

PROTEOLISIS DEL QUESO MANCHEGO: CAMBIOS EN LA  
DISTRIBUCION DEL NITROGENO SOLUBLE.

(PROTEOLYSIS IN MANCHEGO CHEESE: CHANGES IN THE SOLUBLE NITROGEN DISTRIBUTION).

por

M<sup>a</sup> Teresa Mora y A. Marcos

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

Palabras clave: Queso Manchego. Proteolisis. Nitrógeno.

Keywords: Manchego cheese. Proteolysis. Nitrogen.

Summary

During the ripening of three different series of Manchego cheese, the soluble nitrogen increased in six months to about 23 percent of total nitrogen in two of the series, and to 30 percent in the third series. About half of the soluble nitrogen was nonprotein nitrogen. In all the series the level of soluble polypeptides fluctuated during ripening between  $10 \pm 2.5$  percent of the total nitrogen. The higher levels of soluble and nonprotein nitrogen observed in one of the series were due to a large amount of oligopeptides in this series. The aminopeptidase and deaminase activities of lactic acid bacteria were similar in all the series according to the evolution of amino and ammonia nitrogen. The faster and greater extent of proteolysis observed in one of the series seems to be due to a greater chymosin activity.

Resumen

Durante la maduración de tres series diferentes de queso manchego el porcentaje de nitrógeno solubilizado se elevó, a los 6 meses, al 23 p.100, en dos de las series; y al 30 p.100, en la tercera serie. En las tres series de quesos, aproximadamente el 50 p.100 del nitrógeno soluble estaba constituido por nitrógeno no proteico. Los polipéptidos solubles

Recibido para publicación el 12-3-1981.

fluctuaron durante la maduración de las tres series en torno al  $10 \pm 2.5$  p.100 del nitrógeno total. Los mayores niveles de nitrógeno soluble y nitrógeno no proteico observados en una serie se deben fundamentalmente a la mayor riqueza en oligopéptidos. Las actividades aminopeptidasa y deaminasa de las bacterias lácticas fue similar en las tres series de quesos, a juzgar por la evolución del nitrógeno amínico y amoniacal. La mayor velocidad y extensión de la proteolisis observada en una de las tres series de quesos parece ser debida, por tanto, a una mayor actividad quimosínica.

Durante la maduración del queso los compuestos nitrogenados experimentan importantes cambios al ser progresivamente hidrolizados. Clásicamente, el curso de la proteolisis se ha seguido analizando químicamente fracciones tales como el nitrógeno soluble, el nitrógeno no proteico, el nitrógeno amínico y el nitrógeno amoniacal. Algunas de estas fracciones nitrogenadas han sido determinadas durante el proceso madurativo del queso manchego en estudios realizados por Román(22), Ramos y Martínez-Castro (21), Núñez y Martínez-Moreno (17), Ordoñez et al. (18) y Jiménez et al. (6).

Al término de la maduración, cada variedad de queso suele ofrecer un perfil nitrogenado relativamente constante y peculiar, claramente relacionado con sus características organolépticas propias y diferenciales. La distribución del nitrógeno en el queso manchego maduro comercial fue analizada por Marcos et al. (10) y más recientemente por Millán (14), junto a la de otros quesos españoles.

En publicaciones precedentes hemos expuesto los cambios de las caseínas y sus primeros productos de degradación insolubles (15) y la formación de los primeros polipéptidos solubles (12) durante la maduración de tres series diferentes de queso manchego. Ahora exponemos los cambios en la distribución del nitrógeno durante la maduración de las tres series citadas, y en otra publicación próxima (13) nos referiremos a la formación de los aminoácidos libres individuales.

#### Material y Métodos

Quesos. Una serie de quesos (serie A) fue elaborada artesanalmente con leche cruda de oveja coagulada a 32° C con cuajo de ternero. Otras dos series fueron fabricadas industrialmente con leche pasteurizada a 75° C/17 s, que se coaguló añadiéndole  $Cl_2Ca$ , fermentos lácticos y cuajo de terne-

ro. En una de las series (la B) se utilizó leche pura de oveja, y en la otra (serie C), una mezcla de leche de vaca, oveja y cabra.

Después de la salazón (día 0 de maduración) los quesos se mantuvieron en cámaras de fermentación a unos 12° C durante un mes y seguidamente se almacenaron en una cámara comercial a 4° C.

#### Determinación de la composición química bruta.

Las muestras analíticas se prepararon según la UNE (24). El extracto seco se determinó como describe Kosikowski (9); la proteína bruta, por el método de Kjeldahl (1); la grasa, por el método de Gerber (16); y el ácido láctico y las cenizas, por los métodos de la A.O.A.C. (1).

La composición química bruta del extracto seco de las tres series de quesos se indica en la tabla I.

Tabla I. Composición química bruta del extracto seco de los quesos de las tres series.

Componente	Serie A	Serie B	Serie C
	g/100 g extracto seco		
Grasa	55,87	56,38	54,49
Proteína (N x 6,38)	37,06	35,28	38,01
Ac. láctico	1,08	1,45	1,14
Cenizas	6,36	6,65	6,90

### Análisis de la distribución del nitrógeno.

El nitrógeno total soluble a pH 4,4 y no proteico (soluble en ATCA al 12 p.100) se determinó por el método de Johnson (7). El nitrógeno amínico se determinó por el método de Sorensen (5), y el de las bases volátiles, por el método de Conway (5).

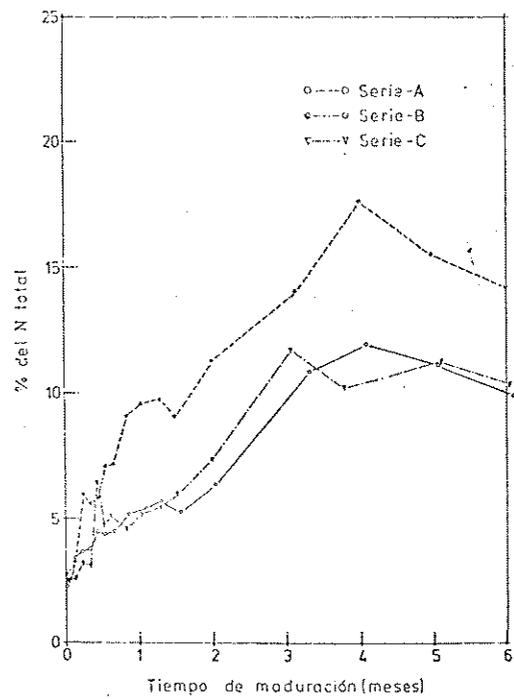
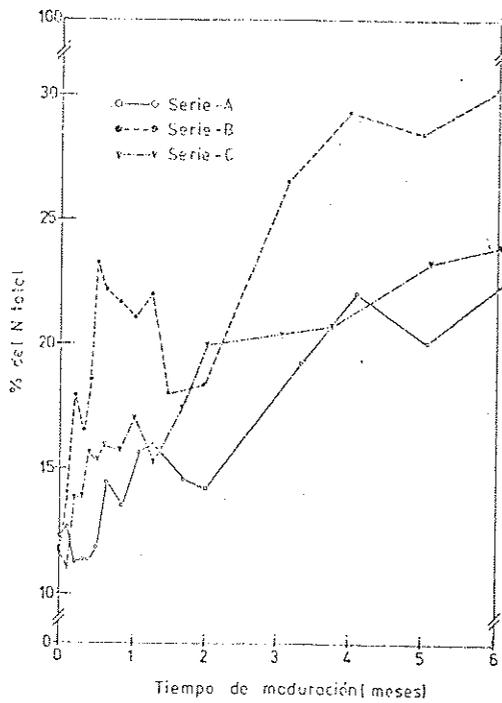
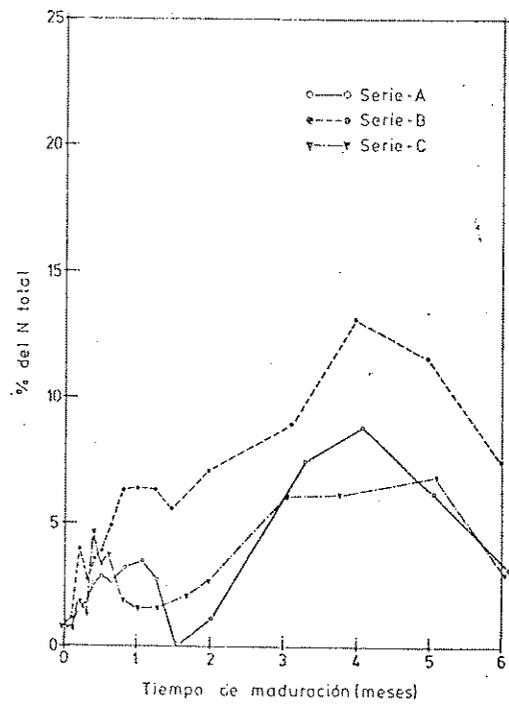
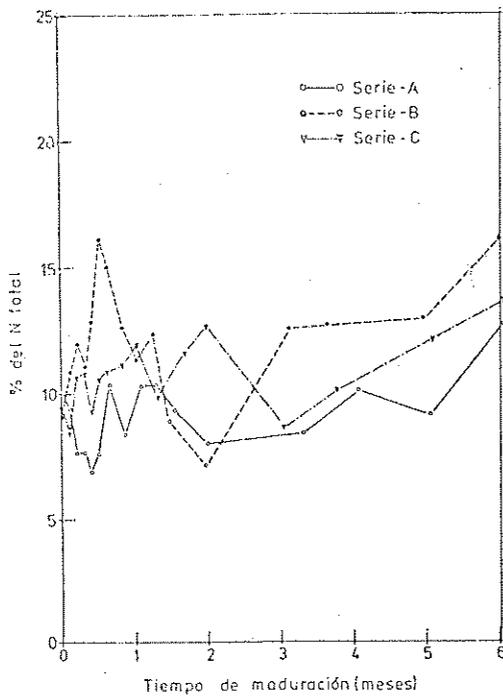
### Resultados y discusión

Polipéptidos solubles. En la figura 1 se representa la evolución del nitrógeno soluble a pH 4,4, observada durante la maduración de tres partidas de queso manchego (12); y en la figura 2, la evolución del nitrógeno no proteico (soluble en ATCA al 12 p.100). Las proporciones relativas tanto de nitrógeno soluble (NS) como de nitrógeno no proteico (NNP) son mayores en la serie de quesos B que en las otras dos series, siendo en cada serie muy similares los cursos evolutivos del NS y NNP durante los cuatro primeros meses de maduración (figuras 1 y 2).

Entre los 4 y los 6 meses de maduración se observa que mientras la proporción relativa de NS tiende a aumentar ligeramente en las tres series de quesos, la proporción relativa de NNP tiende, en cambio, a disminuir ligeramente. Pese a esta diferencia al término de la maduración, las correlaciones existentes en cada serie de quesos entre el NS y el NNP son altamente significativas ( $P < 0,001$ ), lo que indica que las tasas de polipéptidos solubles a pH 4,4 (e insolubles en ATCA) deben ser razonablemente constantes en cada serie de quesos a lo largo de su maduración. En efecto, en las tres series de quesos el nivel de polipéptidos solubles oscila, a lo largo de la maduración, en torno al  $10 \pm 2,5$  p.100 del nitrógeno total (figura 3).

Los polipéptidos solubles (tipo proteosa y peptona) que integran esta fracción incluyen, en la serie A, los fragmentos N-terminales de las caseínas que proceden fundamentalmente de la hidrólisis de las alfa<sub>s</sub>-caseínas por el cuajo y, en menor grado, de la hidrólisis de las beta-caseínas por la proteasa alcalina de la leche (15, 12). En la serie C se incluyen, además, los fragmentos C-terminales de las beta-caseínas liberados por el cuajo, que en los quesos de la serie B alcanzan una alta proporción tras la primera semana de maduración (15, 12).

MORA Y MARCOS: PROTEOLISIS DEL QUESO MANCHEGO: CAMBIOS DEL N SOLUBLE.



Figuras 1, 2, 3 y 4

El incremento al término de la maduración de la proporción de polipéptidos solubles (figura 3) explica la reducción relativa del NNP observada mientras aumenta la proporción de NS (figuras 1 y 2).

Oligopéptidos. El hecho de que el nivel de polipéptidos solubles se mantenga razonablemente constante durante la maduración indica que su velocidad de formación está compensada por la velocidad de su hidrólisis a compuestos solubles en ATCA (oligopéptidos y aminoácidos) por la actividad amino y endopeptidásica de las bacterias lácticas (2, 3 y 4).

La fracción de oligopéptidos se ha calculado deduciendo del NNP el nitrógeno titulable en presencia de formol (NF). En las tres series de quesos los cambios en la distribución del nitrógeno de los oligopéptidos (figura 4) son paralelos a los del NNP (figura 2) debido a que constituyen una alta proporción del mismo.

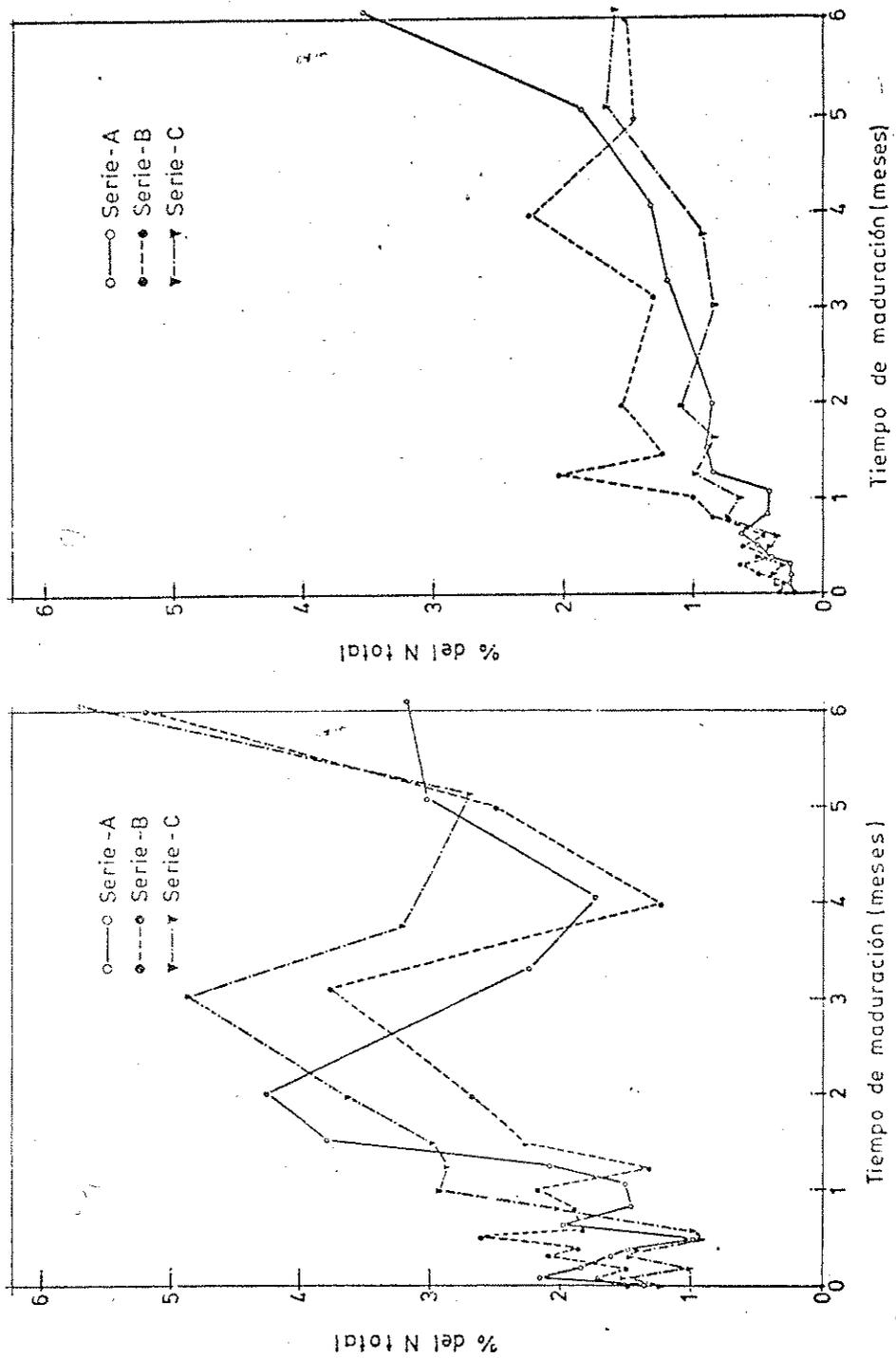
En los quesos de la serie B, en los que la proteólisis fue más rápida y extensa (15, 12), también la proporción de oligopéptidos es notablemente mayor que en las otras series, como en el caso del NS y NNP.

A pesar de la cantidad relativamente alta de péptidos, en los quesos de la serie B no se detectó sabor amargo, posiblemente debido a que la leche de oveja no suele originar péptidos amargos como la de vaca (20).

Aminoácidos libres. Por la actividad aminopeptidásica de las bacterias lácticas, a partir de los péptidos se forman aminoácidos libres, principales componentes nitrogenados de la fracción que resulta de deducir el nitrógeno de las bases volátiles ( $\text{NH}_3$ , etc.) del nitrógeno del formol (NF).

La formación de aminoácidos libres durante la maduración de las tres series de quesos sigue aproximadamente el mismo curso (figura 5). El nivel de aminoácidos libres en la serie B no es mayor que en las restantes series (como ocurría con las fracciones solubles superiores), lo que sugiere que la actividad aminopeptidásica en esta serie es normal (aproximadamente igual a la de las otras series).

Esta fracción también puede contener cierta cantidad de tiramina y otras aminas biógenas (23) resultantes de la decarboxilación de la tirosina y otros aminoácidos por las aminoácidodecarboxilasas bacterianas, que liberan  $\text{CO}_2$  y la amina primaria que corresponde al sustrato. En el queso manchego maduro han sido identificadas cuatro alquilaminas primarias y dos secundarias (25).



Figuras 5 y 6

MORA Y MARCOS: PROTEOLISIS DEL QUESO MANCHEGO: CAMBIOS DEL N SOLUBLE.

Amoniaco. Durante la maduración de las tres series de quesos se forman pequeñas cantidades de sustancias nitrogenadas volátiles, que sólo alcanzan al término del estudio el 2-3 p.100 del nitrógeno total (figura 6).

El amoniaco (principal componente) procede de la desaminación de los aminoácidos libres, que pueden sufrir la degradación de Strecker, originándose aldehídos con un átomo de carbono menos que el aminoácido precursor correspondiente. Particularmente importante es la degradación por esta vía de la metionina que origina metional (8). Aunque la metionina es un aminoácido libre normalmente presente en el queso manchego (25, 11 y 19), en las series de queso B y C no fue detectada (13), posiblemente por haber sido desaminada a metional. Entre los compuestos carbonilo del queso manchego se ha identificado el metional y otros siete aldehídos, así como diez cetonas diferentes (25).

Bibliografía

1. A.O.A.C. Official methods of analysis. 10th ed. CRC Press, Inc., Florida (1965).
2. Castberg, H.B. y H.A. Morris. Milchwissenschaft 31, 85 (1976).
3. Desmazeaud, M.J. y M. Juge. Le Lait, 56, 241 (1976).
4. Exterkate, F.A. Neth. Milk Dairy J. 29, 303 (1975).
5. Fernández-Salguero, J. Tesis doctoral. Univ. Córdoba (España). (1975).
6. Jiménez, S., A. Goicoechea, E. García Matamoros y M.C. Peláez. XV Int. Congr. Refrig. C2, 82 (1979).
7. Johnson, M.L. 3rd Int. Congr. Microbiol., N.Y. 1939 (1941).
8. Keeny, M. y E.A. Day. J. Dairy Sci. 40, 874 (1957).
9. Kosikowski, F.V. Cheese and fermented milk foods, 3rd ed. Ed. Edwards Brothers, Inc., Michigan (1970).
10. Marcos, A., M<sup>a</sup> A. Esteban, J. Fernández-Salguero, M<sup>a</sup> T. Mora Y R. Millán. Anal. Bromatol. 28, 57 (1976).

11. Marcos, A., J. Fernández-Salguero, M<sup>a</sup> T. Mora, M<sup>a</sup> A. Esteban y F. León. Arch. Zootec. 28, 29 (1979).
12. Marcos, A. y M<sup>a</sup> T. Mora. Arch. Zootec. (1982). En prensa.
13. Marcos, A. y M<sup>a</sup> T. Mora. En preparación. (1982).
14. Millán, R. Tesis doctoral. Univ. Córdoba (España). (1981).
15. Mora, M<sup>a</sup> T. y A. Marcos. Arch. Zootec. 30, 139 (1981).
16. N.E.N. Norma 3059 (1969).
17. Núñez, M. y J.L. Martínez-Moreno. Anal. I.N.I.A. 4, 11 (1976).
18. Ordóñez, J.A., R. Barneto y M. Ramos. Milchwissenschaft 33, 609 (1978).
19. Ordóñez, J.A. y J. Burgos. Milchwissenschaft 35, 69 (1980).
20. Pelissier, J.P., J.C. Mercier y B. Ribadeau Dumas. Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys. 14, 343 (1974).
21. Ramos, M. e I. Martínez-Castro. Le Lait 56, 164 (1976).
22. Román, M<sup>a</sup> T. Le Lait, 55, 401 (1975).
23. Silverman, G.J. y F.V. Kosokowski. J. Dairy. Sci. 39, 1134 (1956).
24. U.N.E. Norma 34 105 hl (1969).
25. Wirotama, I.P.G., K.H. Ney y W.G. Freytag. Z. Lebensm. Unters.Forsch. 153 78 (1973).

PIE DE LAS FIGURAS

Figura 1. Evolución del nitrógeno soluble.

Figura 2. Evolución del nitrógeno no proteico.

Figura 3. Evolución de los polipéptidos solubles.

Figura 4. Evolución de los oligopéptidos.

Figura 5. Evolución de los aminoácidos libres.

Figura 6. Evolución del amoníaco.