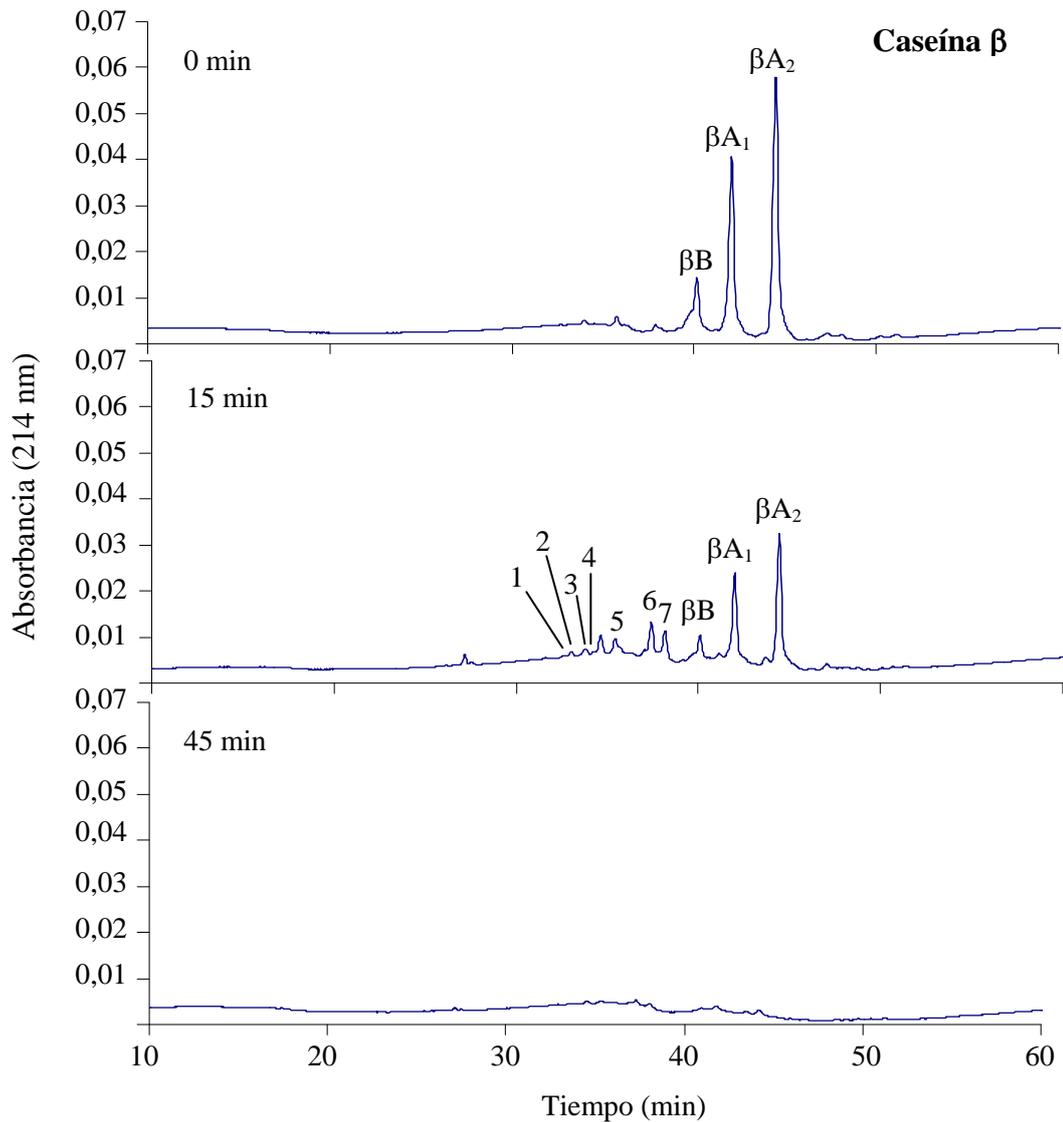


Fig. 4.40. Electroferogramas de caseína β tratada con Neutrase[®] a distintos tiempos de incubación. Condiciones de separación: capilar neutro, 25,09 kV ($\sim 50 \mu A$), tampón fosfato 50 mM, pH 3 con urea 6 M y HPMC 0,05% (p/v) a 21°C. Identificación de picos: 1: $\gamma_2 A$; 2: $\gamma_1 B$; 3: $\gamma_1 A_1$; 4: $\gamma_3 B$; 5: $\gamma_1 A_2$; 6: $\gamma_3 A$; 7: no identificado.

Respecto a la hidrólisis de β -caseína por Neutrase[®] se veía en los electroferogramas de las Fig. 4.39 y Fig. 4.40 que esta caseína sufría una rápida hidrólisis, pues en 15 min de tratamiento la variante B era degradada un 74,1% y cerca del 60% las variantes A_1 y A_2 , siendo total la hidrólisis a los 45 min de incubación.

Los productos de degradación de esta caseína fueron de difícil identificación (picos numerados de 1 a 7). Aunque cabría esperar una actividad tipo renina, por los péptidos encontrados a partir de la α_s -caseína (Fig. 4.37 y Fig. 4.38), no se apreciaba el mismo comportamiento de la proteasa neutra al hidrolizar la β -caseína. Se observaba que los péptidos resultado de la hidrólisis inicial, eran posteriormente degradados tras la desaparición de la caseína β .

López-Fandiño *et al.* (1991) indican que mediante electroforesis en presencia de SDS desnaturalizante (SDS-PAGE) el preparado enzimático Neutrase[®] degradaba la β -caseína bovina generando cuatro bandas de pesos moleculares 23.000, 21.000 (probablemente γ_1 -caseína según Eigel *et al.*, 1984), 20.700 y 20.000 Da, así como productos de degradación de pesos moleculares inferiores a 14.000 Da que incluirían las caseínas γ_2 y γ_3 indicadas por Eigel *et al.* (1984).

Considerando este hecho y teniendo en cuenta los tiempos de migración de las caseínas γ en el estudio de hidrólisis con plasmina, es posible que los picos numerados como 1, 2, 3, 4 y 5 en los electroferogramas del capilar de sílice fundida (Fig. 4.39) se correspondan con las caseínas γ_2A , γ_1B , γ_1A_1 , γ_3B y γ_1A_2 , y los picos 3, 5 y 6 que aparecen en el capilar neutro (Fig. 4.40) con las caseínas γ_1A_1 , γ_1A_2 y γ_3A , respectivamente. El pico 7 no identificado es común en ambos capilares y es un producto mayoritario de la acción hidrolítica de este preparado enzimático.

El ataque de Neutrase[®] sobre la κ -caseína era muy rápido, de modo similar a lo que sucedía con la quimosina, produciéndose la hidrólisis total al cabo de 15 min de incubación y rindiendo productos solubles a pH 4,6. Por ello, se muestran únicamente los resultados obtenidos mediante el capilar neutro (Fig. 4.41).

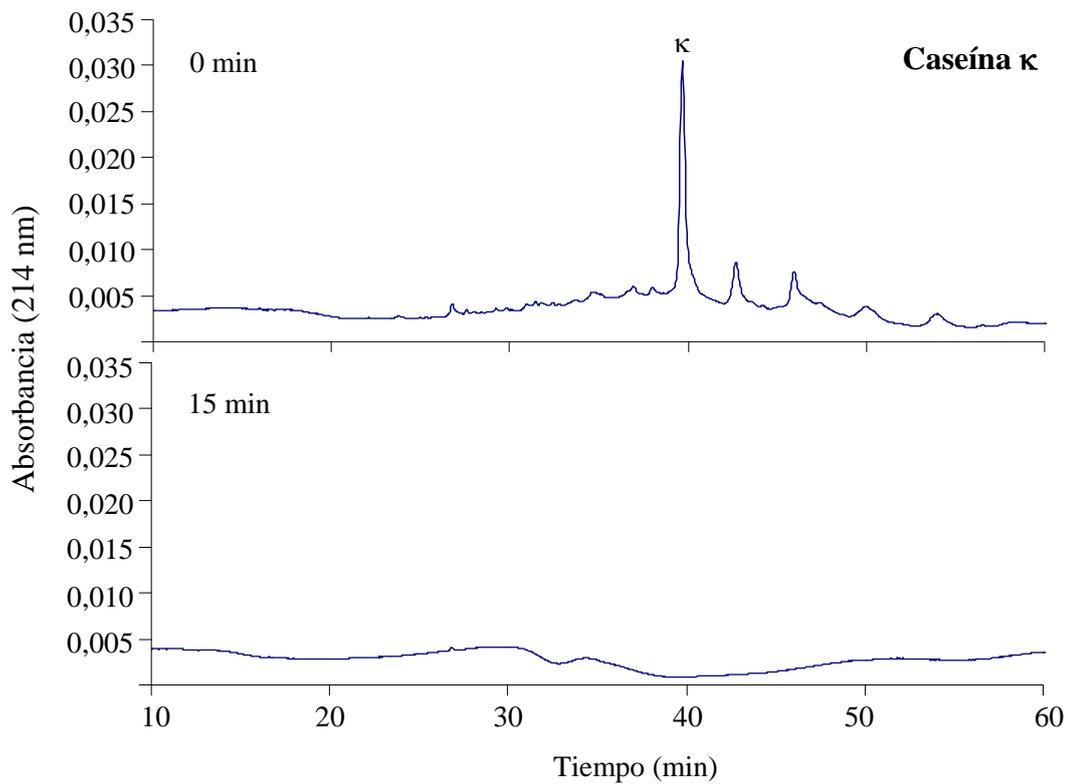


Fig. 4.41. Electroferogramas de caseína κ tratada con Neutrase® a distintos tiempos de incubación. Condiciones de separación: capilar neutro, 25,09 kV ($\sim 50 \mu\text{A}$), tampón fosfato 50 mM, pH 3 con urea 6 M y HPMC 0,05% (p/v) a 21°C.

Es conocido que Neutrase® actúa sobre la κ -caseína dando lugar a un producto fruto de hidrólisis primaria de 15 kDa, que se corresponde con la para- κ -caseína (Eigel *et al.*, 1984; López-Fandiño *et al.*, 1991). Esto explica por qué la adición de Neutrase® a la leche acelera la acción normal de coagulación de la renina (Law y King, 1985; Fernández-García *et al.*, 1990).

En la siguiente figura (Fig. 4.42) se muestran los resultados de la hidrólisis por Neutrase® sobre una mezcla de caseínas α_s , β y κ . Los resultados mostraban una mayor hidrólisis de la caseína β en relación con las caseínas α_s , si bien esta era menor que la que experimentaba cada caseína por separado.

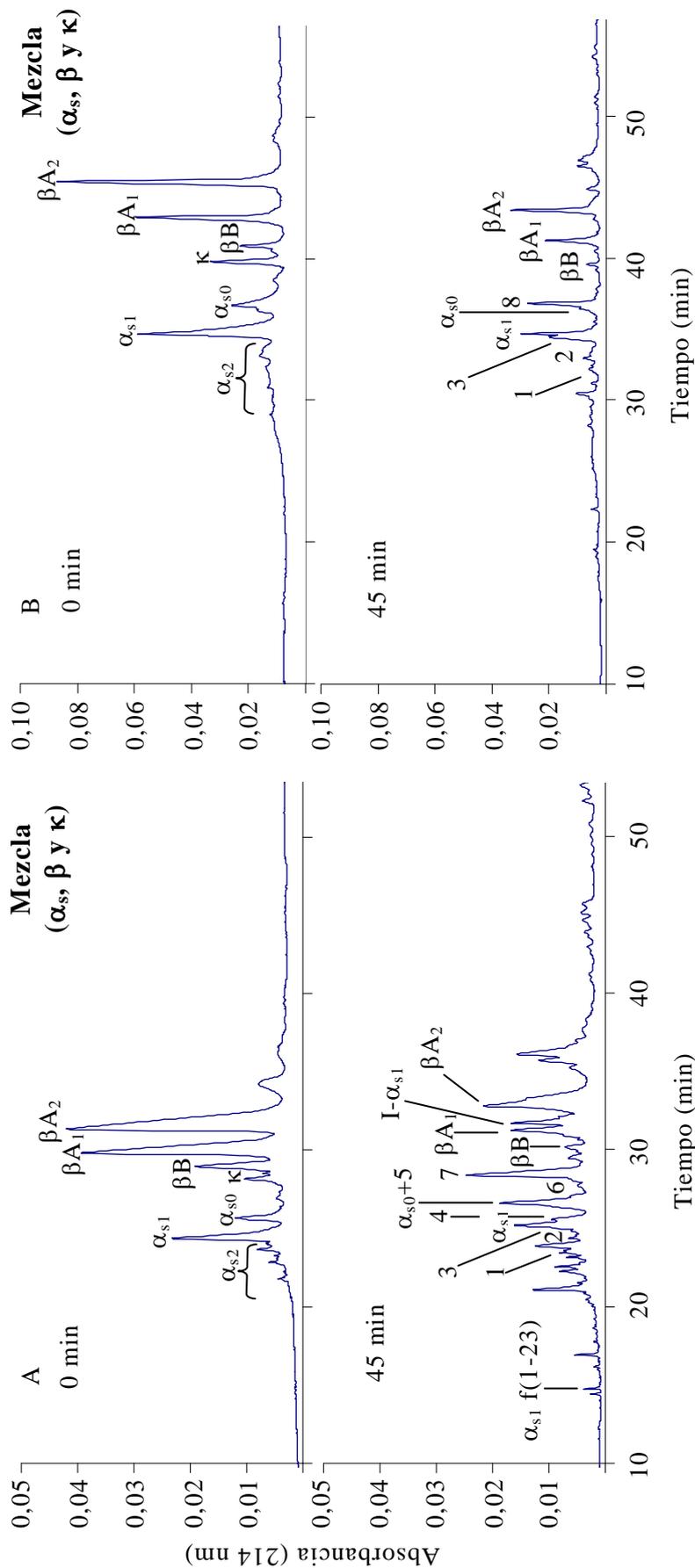


Fig. 4.42. Electroferogramas de mezcla de caseínas α_s , β y κ (1:1:1) tratada con Neutrase[®] a diferentes tiempos de incubación. Condiciones de separación: A) Capilar de sílice fundida, 18,5 kV (~35 μ A), tampón fosfato 50 mM, pH 3 con urea 6 M y HPMC 0,05%. B) Capilar neutro, 25,09 kV (~50 μ A), tampón fosfato 50 mM, pH 3 con urea 6 M y HPMC 0,05% a 21°C. Identificación de picos: 1: γ_2A ; 2: γ_1B ; 3: γ_1A_1 ; 4: γ_3B ; 5: γ_1A_2 ; 6: γ_3A ; 7: γ_1A_2 ; 8: Producto de la hidrólisis de β . 8: Producto no identificado.

En bibliografía la degradación por Neutrase[®] de caseína β se considera siempre de mayor grado a la que sufren las caseínas α_s ; en concreto, estudios sobre caseína procedente de leche (López-Fandiño *et al.*, 1991) y en maduración de quesos (Fresta *et al.*, 1995; Picon *et al.*, 1995) dieron relaciones de degradación β/α_s de 2,5 en 4 horas y 1,3 en 15 minutos, respectivamente. Si bien, dichos resultados no son comparables puesto que la relación enzima-sustrato y el tiempo de hidrólisis eran diferentes, pero confirmaría que efectivamente la hidrólisis de β -caseína se produce antes que la de las caseínas α_s .

En la muestra con el capilar de sílice fundida, a un tiempo de migración de aproximadamente 27,5 min, se observa el pico denominado 7 correspondiente al producto mayoritario liberado de la hidrólisis de la caseína β . También fue posible detectar los picos 1, 2, 3, 4 y 6 que podrían corresponderse según lo analizado previamente a diversas caseínas γ (γ_2A , γ_1B , γ_1A_1 , γ_3B y γ_3A , respectivamente). La γ_1A_2 que se correspondería con el pico 5 no se detecta claramente puesto que migra junto con la α_{s0} y sólo es posible reconocerla a los 15 min de hidrólisis. A su vez, a partir de los 30 min de incubación, se detecta la caseína-I- α_{s1} y su fragmento complementario α_{s1} f(1-23) que tiene un tiempo de migración de aproximadamente 14,5 min.

Los electroferogramas de hidrólisis de la mezcla de caseínas con Neutrase[®] en el capilar neutro permiten detectar fragmentos de la hidrólisis de caseínas α_s a tiempos de migración superiores a la caseína β A₂. También es posible encontrar péptidos de elevada velocidad de migración sobre los 15 min, que se podrían corresponder al fragmento α_{s1} f(1-23). Por su parte, los picos 1, 2 y 3 serían las γ caseínas (γ_2A , γ_1B y γ_1A_1 , respectivamente). Adicionalmente se apreciaba la aparición de un fragmento desconocido junto a la caseína α_{s0} como un hombro a su derecha de intensidad considerable (Pico 8).

4.3. Estudio de la maduración de quesos mediante EC

La producción quesera en España se ha visto incrementada en los últimos tiempos, pasando de 220.000 Tm anuales en 1992 (Cenzano, 1992) a 281.000 Tm en 1999 (Ministerio de Agricultura, mayo 2000). De las 281.000 Tm, 103.000 se correspondieron a quesos mezcla de leches de diversas especies, 28.000 fueron de quesos de oveja, 4.500 Tm de quesos de cabra y 62.500 Tm elaboradas con leche de vaca. Las Tm restantes lo constituyen quesos blandos untables o de pasta fresca (83.000 Tm).

Las importaciones de queso han crecido también considerablemente pasando de 50.000 Tm en 1992 a 102.000 Tm en el año 2000, así como las exportaciones que de 18.000 Tm en 1992 han pasado a 31.000 Tm en el año 2000. Estos datos vienen a confirmar la importancia de la industria quesera como parte del sector lácteo, que está ampliamente consolidado dentro del ámbito alimentario. Es por ello, que en la última década, las investigaciones a escala mundial han ido encaminadas a estudios sobre modificaciones y mejoras en la fabricación de las diferentes variedades de quesos, así como a la comprensión de una forma más detallada de los procesos de maduración con el fin de poder introducir mejoras en el ámbito industrial sin pérdida de calidad.

Como ya se ha comentado en apartados previos (apdo. 2.1.4.2) una de las técnicas que más éxito está alcanzando en estos estudios es la EC, al menos en lo que a hidrólisis primaria de las caseínas se refiere (Ardö, 2002). Sin embargo, tal y como afirman Molina *et al.* (2002), sólo unos pocos trabajos se han referido al estudio de la proteólisis en quesos mediante EC por análisis de la fracción caseínica (Recio *et al.*, 1997a; Broadbent *et al.*, 1998; Gouldsworthy *et al.*, 1999; Izco *et al.*, 1999b; Otte *et al.*, 1999; Molina *et al.*, 2000; Strickland *et al.*, 2001; Trujillo *et al.*, 2002) comparado con los realizados mediante otros tipos de electroforesis.

4.3.1. ANÁLISIS MEDIANTE ELECTROFORESIS CAPILAR DEL ESTADO DE MADURACIÓN DE QUESOS DE OVEJA

Los quesos de oveja proporcionados por Quesos Frías S.A. y elaborados con leche cruda de oveja se analizaron mediante los dos capilares (de sílice fundida y neutro) empleados en los ensayos anteriores, utilizando las condiciones de análisis óptimas obtenidas previamente en el apartado 4.1. Para la identificación de algunos de los productos de hidrólisis liberados durante el proceso de maduración, se analizaron muestras de queso tratadas con plasmina y renina, tal y como se indica en material y métodos (apdo. 3.4.3). De las diferentes condiciones de hidrólisis indicadas en el citado apartado, únicamente se seleccionaron los electroferogramas que aportaban mayor información.

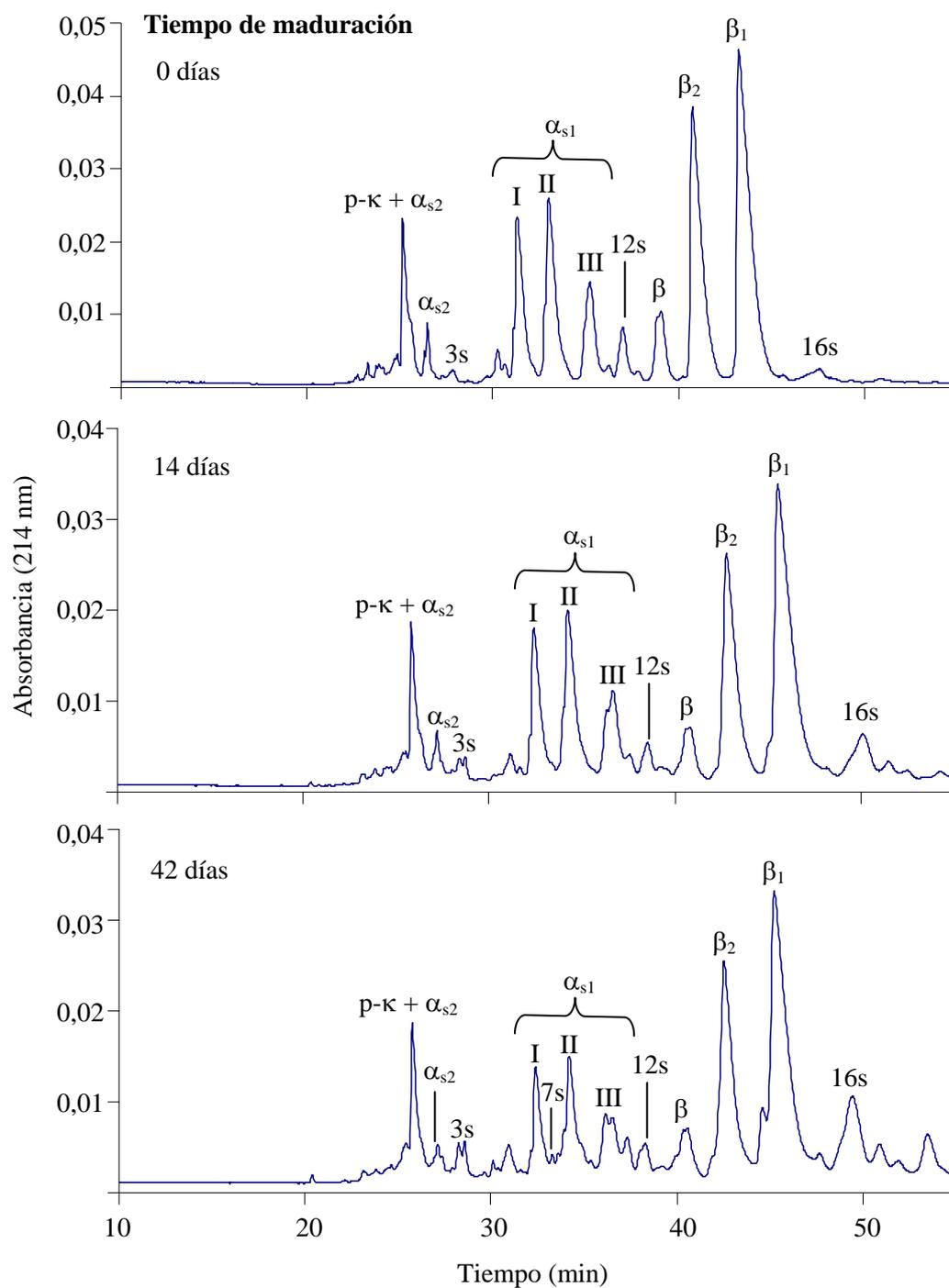
Los electroferogramas obtenidos con el capilar de sílice fundida y con el neutro, correspondientes a la separación de la fracción proteica insoluble a pH 4,6 (apdo. 3.2.3) de muestras de queso de oveja a diferentes tiempos de maduración, se muestran en las Fig. 4.43 y Fig. 4.44, respectivamente. La identificación de las caseínas intactas (α_{s1} , α_{s2} y β) se realizó por comparación de los tiempos de migración relativos con los obtenidos al analizar leche de oveja (apdo. 4.1.3.3). En total, junto con las caseínas intactas se consideraron 16 picos en el capilar de sílice fundida (denominados con el subíndice *s*) (Fig. 4.43) y 21 en el capilar neutro (denominados con el subíndice *n*) (Fig. 4.44).

Los resultados obtenidos con ambos capilares, mostraban una buena resolución entre las proteínas intactas y los productos de degradación presentes en la cuajada (tiempo de maduración 0 días). El perfil electroforético de esta muestra era muy similar al obtenido al analizar la fracción insoluble a pH 4,6 de la leche de oveja correspondiente a dicho queso. Sin embargo, el pico de la

κ -caseína desaparecía con la presencia de un nuevo pico correspondiente a la para- κ -caseína (pico 1s ó 1n), el cual se solapaba con alguna de las caseínas α_{s2} en el electroferograma obtenido con el capilar de sílice (Fig. 4.43), mientras que con el capilar neutro aparecía totalmente resuelto (Fig. 4.44).

Los electroferogramas de los quesos de tiempos de maduración superior a 20 días mostraban importantes cambios como consecuencia de la proteólisis primaria, la cual se debe fundamentalmente al resultado de la acción de proteasas endógenas (plasmina, catepsina D, proteasas de células somáticas...) y de la enzima coagulante residual. Sin embargo, las proteasas procedentes de las bacterias ácido lácticas iniciadoras o *starter* y de microorganismos *no-starter* también se encuentran activas en la degradación de las proteínas del queso (Fox *et al.*, 1993). A la hora de la identificación de estos picos nos encontramos con el inconveniente que suponía el desconocimiento del mecanismo de coagulación empleado en la elaboración de los quesos comerciales analizados y del tipo de cultivos *starter* empleados.

Se observa la degradación a lo largo del tiempo de maduración de los picos correspondientes a la caseína α_{s1} (Fig. 4.43 y Fig. 4.44). La hidrólisis de esta caseína es uno de los eventos más importantes que tienen lugar durante el proceso de maduración de los quesos, ya que de él depende el desarrollo de textura y aroma en este producto (Creamer y Olson, 1982). Como ya se ha comentado la acción de la quimosina sobre la caseína α_{s1} bovina rinde el péptido I- α_{s1} . En quesos de oveja se ha descrito también una actividad similar (Molina *et al.*, 2000), por lo que el fragmento I- α_{s1} es uno de los productos más importantes que aparece en los quesos. Con objeto de poder identificar este pico se trataron muestras de queso de 0 días de maduración con quimosina (Fig. 4.45 y Fig. 4.46) (ver apdo. 3.3.3).



(Continúa)

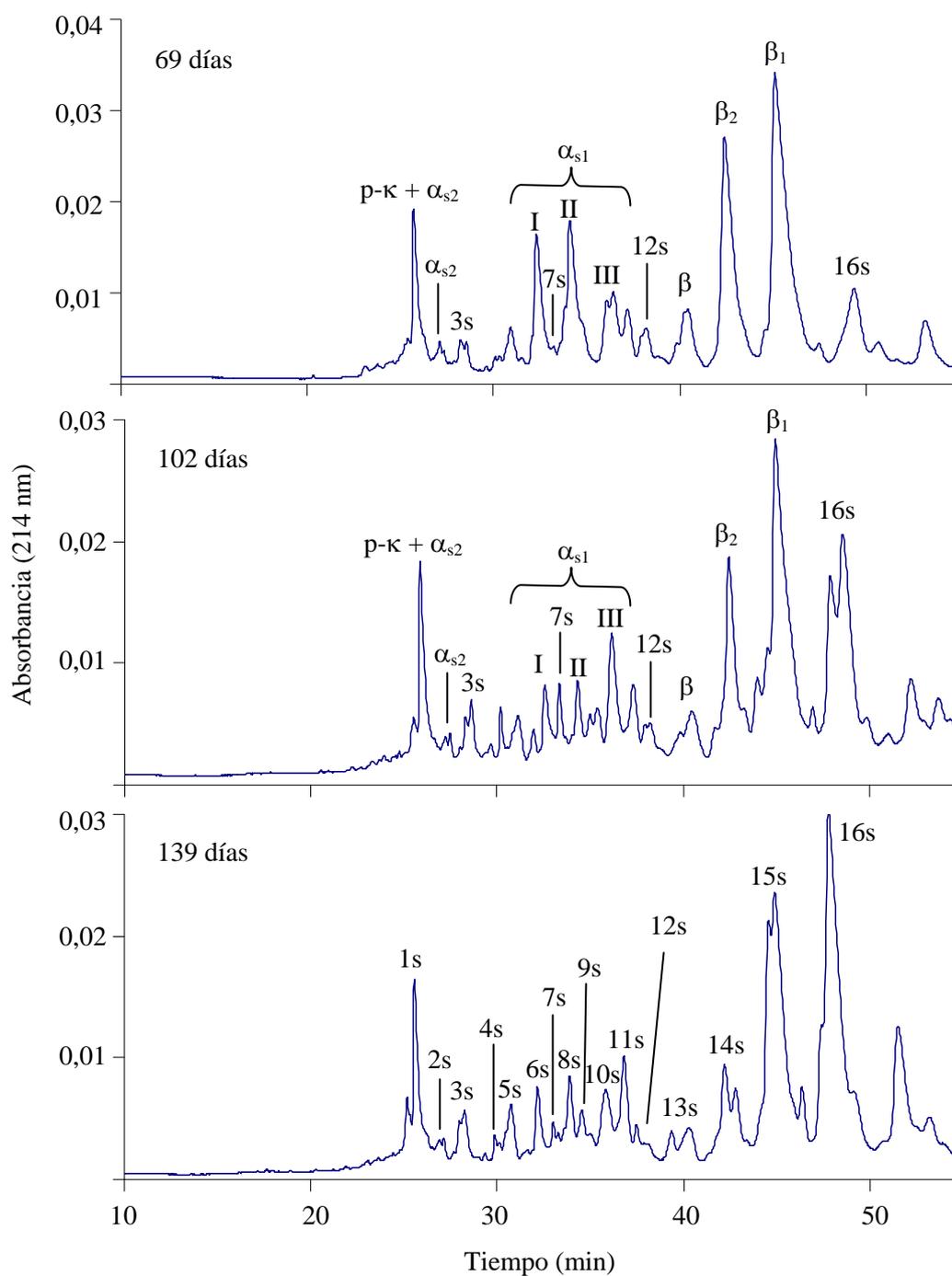
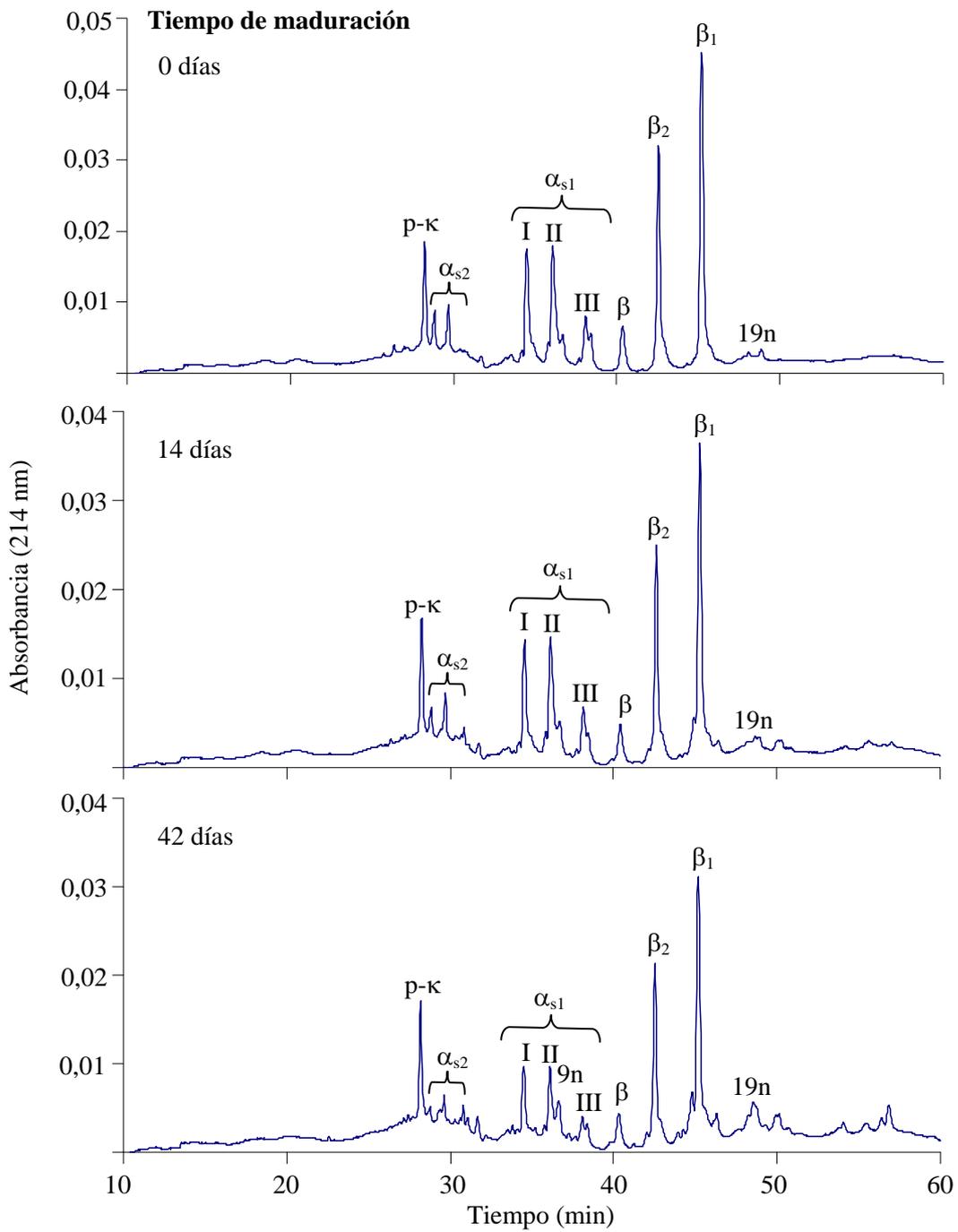


Fig. 4.43. Electroferogramas obtenidos mediante el capilar de sílice fundida de la fracción insoluble a pH 4,6 de quesos de oveja a diferentes tiempos de maduración. Identificación de picos: 1s: p-κ+α_{s2}; 2s: α_{s2}; 3s: R; 4s: R; 5s: Pico 5; 6s: α_{s1}I; 7s: γ; 8s: α_{s1}II; 9s: R; 10s: α_{s1}III+γ; 11s: R; 12s: γ; 13s: β+R; 14s: β₂; 15s: β₁+P; 16s: I-α_{s1}.



(Continúa)

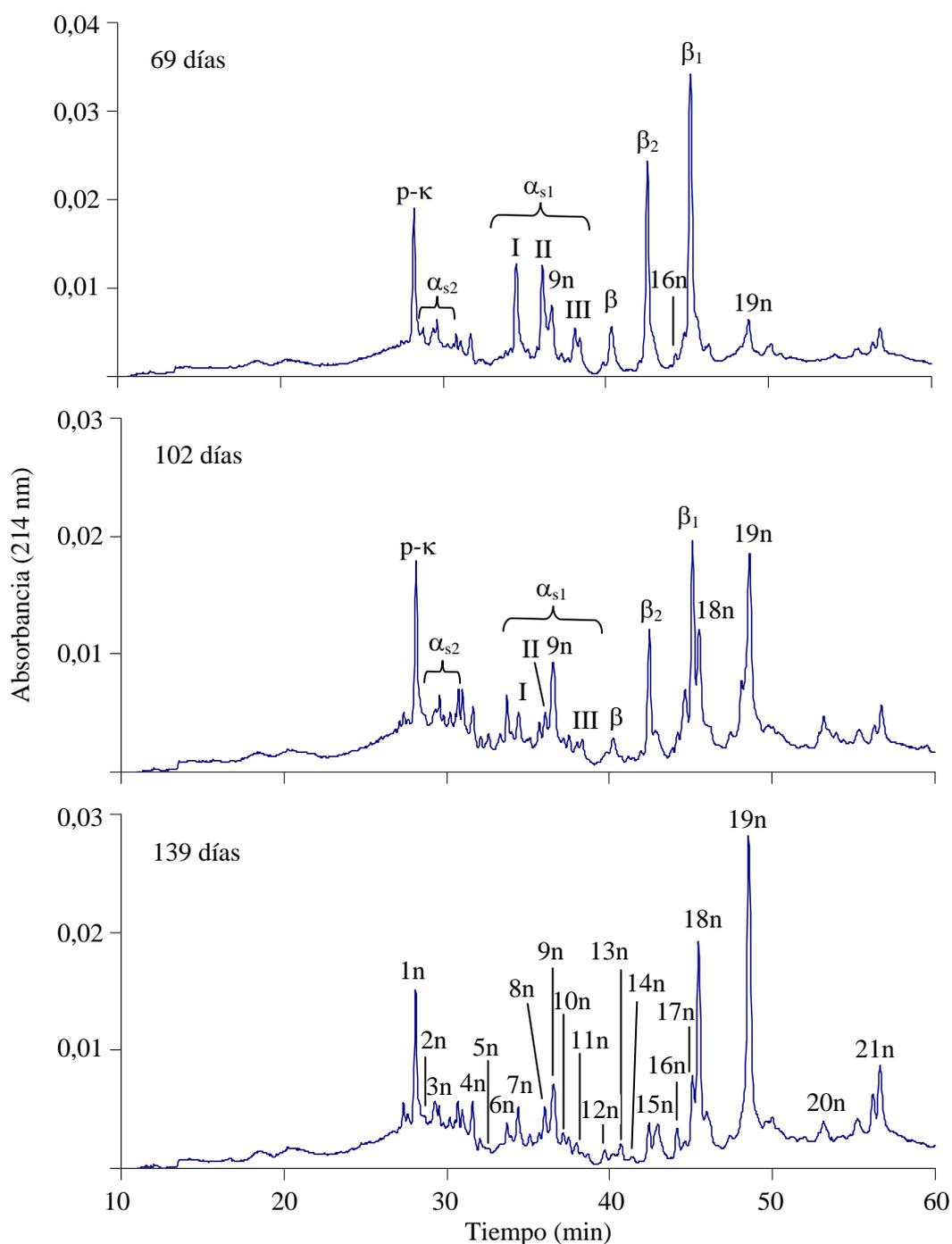


Fig. 4.44. Electroferogramas obtenidos mediante el capilar neutro de la fracción insoluble a pH 4,6 de quesos de oveja a diferentes tiempos de maduración. Identificación de picos: 1n: p-κ; 2n: α_{s2} ; 3n: α_{s2} +péptido; 4n: γ ; 5n: γ ; 6n: R; 7n: α_{s1} I; 8n: α_{s1} II; 9n: γ ; 10n: γ ; 11n: α_{s1} III+ γ ; 12n: R; 13n: β ; 14n: γ ; 15n: β_2 ; 16n: P; 17n: β_1 ; 18n: Pico 18; 19n: I- α_{s1} ; 20n: P; 21n: P.

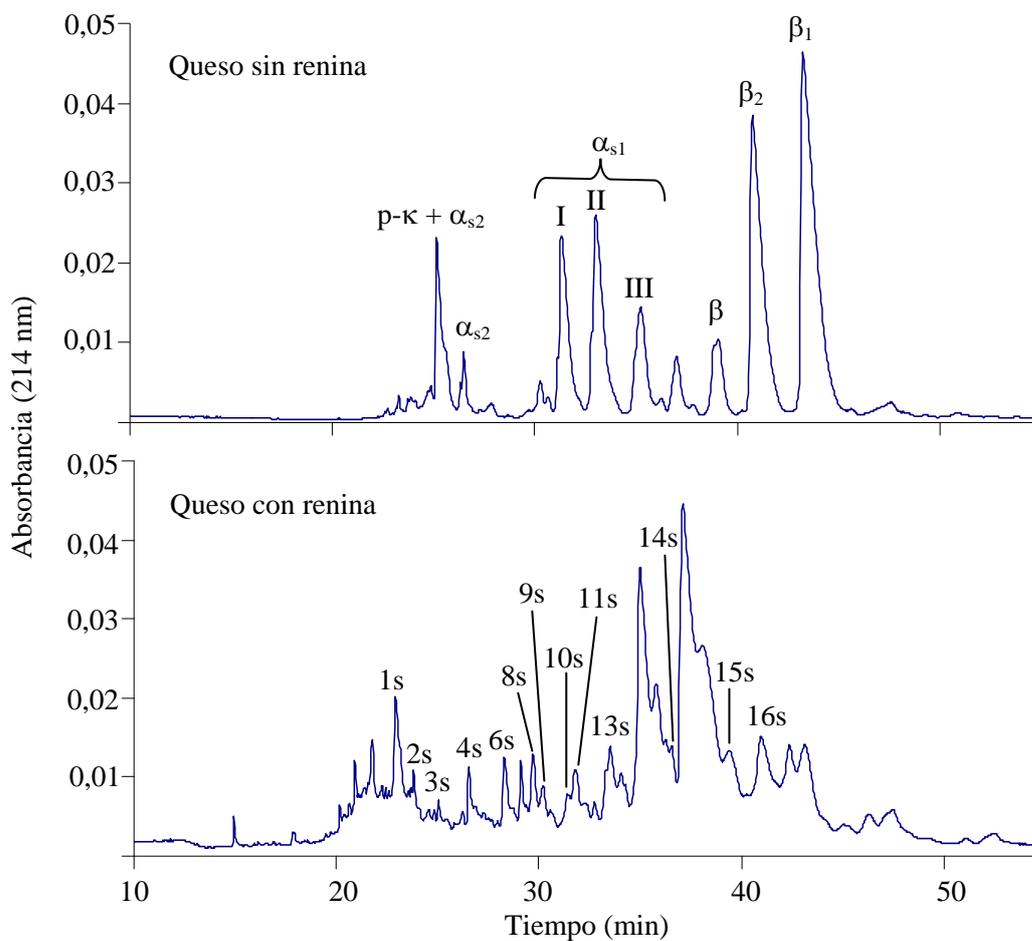


Fig. 4.45. Electroferogramas de queso de oveja de 0 días de maduración tratado con renina 0,008% durante 120 min a 37°C. Capilar de sílice fundida. Identificación de picos: 1s: p-κ+α_{s2}; 2s: α_{s2}; 3s: R; 4s: R; 6s: α_{s1}I; 8s: α_{s1}II; 9s: R; 10s: α_{s1}III+γ; 11s: R; 13s: β+R; 14s: β₂; 15s: β₁; 16s: I-α_{s1}.

De la comparación de los perfiles electroforéticos de esta figura podía concluirse que los picos 16s (capilar de sílice fundida) y 19n (capilar neutro) se corresponden con la caseína I-α_{s1}. Además, podía comprobarse cómo el área de los picos 3s, 4s, 9s, 11s y el hombro de la izquierda del 13s para el capilar de sílice fundida y el 6n y 12n para el neutro, se incrementaba con la adición de quimosina al queso. Posiblemente estos picos se formaban por la acción del “cuajo” sobre las caseínas de la leche. Este hecho indicaría que la enzima coagulante utilizada tendría posiblemente una actividad similar a la quimosina. Además, la elevada actividad de la quimosina hacia las caseínas β₁ y β₂ en

muestras de queso (Fig. 4.45 y Fig. 4.46) contrasta con el bajo efecto que tiene esta enzima sobre la β caseína de este tipo de queso (Fig. 4.44). Así, en queso Manchego, elaborado con leche de oveja, aproximadamente el 90% de la β -caseína permanecía intacta al final del periodo de maduración (Ordoñez *et al.*, 1978).

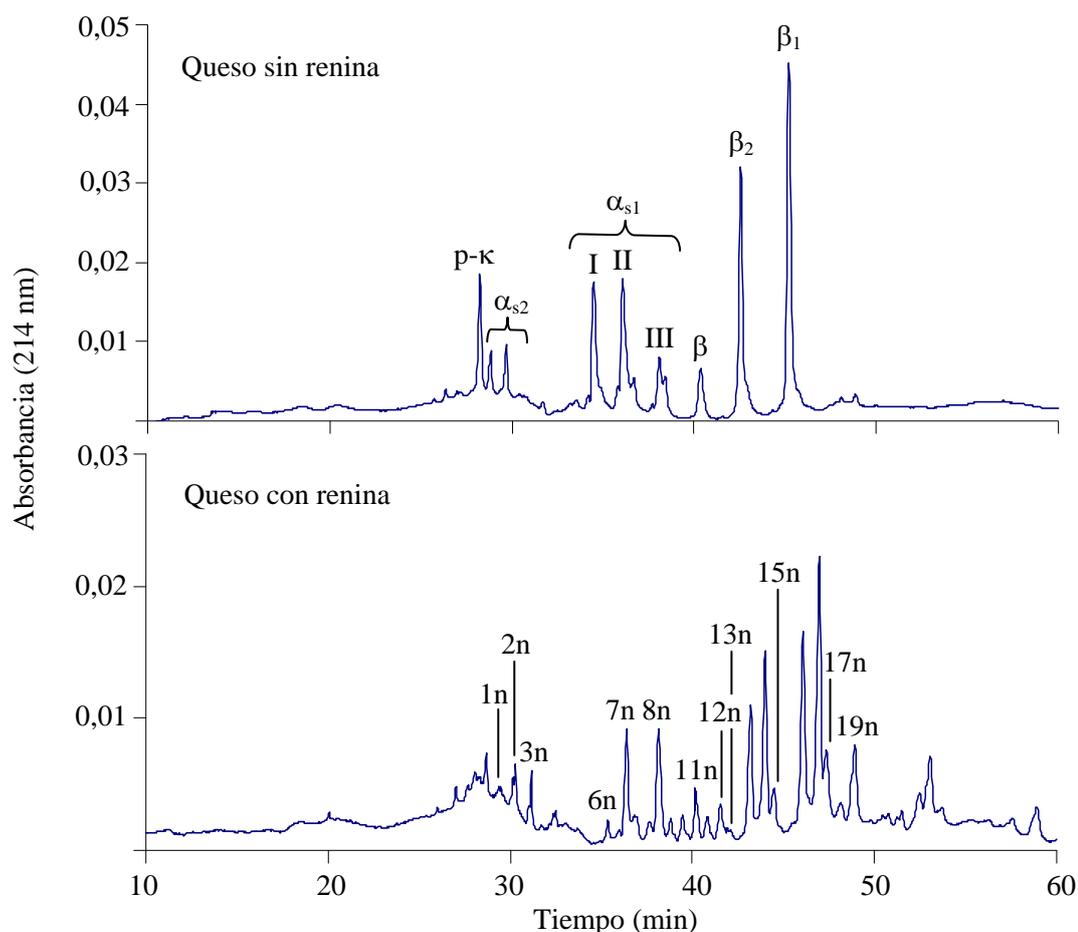


Fig. 4.46. Electroferogramas de queso de oveja de 0 días de maduración tratado con renina 0,004% durante 90 min a 37°C. Capilar neutro. Identificación de picos: 1n: p- κ ; 2n: α_{s2} ; 3n: α_{s2} +péptido; 6n: R; 7n: α_{s1} I; 8n: α_{s1} II; 11n: α_{s1} III; 12n: R; 13n: β ; 15n: β_2 ; 17n: β_1 ; 19n: I- α_{s1} .

También es conocido que la plasmina, principal proteasa endógena de la leche, actúa sobre la β -caseína dando lugar a la formación de γ -caseínas (Fox *et al.*, 1993; Trujillo *et al.*, 1997). Con objeto de identificar estos péptidos se analizaron mediante EC muestras de queso (0 días de maduración) tratadas con

plasmina (Fig. 4.47 y Fig. 4.48) (ver apdo. 3.3.3). Considerando los tiempos de migración relativa mostrados por otros autores (Molina *et al.*, 2000; Trujillo *et al.*, 2000), fue posible la identificación de alguna γ -caseína como los picos 7s, el hombro que aparece junto con la caseína α_{s1} III (integrados conjuntamente en el pico 10s) y el pico 12s en el capilar de sílice fundida, y los picos 4n, 5n y 14n en los electroferogramas obtenidos con el capilar neutro. Además, en los electroferogramas del capilar sin tratar (Fig. 4.47) se observa cómo el hombro que aparece a la izquierda de la caseína β (integrados ambos en el pico 15s) proviene de la acción de la plasmina, así como el pico 16n cuando la muestra era analizada con el capilar neutro (Fig. 4.48).

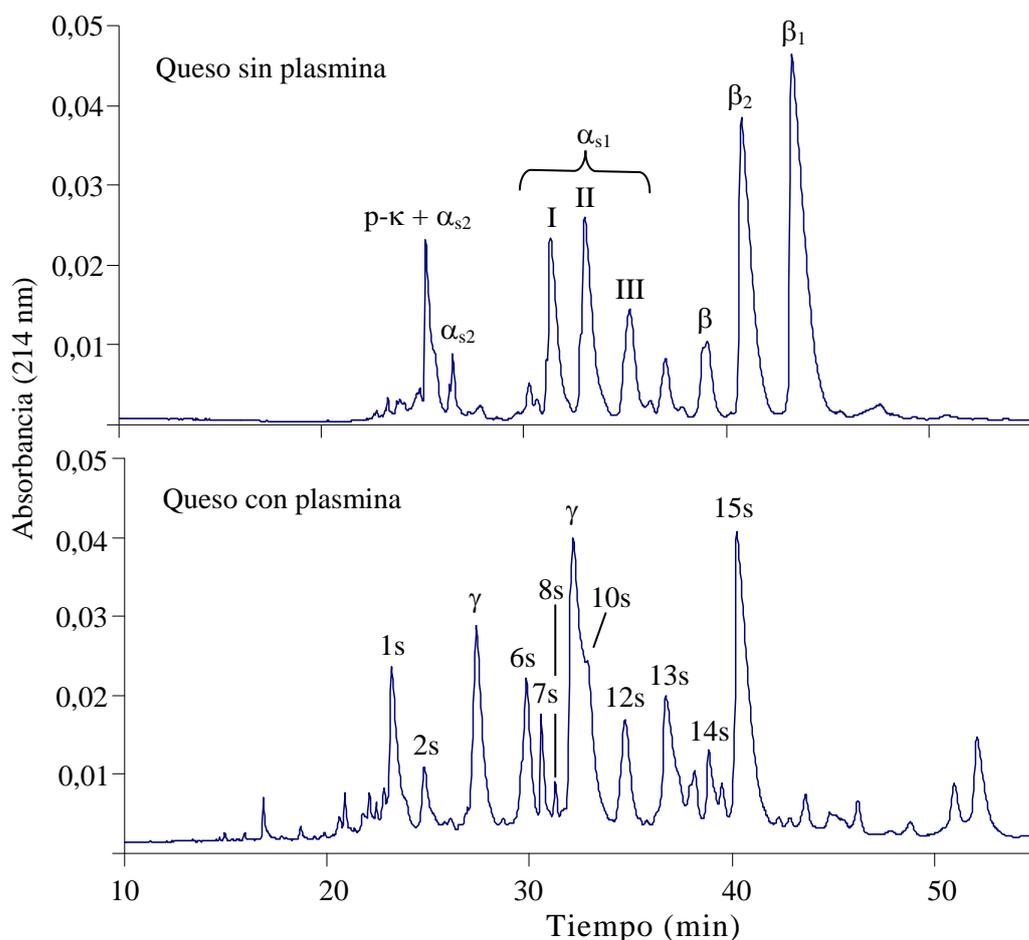


Fig. 4.47. Electroferogramas de queso de oveja de 0 días de maduración tratado con plasmina 0,04% durante 240 min a 37°C. Capilar de sílice fundida. Identificación de picos: 1s: p-κ+α_{s2}; 2s: α_{s2}; 6s: α_{s1}I; 7s: γ; 8s: α_{s1}II; 10s: α_{s1}III+γ; 12s: γ; 13s: β; 14s: β₂; 15s: β₁.

En resumen, con ambos capilares fue posible la identificación de las caseínas intactas (α_s , β) y de los principales productos de hidrólisis que aparecían durante el proceso de maduración de quesos (para- κ -CN, caseína-I- α_{s1} y γ -caseínas). Sin embargo, los picos detectados con cada uno de los capilares no fueron los mismos, recogiendo en la Tabla 4.21 la asignación de picos para ambos capilares.

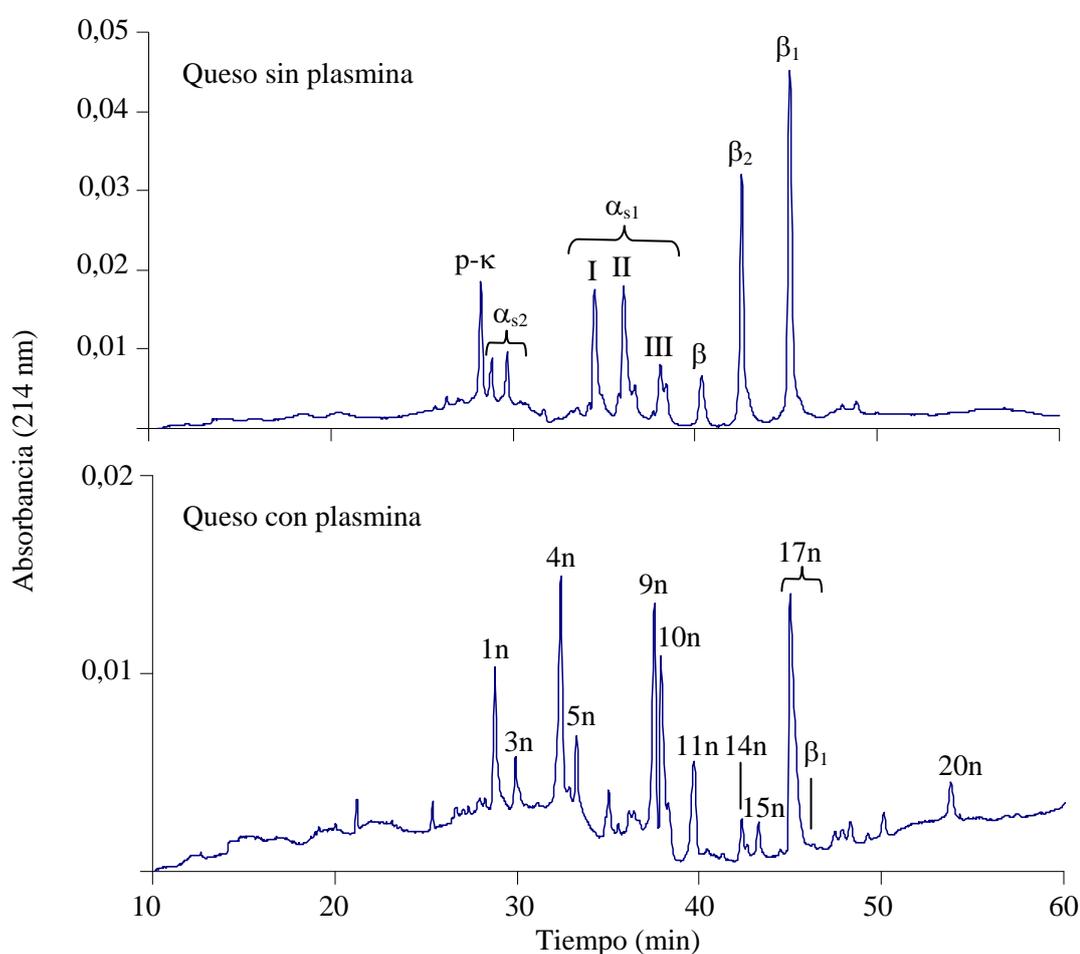


Fig. 4.48. Electroferogramas de queso de oveja de 0 días de maduración tratado con plasmina 0,04% durante 240 min a 37°C. Capilar neutro. Identificación de picos: 1n: p- κ ; 3n: α_{s2} +péptido; 4n: γ ; 5n: γ ; 9n: γ ; 10n: γ ; 11n: α_{s1} III+ γ ; 14n: γ ; 15n: β_2 ; 17n: β_1 ; 20n: P.

Tabla 4.21. Tabla de asignación de picos en los electroferogramas de muestras de quesos de oveja. Capilar de sílice fundida y capilar neutro.

Caseína o péptido			
Pico^a	Capilar de sílice fundida	Pico^a	Capilar neutro
1s	para- κ + α_{s2}	1n	Para- κ
2s	α_{s2}	2n	α_{s2}
3s	R ^b	3n	α_{s2} + péptido
4s	R ^b	4n	γ caseína
5s	Pico 5	5n	γ caseína
6s	α_{s1} I	6n	R ^b
7s	γ caseína	7n	α_{s1} I
8s	α_{s1} II	8n	α_{s1} II
9s	R ^b	9n	γ caseína
10s	α_{s1} III + γ caseína	10n	γ caseína
11s	R ^b	11n	α_{s1} III + γ caseína
12s	γ caseína	12n	R ^b
13s	β + R ^b	13n	β
14s	β_2	14n	γ caseína
15s	β_1 + P ^c	15n	β_2
16s	Caseína-I- α_{s1}	16n	P ^c
		17n	β_1
		18n	Pico 18
		19n	Caseína-I- α_{s1}
		20n	P ^c
		21n	P ^c

^a “s” capilar de sílice fundida y “n” capilar neutro

^b R: fragmento observado tras la adición de renina

^c P: fragmento observado tras la adición de plasmina

Por otra parte, a partir de las áreas de pico se calculó el porcentaje de caseínas α_s y β residual en el queso para los diferentes tiempos de maduración, representados en las Fig. 4.49 para el capilar de sílice fundida y Fig. 4.50 para el capilar neutro. Un primer análisis de estas figuras indicaba una mayor proteólisis de las caseínas α_s en comparación con las caseínas β presentes en el queso de oveja. Este comportamiento ha sido descrito por otros autores en los primeros meses del proceso de maduración de los quesos (Fernández-Salguero, *et al.*, 1989, Guindeo *et al.*, 1990; Núñez *et al.*, 1991; Macedo y Malcata, 1997; Izco *et al.*, 1999b). En concreto, era la caseína α_{s1} II la que sufría una mayor hidrólisis para tiempos cortos de maduración, ya que aproximadamente un 70% de la caseína inicial había sido degradada en el queso de 42 días de elaboración.

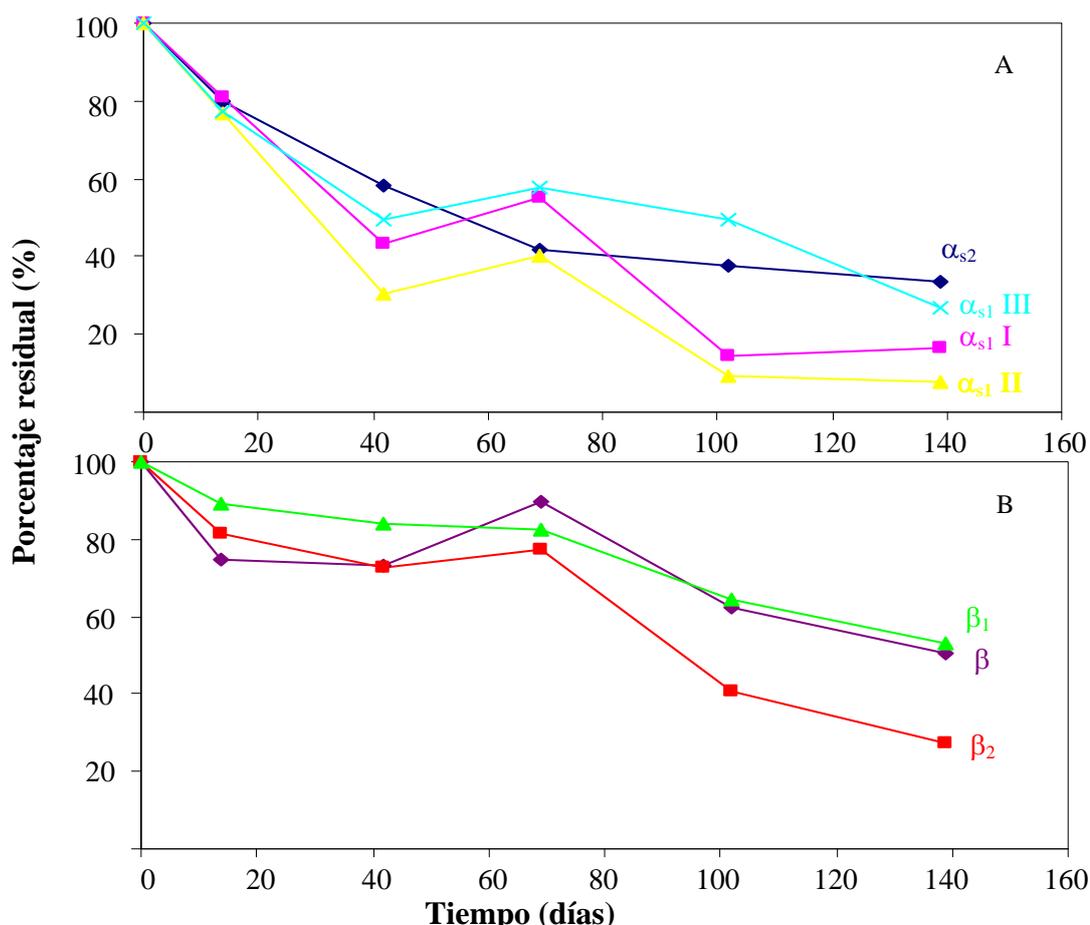


Fig. 4.49. Evolución del porcentaje residual de α_s -caseína (A) y β -caseína (B) en quesos de oveja a lo largo del tiempo de maduración. Resultados obtenidos a partir del capilar de sílice fundida (ver Fig. 4.43).

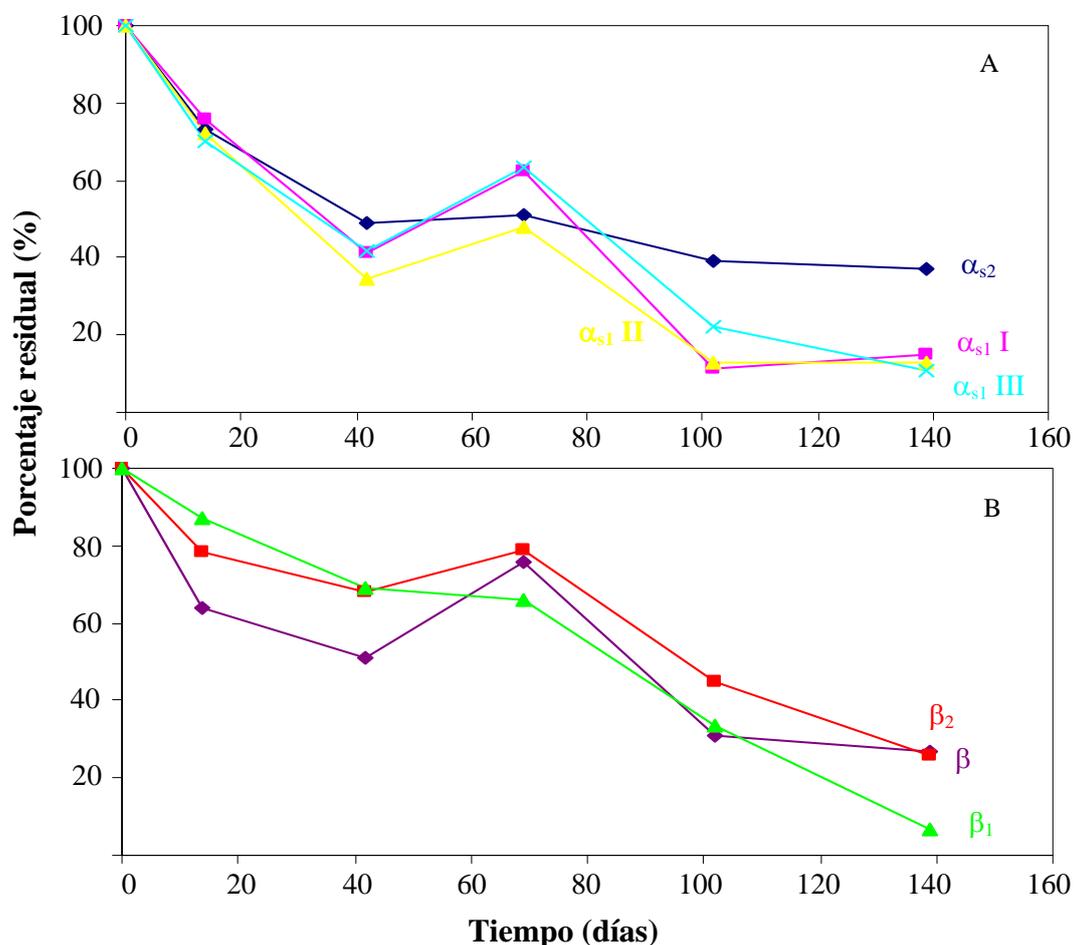


Fig. 4.50. Evolución del porcentaje residual de α_s -caseína (A) y β -caseína (B) en quesos de oveja a lo largo del tiempo de maduración. Resultados obtenidos a partir del capilar neutro (ver Fig. 4.44).

Como ya se ha indicado, el pico correspondiente a la caseína α_{s1} -III migraba conjuntamente con una γ -caseína, lo cual explicaría las oscilaciones en el porcentaje residual de esta caseína a lo largo del tiempo de maduración.

En relación con la caseína α_{s2} se observa en las Fig. 4.49 y Fig. 4.50 que si bien esta proteína sufría un 60% de degradación durante todo el proceso de maduración, la mayor hidrólisis tenía lugar en los primeros 42 días del proceso.

Este hecho está relacionado con la susceptibilidad de la caseína α_{s2} al ataque de la plasmina y en menor medida al de la quimosina (Fox y Stepaniak, 1993).

En el caso de la caseína β se observaron discrepancias en el porcentaje de hidrólisis obtenido con el capilar de sílice fundida y con el neutro al cabo de 139 días de maduración (50,3 y 25,6%, respectivamente). Dado que en los electroferogramas obtenidos con el capilar de sílice fundida junto con esta caseína migraban otros productos liberados durante la maduración, el valor calculado a partir de este capilar estaría sobreestimado siendo más correcto el calculado a partir del análisis de las muestras con el capilar neutro.

En el análisis de la caseína β_1 nos encontramos con una situación similar a la descrita en el párrafo anterior, por lo que se consideró más adecuado el porcentaje de degradación calculado a partir de los electroferogramas obtenidos con el capilar neutro. El resultado obtenido mostraba que tras 139 días de curación únicamente permanecía en el queso un 6,7% de caseína β_1 , lo cual significaba que era esta caseína la que experimentaba una mayor hidrólisis durante el proceso de maduración.

Por otra parte, indicar el anómalo comportamiento detectado en la muestra de 69 días de maduración. Para todas las caseínas estudiadas se observó un incremento del área de todos los picos, lo cual implicaba una hidrólisis menor de la que probablemente le correspondiese para su tiempo de maduración. Este hecho podría deberse a la diferencia en el contenido proteico en la leche de partida, a la variación en la concentración de enzima coagulante o de los cultivos *starter* añadidos, a un menor desuerado, a cambios en las condiciones de temperatura o humedad durante el almacenamiento, entre otras posibilidades. A este respecto, también se han detectado marcadas oscilaciones en el porcentaje de caseína residual para determinados tiempos de curación en diversos estudios realizados sobre el grado de maduración de quesos comerciales (Gaiaschi *et al.*, 2000, 2001; Strickland *et al.*, 2001) y de quesos elaborados en plantas piloto (Gouldsworthy *et al.*, 1999).

En resumen, durante los primeros días de maduración la proteólisis tenía lugar fundamentalmente sobre las caseínas α_s . A partir de los 102 días de curación, la ruptura de dichas caseínas era más limitada, observándose una mayor hidrólisis de las caseínas β . No obstante, en ningún caso se observaba una hidrólisis total de las caseínas. Este comportamiento concuerda con los resultados obtenidos por otros autores que han observado una mayor resistencia a la proteólisis en los quesos de oveja aplicando la técnica de SDS-PAGE (Poveda *et al.*, 2003). Así por ejemplo, Mendia *et al.* (2000) proporcionaron datos sobre α_s - y β -caseínas totales residuales de 10,1% y 37,1% respectivamente para 180 días de maduración en quesos tipo Idiazábal.

Finalmente, indicar que con los datos sobre el porcentaje de hidrólisis de las caseínas discutidos anteriormente, no era posible obtener una correlación lineal con el tiempo de maduración. En este sentido, y con objeto de poder predecir el tiempo de maduración de un queso mediante análisis electroforéticos se procedió en el apartado 4.3.3.1 al estudio multivariante del problema.

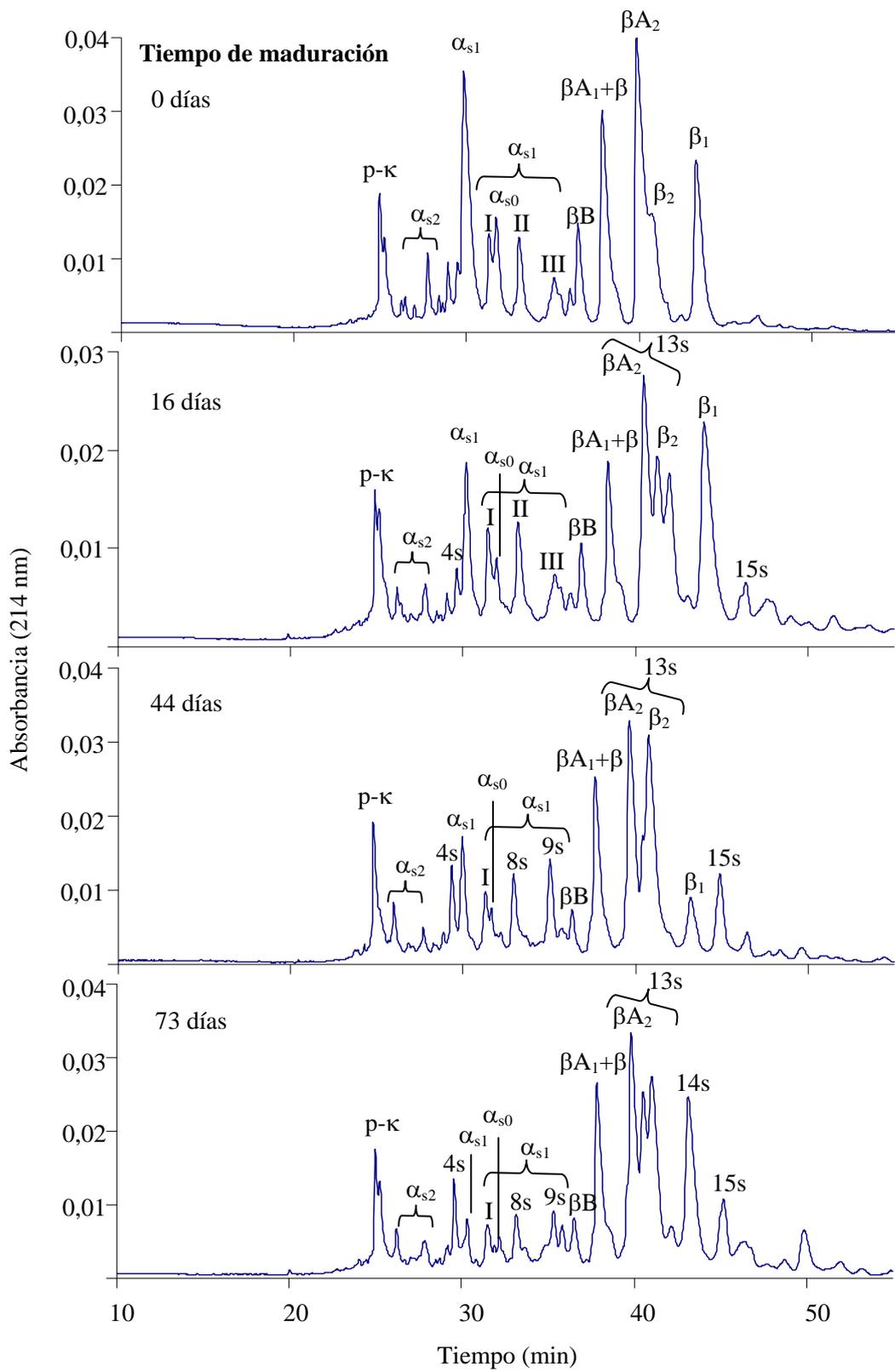
4.3.2. ANÁLISIS MEDIANTE ELECTROFORESIS CAPILAR DEL ESTADO DE MADURACIÓN DE QUESOS MEZCLA

Las muestras de quesos mezcla analizadas se correspondían también a quesos suministrados por la empresa Quesos Frías, S.A. y elaborados con leche cruda de oveja y leche pasteurizada de vaca.

Las Fig. 4.51 y Fig. 4.52 muestran, respectivamente, los electroferogramas obtenidos, con el capilar de sílice fundida y el neutro, al analizar la fracción insoluble a pH 4,6 de quesos mezcla de distintos tiempos de maduración. A pesar de la complejidad de las muestras fue posible la identificación de todas las caseínas de ambas especies. No obstante, como ya se

había observado al analizar muestras de mezclas de leche (apdo. 4.1.3.3), las caseínas βA_1 (de vaca) y β (de oveja) migraban conjuntamente en el pico 12s (capilar de sílice fundida) y pico 11n (capilar neutro). Separaciones electroforéticas similares han sido descritas por otros autores (Molina *et al.*, 1999; 2000). Además, en las figuras se observa que no fue posible la separación de las caseínas βA_2 de vaca y β_2 de oveja, por lo que se integraron como un único pico (pico 13s, junto con un producto de hidrólisis como se discutirá posteriormente, y pico 12n). Además de las caseínas intactas fue posible la separación de diferentes productos de hidrólisis liberados durante el proceso de maduración. En total se pudieron integrar 18 picos con el capilar de sílice fundida (Fig. 4.51) y 16 con el neutro (Fig. 4.52).

En los electroferogramas correspondientes a quesos de 0 días de maduración se observaba la presencia de un pico a un tiempo de migración de 24,96 min (pico 1s, capilar de sílice fundida) y de 28,97 min (pico 1n, capilar neutro). Este pico desdoblado se debería a la presencia tanto de p- κ -caseína de oveja como de vaca. En concreto, el de menor velocidad de migración se correspondería con la p- κ -caseína de oveja, ya que su diferencia con el correspondiente péptido bovino radica en dos residuos de Ala que son sustituidos por Val⁶⁵ y Asp⁹⁰, lo que le confiere mayor voluminosidad a igualdad de carga.



(Continúa)

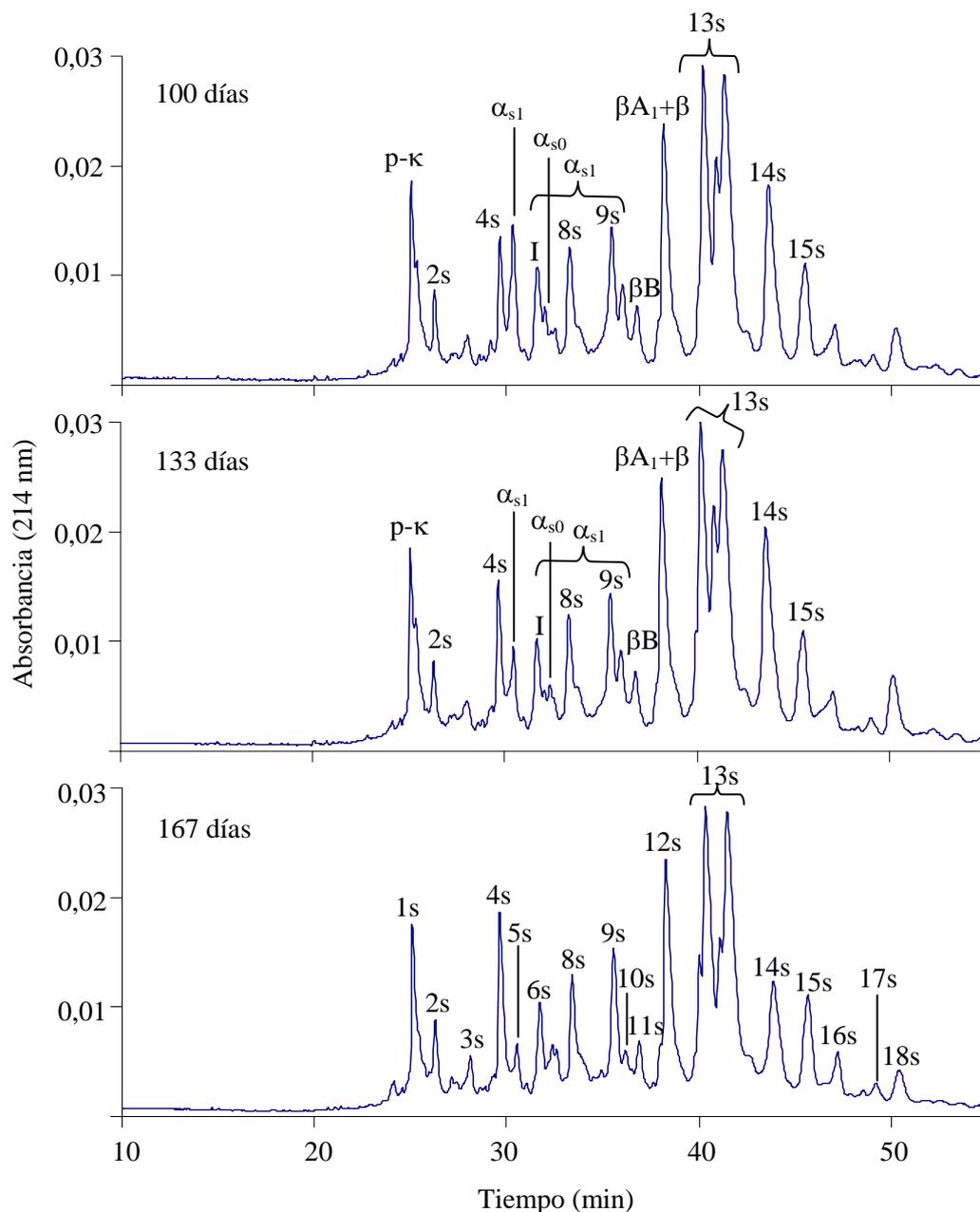
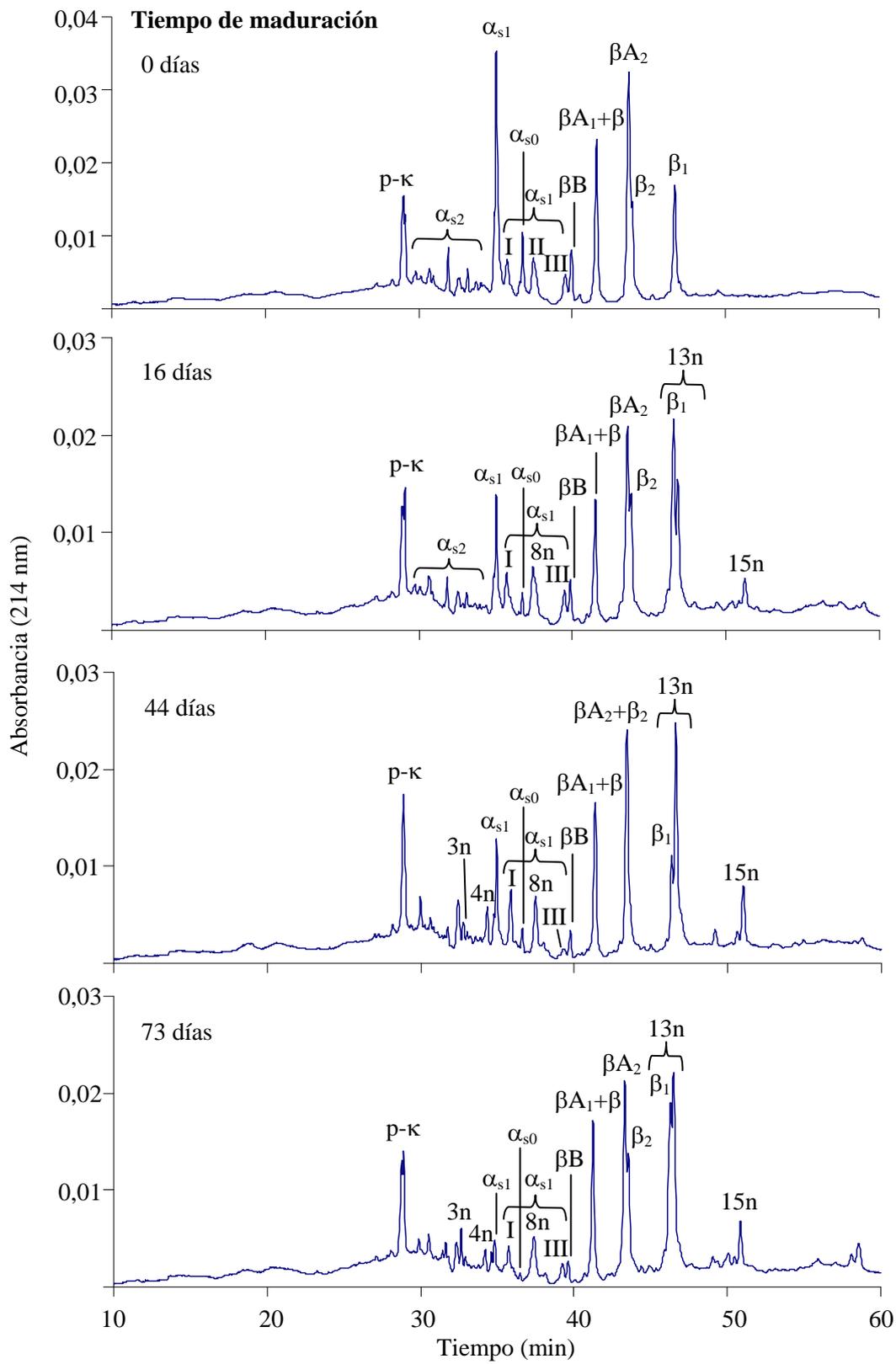


Fig. 4.51. Electroferogramas obtenidos mediante el capilar de sílice fundida de la fracción insoluble a pH 4,6 de quesos mezcla a diferentes tiempos de maduración. Identificación de picos: 1s: $p\text{-}\kappa(v \text{ y } o) + \alpha_{s2}(o)$; 2s: $\alpha_{s2}(o)$; 3s: $\alpha_{s2}(v)$; 4s: γ ; 5s: $\alpha_{s1}(v)$; 6s: $\alpha_{s1}I(o)$; 7s: $\alpha_{s0}(v)$; 8s: $\alpha_{s1}II(o) + \gamma$; 9s: $\alpha_{s1}III(o) + \gamma$; 10s: Pico 10; 11s: $\beta B(v)$; 12s: $\beta A_1(v) + \beta(o) + P$; 13s: $\beta A_2(v) + \beta_2(o) + P$; 14s: $\beta_1(o) + P$; 15s: caseína-I- α_{s1} ; 16s: Pico 16; 17s: P; 18s: P.



(Continúa)

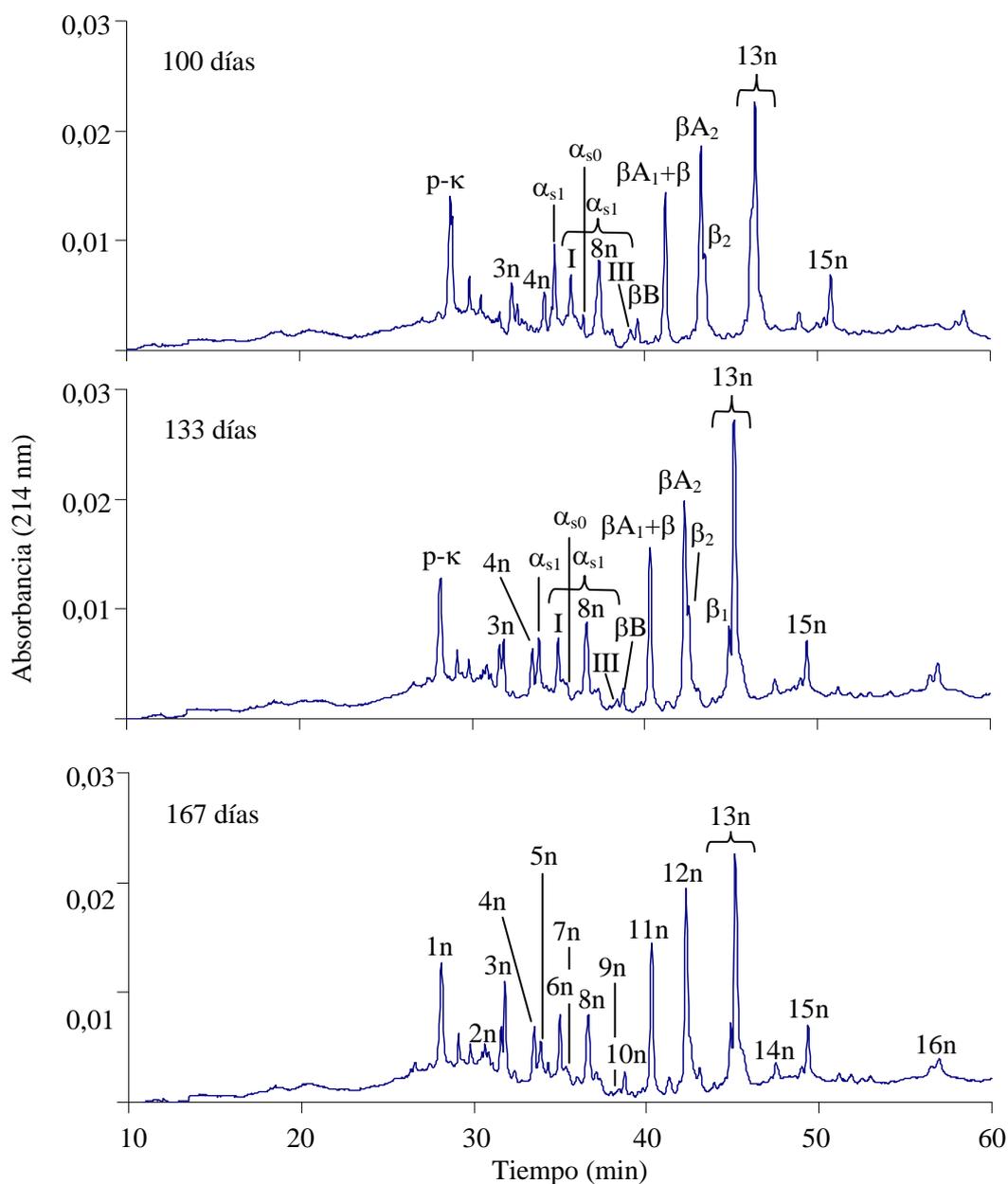


Fig. 4.52. Electroferogramas obtenidos mediante el capilar neutro de la fracción insoluble a pH 4,6 de quesos mezcla a diferentes tiempos de maduración. Identificación de picos: 1n: $p\text{-}\kappa(v \text{ y } o) + \alpha_{s2}(o)$; 2n: $\alpha_{s2}(v)$; 3n: $\alpha_{s2}(v) + \gamma$; 4n: γ ; 5n: $\alpha_{s1}(v)$; 6n: $\alpha_{s1}I(o)$; 7n: $\alpha_{s0}(v)$; 8n: $\alpha_{s1}II(o) + \gamma$; 9n: $\alpha_{s1}III(o)$; 10n: $\beta B(v)$; 11n: $\beta A_1(v) + \beta(o)$; 12n: $\beta A_2(v) + \beta_2(o)$; 13n: $\beta_1(o) + P + R$ (caseína- $I\text{-}\alpha_{s1}$); 14n: Pico 14; 15n: R; 16n: P de oveja.

Con objeto de poder identificar alguno de los productos de hidrólisis más significativos del proceso de maduración de quesos, como son el fragmento caseína-I- α_{s1} y las γ -caseínas, se trataron muestras de queso de 0 días de maduración con renina (Fig. 4.53) y plasmina (Fig. 4.54 y Fig. 4.55). En el caso de quesos mezcla tratados con renina únicamente se muestran los resultados obtenidos con el capilar neutro (Fig. 4.53), dada la baja resolución obtenida con el capilar de sílice fundida.

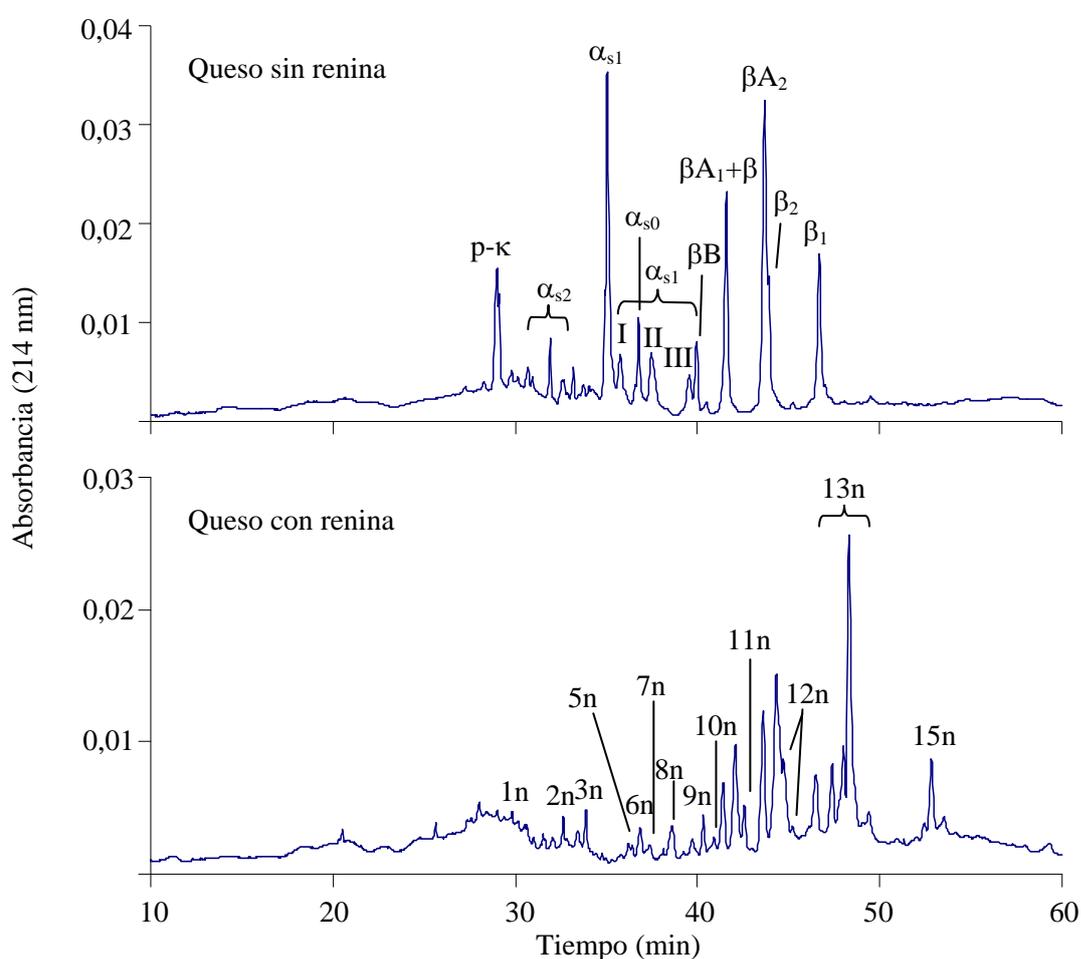


Fig. 4.53. Electroferogramas de queso mezcla de 0 días de maduración tratado con renina 0,004% durante 90 min a 37°C. Capilar neutro. Identificación de picos: 1n: p- κ (v y o)+ α_{s2} (o); 2n: α_{s2} (v); 3n: α_{s2} (v); 5n: α_{s1} (v); 6n: α_{s1} I(o); 7n: α_{s0} (v); 8n: α_{s1} II(o); 9n: α_{s1} III(o); 10n: β B(v); 11n: β A₁(v)+ β (o); 12n: β A₂(v)+ β_2 (o); 13n: β_1 (o)+R(caseína-I- α_{s1}); 14n: Pico 14; 15n: R.

Del análisis de los electroferogramas de la Fig. 4.53 y los tiempos de migración relativos observados por otros autores (Molina *et al.*, 2000), podría asignarse el pico 15s y hombro derecho de la caseína ovina β_1 (pico 13n) a la caseína-I- α_{s1} . Esta suposición se veía confirmada por el incremento que experimentaban estos picos, paralelo a la hidrólisis de las caseínas α_s , si bien, posteriormente, este péptido también era degradado por la acción de las proteasas presentes.

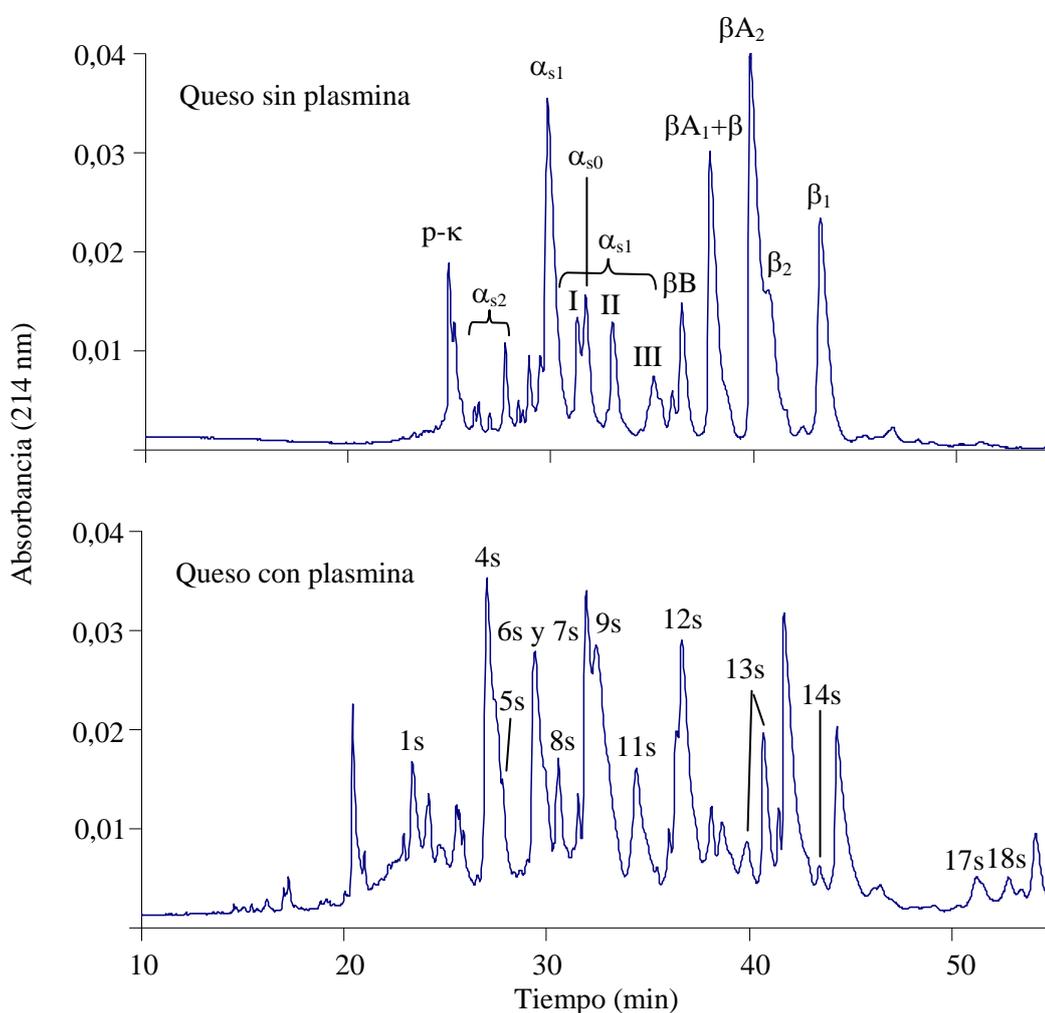


Fig. 4.54. Electroferogramas de queso mezcla de 0 días de maduración tratado con plasmina 0,04% durante 240 min a 37°C. Capilar de sílice fundida. Identificación de picos: 1s: p-κ(v y o)+α_{s2}(o); 4s: γ; 5s: α_{s1}(v); 6s: α_{s1}I(o); 7s: α_{s0}(v); 8s: α_{s1}II(o)+γ; 9s: α_{s1}III(o)+γ; 11s: βB(v); 12s: βA₁(v)+β(o)+P; 13s: βA₂(v)+β₂(o)+P; 14s: β₁(o)+P; 17s: P; 18s: P.

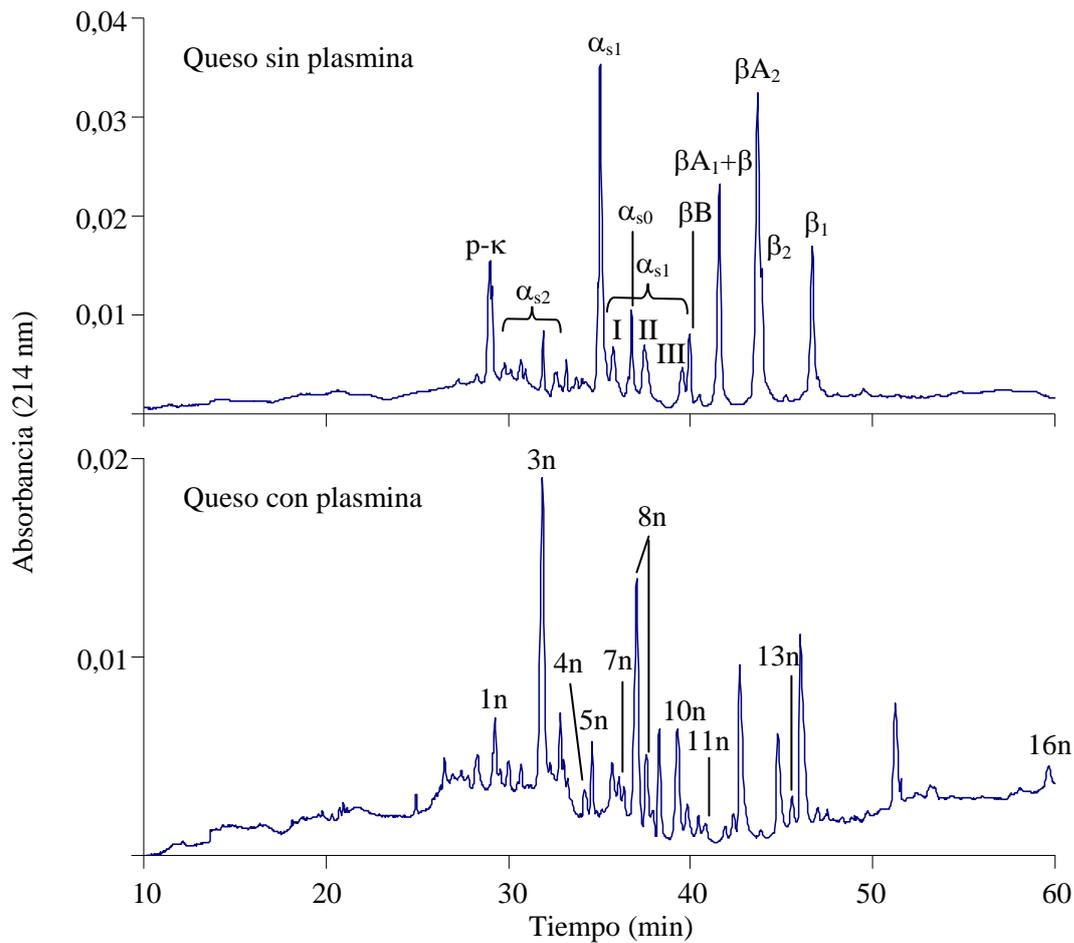


Fig. 4.55. Electroferogramas de queso mezcla de 0 días de maduración tratado con plasmina 0,04% durante 240 min a 37°C. Capilar neutro. Identificación de picos: 1n: p-κ(v y o)+α_{s2}(o); 3n: α_{s2}(v)+γ; 4n: γ; 5n: α_{s1}(v); 7n: α_{s0}(v); 8n: α_{s1}II(o)+γ; 10n: βB(v); 11n: βA₁(v)+β(o); 13n: β₁(o)+P; 16n: P de oveja.

Las Fig. 4.54 y Fig. 4.55 destacan los electroferogramas referidos a la acción de plasmina sobre muestras de quesos mezcla. Se observaba la presencia de un cierto número de picos producto de la actividad de dicha enzima que por sus tiempos de migración se corresponderían con caseínas γ tanto de vaca como de oveja, así como con otros fragmentos liberados como consecuencia de una hidrólisis extensiva de las caseínas impuesta por las condiciones de ensayo. Uno de los fragmentos de hidrólisis por plasmina coincide con el fragmento denominado pico 4 en ambos capilares. Se correspondería, probablemente, con

una caseína γ de oveja ya que se observaba, en este tipo de quesos, una mayor proteólisis sobre las caseínas β de esta especie que sobre las de vaca.

Además, como consecuencia de la acción enzimática tanto de renina como de plasmina en el queso, se observaron una serie de picos que no fue posible identificar y que aparecían también en las muestras de queso iniciales. Estos fragmentos se les denominó con una R (15n) o una P (picos 12s, 13s, 14s, 17s, 18s, 13n y 16n), respectivamente, como se muestra en la Tabla 4.22 donde se recogen los diferentes picos integrados con ambos capilares.

Por otra parte, y a pesar de la complejidad de las muestras, fue posible la cuantificación de los porcentajes de caseínas residuales a lo largo de los diferentes tiempos de maduración. Los valores obtenidos con cada uno de los capilares utilizados han sido representados en las Fig. 4.56 y Fig. 4.57.

La caseína que sufría mayor degradación era la α_{s0} de vaca llegando prácticamente a la hidrólisis total a los 167 días de maduración, seguida de la α_{s1} de vaca para la que se comprobó que al final del periodo de tiempo estudiado permanecía sin degradar aproximadamente el 6% de la caseína inicial (Fig. 4.56 y Fig. 4.57).

Respecto a las caseínas α_{s1} de oveja, y como ya se ha comentado en el estudio de los quesos de oveja, indicar que estas caseínas eran degradadas a mayor velocidad que las caseínas β de oveja e incluso que las de vaca. Sin embargo, del análisis de las Fig. 4.56 y Fig. 4.57 no era posible conocer el grado de hidrólisis que sufren las caseínas α_{s1} de oveja. Así, por ejemplo, se observa en la Fig. 4.56 un incremento del porcentaje residual de caseína α_{s1} -II y de caseína α_{s1} -I de oveja a medida que progresa el tiempo de maduración. La explicación se encuentra en que estas caseínas migran conjuntamente con diferentes productos liberados durante la hidrólisis primaria que tiene lugar en el proceso de maduración de los quesos estudiados. Este problema se apreciaba especialmente para la caseína α_{s1} -II de oveja con ambos capilares (Fig. 4.51 y Fig. 4.52) y para la α_{s1} -III ovina en el capilar de sílice fundida (Fig. 4.51).

Tabla 4.22. Tabla de asignación de picos en los electroferogramas de muestras de quesos mezcla. Capilar de sílice fundida y capilar neutro.

Caseína o péptido ^a			
Pico ^b	Capilar de sílice fundida	Pico ^b	Capilar neutro
1s	p-κ (v) + p-κ (o) + α _{s2} (o)	1n	p-κ (v) + p-κ (o) + α _{s2} (o)
2s	α _{s2} (o)	2n	α _{s2} (v)
3s	α _{s2} (v)	3n	α _{s2} (v) + γ caseína
4s	γ caseína	4n	γ caseína
5s	α _{s1} (v)	5n	α _{s1} (v)
6s	α _{s1} I (o)	6n	α _{s1} I (o)
7s	α _{s0} (v)	7n	α _{s0} (v)
8s	α _{s1} II (o) + γ caseína	8n	α _{s1} II (o) + γ caseína
9s	α _{s1} III (o) + γ caseína	9n	α _{s1} III (o)
10s	Pico 10	10n	β B (v)
11s	β B (v)	11n	β A ₁ (v) + β (o)
12s	β A ₁ (v) + β (o) + P ^d	12n	β A ₂ (v) + β ₂ (o)
13s	β A ₂ (v) + β ₂ (o) + P ^d	13n	β ₁ (o) + P ^d + R ^c (caseína-I-α _{s1})
14s	β ₁ (o) + P ^d	14n	Pico 14
15s	Caseína-I-α _{s1}	15n	R ^c
16s	Pico 16	16n	P ^d de oveja
17s	P ^d		
18s	P ^d		

^a v: vaca, o: oveja^b “s” capilar de sílice fundida y “n” capilar neutro^c R: fragmento observado tras adición de renina^d P: fragmento observado tras adición de plasmina

De las caseínas β la que experimentaba una mayor hidrólisis durante el proceso de maduración era la caseína β B de vaca. En cuanto al resto de caseínas β se apreciaba en las Fig. 4.51 y Fig. 4.52 una mayor hidrólisis

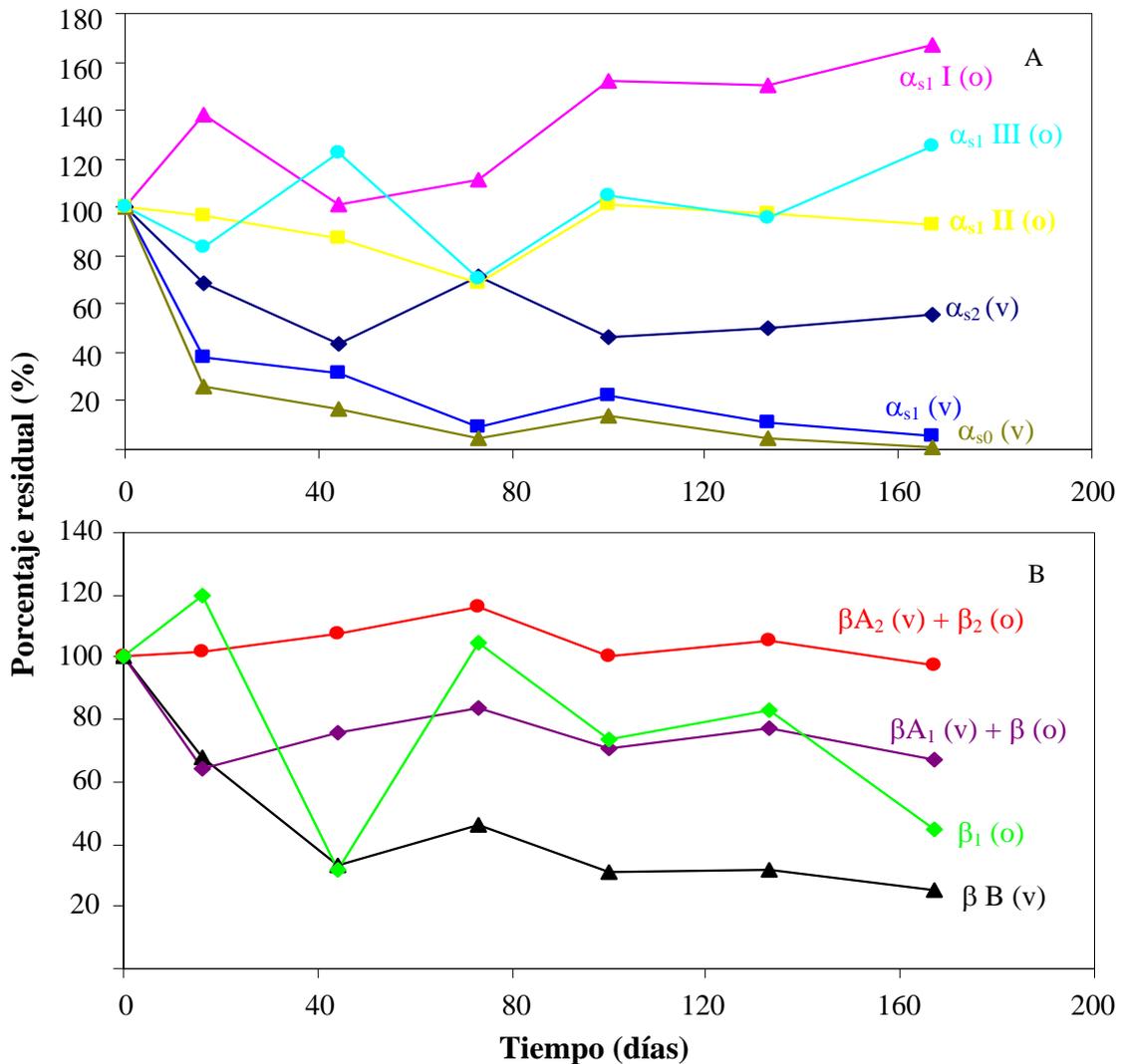


Fig. 4.56. Evolución del porcentaje residual de α_s -caseína (A) y β -caseína (B) a lo largo del tiempo de maduración. Resultados obtenidos a partir del análisis de la fracción caseínica con el capilar de sílice fundida en quesos mezcla.

de las caseínas β de vaca en los primeros días de curación, con la consiguiente aparición de alguna caseína γ (entre ellas el pico 4s ó 4n, dependiendo del capilar). Por el contrario, a tiempos de maduración superiores, se apreciaba cómo la caseína β_1 de oveja era la que alcanzaba mayor grado de hidrólisis aunque el hecho de integrarse conjuntamente con otro fragmento (uno de los productos mayoritarios de hidrólisis que se resolvía parcialmente en el capilar neutro) influía en su cuantificación. Este hecho explicaría los erróneos porcentajes residuales calculados para esta caseína con el capilar neutro, los

cuales eran para todos los tiempos de maduración superiores al 100% (Fig. 4.57).

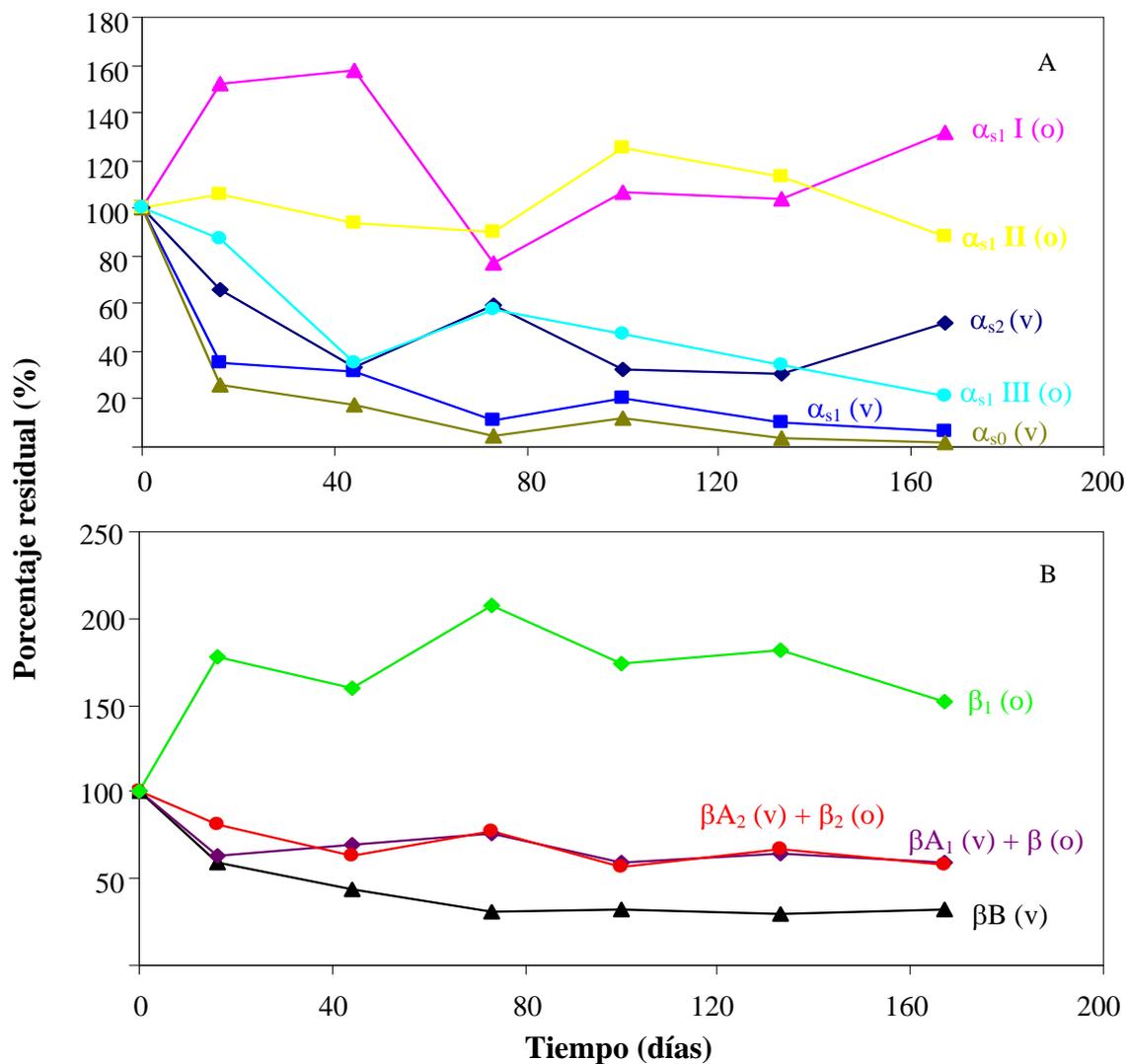


Fig. 4.57. Evolución del porcentaje residual de α_s -caseína (A) y β -caseína (B) a lo largo del tiempo de maduración. Resultados obtenidos a partir del análisis de la fracción caseínica con el capilar neutro en quesos mezcla.

Al igual que sucedía en el estudio de los quesos de oveja, no era posible determinar ningún parámetro que por sí sólo se correlacionara con el tiempo de maduración. Por ello, se planteó en el siguiente apartado un estudio multivariante de los resultados obtenidos.

4.3.3. PREDICCIÓN DEL TIEMPO DE MADURACIÓN DE QUESOS DE OVEJA Y MEZCLA USANDO ANÁLISIS ESTADÍSTICO MULTIVARIANTE

El análisis quimiométrico multivariante (PCR, PLS...) se ha mostrado como una herramienta eficaz para dar modelos cuantitativos que correlacionen el grado de maduración con los perfiles proteolíticos (García Ruiz *et al.*, 1998; Herrero-Martínez *et al.*, 2000; Pripp *et al.*, 2000b), o para discriminar entre tipos de quesos (Pripp *et al.*, 1999a; Sousa *et al.*, 2001), así como en la evaluación de la influencia de factores como el tipo de *starter* (Pripp *et al.*, 1999b, 2000a; Poveda *et al.*, 2003), variables físico-químicas (García Ruiz *et al.*, 1998; Frau *et al.*, 1999; Skeie *et al.*, 2001), conteos microbianos (Skeie y Ardö, 2000), parámetros de fabricación (Benfeldt *et al.*, 1997; Sørensen y Benfeldt, 2001; Benfeldt y Sørensen, 2001) y características cualitativas y sensoriales (Chapman *et al.*, 2001).

Estos métodos de evaluación permiten un estudio objetivo y una reducción adecuada de la dimensionalidad de los datos así como una interpretación adicional a la visión tradicional de los perfiles proteolíticos (Pripp *et al.*, 2000b). No obstante, no se ha logrado desarrollar un método global de análisis para predecir la calidad de un queso durante la producción y maduración, relacionando los aspectos sensoriales con otro tipo de señales técnicas. Los métodos espectroscópicos (fluorescencia e infrarrojo) junto con la resonancia magnética nuclear combinados con la quimiometría aplicada, son prometedores en este sentido, pero aún, no tienen suficiente sensibilidad como para reflejar la complejidad de la proteólisis en el queso que acompaña la aparición del aroma y sabor característicos (Ardö, 2002).

En este sentido, y a partir de los datos electroforéticos obtenidos en los apartados anteriores con los dos capilares objeto de estudio, se ha procedido a valorar el grado de maduración de las muestras de quesos de oveja y mezcla mediante análisis multivariante.

4.3.3.1. Correlación multivariante en quesos de oveja

En este apartado se aplicó el análisis multivariante a los datos obtenidos a partir de los electroferogramas de las muestras de queso de oveja con distinto tiempo de maduración determinadas mediante electroforesis capilar aplicando el capilar de sílice fundida y el neutro (Fig. 4.43 y Fig. 4.44). Concretamente, se utilizó la regresión sobre mínimos cuadrados parciales con validación cruzada (PLSC) y la regresión sobre componentes principales (PCR). Previo al análisis mediante PCR se realizó el cálculo de componentes principales (PCA).

- *Regresión por mínimos cuadrados parciales con validación cruzada (PLSC)*

El análisis de las muestras de quesos de oveja de diferentes tiempos de maduración con el *capilar de sílice fundida* rendía 16 picos (Tabla 4.21). La variable seleccionada para llevar a cabo este estudio fue el área de cada uno de estos picos. A partir de estos datos se procedió al cálculo, mediante el paquete estadístico PARVUS, de la regresión por mínimos cuadrados parciales con validación cruzada (PLSC) con 12 grupos de cancelación (*leave one out*). Tras un primer cálculo se eliminaron las variables correspondientes a las áreas de los picos 3s y 7s, dado su bajo poder modelante. Los resultados obtenidos indicaban la necesidad de 8 variables latentes que mejoraban el porcentaje de la varianza explicada en validación cruzada hasta un 99,24% y reducían el error medio en predicción en días hasta 3,8 ($R^2 = 0,9997$).

El programa PLSC de PARVUS calcula la fórmula cerrada, esto es, relaciona la variable respuesta (tiempo de maduración) con las variables originales, por lo que la ecuación obtenida sería la siguiente:

$$t_{\text{mad}} = 74,07 + 7,33 V_{1s} - 23,17 V_{2s} - 5,44 V_{4s} - 18,82 V_{5s} + 1,21 V_{6s} - 0,29 V_{8s} - 13,05 V_{9s} - 2,23 V_{10s} + 17,27 V_{11s} + 0,54 V_{12s} + 12,48 V_{13s} - 1,46 V_{14s} - 2,98 V_{15s} + 2,39 V_{16s}$$

Siendo t_{mad} , el tiempo de maduración, y V_{1s} a V_{16s} las variables que se refieren a los picos integrados en el electroferograma correspondiente y caracterizados en la Tabla 4.21.

En el caso del análisis de las muestras de queso de oveja con el *capilar neutro* se detectaron 21 picos. El análisis de los datos mediante regresión por mínimos cuadrados parciales con validación cruzada y 12 grupos de cancelación (PLSC), dejando fuera los picos 11n, 13n y 20n de bajo poder modelante, indicaba que eran necesarias únicamente 4 variables latentes para ajustar el modelo (frente a las 8 que hacían falta con el capilar de sílice fundida). La desviación estándar explicada en el bloque de las variables predictoras (bloque X) era de 42,36% con la primera variable latente; 49,29% con la segunda; 62,30% con la tercera y 73,27% con la cuarta. Se obtenía un 99,17% de la varianza total explicada por la regresión en validación cruzada, con un error medio en predicción de 4,1 días y un valor del coeficiente de correlación (R^2) de 0,9981. La ecuación de correlación obtenida fue la siguiente:

$$t_{\text{mad}} = 0,47 + 10,54 V_{1n} - 7,34 V_{2n} - 7,00 V_{3n} + 34,14 V_{4n} + 28,88 V_{5n} + 15,42 V_{6n} - 0,82 V_{7n} - 1,18 V_{8n} + 10,72 V_{9n} + 61,76 V_{10n} + 81,61 V_{12n} + 0,54 V_{13n} - 50,18 V_{14n} - 1,10 V_{15n} + 40,45 V_{16n} - 1,49 V_{17n} + 4,68 V_{18n} + 1,55 V_{19n} + 4,29 V_{21n}$$

Siendo V_{1n} a V_{21n} las variables que se corresponden con los picos integrados en el electroferograma obtenidos con el capilar neutro y caracterizados en la Tabla 4.21.

Un resumen de los resultados de la aplicación de la técnica de regresión por PLSC para la predicción de los tiempos de maduración de queso de oveja analizados con el capilar de sílice fundida y el neutro se detallan en la Tabla 4.23.

Tabla 4.23. Resultados de la aplicación de PLSC para la predicción del tiempo de maduración de quesos de oveja a partir de los electroferogramas obtenidos mediante electroforesis capilar (EC).

Capilar	n ^a	R ² (Coeficiente de correlación)	Porcentaje de varianza explicada ^b	Error medio en predicción ^c
Sílice fundida	8	0,9997	99,24%	3,8
Neutro	4	0,9981	99,17%	4,1

^a Número de variables latentes seleccionadas por validación cruzada

^b Porcentaje de varianza explicada en validación cruzada

^c Error medio en predicción calculado mediante validación cruzada (días)

- **Componentes principales (PCA)**

Con objeto de reducir la dimensionalidad del problema y previo a la regresión multivariante, se procedió al cálculo de las componentes principales. El estudio se realizó paralelamente con los datos de áreas de pico calculados a partir de los electroferogramas de queso de oveja obtenidos con el capilar de sílice fundida y el neutro.

Las variables empleadas en el análisis con el capilar de sílice fundida, incluyeron todos los picos integrados en los electroferogramas excepto, como se ha indicado anteriormente, aquellos que habían mostrado bajo poder modelante en PLSC, es decir, las variables correspondientes a las áreas de los picos 3s y 7s. El análisis realizado indicaba que eran necesarias 4 componentes principales para explicar el 97,05% de la varianza total de los datos.

Partiendo de los datos autoescalados fue posible calcular los pesos o *loadings* correspondientes a cada variable original (Tabla 4.24). En negrita se muestran los *loadings* de mayor peso dentro de cada variable original. En la primera componente principal o CP₁ se aprecia mayor peso de las caseínas α_s de oveja, junto con la caseína β_1 . Mientras que la CP₂ está más correlacionada con los fragmentos de hidrólisis de las caseínas que aparecían también cuando las muestras de queso eran tratadas con renina (ver apdo. 4.3.1). Estas dos componentes explicaban un 88,94% del total de la varianza de los datos,

indicando que estos fragmentos eran los más significativos en cuanto a la correlación con el tiempo de maduración para este estudio.

Tabla 4.24. *Loadings* de las 4 componentes principales calculadas con las áreas de pico de los electroferogramas de quesos de oveja, obtenidos con el capilar de sílice fundida.

Pico ^a	Caseína	CP ₁	CP ₂	CP ₃	CP ₄
1s	p-κ + α _{s2}	-0,279	-0,154	-0,083	0,220
2s	α _{s2}	-0,286	0,056	0,094	0,437
4s	R	0,193	0,382	-0,702	-0,017
5s	Pico 5	0,086	-0,692	-0,292	0,232
6s	α _{s1} I	-0,297	-0,112	0,151	0,118
8s	α _{s1} II	-0,294	-0,088	0,092	0,251
9s	R	0,247	-0,407	0,103	-0,153
10s	α _{s1} III + γ caseína	-0,291	0,020	-0,230	0,162
11s	R	0,272	-0,323	-0,035	-0,159
12s	γ caseína	-0,268	-0,090	-0,443	0,039
13s	β + R	-0,267	-0,213	-0,314	-0,404
14s	β ₂	-0,296	-0,058	0,027	-0,322
15s	β ₁ + P	-0,297	-0,001	0,026	-0,283
16s	Caseína-I-α _{s1}	0,285	-0,014	-0,118	0,454
Proporción de la varianza total		76,56%	12,38%	4,55%	3,56%

^a “s” capilar de sílice fundida

En el diagrama conjunto de los *loadings* y los *scores*, para la representación del autovector 1 y 2 (Fig. 4.58), se puede comprobar la correlación que presentan los quesos de pasta fresca con valores altos en las áreas de los picos 1s, 2s, 6s, 8s, 10s 12s, 13s, 14s y 15s (valor negativo para la CP₁) y que se corresponden mayoritariamente con las caseínas originales, mientras que los quesos de mayor tiempo de maduración se ven reflejados por

valores altos en los picos 9s, 11s y 16s que son productos de la hidrólisis relacionados con la acción de una actividad similar a la de la renina (valor positivo global en la CP₁). Por tanto, la primera componente principal consigue separar entre los quesos de menor y mayor tiempo de maduración, mientras que la CP₂ permite hacer la separación de quesos de tiempos de maduración intermedios (42 y 69 días), con valores positivos de CP₂ para los quesos de oveja de tiempo 42 días y valores negativos de esa misma componente para los quesos de 69 días.

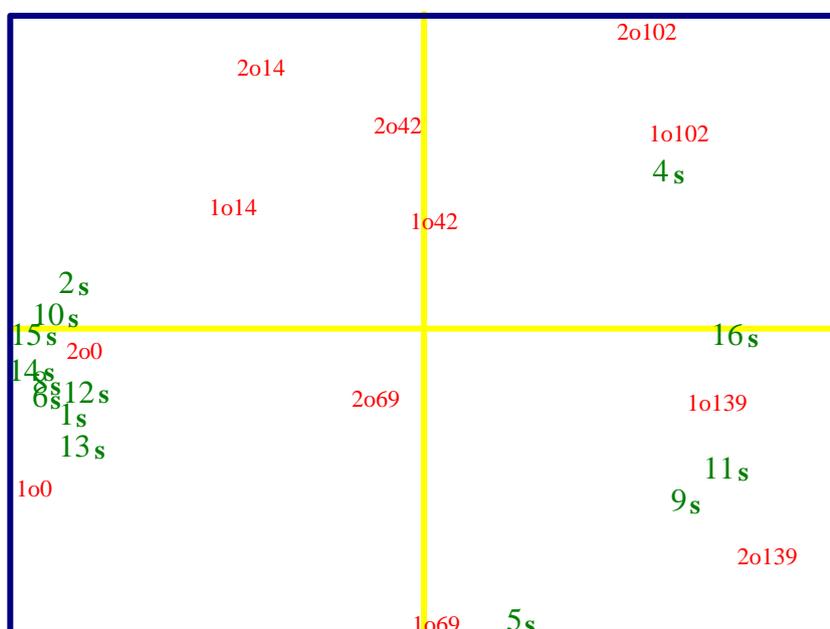


Fig. 4.58. Representación sobre el plano del 1^{er} y 2^o autovector del análisis con PCA de los electroferogramas de quesos de oveja obtenidos con el capilar de sílice fundida. Los números (en verde) se corresponden con las variables originales de acuerdo con sus respectivos *loadings*. Las muestras (en rojo) se sitúan según sus *scores* en estas nuevas componentes; la primera cifra indica el número de réplica, la o hace referencia a queso de oveja y las últimas cifras indican tiempo de maduración en días.

Del análisis de la representación del autovector 1 frente al autovector 3 (Fig. 4.59) se deduce que el mayor peso de la componente principal 3 (CP₃) lo tiene el pico 4s. Además, esta componente está altamente correlacionada con

los quesos de 102 días de maduración, periodo de tiempo en el que este fragmento presentaba un área de pico mayor, pudiendo ser hidrolizado a medida que avanzaba el tiempo de curación.

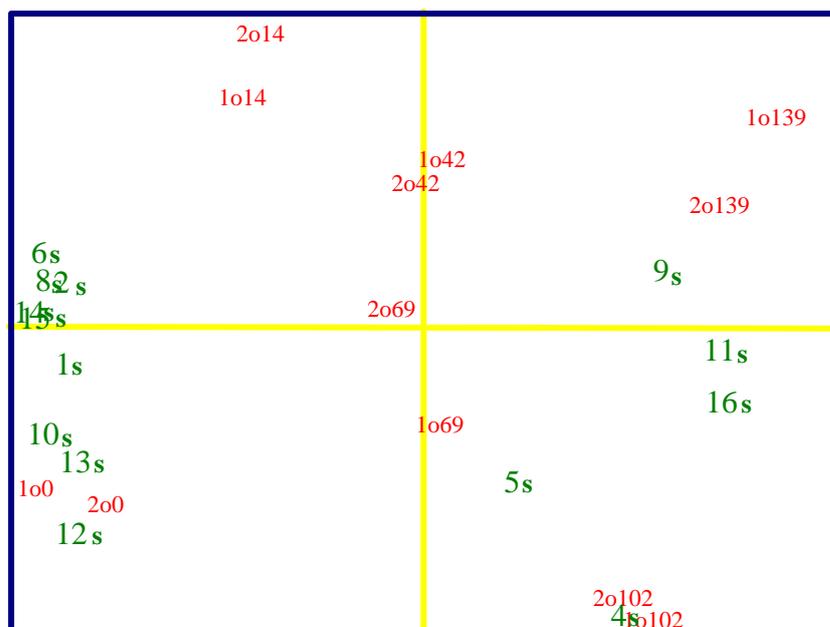


Fig. 4.59. Representación sobre el plano del 1^{er} y 3^{er} autovector del análisis con PCA de los electroferogramas de quesos de oveja con el capilar de sílice fundida. Los números (en verde) se corresponden con las variables originales de acuerdo con sus respectivos *loadings*. Las muestras (en rojo) se sitúan según sus *scores* en estas nuevas componentes; la primera cifra indica el número de réplica, la o hace referencia a queso de oveja y las últimas cifras indican tiempo de maduración en días.

Paralelamente al análisis anterior se realizó un estudio con los resultados obtenidos con el capilar neutro. Para ello, se seleccionaron todas las variables excepto los picos 11n, 13n y 20n (en total, 18 variables) que habían demostrado con PLSC mayor poder modelante, comprobándose que eran necesarias 4 componentes principales para explicar un 96,69% de la varianza total de los datos.

Los resultados obtenidos para los *loadings* de cada variable original sobre las componentes principales se detallan en la Tabla 4.25. De esta tabla se

observa que mientras la CP₁ está altamente correlacionada con las caseínas α_s y con las caseínas β de oveja, al igual que sucedía en el estudio realizado con el capilar de sílice fundida, la CP₂ estaba mayormente relacionada con cuatro de los fragmentos producto de la hidrólisis liberados durante el proceso de maduración y la CP₃ aportaba información sobre las caseínas α_{s2} , γ -caseínas y el fragmento I- α_{s1} .

Tabla 4.25. *Loadings* de las 4 componentes principales calculadas con las áreas de pico de los electroferogramas de quesos de oveja, obtenidos con el capilar neutro.

Pico ^a	Caseína	CP ₁	CP ₂	CP ₃	CP ₄
1n	p- κ	-0,202	-0,145	-0,078	-0,699
2n	α_{s2}	-0,257	0,040	-0,262	0,140
3n	α_{s2} + péptido	-0,247	0,045	-0,391	-0,038
4n	γ caseína	0,261	0,061	0,042	-0,345
5n	γ caseína	0,116	-0,521	-0,214	-0,155
6n	R	0,202	-0,407	-0,142	-0,068
7n	α_{s1} I	-0,266	0,127	-0,036	-0,137
8n	α_{s1} II	-0,267	0,090	-0,207	0,014
9n	γ caseína	0,222	-0,224	-0,253	-0,200
10n	γ caseína	0,202	0,308	0,249	-0,348
12n	R	0,219	0,346	-0,017	-0,184
14n	γ caseína	0,167	-0,338	0,481	0,166
15n	β_2	-0,269	-0,014	0,095	-0,235
16n	P	0,245	0,272	-0,130	-0,082
17n	β_1	-0,274	-0,041	0,158	-0,022
18n	Pico 18	0,230	0,177	-0,403	0,182
19n	Caseína-I- α_{s1}	0,262	-0,061	-0,299	0,072
21n	P	0,268	0,141	-0,004	-0,028
Proporción de la varianza total		71,47%	14,52%	6,08%	4,62%

^a "n" capilar neutro

De la representación sobre el plano del primer y segundo autovector de los *loadings* y los *scores* (Fig. 4.60) se deduce que la componente CP₁ es capaz de separar los quesos de oveja en función de su tiempo de maduración. De hecho, la CP₁ está correlacionada con las variables 1n, 2n, 3n, 7n, 8n, 15n y 17n, que se corresponden a las caseínas intactas, lo cual explicaría su proximidad a los *scores* de las muestras de poco tiempo de maduración. Por el contrario, los picos que se corresponden con las variables que se sitúan a la izquierda de la primera componente principal, se corresponden a productos fruto de proceso de maduración de los quesos, indicando un mayor grado de curación. Sin embargo, de manera similar a lo observado con el capilar de sílice fundida esta componente principal no era capaz de distinguir entre los quesos de tiempo de maduración intermedia.

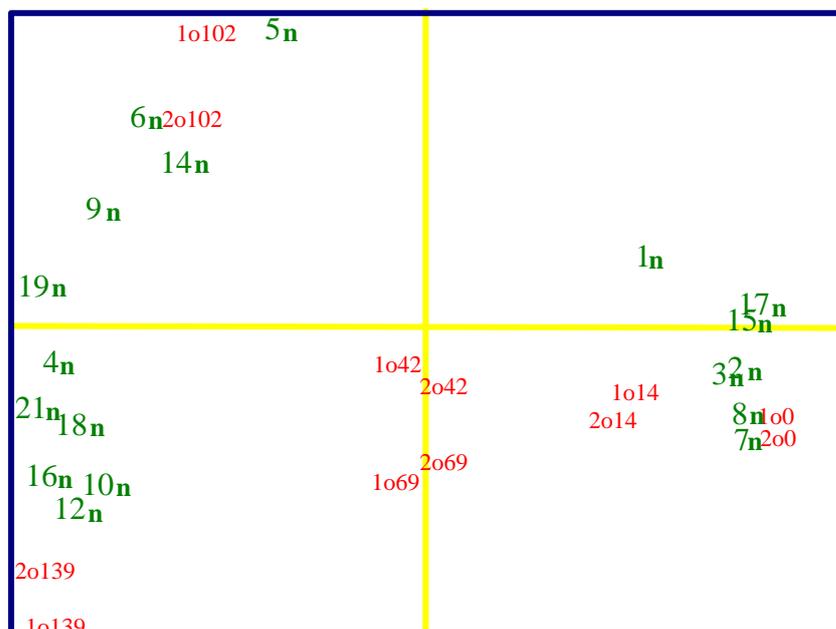


Fig. 4.60. Representación sobre el plano del 1^{er} y 2^o autovector del análisis con PCA de los electroferogramas de quesos de oveja con el capilar neutro. Los números (en verde) se corresponden con las variables originales de acuerdo con sus respectivos *loadings*. Las muestras (en rojo) se sitúan según sus *scores* en estas nuevas componentes; la primera cifra indica el número de réplica, la o hace referencia a queso de oveja y las últimas cifras indican tiempo de maduración en días.

- ***Regresión sobre componentes principales (PCR)***

La regresión sobre componentes principales suponía la obtención de la ecuación que correlacionaba el tiempo de maduración con las componentes principales calculadas anteriormente. En las Tabla 4.26 y Tabla 4.27 se detallan los parámetros de la regresión, el coeficiente de ajuste, el porcentaje de varianza explicada en validación cruzada y el error medio en predicción, obtenidos al realizar la regresión sobre las componentes principales (CP₁, CP₂, CP₃ y CP₄) calculadas en el apartado anterior para el capilar de sílice fundida y el neutro, respectivamente. Los valores del error cometido en predicción (3,6 días) y de la varianza explicada en la regresión (99,2%) con el capilar neutro (Tabla 4.27) eran mejores que los obtenidos con el capilar de sílice fundida (8,6 días y 96,2%, respectivamente) (Tabla 4.28). Adicionalmente, cabe considerar que los intervalos de confianza para los coeficientes de las componentes principales CP₃ y CP₄ contenían al cero, por lo que cabría suponer que no contienen información relevante para la predicción de la respuesta (Forina *et al.*, 2000). Dicho aspecto se rechazó mediante el método alternativo propuesto por Forina *et al.* (2000) para el PARVUS consistente en realizar componentes principales con el algoritmo NIPALS, seguido de la selección paso a paso de cada componente significativa con STEPREG y finalmente realizando la correlación sobre las componentes seleccionadas con el programa MULTIREG. Eliminando las componentes CP₃ y CP₄, se obtenía un error en predicción más elevado de 11,4 días y una varianza explicada en validación cruzada menor (94,37%), lo cual indicaba que la inclusión en el modelo de ambas componentes era preferible a su eliminación.

Para finalizar, es interesante contrastar los resultados obtenidos para ambos capilares con los dos métodos de regresión utilizados, PLSC y PCR. De las Tabla 4.23, Tabla 4.26 y Tabla 4.27 se deduce que todos los métodos de regresión presentaban valores elevados del coeficiente de correlación (valores de R² superiores a 0,98), porcentajes de la varianza explicada que oscilaban en todos los casos entre el 96,18% y el 99,24%, y valores del error medio en

Tabla 4.26. Regresión sobre componentes principales (PCR) en muestras de quesos de oveja analizadas con el capilar de sílice fundida.

Componente principal	Parámetro de la regresión		
	Coefficiente	Desviación estándar	Intervalo de confianza
CP ₁	14,97	0,779	1,843
CP ₂	-6,19	1,938	4,583
CP ₃	-6,53	3,195	7,554
CP ₄	7,26	3,615	8,549
O. en origen	61,00	0,705	5,776
R²		0,9823	
Varianza explicada en validación cruzada		96,18%	
Error medio en predicción en validación cruzada (días)		8,6	

Tabla 4.27. Regresión sobre componentes principales (PCR) en muestras de quesos de oveja analizadas con el capilar neutro.

Componente principal	Parámetro de la regresión		
	Coefficiente	Desviación estándar	Intervalo de confianza
CP ₁	-13,78	0,270	0,638
CP ₂	-2,57	0,599	1,416
CP ₃	7,02	0,925	2,188
CP ₄	7,51	1,061	2,507
O. en origen	61,00	0,267	2,191
R²		0,9975	
Varianza explicada en validación cruzada		99,23%	
Error medio en predicción en validación cruzada (días)		3,6	

predicción inferiores a 8,6 días. A la hora de seleccionar el método más preciso en la determinación del tiempo de maduración el criterio seleccionado fue el error medio en predicción más bajo (García Ruiz *et al.*, 1998). El método más adecuado para la determinación del tiempo de maduración de muestras de queso de oveja sería la utilización de PCR con los 16 picos seleccionados de los electroferogramas obtenidos con el capilar neutro. Con estos resultados sería posible predecir el tiempo de maduración de muestras de queso con un error aproximado de 3 días. Esta valoración mejora a las referencias encontradas en otros trabajos sobre quesos comerciales tipo Manchego aplicando la técnica de PAGE y una serie de parámetros capaces de detectar la proteólisis secundaria, en donde se obtuvieron valores de error medio en predicción de 10 días (García Ruiz *et al.*, 1998). No obstante, sería conveniente llevar a cabo un número más elevado de muestras de quesos comerciales y elaborados en diferentes épocas del año antes de poder establecer una conclusión firme sobre la capacidad predictiva propuesta en las ecuaciones presentadas anteriormente.

4.3.3.2. Correlación multivariante en quesos mezcla

A continuación se llevó a cabo un estudio similar al descrito anteriormente con los resultados obtenidos al analizar por EC con el capilar de sílice fundida y el neutro muestras de queso mezcla de diferentes tiempos de maduración.

- ***Regresión mediante mínimos cuadrados parciales con validación cruzada (PLSC)***

En los electroferogramas obtenidos en el análisis de quesos mezcla a diferentes tiempos de maduración con el capilar de sílice fundida se identificaron 18 picos, tal y como se indicaba en la Tabla 4.22. A partir de las áreas de estos picos se realizó la regresión por mínimos cuadrados parciales con

validación cruzada y con 14 grupos de cancelación (método *leave one out*). Tras un primer cálculo se eliminaron las variables correspondientes a las áreas de los picos 2s, 8s, 10s y 14s dado su bajo poder modelante. El análisis realizado con las 14 variables restantes indicaba que eran necesarias 6 variables latentes para correlacionar las variables predictoras con la respuesta (tiempo de maduración), lográndose un 98,08% de explicación en la varianza de la regresión, un coeficiente de correlación de 0,9965 y un error medio en predicción de 7,0 días (Tabla 4.28). A continuación se muestra la ecuación que relaciona el tiempo de maduración con las variables originales.

$$t_{\text{mad}} = 18,60 - 9,24 V_{1s} + 7,54 V_{3s} + 18,46 V_{4s} - 1,25 V_{5s} + 56,25 V_{6s} + 0,12 V_{7s} \\ + 7,05 V_{9s} - 4,45 V_{11s} + 5,46 V_{12s} - 3,70 V_{13s} - 3,47 V_{15s} - 13,46 V_{16s} + \\ 66,90 V_{17s} + 15,41 V_{18s}$$

Siendo t_{mad} , el tiempo de maduración, y V_{1s} a V_{18s} las variables que se corresponden con los picos integrados en el electroferograma obtenidos con el capilar de sílice fundida y caracterizados en la Tabla 4.22.

Cuando las muestras de queso eran analizadas con el capilar neutro el número de picos identificados fue de 16 (ver Tabla 4.22). Tomando como variables el área de estos picos, excepto la de los picos 1n, 2n, 6n, 12n, 13n, y 16n de bajo poder modelante, la técnica de regresión PLSC, indicaba la necesidad de cinco variables latentes para explicar un 97,46% de la varianza del modelo, con un error medio en predicción de 7,8 y un coeficiente de ajuste de 0,9929 (Tabla 4.28). Concretamente, se explicaría un 42,01; 46,58; 50,58; 65,47 y 75,81% de la varianza de las variables predictoras, con la primera, segunda, tercera, cuarta y quinta variable latente, respectivamente. La ecuación que explica la correlación del tiempo de maduración con las áreas de pico de las variables originales sería la siguiente:

$$t_{\text{mad}} = 27,84 + 98,78 V_{3n} + 5,35 V_{4n} + -6,11 V_{5n} - 4,87 V_{7n} + 32,10 V_{8n} - 47,73 \\ V_{9n} - 27,61 V_{10n} - 9,93 V_{11n} + 71,88 V_{14n} - 61,99 V_{15n}$$

Siendo t_{mad} el tiempo de maduración de los quesos de mezcla y V_{3n} a V_{15n} las variables que se corresponden con los picos integrados en el electroferograma del capilar neutro y caracterizados en la Tabla 4.22.

Tabla 4.28. Resultados de la aplicación de PLSC para la predicción del tiempo de maduración de quesos mezcla a partir de los electroferogramas obtenidos mediante electroforesis capilar.

Capilar	n ^a	R ² (Coeficiente de correlación)	Porcentaje de varianza explicada ^b	Error medio en predicción ^c
Sílice fundida	6	0,9965	98,08%	6,9
Neutro	5	0,9929	97,46%	7,8

^a Número de variables latentes seleccionadas por validación cruzada

^b Porcentaje de varianza explicada en validación cruzada

^c Error medio en predicción calculado mediante validación cruzada (días)

- **Componentes principales (PCA)**

El análisis de componentes principales (PCA) de los picos integrados en los electroferogramas del capilar de sílice fundida, una vez eliminados aquellos de bajo poder modelante (2s, 8s, 10s y 14s), señalaba la necesidad de 7 componentes principales para modelar un 99,66% de las variables predictoras, explicándose el 76,61% entre las dos primeras componentes principales (Tabla 4.29). En esta tabla se puede comprobar cómo la CP₁, que representa el 58,03% de la variación de los datos, está ligada a las caseínas α_{s1} (pico 5s), α_{s0} (pico 7s), y β B (pico 11s) de vaca, y al fragmento de hidrólisis denominado pico 17s. De hecho, como se discutió en el apartado 4.3.2 de resultados, estas caseínas eran las que experimentaban mayores variaciones a lo largo del periodo de maduración estudiado. La Fig. 4.61 muestra la diferenciación que permitía la primera componente principal en cuanto a tiempo de maduración, de izquierda a derecha.

Tabla 4.29. Loadings de las 7 componentes principales calculadas con las áreas de pico de los electroferogramas de quesos mezcla obtenidos con el capilar de sílice fundida.

Pico ^a	Caseína	CP ₁	CP ₂	CP ₃	CP ₄	CP ₅	CP ₆	CP ₇
1s	p-κ (v - o) + α _{s2} (o)	-0,206	-0,348	0,026	-0,501	-0,428	-0,160	-0,099
3s	α _{s2} (v)	-0,301	-0,127	0,126	0,383	-0,152	0,484	-0,018
4s	γ caseína	0,291	0,201	-0,151	0,398	-0,170	0,216	-0,289
5s	α _{s1} (v)	-0,342	0,109	-0,041	-0,001	-0,019	-0,246	0,179
6s	α _{s1} I (o)	0,222	0,164	0,409	0,062	-0,667	-0,020	0,390
7s	α _{s0} (v)	-0,340	0,088	-0,021	0,148	-0,079	-0,227	0,211
9s	α _{s1} III (o) + γ caseína	0,066	0,532	-0,355	-0,062	-0,227	0,054	0,279
11s	β B (v)	-0,341	-0,094	0,095	0,012	-0,132	0,205	-0,018
12s	β A ₁ (v) + β (o) + P	-0,244	-0,148	-0,384	0,501	-0,081	-0,339	0,131
13s	β A ₂ (v) + β ₂ (o) + P	0,035	-0,452	-0,513	-0,092	-0,148	0,423	0,320
15s	Caseína-I-α _{s1}	0,312	0,004	-0,335	-0,175	0,103	-0,151	0,267
16s	Pico 16	0,242	-0,297	0,345	0,157	0,327	0,0734	0,563
17s	P	0,319	-0,196	-0,105	0,016	-0,267	0,018	-0,276
18s	P	0,248	-0,363	0,040	0,314	-0,163	-0,462	-0,123
Proporción de la varianza total		58,03%	18,58%	10,26%	6,016%	4,31%	1,77%	0,68%

^a “s” capilar de sílice fundida

Paralelamente se analizaron mediante componentes principales las áreas de pico de los electroferogramas del capilar neutro, eliminando aquellas de bajo poder modelante (1n, 2n, 6n, 12n, 13n y 16n) (Fig. 4.52). Esta herramienta indicaba la necesidad de considerar 5 componentes principales en el modelo, es decir, de este modo era posible reducir a la mitad la dimensión del problema.

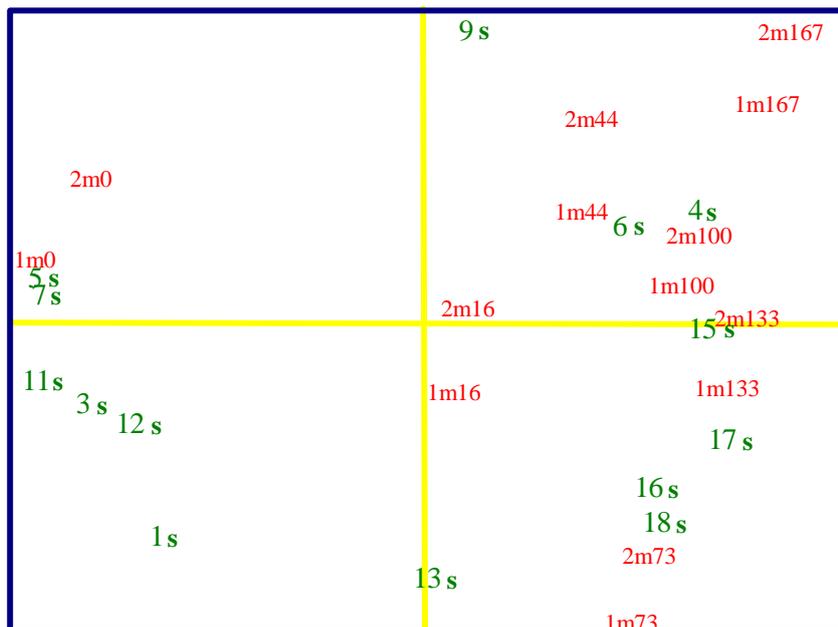


Fig. 4.61. Representación sobre el plano del 1^{er} y 2^o autovector del análisis con PCA de los electroferogramas de queso mezcla con el capilar de sílice fundida. Los números (en verde) se corresponden con las variables originales de acuerdo con sus respectivos *loadings*. Las muestras (en rojo) se sitúan según sus *scores* en estas nuevas componentes; la primera cifra indica el número de réplica, la m hace referencia a queso mezcla y las últimas cifras indican tiempo de maduración en días.

La relación de cada una de las componentes principales con las 10 variables originales se detalla en la Tabla 4.30. La CP₁ explicaba un 72,20% de la varianza de los datos, encontrándose correlacionada con las caseínas α_{s1} , α_{s0} y β B de vaca. La CP₂ estaba ligada a las áreas de los picos 8s (caseína α_{s1} III de oveja, y posiblemente una γ caseína) y 11s (caseína β A₁ de vaca y β de oveja).

Tabla 4.30. *Loadings* de las 5 componentes principales calculadas con las áreas de pico de los electroferogramas de quesos mezcla obtenidos con el capilar neutro.

Pico ^a	Caseína	CP ₁	CP ₂	CP ₃	CP ₄	CP ₅
3n	α_{s2} (v) + γ caseína	-0,314	-0,332	0,227	-0,361	0,518
4n	γ caseína	-0,340	-0,139	0,353	-0,220	-0,248
5n	α_{s1} (v)	0,350	-0,115	0,276	-0,206	-0,263
7n	α_{s0} (v)	0,347	-0,146	0,309	-0,226	-0,075
8n	α_{s1} II (o) + γ caseína	-0,011	0,791	0,531	-0,104	0,025
9n	α_{s1} III (o)	0,349	0,185	-0,093	0,384	0,173
10n	β B (v)	0,356	-0,125	0,138	-0,234	-0,067
11n	β A ₁ (v) + β (o)	0,309	-0,358	0,254	0,312	-0,206
14n	Pico 14	-0,283	-0,176	0,513	0,646	0,080
15n	R	-0,345	0,033	-0,124	0,009	-0,715
Proporción de la varianza total		72,20%	12,05%	8,41%	3,45%	2,37%

^a “n” capilar neutro

- **Regresión sobre componentes principales (PCR)**

Determinadas las componentes principales para los resultados obtenidos con el capilar de sílice fundida se procedió al cálculo de la correlación con el tiempo de maduración de dichas componentes principales (PCR). Los parámetros de la regresión, junto con el coeficiente de correlación, el porcentaje de varianza explicada en validación cruzada y el error medio en predicción se detallan en la Tabla 4.31.

Nuevamente se obtenían para las componentes CP₃ y CP₆ intervalos de confianza que podrían hacer suponer poca capacidad predictora en estas dos componentes. Este hecho, se descartó como en el caso anterior mediante NIPALS, seguido de STEPREG y MULTIREG (Forina *et al.*, 2000), concluyéndose que su inclusión en el modelo no afectaba al resto de

coeficientes de la regresión pero sí mejoraba la varianza explicada en predicción (de 97,73% a 98,17%), y el error medio en predicción (pasando de 7,9 a 6,3 días) aunque no de forma significativa.

Tabla 4.31. Regresión sobre componentes principales (PCR) de muestras de quesos mezcla analizadas con el capilar de sílice fundida.

Componente principal	Parámetro de la regresión		
	Coefficiente	Desviación estándar	Intervalo de confianza
CP ₁	-17,23	0,495	1,213
CP ₂	-7,76	0,876	2,144
CP ₃	-2,05	1,178	2,884
CP ₄	25,73	1,539	3,767
CP ₅	-22,09	1,819	4,453
CP ₆	-5,53	2,839	6,951
CP ₇	-13,44	4,577	11,205
O. en origen	76,14	0,364	3,331
	R²	0,9965	
	Varianza explicada en validación cruzada	98,17%	
	Error medio en predicción en validación cruzada (días)	6,3	

En cuanto a los resultados obtenidos mediante el capilar neutro, también se procedió a efectuar la regresión sobre las componentes principales analizadas previamente. Se obtuvo la relación correspondiente de coeficientes para las diversas componentes principales acompañadas del coeficiente de correlación R^2 , de la varianza explicada en validación cruzada y el error medio en predicción obtenido (Tabla 4.32).

En resumen, del análisis de los resultados de la Tabla 4.28, Tabla 4.31 y Tabla 4.32 se deduce que el error medio en predicción del tiempo de maduración de quesos mezcla analizados con los dos capilares era muy similar,

oscilando entre los 6,3 y 7,8 días para el capilar de sílice fundida (análisis PCR) y para el neutro (análisis PLSC), respectivamente. Dado el gran parecido de los resultados, la elección del capilar más adecuado, podría estar determinada por la mayor facilidad experimental que suponía utilizar el capilar neutro, ya que el número de picos a integrar era menor (únicamente 10 variables, frente a las 13 del capilar de sílice fundida).

Tabla 4.32. Regresión sobre componentes principales (PCR) en muestras de quesos mezcla analizados con el capilar neutro.

Componente principal	Parámetro de la regresión		
	Coefficiente	Desviación estándar	Intervalo de confianza
CP ₁	-18,706	0,818	1,886
CP ₂	-7,304	2,003	4,619
CP ₃	15,264	2,398	5,529
CP ₄	-13,434	3,742	8,628
CP ₅	49,277	4,513	10,406
O. en origen	76,143	0,566	4,885
R²		0,989	
Varianza explicada en validación cruzada		97,17%	
Error medio en predicción en validación cruzada (días)		7,5	

Del estudio global de todos los resultados presentados, se constata la capacidad y precisión de la técnica de electroforesis capilar (EC) para el análisis y seguimiento de la proteólisis primaria a lo largo del proceso de maduración de distintos tipos de quesos. Así como la posibilidad de predicción del grado de maduración de las muestras de queso mediante el tratamiento estadístico de análisis multivariante (PLSC y PCR) aplicado a las áreas de pico de los electroferogramas obtenidos, con errores medios en predicción de 3 y 6 días en quesos de oveja y mezcla, respectivamente.

5. *CONCLUSIONES*

De los resultados obtenidos en el presente trabajo de investigación, pueden destacarse las siguientes conclusiones con relación a:

A) Optimización de la separación de caseínas por EC

1. El aditivo polimérico hidroxipropilmetil celulosa (HPMC) incrementaba considerablemente la resolución entre las caseínas, ya que aportaba un recubrimiento dinámico a la pared interna del capilar cuando se incluía en el tampón de separación
2. Las condiciones óptimas de separación de α_s -, β - y κ -caseína para el *capilar de sílice fundida*, aplicando el diseño de experimentos, fueron las siguientes:

pH del tampón de separación: 3,0

Voltaje aplicado: 18,5 kV

Concentración de HPMC: 0,05% (p/v)

Concentración de urea: 6 M

Temperatura: 23°C

3. Las condiciones óptimas de separación con el *capilar neutro hidrofílicamente recubierto*, aplicando el diseño de experimentos, fueron las siguientes:

pH del tampón de separación: 3,0

Voltaje aplicado: 25,09 kV

Concentración de HPMC: 0,05% (p/v)

Concentración de urea: 6 M

Temperatura: 21°C

4. En las condiciones óptimas seleccionadas con ambos capilares fue posible la separación e identificación en muestras de leche de vaca y oveja de las siguientes caseínas:
 - Leche de vaca: caseína α_{s0} , α_{s1} , α_{s2} , βA_1 , βA_2 , βB y κ .
 - Leche de oveja: caseína α_{s1} (I, II y III), α_{s2} , β , β_1 , β_2 y κ , careciendo de la variante $\alpha_{s1} D$.
5. En las condiciones óptimas seleccionadas solamente fue posible la cuantificación de la caseína α_{s2} con el capilar neutro, debido a su mayor potencial de resolución.
6. En los electroferogramas obtenidos al analizar una mezcla de leche de vaca y oveja fue posible la identificación de todas las caseínas:
 - con el *capilar de sílice fundida* se solapaban seis caseínas, dos a dos, en 3 picos diferentes.
 - con el *capilar neutro* sólo se solapan dos, concretamente la β de oveja con la βA_1 de vaca.
7. La respuesta (área de pico) en el análisis de las caseínas mediante EC con ambos capilares presentaba un comportamiento lineal frente a la concentración de la muestra.
8. Las pruebas sobre repetitividad y precisión en las muestras con ambos capilares rendían valores de desviación estándar relativa (RSD) para el tiempo de migración y el área de pico inferiores al 1,2% y 7%, respectivamente, obteniéndose los mejores resultados para el capilar neutro.

B) Análisis de la hidrólisis enzimática de caseínas mediante EC

1. Los métodos de separación mediante EC optimados para cada uno de los capilares permitían el seguimiento de la hidrólisis de caseína α_s , β y κ por acción de *plasmina*:
 - Los resultados obtenidos con ambos capilares mostraban cómo las caseínas α_{s2} y β eran rápidamente degradadas por la acción de la *plasmina*, mientras que la caseína α_{s0} y κ no resultaban afectadas por la presencia de esta enzima proteolítica en las condiciones de estudio.
 - Los productos de hidrólisis identificados fueron el péptido α_sP (procedente de α_{s1}) y las caseínas γ_2A , γ_1B , γ_1A_1 , γ_3B , γ_1A_2 y γ_3A (liberadas a partir de la caseína β).
 - Cuando una mezcla de caseínas (α_s , β y κ) era tratada con *plasmina* únicamente fue posible identificar las caseínas γ_1B , γ_1A_1 y γ_3A con el capilar neutro.

2. Los métodos de separación mediante EC optimados para cada uno de los capilares permitían el seguimiento de la hidrólisis de caseína α_s , β y κ por acción de *renina*:
 - El seguimiento electroforético realizado a los productos liberados por la acción de la quimosina sobre las caseínas α_s , β y κ mostraba que la única caseína no hidrolizada por esta proteína enzimática era la caseína α_{s2} .
 - Fue posible la identificación de los productos de hidrólisis de la caseína α_{s1} (caseína-I- α_{s1} y péptido f(1-23/24)) y de la caseína α_{s0} (caseína-I- α_{s0}).

- En la hidrólisis de caseína β se identificaron con el *capilar neutro* siete picos, tres de ellos procedían de la degradación de caseína β B y el resto han sido identificados como los fragmentos caseína β I' A₁ y A₂ y caseína β I'' A₁ y A₂.
 - Se observó también mayor poder de resolución del *capilar neutro* al hidrolizar con *quimosina* una mezcla de caseínas.
3. Los métodos de separación mediante EC optimados para cada uno de los capilares permitían el seguimiento de la hidrólisis de caseína α_s , β y κ por acción de *Neutrase*[®]:
- Se constató mayor actividad de este preparado enzimático hacia la β -caseína que hacía la caseína α_s , así como una rápida hidrólisis de la caseína κ .
 - De los numerosos productos liberados durante la hidrólisis con esta proteasa comercial destacar la posible presencia de las caseínas I- α_{s1} y I- α_{s0} , y de alguna caseína γ .

C) Análisis y predicción del estado de maduración de quesos mediante EC

1. Los métodos de análisis mediante EC optimados permitieron el seguimiento de las caseínas α_s y β y la identificación de los principales fragmentos de la proteólisis primaria en queso de oveja y queso mezcla de diferentes tiempos de maduración. Así, en muestras de quesos de oveja y mezcla se detectaron, respectivamente, 16 y 18 picos con el capilar de sílice fundida y 21 y 16 picos con el neutro.
2. En el *queso de oveja*, durante los primeros días de maduración, la proteólisis tenía lugar fundamentalmente sobre las caseínas α_s (especialmente α_{s1} II). A partir de los 102 días se observaba mayor

hidrólisis sobre las caseínas β , siendo la β_1 la más hidrolizada tras 139 días.

3. En el *queso mezcla* las caseínas que sufrían mayor grado de hidrólisis a lo largo del tiempo estudiado fueron las α_{s1} y α_{s0} de vaca, detectándose una hidrólisis preferente sobre las caseínas β de oveja frente a las de vaca.
4. Del análisis multivariante (PCR y PLSC) de las áreas de pico obtenidas por EC con el capilar neutro, se obtuvieron valores de error medio en predicción del tiempo de maduración de quesos de oveja y mezcla de 3,6 y 7,8 días, respectivamente.

Del estudio global de los resultados obtenidos, se constata la capacidad y precisión de la técnica de electroforesis capilar para el análisis y seguimiento de la proteólisis primaria a lo largo de la maduración de quesos de oveja y de mezcla, así como la posibilidad de predicción del tiempo de maduración de muestras de queso mediante análisis multivariante de los datos recogidos por EC.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Addeo, F., Chianese, L., di Luccia, A., Petrilli, P., Mauriello, R. y Anelli, G.** (1983). Identification of bovine casein variants by gel isoelectric focusing. *Milchwissenschaft*, 38, 586-588.
- Addeo, F., Garro, G., Intorcia, N., Pellegrino, L., Resmini, P. y Chianese, L.** (1995). Gel electrophoresis and immunoblotting for the detection of casein proteolysis in cheese. *Journal of Dairy Research*, 62, 297-309.
- Addeo, F., Mauriello, R., Moio, L., Laezza, P., Chianese, L. y di Luccia, A.** (1992). Ovine casein variant identification using electrophoretic, immunochemical and chromatographic techniques. *Milchwissenschaft*, 47, 283-287.
- Aebersold, R. y Morrison, H.D.** (1990). Analysis of dilute peptide samples by capillary zone electrophoresis. *Journal of Chromatography*, 516, 79-88.
- Aimutis, W.R. y Eigel, W.N.** (1982). Identification of λ -casein as plasmin-derived fragments of bovine α_{s1} -casein. *Journal of Dairy Science*, 65, 175-181.
- Altria, K.D., Clark, B.J., Filbey, S.D., Kelly, M.A. y Rudd, D.R.** (1995). Application of chemometric experimental designs in capillary electrophoresis: A review. *Electrophoresis*, 16, 2143-2148.
- Altria, K.D. y Filbey, S.D.** (1994). The application of experimental design to the robustness testing of a method for the determination of drug-related impurities by capillary electrophoresis. *Chromatographia*, 39, 306-310.
- Amigo, L., Recio, I. y Ramos, M.** (2000). Genetic polymorphism of ovine milk proteins: its influence on technological properties of milk – a review. *International Dairy Journal*, 10, 135-149.
- Andrews, A.T.** (1979). The formation and structure of some proteasepeptone components. *Journal of Dairy Research*, 46, 215-218.
- Andrews, A.T. y Alichanidis, E.** (1983). Proteolysis of caseins and the protease-peptone fraction of bovine milk. *Journal of Dairy Research*, 50, 275-290.
- Andrews, A.T., Taylor, M.D. y Owen, A.J.** (1985). Rapid analysis of bovine milk proteins by fast protein liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 348, 177-185.
- Ardö, Y.** (2002). Cheese ripening. General mechanisms and specific cheese varieties. *Bulletin of the International Dairy Federation*, 369, 7-12.

- Ardö, Y. y Madsen, J.S.** (1998). Evaluation of biochemical methods to analyse cheese characteristics derived from milk microflora activities. En: *Proceedings, COST Action 95 Symposium-Quality and Microbiology of Traditional and Raw Milk Cheeses*, Dijon, France.
- Arnaiz, G.** (1986). Modelos de rango no total. En: *Introducción a la Estadística Teórica*, (G. Arnaiz, ed.). Lex Nova, Valladolid, pp. 748-781.
- Bastian, E.D. y Brown, R.J.** (1996). Plasmin in milk and dairy products. An update. *International Dairy Journal*, 6, 435-457.
- Benfeldt, C. y Sørensen, J.** (2001). Heat treatment of cheese milk: effect on proteolysis during cheese ripening. *International Dairy Journal*, 11, 567-574.
- Benfeldt, C., Sørensen, J., Ellegård, K.H. y Petersen, T.E.** (1997). Heat treatment of cheese milk: effect on plasmin activity and proteolysis during cheese ripening. *International Dairy Journal*, 7, 723-731.
- Boisnard, M., Hue, D., Bouniol, C., Mercier, J.C. y Gaye, P.** (1991). Multiple mRNA species code for two non-allelic forms of ovine α_{s2} -casein. *European Journal of Biochemistry*, 201, 633-641.
- Boisnard, M. y Petrissant, G.** (1985). Complete sequence of ovine α_{s2} -casein messenger RNA. *Biochimie*, 67, 1043-1051.
- Bovenhuis, H. y Verstege, A.J.M.** (1989). Improved method for phenotyping milk protein variants by isoelectric focusing using PhastSystem. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 43, 447-451.
- Box, G.E.P. y Draper, N.R.** (1987). *Empirical Model-Building and Response Surfaces*. John Wiley & Sons, Inc., New York.
- Box, G.E.P. y Hunter, J.S.** (1978). *Statistics for Experiments: An Introduction to Design, Data Analysis and Model Building*. Wiley, New York.
- Box, G.E.P., Hunter, W.G. y Hunter, J.S.** (1989). *Estadística para Investigadores: Introducción al Diseño de Experimentos, Análisis de Datos y Construcción de Modelos*. Reverté, Barcelona.
- Braconnot, H.** (1830). Mèmoire sur le caséum et sur le lait: nouvelles ressources qu'ils peuvent offrir à la société. *Annales de Chimie et de Physique*, 43, 337-351.

- Braun, F., Krause, I. y Klostermeyer, H.** (1990). Efficient determination of skim milk powder, casein, whey-protein and total milk protein in compound feedingstuffs by isoelectric-focusing and laser densitometry. *Milchwissenschaft*, 45, 1-9.
- Breen, E.D.** (1992). Fractionation and identification of water-soluble and water-insoluble cheese nitrogen. *Msc thesis, National University of Ireland, Cork*.
- Breen, E.D., Fox, P.F. y McSweeney, P.L.H.** (1995). Fractionation of water-soluble peptides from Cheddar cheese. *Italian Journal of Food Science*, 7, 211-220.
- Brereton, R.G.** (1990). Multivariate calibration. En: *Chemometrics: Applications of Mathematics and Statistics to Laboratory Systems*, (R.G. Brereton, ed.). Ellis Horwood Ltd., West Sussex, pp. 209-238.
- Brignon, G., Ribadeau-Dumas, B., Mercier, J.C. y Pelissier, J.P.** (1977). Complete amino acid sequence of bovine α_{s2} casein. *FEBS Letters*, 76, 274-279.
- Broadbent, J.R., Strickland, M., Weimer, B.C., Johnson, M.E. y Steele, J.L.** (1998). Peptide accumulation and bitterness in Cheddar cheese made using single-strain *Lactococcus lactis* starters with distinct proteinase specificities. *Journal of Dairy Science*, 81, 327-337.
- Brown, J.R., Law, A.J.R. y Knight, C.H.** (1995). Changes in casein composition of goats' milk during the course of lactation: physiological inferences and technological implications. *Journal of Dairy Research*, 62, 431-439.
- Bruin, G.J.M., Huisden, R., Kraak, J.C. y Poppe, H.** (1989). Performance of carbohydrate-modified fused silica capillaries for the separation of proteins by zone electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, 480, 339-350.
- Bushey, M. y Jorgenson, J.** (1989). Capillary electrophoresis of proteins in buffers containing high concentrations of zwitterionic salts. *Journal of Chromatography A*, 480, 301-310.
- Cattaneo, T.M.P., Nigro, F., Toppino, P.M. y Denti, V.** (1996). Characterization of ewe's milk by capillary zone electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, 721, 345-349.
- Cenzano, I.** (1992). Producción de Quesos en España. En: *Los quesos*, (I. Cenzano, ed.). AMV Ediciones y Mundi-Prensa Libros, S.A., Madrid, p. 33.

- Chaplin, L.C.** (1986). Hydrophobic interaction fast protein liquid chromatography of milk proteins. *Journal of Chromatography*, 363, 329-335.
- Chapman, K.W., Lawless, H.T. y Boor, K.J.** (2001). Quantitative descriptive analysis and principal component analysis for sensory characterization of ultrapasteurized milk. *Journal of Dairy Science*, 84, 12-20.
- Cheftel, J.C., Cuq, J.L. y Lorient, D.** (1989). *Proteínas Alimentarias: Bioquímica. Propiedades Funcionales. Valor nutritivo. Modificaciones Químicas*. Acribia, Zaragoza.
- Chen, F.T.A., Kelly, L., Palmieri, R., Biehler, R. y Schwartz, H.** (1992). Use of high ionic strength buffers for the separation of proteins and peptides with capillary electrophoresis. *Journal of Liquid Chromatography*, 15, 1143-1161.
- Chen, J.H. y Ledford, R.A.** (1971). Purification and characterization of milk protease. *Journal of Dairy Science*, 54, 763-770.
- Chen, F.T.A. y Zang, J.H.** (1992). Determination of milk proteins by capillary electrophoresis. *Journal of AOAC International*, 75, 905-909.
- Cherkaoui, S., Doumenc, N., Tachon, P., Neeser, J.R. y Veuthey, J.L.** (1997). Development of a capillary zone electrophoresis method for caseinoglycomacropptide determination. *Journal of Chromatography A*, 790, 195-205.
- Chianese, L.** (1997). The casein variants of ovine milk and the relationships between the α_{s1} -casein variants and milk composition, micellar size and cheese yield. En : *Caseins and caseinates : Structures, Interactions, Networks*. Hannah Symposium. Scotland, United Kingdom.
- Chianese, L., Garro, G., Addeo, F., López-Gálvez, G. y Ramos, M.** (1993). Discovery of an ovine α_{s2} -casein variant. *Journal of Dairy Research*, 60, 485-493.
- Chianese, L., Garro, G., Mauriello, R., Laezza, P., Ferranti, P. y Addeo, F.** (1996). Occurrence of five α_{s1} -casein variants in ovine milk. *Journal of Dairy Research*, 63, 49-59.
- Chianese, L., Mauriello, R., Moio, L., Intorcchia, N. y Addeo, F.** (1992). Determination of ovine casein heterogeneity using gel electrophoresis and immunochemical techniques. *Journal of Dairy Research*, 59, 39-47.

- Cobb, G.W.** (1998). *Introduction to Design and Analysis of Experiments*. Springer cop., New York.
- Creamer, L.K.** (1991). Electrophoresis of cheese. *Bulletin of the International Dairy Federation*, 261, 14–28.
- Creamer, L.K. y Olson, N.F.** (1982). Rheological evaluation of maturing Cheddar cheese. *Journal of Food Science*, 47, 631-636, 646.
- Creamer, L.K. y Richarson, N.F.** (1974). Identification of the primary degradation product of α_{s1} -casein in Cheddar cheese. *New Zealand Journal of Dairy Science and Technology*, 9, 9-13.
- Crufferty, M.B. y Fox, P.F.** (1988). Milk alkaline protease. *Journal of Dairy Research*, 55, 609-616.
- Dagleish, D.G.** (1979). Proteolysis and aggregation of casein micelles treated with immobilized or soluble chymosin. *Journal of Dairy Research*, 46, 653-655.
- Dagleish, D.G.** (1987). The enzymatic coagulation of milk. En: *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology. Vol. 1: General Aspects*, (P.G. Fox, ed.). Elsevier Applied Science, London, pp. 63-96.
- de Jong, N., Visser, S. y Olieman, C.** (1993). Determination of milk proteins by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, 652, 207-213.
- di Gregorio, P., Rando, A., Pieragostini, E. y Masina, P.** (1991). DNA polymorphism at the casein loci in sheep. *Animal Genetics*, 22, 21-30.
- Diem, K. y Lentner, C.** (1975). Soluciones acuosas. En: *Tablas Científicas*, (M. Geigy, ed.). Sadag Color, Barcelona, pp. 276-290.
- Donnelly, W.J., McNeil, G.P., Buchheim, W. y McGam, T.C.A.** (1984). A comprehensive study of the relationship between size and protein-composition in natural bovine casein micelles. *Biochimica et Biophysica Acta*, 789, (2), 136-143.
- Draper, N.R. y Smith, H.** (1981). *Applied Regression Analysis*, 2nd edition. Wiley Series in Probability and Mathematical Statistics, New York.
- Driessen, F.M. y Van der Waals, C.B.** (1978). Inactivation of native milk proteinase by heat treatment. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 32, 245-254.
- Eigel, W.N.** (1977). Effect of bovine plasmin on α_{s1} -, β - and κ -caseins. *Journal of Dairy Science*, 60, 1399-1403.

- Eigel, W.N., Butler, J.E., Ernstrom, C.A., Farrel, H.M., Harwalkar, V.R., Jenness, R. y Whitney, R. McL.** (1984). Nomenclature of proteins of cow's milk: fifth revision. *Journal of Dairy Science*, 67, 305-310.
- El Soda, M.** (1993). Accelerated maturation of cheese. *International Dairy Journal*, 3, 531-544.
- El Soda, M. y Pandian, S.** (1991). Recent developments in accelerated cheese ripening. *Journal of Dairy Science*, 74, 2317-2335.
- Emmer, Å., Jansson, M. y Roeraade, J.** (1991). Improved capillary zone electrophoretic mixtures in capillary zone electrophoresis. *Analytical Chemistry*, 63, 69-72.
- Exterkate, F.A. y Alting, A.C.** (1995). The role of starter peptidases in the initial proteolytic events leading to amino acids in Gouda cheese. *International Dairy Journal*, 5, 15-28.
- Ezzat, N.** (1990). Accelerated ripening of Ras cheese with a commercial proteinase and intracellular enzymes from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Propionibacterium freudenreichii* and *Brevibacterium linens*. *Lait*, 70, 459-466.
- Farkye, N.Y. y Fox, P.F.** (1990). Objective indices of cheese ripening. *Trends in Food Science and Technology*, 1, 37-40.
- Farkye, N.Y. y Fox, P.F.** (1992). Contribution of plasmin to Cheddar cheese ripening: effect of added plasmin. *Journal of Dairy Research*, 59, 786-788.
- Farrell Jr., H.M., Kumosinski, T.F., Cooke, P.H. y King, G.** (1997). Particle sizes of purified κ -casein: metal effect, and correspondence with predicted 3D molecular models. *Journal of Dairy Science*, 80, 110-114.
- Fell, A.F., Small, T.S., Coleman, M.W., Kinns, M. y Berridge, J.C.** (1995). *Presented at HPCE'95, Würzburg.*
- FENIL.** (1998). La Producción Quesera en España supera las 270.000 Tm al año. *Industrias Lácteas Españolas*, 231, 19-24.
- Fernández del Pozo, B., Gaya, P., Medina, M., Rodríguez-Marín, M.A. y Núñez, M.** (1988). Changes in chemical and rheological characteristics of La Serena ewe's milk cheese during ripening. *Journal of Dairy Research*, 55, 457-464.

- Fernández-García, E. y López-Fandiño, R.** (1994). Revisión: Maduración acelerada de quesos de leche de oveja. *Revista Española de Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 34, 353-367.
- Fernández-García, E., López-Fandiño, R., Alonso, L.P. y Ramos, M.** (1994). The use of lipolytic and proteolytic enzymes in the manufacture of Manchego-type cheese from ovine and bovine milk. *Journal of Dairy Science*, 77, 2139-2149.
- Fernández-García, E., López-Fandiño, R., Olano, A. y Ramos, M.** (1990). Comparative study of the proteolytic activity of a *Bacillus subtilis* neutral protease preparation during early stages of ripening of cheeses made from cow's and ewe's milk. *Milchwissenschaft*, 45, 428-431.
- Fernández-Salguero, J., Marcos, A., Alcalá, M. y Esteban, M.A.** (1989). Proteolysis of Cabrales cheese and other European blue cheese varieties. *Journal of Dairy Research*, 56, 141-145.
- Ferranti, P., Chianese, L., Malorni, A., Migliaccio, F., Stingo, V. y Addeo, F.** (1998). Copresence of deleted protein species generates structural heterogeneity of ovine α_{s1} -casein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 411-416.
- Ferranti, P., Malorni, A., Nitti, G., Laezza, P., Pizzano, R., Chianese, L. y Addeo, F.** (1995). Primary structure of ovine α_{s1} -caseins: localization of phosphorylation sites and characterization of genetic variants A, C and D. *Journal of Dairy Research*, 62, 281-296.
- Foret, F., Szoko, E. y Karger, B.L.** (1993). Trace analysis of proteins by capillary zone electrophoresis with on-column transient isotachophoretic preconcentration. *Electrophoresis*, 14, 417-428.
- Forina, M., Lanteri, S. y Armanino, C.** (2000). Q-PARVUS 3.0. An extendable package of programs, for data explorative analysis, classification and regression analysis. Dipartimento Chimica e Tecnologie Farmaceutiche ed Alimentari. Universidad de Génova. Italia.
- Fox, P.F.** (1981). Proteinases in dairy technology. *Netherlands Milk Dairy Journal*, 35, 233-253.
- Fox, P.F.** (1989). Proteolysis during cheese manufacture and ripening. *Journal of Dairy Science*, 72, 1379-1400.

- Fox, P.F. y Guiney, J.** (1973). Casein micelle structure: susceptibility of various casein systems to proteolysis. *Journal of Dairy Research*, 40, 229-235.
- Fox, P.F., Law, J., McSweeney, P.L.H. y Singh, T.K.** (1995). Methods for assessing proteolysis in cheese during ripening. En: *Chemistry of Structure/Function Relationships in Cheese*, (E.L. Malin y M.H. Tunick, eds.). Plenum Publ Corporation, New York, pp. 161-194.
- Fox, P.F., Law, J., McSweeney, P.L.H. y Wallace, J.** (1993). Biochemistry of cheese ripening. En: *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology. Vol. 1: General Aspect*, (P.F. Fox, ed.). Chapman and Hall, London, pp. 389-438.
- Fox, P.F. y Stepaniak, L.** (1993). Enzymes in cheese technology. *International Dairy Journal*, 3, 509-530.
- Frau, M., Simal, S., Femenia, A., Sanjuán, E. y Roselló, C.** (1999). Use of principal component analysis to evaluate the physical properties of Mahon cheese. *European Food Research Technology*, 210, 73-76.
- Fresta, M., Wehrli, E. y Puglisi, G.** (1995). Neutrase entrapment in stable multilamellar and large unilamellar vesicles for the acceleration of cheese ripening. *Journal of Microencapsulation*, 12, 307-325.
- Gaiaschi, A., Beretta, B., Poiesi, C., Conti, A., Giuffrida, M.G., Galli, C.L. y Restani, P.** (2000). Proteolysis of α_s -casein as a marker of Grana Padano cheese ripening. *Journal of Dairy Science*, 83, 2733-2739.
- Gaiaschi, A., Beretta, B., Poiesi, C., Conti, A., Giuffrida, M.G., Galli, C.L. y Restani, P.** (2001). Proteolysis of β -casein as a marker of Grana Padano cheese ripening. *Journal of Dairy Science*, 84, 60-65.
- Gao, J., Gomez, F.A., Harter, R. y Whitesides, G.M.** (1994). Determination of the effective charge of a protein in solution by capillary electrophoresis. *Proceeding of the National Academy of Science of the United States*, 91, 12027.
- García-Risco, M.R., Molina, E., Ramos, M. y López-Fandiño, R.** (2000). Capillary electrophoresis and Western blotting detection of ovine and caprine cheese whey added to bovine milk. *Milchwissenschaft*, 55, (10), 555-559.
- García-Ruiz, A., Cabezas, L., Martín-Álvarez, P.J. y Cabezudo, D.** (1998). Prediction of the ripening times of Manchego cheese using multivariate statistical

analyse: a preliminary study. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung A*, 206, 382-386.

- García-Ruiz, A., López-Fandiño, R., Lozada, L., Fontecha, J., Fragas, M.J. y Juárez, M.** (2000). Distribution of nitrogen in goats' milk and use of capillary electrophoresis to determine casein fractions. *Journal of Dairy Research*, 67, 113-117.
- Gilges, M., Husmann, H., Kleemiß, M.H., Motsch, S.R. y Schomberg, G.** (1992). CZE separation of basic proteins at low pH in fused silica capillaries with surfaces modified by silane derivatization and/or adsorption of polar polymers. *Journal of High Resolution Chromatography*, 15, 452-458.
- Girardet, J.-M., Saulnier, F., Driou, A., Linden, G., Codeville, G. y Spik, G.** (1994). High performance electrophoresis chromatography of bovine milk component 3 glycoproteins. *Journal of Dairy Science*, 77, 1205-1215.
- Gonzalez de Llano, D., Polo, M.C. y Ramos, M.** (1991). Production, isolation and identification of low molecular mass peptides from blue cheese by high performance liquid chromatography. *Journal of Dairy Research*, 58, 363-372.
- Gordon, W.G. y Groves, M.L.** (1974). Primary sequence of beta, gamma and minor caseins. *Journal of Dairy Science*, 58, 574-582.
- Gouldsworthy, A.M., Banks, J.M., Law, A.J.R. y Leaver, J.** (1999). Casein degradation in Cheddar cheese monitored by capillary electrophoresis. *Milchwissenschaft*, 54, 620-623.
- Green, M.L., Hobbs, D.G., Morant, S.V. y Hill, V.A.** (1978). Intermicellar relationships in rennet-treated separated milk. 2. Process of gel assembly. *Journal of Dairy Research*, 45, (3), 413-421.
- Groves, M.L., Gordon, W.G., Kalan, E.B. y Jones, S.B.** (1973). TS-A₂, TS-B, R and S caseins; their isolation, composition and relationship to the β and γ casein polymorphs A₂ and B. *Journal of Dairy Science*, 56, 558-568.
- Guindeo, M.J., Astiasaran, I. y Bello, J.** (1990). Estudio del proceso de maduración del queso de Urbasa elaborado de modo artesanal con leche de oveja de raza lacha. *Revista Agroquímica de Tecnología Alimentaria*, 30, 469-480.
- Guinee, T.P. y Wilkinson, M.G.** (1992). Rennet coagulation and coagulants in cheese manufacture. *Journal of the Society of Dairy Technology*, 45, 90-104.

- Guinee, T.P., Wilkinson, M.G., Nulholland, E.O. y Fox, P.F.** (1991). Influence of ripening temperature, added commercial enzyme preparations and attenuated mutant (Lac⁻) *Lactococcus lactis* starter on the proteolysis and maturation of Cheddar cheese. *Irish Journal of Food Science and Technology*, 15, (1-2), 27-52.
- von Helmholtz, H.L.F.** (1879). About electrical interfaces (translated title). *Ann. Phys. Chem.*, 7, 337.
- Herrero-Martínez, J.M., Simó-Alfonso, E.F., Ramis-Ramos, G., Gelfi, C. y Righetti, P.G.** (2000). Determination of cow's milk and ripening time in nonbovine cheese by capillary electrophoresis of the ethanol-water protein fraction. *Electrophoresis*, 21, 633-640.
- Hjertén, S.** (1983). High performance electrophoresis: the electrophoretic counterpart of high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography*, 270, 1-6.
- Hjertén, S.** (1985). High performance electrophoresis, elimination of electroendosmosis and solute adsorption. *Journal Chromatography*, 347, 191-198.
- Hoagland, P.D., Thompson, M.P. y Kalan, E.B.** (1971). Amino acid composition of α_{s3} -, α_{s4} -, and α_{s5} -caseins. *Journal of Dairy Science*, 54, 1103-1110.
- Holt, C.** (1975). En: *Proceeding of the International Conference of Surface Science*, (E. Wolfram, ed.). Akademiai Kiado, Budapest, pp. 641-672.
- Hotelling, H.** (1933). Analysis of a complex of statistical variables into principal components. *Journal of Educational Psychology*, 24, 417-441, 498-520.
- Ibáñez, F.C. y Barcina, Y.** (1994). Compuestos nitrogenados en el queso. *Alimentación, Equipos y Tecnología*, Diciembre, 67-71.
- Irigoyen, A., Izco, J.M., Ibáñez, F.C. y Torre, P.** (2000). Evaluation of the effect of rennet type on casein proteolysis in an ovine milk cheese by means of capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, 881, 59-67.
- Issaq, H.J., Janini, G.M., Atamna, I.Z. y Muschik, G.M.** (1991). Separations by high performance liquid chromatography and capillary electrophoresis: a comparative study. *Journal of Liquid Chromatography*, 14, 817-845.
- Izawa, N., Izumi, T., Asakawa, S. y Hayashi, K.** (1997). Application of capillary electrophoresis to the study of proteolysis during ripening of Gouda-type cheese. *Journal of Japanese Society of Food Science and Technology*, 44, 871-876.

- Izco, J.M., Ordóñez, A.I., Torre, P. y Barcina, Y.** (1999a). Validation of capillary electrophoresis in the analysis of ewe's milk casein. *Journal of Chromatography A*, 832, 239-246.
- Izco, J.M., Torre, P. y Barcina, Y.** (1999b). Capillary electrophoresis: Evaluation of the effect of added enzymes on casein proteolysis during the ripening of a ewe's-milk cheese. *Advances in Food Sciences*, 21, 110-116.
- Jollès, P. y Fiat, A.M.** (1979). The carbohydrate portions of milk glycoproteins. *Journal of Dairy Science*, 46, 187-191.
- Jollès, J., Fiat, A.M., Schoentgen, F., Alais, C. y Jollès, P.** (1974). The amino acid sequence of sheep κ_A -casein. II. Sequence studies concerning the κ_A -caseinoglycopeptide and establishment of the complete primary structure of the protein. *Biochimica et Biophysica Acta*, 365, 335-343.
- Jollès, J.F., Schoentgen, F., Alais, C. y Jollès, P.** (1972). Studies on the primary structure of cow κ -casein: the primary sequence of cow para κ -casein. *Chimia*, 26, 645-646.
- Jorgenson, J.W. y Lukacs, K.D.** (1981). Zone electrophoresis in open tubular glass capillaries. *Analytical Chemistry*, 53, 1298-1302.
- Jumppanen, J.H., Wiedmer, S.K., Siren, H., Riekkola, M.L. y Haario, H.** (1994). Optimized separation of 7 corticosteroids by micellar electrokinetic chromatography. *Electrophoresis*, 15, 1267-1272.
- Kaminogawa, S., Mizobuchi, H. y Yamouchi, K.** (1972). Comparison of bovine milk protease with plasmin. *Agricultural Biology and Chemistry*, 36, 2163-2168.
- Kanning, M., Casella, M. y Olieman, C.** (1993). Milk and soy protein analysis using capillary zone electrophoresis. *LC-LG International*, 6, 701-706.
- King, J.W.B.** (1967). The caseins of sheep's milk. En: *Polymorphismes Biochimiques des Animaux, (European Conference on Animal Blood Groups and Biochemical Polymorphisms no 10, 1966)*. INRA, Paris, pp. 427-431.
- Kirby, C.J. y Law, B.** (1987). Developments in the microencapsulation of enzymes in food technology. En: *Chemical Aspects of Food Enzymes*, (A.T. Andrews, ed.). Royal Society of Chemistry, London, pp. 106-119.

- Kitchen, B.J.** (1985). Indigenous milk enzymes. En: *Developments in Dairy Chemistry, Vol. 3*, (P.F. Fox, ed.). Applied Science Publishers, London, pp. 239-252.
- Knox, J.H.** (1988). Thermal effects and band spreading in capillary electroseparation. *Chromatographia*, 26, 329-337.
- Kristiansen, K.R., Otte, J., Zakora, M. y Qvist, K.B.** (1994). Capillary electrophoresis used to monitor the enzymatic hydrolysis of caseins and the fractionation of hydrolysis products. *Milchwissenschaft*, 49, (12), 683-687.
- Kuchroo, C.N. y Fox, P.F.** (1982). Fractionation of water-soluble nitrogen from Cheddar cheese: chemical methods. *Milchwissenschaft*, 37, 651-653.
- Lagerwerf, F.M., van Wasseenaar, P.D. y Haverkamp, J.** (1995). Comparison of Cheddar cheeses produced with recombinant chymosin with calf rennet using two dimensional high-performance liquid chromatography. *Journal of Dairy Research*, 62, 673-679.
- Landers, J.P.** (1997). *Handbook of Capillary Electrophoresis*. CRC Press, Boca Ratón.
- Landers, J.P., Oda, R.P. y Spelsberg, T.C.** (1993). Capillary electrophoresis: A powerful microanalytical technique for biologically active molecules. *BioTechniques*, 14, 98-106.
- Lanteri, S.** (1992). Full validation procedures for feature selection in classification and regression problems. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 15, 159-169.
- Lauer, H.H. y McManigill, D.** (1986). Capillary zone electrophoresis of proteins in untreated fused silica tubing. *Analytical Chemistry*, 58, 166-170.
- Law, A.J.R.** (1993). Quantitative examination of genetic polymorphism in κ - and β -caseins by anion- and cation-exchange FPLC. *Milchwissenschaft*, 48, 243-247.
- Law, A.J.R., Horne, D.S., Banks, J.M. y Leaver, J.** (1994). Heat-induced changes in the whey proteins and caseins. *Milchwissenschaft*, 49, 125-129.
- Law, A.J.R., Papoff, C.M., Dalgleish, D.G. y Campus, R.L.** (1992). Quantitative fractionation of ovine casein by cation-exchange FPLC. *Milchwissenschaft*, 47, (5), 279-282.

- Law, B.A.** (2001). Controlled accelerated cheese ripening: the research base for new technologies. *International Dairy Journal*, 11, 383-398.
- Law, B.A. y King, J.S.** (1985). Use of liposomes for proteinase addition to Cheddar cheese. *Journal of Dairy Research*, 52, 183-188.
- Law, B.A. y Wigmore, A.S.** (1983). Accelerated ripening of Cheddar cheese with a commercial proteinase and intracellular enzymes from starter streptococci. *Journal of Dairy Research*, 50, 519-525.
- Le Bars, D. y Gripon, J.C.** (1989). Specificity of plasmin towards bovine α_{s2} -casein. *Journal of Dairy Research*, 56, 817-821.
- Ledford, R.A., O'Sullivan, A.C. y Nath, K.R.** (1966). Residual casein fractions in ripened cheese determined by polyacrylamide-gel electrophoresis. *Journal of Dairy Science*, 49, 1098-1101.
- Lindeberg, J.** (1996). Capillary electrophoresis in food analysis. *Food Chemistry*, 55, (1), 73-94.
- López-Fandiño, R., Ramos, M., Fernández-García, E. y Olano, A.** (1991). Proteolytic activity of two commercial proteinases from *Aspergillus oryzae* and *Bacillus subtilis* on ovine and bovine caseins. *Journal of Dairy Research*, 58, 461-467.
- López-Gálvez, G.** (1993). Study of the polymorphism of ovine milk proteins in Manchega and Segureña breeds. Coagulation properties and cheese yield. *PhD thesis. Universidad Complutense de Madrid.*
- López-Gálvez, G., Ramos, M. y Juárez, M.** (1994). Revisión. Polimorfismo genético de las proteínas de leche de oveja. *Revista Española de Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 34, (6), 609-622.
- López-Gálvez, G., Ramos, M., Martín Álvarez, P.J. y Juárez, M.** (1993). Influence of milk protein polymorphism on cheese producing ability in the milk of Manchega ewes breed. *Cheese Yield & Factors Affecting its Control, IDF Seminar, Cork*, 167-173.
- Macedo, A.C. y Malcata, F.X.** (1997). Hydrolysis of α_s - and β -caseins during ripening of Serra cheese. *Food Chemistry*, 58, 43-48.

- Macedo, I.Q., Faro, C.J. y Pires, E.M.** (1996). Caseinolytic specificity of Cardosin, an aspartic protease from the Cardoon *Cynara cardunculus* L.: action on bovine α_s - and β -casein and comparison with Chymosin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 42-47.
- Martin, P.** (1993). Biochemical characteristics and quality of goat milk. *Lait*, 73, 511-532.
- Massart, D.L., Vandeginste, B.G.M., Deming, S.N., Michotte, Y. y Kaufman, L.** (1988). *Chemometrics: A textbook*. Elsevier Science Publishers, Amsterdam.
- McCormick, R.M.** (1988). Capillary zone electrophoresis separation of peptides and proteins using low pH buffers in modified silica capillaries. *Analytical Chemistry*, 60, 2322-2338.
- McGam, T.C.A., Donnelly, W.J., Kearney, R.D. y Buchheim, W.** (1980). Composition and size distribution of bovine casein micelles. *Biochimica et Biophysica Acta*, 630, (2), 261-270.
- McLaughlin, G.M., Nolan, J.A., Lindahl, J.L., Palmieri, R.H., Anderson, K.W., Morris, S.C., Morrison, J.A. y Bronzart, T.J.** (1992). Pharmaceutical drug separations by HPLC: practical guidelines. *Journal of Liquid Chromatography*, 15, 961-1021.
- McSweeney, P.L.H. y Fox, P.F.** (1993). Cheese, methods of chemical analysis. En: *Cheese, Chemistry, Physics and Microbiology. Vol. 1. General Aspects*, (P.F. Fox, ed.). Chapman and Hall, London, pp. 341-388.
- McSweeney, P.L.H. y Fox, P.F.** (1997). Chemical methods for the characterization of proteolysis in cheese during ripening. (Review). *Lait*, 77, 41-76.
- McSweeney, P.L.H., Olson, N.F., Fox, P.F. y Healy, Á.** (1994a). Proteolysis of bovine α_{s2} -casein by chymosin. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung*, 199, 429-432.
- McSweeney, P.L.H., Olson, N.F., Fox, P.F., Healy, Á. y Hojrup, P.** (1993). Proteolytic specificity of chymosin on bovine α_{s1} -casein. *Journal of Dairy Research*, 60, 401-412.

- McSweeney, P.L.H., Pochet, S., Fox, P.F. y Healy, Á.** (1994b). Partial identification of peptides from water-insoluble fraction of Cheddar cheese. *Journal of Dairy Research*, 61, 587-590.
- Manterola, H.** (1999). Situación actual y perspectivas de la producción de leche y quesos con rumiantes menores en Chile. *Circular de Extensión. Publicación Técnico Ganadera. Departamento de Producción Animal. N° 25.*
- Melachouris, N.P. y Tuckey, S.L.** (1966). Changes in the proteins in Cheddar cheese made from milk heated at different temperatures. *Journal of Dairy Science*, 49, 800-805.
- Meloun, M., Militk, J. y Forina, M.** (1992). *Chemometrics for Analytical Chemistry. Volume 1: PC-aided Statistical Data Analysis.* Ellis Horwood, New York.
- Mendia, C., Ibañez, F.J., Torre, P. y Barcina, Y.** (2000). Effect of pasteurization and use of a native starter culture on proteolysis in an ewes' milk cheese. *Food Control*, 11, 195-200.
- Mercier, J.C.** (1981). Phosphorylation of caseins, present evidence for an aminoacid triplet code post translationally recognized by specific kinases. *Biochimie*, 63, 1-17.
- Mercier, J.C., Brignon, G. y Ribadeau-Dumas, B.** (1973). Structure primaire de la caséine κ B bovine. Séquence complète. *European Journal of Biochemistry*, 35, 222-235.
- Mercier, J.C., Grosclaude, F. y Ribadeau-Dumas, B.** (1971). Structure primaire de la caséine α_{s1} B bovine. Séquence complète. *European Journal of Biochemistry*, 23, 41-51.
- Miralles, B., Bartolomé, B., Amigo, L. y Ramos, M.** (2000a). Comparison of three methods to determine the whey protein to total protein ratio in milk. *Journal of Dairy Science*, 83, 2759-2765.
- Miralles, B., Ramos, M. y Amigo, L.** (2000b). Application of capillary electrophoresis to the characterization of processed cheeses. *Journal of Dairy Research*, 67, 91-100.
- Miralles, B., Rothbauer, V., Manso, M.A., Amigo, L., Krause, I. y Ramos, M.** (2001). Improved method for the simultaneous determination of whey proteins,

- caseins and *para*- κ -casein in milk and dairy products by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, 915, 225-230.
- Molina, E., de Frutos, M. y Ramos, M.** (2000). Capillary electrophoresis characterization of the casein fraction of cheeses made from cows', ewes' and goats' milks. *Journal of Dairy Research*, 67, 209-216.
- Molina, E., Martín-Álvarez, P.J. y Ramos, M.** (1999). Analysis of cow's, ewe's and goat's milk mixtures by capillary electrophoresis: quantification by multivariate regression analysis. *International Dairy Journal*, 9, 99-105.
- Molina, E., Ramos, M. y Amigo, L.** (2002). Characterisation of the casein fraction of Ibérico cheese by electrophoretic techniques. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82, 1240-1245.
- Molina, E., Ramos, M., Cifuentes, A. y López-Fandiño, R.** (1998). Characterization of cheese proteolysis by capillary electrophoresis and reverse-phase HPLC analyses of peptides. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung A*, 206, 259-263.
- Moring, S.E.** (1996). Buffers, electrolytes, and additives for capillary electrophoresis. En: *Capillary Electrophoresis in Analytical Biotechnology*, (P.G. Righetti, ed.). CRC Press, Boca Ratón, pp. 37-60.
- Muijellar, W.G.H.M., de Bruijn, C.H.M.M. y Everaerts, F.M.** (1992). Capillary zone electrophoresis of proteins with a dynamic surfactant coating - Influence of a voltage gradient on the separation efficiency. *Journal of Chromatography*, 605, (1), 115-123.
- Ng-Kawai-Hang, K.F. y Grosclaude, F.** (1992). Genetic polymorphism of milk proteins. En: *Advanced Dairy Chemistry. Vol. 1: Proteins*, (P.F. Fox, ed.), Elsevier Applied Science, London.
- Novotny, M.V., Cobb, K.A. y Liu, J.** (1990). Recent advances in capillary electrophoresis of proteins, peptides and amino acids. *Electrophoresis*, 11, 735-749.
- Núñez, M., Guillén, A.M., Rodríguez-Marín, M.A., Marcilla, A.M., Gaya, P. y Medina, M.** (1991). Accelerated ripening of ewe's milk Manchego cheese: the effect of neutral proteinases. *Journal of Dairy Science*, 74, 4108-4118.

- O'Shea, B.A., Uniacke-Lowe, T. y Fox, P.F.** (1996). Objective assessment of Cheddar cheese quality. *International Dairy Journal*, 6, 1135-1147.
- Oda, R.P. y Landers, J.P.** (1997). Introduction to capillary electrophoresis. En: *Handbook of Capillary Electrophoresis*, (J.P. Landers, ed.). CRC Press, Boca Ratón, pp. 1-49.
- Ordoñez, J.A., Barneto, R. y Ramos, M.** (1978). Studies on Manchego cheese ripened in olive oil. *Milchwissenschaft*, 33, 609-613.
- Ortega, N., Albillos, S.M. y Busto, M.D.** (2003). Application of factorial design and response surface methodology to the analysis of bovine caseins by capillary zone electrophoresis. *Food Control*, 14 (5), 307-315.
- Ortiz, M.C. y Sarabia, L.A.** (1994). Componentes principales y correspondencias. En: *Avances en Quimiometría Práctica*, (R. Cela, ed.). Universidade de Santiago de Compostela. Servicio de Publicaciones e Intercambio Científico, Santiago de Compostela, pp. 241-285.
- Otte, J., Ardö, Y., Weimer, B. y Sørensen, J.** (1999). Capillary electrophoresis used to measure proteolysis in cheese. *Bulletin of the International Dairy Federation*, 337, 10-16.
- Otte, J., Midtgaard, L. y Qvist, K.B.** (1995). Analysis of caseinomacropeptide(s) by free solution capillary electrophoresis. *Milchwissenschaft*, 50, (2), 75-79.
- Otte, J., Zakora, M., Kristiansen, K.R. y Qvist, K.B.** (1997). Analysis of bovine caseins and primary hydrolysis products in cheese by capillary zone electrophoresis. *Lait*, 77, 241-257.
- Otto, M.** (1999). Modeling: Multiple linear regression. En: *Chemometrics. Statistics and Computer Application in Analytical Chemistry*, (M. Otto, ed.). Wiley-VCH, Weinheim, pp. 192-214..
- Pahkala, E., Antila, V. y Laukkanen, M.** (1985). Accelerating the ripening of cheese by the addition of proteolytic enzymes. II. Preparation of Edam cheese. *Meijeritiet. Aikak.*, 53, 33.
- Papoff, C.M., Law, A.J.R., Dalglish, D.G. y Campus, R.L.** (1993). Determination of the composition of ovine casein by anion-exchange FPLC. *Scienza e Tecnica Lattiero-casearia*, 44 (5), 273-291.

- Pérez-Rodríguez, M.L., Martín-Álvarez, P.J., Ramos, M., García-Muro, E., Zarazaga, I. y Amigo, L.** (1998). Genetic polymorphism of bovine milk proteins in Holstein-Friesian and Fleckvieh breeds exploited in Spain. *Milchwissenschaft*, 53, (10), 543-546.
- Picon, A., Gaya, P., Medina, M. y Nuñez, M.** (1995). The effect of liposome-encapsulated *Bacillus subtilis* neutral proteinase on Manchego cheese ripening. *Journal of Dairy Science*, 78, 1238-1247.
- Picon, A., Gaya, P., Medina, M. y Nuñez, M.** (1997). Proteinases encapsulated in stimulated release liposomes for cheese ripening. *Biotechnology Letters*, 19, 345-348.
- Pirisi, A., Piredda, G., Papoff, C.M., di Salvo, R., Pintus, S., Garro, G., Ferranti, P. y Chianese, L.** (1999). Effects of sheep α_{s1} -casein CC, CD and DD genotypes on milk composition and cheesemaking properties. *Journal of Dairy Research*, 66, 409-419.
- Poveda, J.M., Sousa, M.J., Cabezas, L. y McSweeney, P.L.H.** (2003). Preliminary observations on proteolysis in Manchego cheese made with a defined-strain starter culture and adjunct starter (*Lactobacillus plantarum*) or a commercial starter. *International Dairy Journal*, 13, 169-178.
- Prripp, A.H., Kieronczyk, A., Stepaniak, L. y Sørhaug, T.** (1999a). Comparison of biochemical characteristics of three Norwegian cheese varieties using multivariate statistical analysis. *Milchwissenschaft*, 54, (10), 558-562.
- Prripp, A.H., Shakeel-Ur-Rehman, McSweeney, P.L.H., Sørhaug, T. y Fox, P.F.** (2000a). Comparative study by multivariate statistical analysis of proteolysis in a sodium caseinate solution under cheese-like conditions caused by strains of *Lactococcus*. *International Dairy Journal*, 10, 25-31.
- Prripp, A.H., Shakeel-Ur-Rehman, McSweeney, P.L.H. y Fox, P.F.** (1999b). Multivariate statistical analysis of peptide profiles and free amino acids to evaluate effects of single-strain starters on proteolysis in miniature Cheddar-type cheeses. *International Dairy Journal*, 9, 473-479.
- Prripp, A.H., Stepaniak, L. y Sørhaug, T.** (2000b). Chemometrical analysis of proteolytic profiles during cheese ripening. *International Dairy Journal*, 10, 249-253.

- Rao, C.R.** (1964). The use and interpretation of principal component analysis in applied research. *Sankhyá A*, 26, 329-358.
- Rasmussen, L.K. y Petersen, T.E.** (1991). Purification of disulfide-linked α_{s2} - and κ -casein from bovine milk. *Journal of Dairy Research*, 58, 187-193.
- Rasmussen, L.K., Højrup, P. y Petersen, T.E.** (1992). The multimeric structure and disulfide-bonding pattern of bovine κ -casein. *European Journal of Biochemistry*, 207, 215-222.
- Recio, I., Amigo, L., Ramos, M. y López-Fandiño, R.** (1997a). Application of capillary electrophoresis to the study of proteolysis of caseins. *Journal of Dairy Research*, 64, 221-230.
- Recio, I., Fernández-Fournier, A., Martín-Álvarez, P.J. y Ramos, M.** (1997b). β -Lactoglobulin polymorphism in ovine breeds: influence on cheesemaking properties and milk composition. *Lait*, 77, 259-265.
- Recio, I., Frutos, M., Olano, A. y Ramos, M.** (1996a). Application of capillary electrophoresis and reversed-phase HPLC to the study of proteolysis in UHT milks. *Heat Treatment & Alternative Methods, IDF*, 422-428.
- Recio, I., Frutos, M., Olano, A. y Ramos, M.** (1996b). Protein changes in stored ultra-high-temperature-treated milks studied by capillary electrophoresis and high-performance liquid chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 3955-3959.
- Recio, I., Pérez-Rodríguez, M.L., Amigo, L. y Ramos, M.** (1997c). Study of the polymorphism of caprine milk caseins by capillary electrophoresis. *Journal of Dairy Research*, 64, 515-523.
- Recio, I., Pérez-Rodríguez, M.L., Ramos, M. y Amigo, L.** (1997d). Capillary electrophoretic analysis of genetic variants of milk proteins from different species. *Journal of Chromatography A*, 768, 47-56.
- Recio, I., Ramos, M. y Amigo, L.** (1997e). Study of the polymorphism of ovine α_{s1} - and α_{s2} -caseins by capillary electrophoresis. *Journal of Dairy Research*, 64, 525-534.
- Recio, I., Ramos, M. y López-Fandiño, R.** (2001). Capillary electrophoresis for the analysis of food proteins of animal origin. *Electrophoresis*, 22, 1489-1502.

- Ribadeau-Dumas, B.** (1981). Actualités dans le domaine de la connaissance de la structure et des propriétés biochimiques des protéines laitières. *Revue Lait. Franç.*, 400, 17-32.
- Ribadeau-Dumas, B., Brignon, G., Grosclaude, F. y Mercier, J.C.** (1972). Structure primaire de la caséine β A₂ bovine. Séquence complète. *European Journal of Biochemistry*, 25, 505-514.
- Richardson, B.C. y Creamer, L.K.** (1976). Comparative micelle structure. V. The isolation and characterization of the major ovine caseins. *New Zealand Journal of Dairy Science and Technology*, 11, 46-53.
- Richardson, B.C., Creamer, L.K., Pearce, K.N. y Munford, R.E.** (1974). Comparative micelle structure. II Structure and composition of casein micelles in ovine and caprine milk as compared with those in bovine milk. *Journal of Dairy Research*, 41, 239-247.
- Richardson, B.C. y Mercier, J.C.** (1979). The primary structure of the ovine β -caseins. *European Journal of Biochemistry*, 99, 285-297.
- Righetti, P.G., Nembri, F., Bossi, A. y Mortarino, M.** (1997). Continuous enzymatic hydrolysis of β -casein and isoelectric collection of some of the biologically active peptides in an electric field. *Biotechnology Progress*, 13, 258-264.
- Rogan, M.M., Altria, K.D. y Goodall, D.M.** (1994). Plackett-Burman experimental design in chiral analysis using capillary electrophoresis. *Chromatographia*, 38, 723-729.
- Schmidt, D.G.** (1982). Association of caseins and casein micelle. En: *Developments in Dairy Chemistry. Vol. 1: Protein*, (P.F. Fox, ed.). Applied Science Publishers, London, pp. 61-86.
- Schmidt, D.G. y Koops, J.** (1965). *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 19, 63-74.
- Schomberg, G., Belder, D., Gilges, M., Kleemiß, M.H. y Motsch, S.R.** (1994). Wall chemistry in capillary electrophoresis: The importance of maximal efficiency in analytical CE. *Abstract 101, a lecture presented at HPCE '94, San Diego, CA.*
- Skeie, S. y Ardö, Y.** (2000). Influence from raw milk flora on cheese ripening studied by different treatments of milk to model cheese. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, 33, 499-505.

- Skeie, S., Lindberg, C. y Narvhus, J.** (2001). Development of amino acids and organic acids in Norvegia, influence of milk treatment and adjunct *Lactobacillus*. *International Dairy Journal*, 11, 399-411.
- Skeie, S., Narvhus, J., Ardö, Y. y Abrahamsen, R.G.** (1995). Influence of liposome-encapsulated Neutrase and heat-treated lactobacilli on the quality of low-fat Gouda-type cheese. *Journal of Dairy Research*, 62, 131-139.
- Snoeren, T.H.M. y Van Riel, J.A.M.** (1979). Milk proteinase, its isolation and action on α_{s2} - and β -casein. *Milchwissenschaft*, 34, 528-531.
- Sørensen, J. y Benfeldt, C.** (2001). Comparison of ripening characteristics of Danbo cheeses from two dairies. *International Dairy Journal*, 11, 355-362.
- Sousa, M.J., Ardö, Y. and McSweeney, P.L.H.** (2001). Advances in the study of proteolysis during cheese ripening. *International Dairy Journal*, 11, 327-345.
- Steuer, W., Grant, I. y Erni, F.** (1990). Comparison of high performance liquid chromatography, supercritical fluid chromatography and capillary zone electrophoresis in drug analysis. *Journal of Chromatography*, 507, 125-140.
- Strange, E.D., Malin, E.L., Van Hekken, D.L. y Basch, J.J.** (1992). Chromatographic and electrophoretic methods used for analysis of milk proteins. *Journal of Chromatography*, 624, 81-102.
- Strickland, M., Johnson, M.E. y Broadbent, J.R.** (2001). Qualitative and quantitative analysis of proteins and peptides in milk products by capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, 22, 1510-1517.
- Swaisgood, H.E.** (1992). Chemistry of the caseins. En: *Advanced Dairy Chemistry. Vol 1: Proteins*, (P.F. Fox, ed.). Elsevier Applied Science, New York, pp. 63-110.
- Terabe, S., Otsuka, K. y Ando, T.** (1985). Electrokinetic chromatography with micellar solution and open-tubular capillary. *Analytical Chemistry*, 57, 834-841.
- Thompson, M.P., Kiddy, C.A., Johnston, J.O. y Weinberg, R.M.** (1964). Genetic polymorphism in caseins of cows milk. 2. Confirmation of genetic control of β -casein variation. *Journal of Dairy Science*, 47, 378-382.
- Towns, J.K. y Regnier, F.R.** (1991). Capillary electrophoretic separations of proteins using nonionic surfactant coating. *Analytical Chemistry*, 63, 1126-1132.

- Tran, A.D., Park, S., List, P.J., Huynh, O.T., Ryall, R.R. y Lane, P.A.** (1991). Separation of carbohydrate-mediated microheterogeneity or recombinant human erythropoietin by free solution capillary electrophoresis: Effects of pH, buffer type and organic additives. *Journal of Chromatography*, 542, 459-471.
- Trieu-Cuot, P. y Gripon, J.C.** (1982). A study of proteolysis during Camembert cheese ripening using isoelectric focusing and two-dimensional electrophoresis. *Journal of Dairy Research*, 49, 501-510.
- Trujillo, A.J., Buffa, M., Casals, I., Fernández, P. y Guamis, B.** (2002). Proteolysis in goat cheese made from raw, pasteurized or pressure-treated milk. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 3, (4), 309-319.
- Trujillo, A.J., Guamis, B. y Carretero, C.** (1997). Hydrolysis of caprine β -casein by plasmin. *Journal of Dairy Science*, 80, 2258-2263.
- Trujillo, A.J., Guamis, B., Laencina, J. y López, M.B.** (2000). Proteolytic activities of some milk clotting enzymes on ovine casein. *Food Chemistry*, 71, 449-457.
- Tsuda, T.** (1994). Control of electroosmotic flow in capillary electrophoresis. En: *Handbook of Capillary Electrophoresis*, (J.P. Lander, ed.). CRC Press, Boca Raton, pp. 720-733.
- van Hooydonk, A.C.M., Olieman, C. y Hagedoorn, H.G.** (1984). Kinetics of the chymosin-catalyzed proteolysis of κ -casein in milk. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 38, 207-222.
- Vesterberg, O.** (1989). History of electrophoretic methods. *Journal of Chromatography*, 480, 3-19.
- Vindevogel, J. y Sandra, P.** (1991). Resolution optimization in micellar electrokinetic chromatography. Use of Plackett-Burman statistical design for the analysis of testosterone esters. *Analytical Chemistry*, 63, 1530-1536.
- Visser, S. y Slangen, K.J.** (1977). On the specificity of chymosin (rennin) in its action on bovine β -casein. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 31, 16-30.
- Visser, S., Slangen, K.J. y Hup, G.** (1975). Some bitter peptides from rennet-treated casein. A method for their purification, utilizing chromatographic separation on silica gel. *Netherlands Milk Dairy Journal*, 29, 319-334.

- Visser, S., Slangen, K.J. y Rollema, H.S.** (1991). Phenotyping of bovine-milk proteins by reversed-phase high-performance liquid-chromatography. *Journal of Chromatography*, 548, (1-2), 361-370.
- Visser, S. y van den Berg, G.** (2002). The role of proteolytic enzymes in cheese ripening. *Bulletin of the International Dairy Federation*, 371, 6-9.
- Walstra, P., Bloomfield, V.A., Wei, J.G. y Jenness, R.** (1981). Effects of chymosin action on the hydrodynamic diameter of casein micelles. *Biochimica et Biophysica Acta*, 669, 258-259.
- Ward, L.S. y Bastian, E.O.** (1996). A method for isolating β -casein. *Journal of Dairy Science*, 79, 1332-1339.
- Werner, W.E., Demorest, D.M., Stevens, J. y Wiktorowicz, J.E.** (1993). Size-dependent separation of proteins denatured in SDS by capillary electrophoresis using a replaceable sieving matrix. *Analytical Biochemistry*, 212, 253-258.
- West, D.W.** (1986). Review Article. Structure and function of the phosphorylated residues of casein. *Journal of Dairy Research*, 53, 333-352.
- Whitaker, J.R.** (1994). *Principles of Enzymology for the Food Sciences*. Marcel Dekker, New York.
- Wold, H.** (1966). Estimation of principal components and related models by iterative least squares. En: *Multivariate Analysis, I*, (P.K. Krishnaiah, ed.). Academic Press, Inc., New York, pp. 391-420.
- Wold, S.** (1978). Cross-validatory estimation of the number of components in factor and principal component analysis. *Technometrics*, 20, 397-405.
- Zeece, M.** (1992). Capillary electrophoresis: a new analytical tool for food sciences. *Trends in Food Science Technology*, 3, 6-10.
- Zhu, M., Hansen, D.L., Burd, S. y Gannon, F.** (1989). Factors affecting free zone electrophoresis and isoelectric focusing in capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography*, 480, 311-319.

