

PROTEOLISIS DEL QUESO MANCHEGO: EVOLUCIÓN DE LOS AMINOACIDOS LIBRES.

(PROTEOLYSIS IN MANCHEGO CHEESE. EVOLUTION OF FREE AMINO ACIDS).

por

A. Marcos y M^a Teresa Mora

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

Palabras clave: Queso. Manchego. Proteolisis. Aminoácidos.

Keywords: Cheese. Manchego. Proteolysis. Amino acids.

Summary

During the ripening of three different series of Manchego cheese the evolution of free amino acids was followed by a semiquantitative method. A total of 13-14 free amino acids were identified. Total free amino acids increased during ripening to reach a maximum level of about 1% between the 4th and 5th month. From 5th to 6th month of ripening both total concentration and number of free amino acids decreased by bacterial deamination and decarboxylation. The predominant amino acids were Val, Leu + Ile, and Arg. In none of the cheese series the aromatic amino acids Tyr, Trp, and Phe, were detected. These were probably decarboxylated to the corresponding pressor amines, tyramine, tryptamine, and phenylethylamine. In cheeses made with raw milk Met was abundant, but this amino acid was absent in free state in those cheeses made from pasteurized milk due probably to deamination to methional.

Resumen

Durante la maduración de tres series de quesos manchegos se ha seguido semicuantitativamente la evolución de aminoácidos libres y se han

Recibido para publicación el 12-3-1981.

identificado en total 13-14 aminoácidos libres. En general la concentración de los aminoácidos libres (y en particular la de los básicos) tiende a incrementarse durante la maduración, hasta alcanzar, entre el cuarto y quinto mes, una concentración máxima total de aproximadamente el 1 p.100. Entre el quinto y sexto mes de maduración se produjo un notable descenso, tanto de la concentración total como del número de aminoácidos libres, imputable a desaminaciones y decarboxilaciones. Los aminoácidos libres predominantes fueron Val, Leu + Ile y Arg. En ninguna de las series se detectaron Tyr, Trp y Phe; aminoácidos probablemente decarboxilados a las correspondientes aminas aromáticas presoras, tiramina, triptamina y fenetilamina. La Met, abundante en estado libre en los quesos fabricados con leche cruda, no se detectó en los hechos con leche pasteurizada, probablemente por haber sido desaminada a metional.

Durante la maduración del queso y debido fundamentalmente a la hidrólisis de péptidos por la actividad aminopeptidásica de las bacterias lácticas (4, 6, 8) se van liberando los aminoácidos constituyentes de las caseínas, que ulteriormente sirven de substratos a transaminasas, deaminasas y decarboxilasas, y se transforman en otros aminoácidos libres diferentes, aminas, aldehídos y otros compuestos: carbonilo, amoniaco y dióxido de carbono.

Los aminoácidos libres influyen marcadamente en las características organolépticas del queso y al conjunto de aminoácidos libres totales se le atribuye el "aroma de fondo" de los quesos maduros. Se ha señalado que entre el aroma del queso y la concentración de determinados aminoácidos libres, como la tirosina, el triptófano, la prolina y el ácido glutámico, existe una relación definida y que determinados aminoácidos individuales son responsables de diferentes sabores característicos. A ello se debe que se hayan realizado múltiples investigaciones sobre los aminoácidos libres de los quesos (25).

Su estudio en el queso manchego lo iniciaron en 1956 Aparicio Gallego y Tauler Martín (3), quienes separaron seis aminoácidos por cromatografía monodimensional en papel.

Mediante cromatografía bidimensional López Lorenzo et al. (15) separaron e identificaron 13 aminoácidos libres, en el queso manchego.

En una investigación cualitativa sobre los componentes del aroma de este mismo queso, Wirotama et al. (29) detectaron 17 aminoácidos li-

MARCOS Y MORA: PROTEOLISIS DEL QUESO MANCHEGO: AMINOACIDOS LIBRES.

bres, con un analizador automático. Posteriormente, Marcos *et al.* (17) analizaron 15 muestras de queso manchego adquiridas en el comercio y encontraron, en las muestras individuales, de 9 a 16 aminoácidos libres. Los aminoácidos identificados fueron semicuantificados por el método de Fisher *et al.* (12) modificado (17).

Paralelamente a nosotros, Ordoñez y Burgos (21) investigaron, con un analizador, la evolución de los aminoácidos libres, durante la maduración de una partida de queso manchego que a los tres meses fue sumergida en aceite de oliva.

Seguidamente expondremos nuestros resultados semicuantitativos relativos a la evolución de los aminoácidos libres, durante 6 meses de maduración, de una partida de queso manchego elaborada artesanalmente con leche cruda de oveja y otras dos partidas fabricadas industrialmente con leche pasteurizada, empleando en una de ellas leche de oveja y en la otra una mezcla de leche de vaca, oveja y cabra. Con esta publicación concluimos el estudio de la proteólisis durante la maduración de las tres partidas (18, 19, 20).

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 de quesos se fabricaron industrialmente con leche pasteurizada a 75° C/17 s, que se coaguló añadiendo Cl_2Ca , fermentos lácticos y cuajo de ternero. 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) los quesos se mantuvieron en cámara de fermentación, a unos 12° C, durante un mes y seguidamente se transfirieron a una cámara comercial, a unos 4° C.

Preparación de las muestras. Las muestras analíticas se prepararon según la U.N.E. (28). En una publicación anterior (20) se indica la composición química bruta del extracto seco de las tres series de quesos.

Para la separación cromatográfica de los aminoácidos libres de las muestras se trataron siguiendo básicamente el procedimiento descrito por Adamicic *et al.* (1).

MARCOS Y MORA: PROTEOLISIS DEL QUESO MANCHEGO: AMINOACIDOS LIBRES.

Aminoácidos de referencia. Con aminoácidos puros (Merck p.c.) se preparó una solución mixta en ClH 0,1 N, que contiene 800 ng/ μ l de cada aminoácido (excepto de histidina, cuya concentración fue de 1.600 ng/ μ l). A partir de esta solución madre se prepararon diferentes diluciones.

Separación cromatográfica. Como soporte se utilizó papel Whatman nº 3, de 20 x 20 cm, y como sistema solvente para la primera dimensión (desarrollada en la dirección de la máquina del soporte), n-butanol: ácido acético: agua (80:20:20 v/v); y para la segunda dimensión, fenol: agua (75:25 p/p) con 0,01 p.100 de Tritriplex III. A los cromatogramas se aplicaron con micropipeta diferentes volúmenes de las soluciones problemas o diferentes cantidades de las soluciones de los aminoácidos de referencia (0,5, 1,0, 2,0, 4,0 y 8,0 ng $\times 10^3$, de cada aminoácido patrón, excepto de histidina: doble cantidad).

Revelado. Los aminoácidos separados se revelaron pulverizando los cromatogramas con el reactivo de la ninhidrina-collidina.

Semicuantificación. Los aminoácidos libres fueron semicuantificados por el método de Fisher et al.(12) aplicado por Marcos et al.(17) a la cromatografía bidimensional ascendente. El área de las manchas de los aminoácidos separados en los cromatogramas revelados se estimó planimétricamente (con planímetro de Ott) y seguidamente se halló para cada aminoácido de referencia la ecuación de la mejor recta de ajuste entre el logaritmo de la cantidad de sustancia (en ng) y la raíz cuadrada del área de difusión (en mm^2):

$$\log ng = a_1 \sqrt{\text{mm}^2} + a_0;$$

ecuación en la que las constantes de regresión a_1 y a_0 , correspondientes a los distintos aminoácidos, fueron las siguientes:

<u>Aminoácido</u>	a_1	a_0	<u>Aminoácido</u>	a_1	a_0
Ala	0,12	4,49	Lys	0,19	4,17
Arg	0,18	4,35	Met	0,09	4,73
Asp	0,16	4,15	Orn	0,22	3,61

<u>Aminoácidos</u>	a_1	a_0	<u>Aminoácidos</u>	a_1	a_0
Glu	0,19	3,89	Phe	0,12	5,33
Gly	0,24	3,39	Pro	0,13	4,82
His	0,42	2,36	Thr	0,13	5,36
Leu	0,09	5,18	Val	0,09	4,73

A partir del área de difusión de cada aminoácido problema, se calculó su concentración (en ng/10 μ l de muestra cromatográfica aplicada), mediante las correspondientes ecuaciones de regresión:

$$y = a_1 x + a_0$$

Los valores correspondientes a la histidina se multiplicaron por 2 (doble umbral de detección).

Finalmente se calculó la concentración de cada aminoácido en mg/100 gramos de queso.

Resultados

Los aminoácidos libres semicuantificados a lo largo del proceso madurativo (6 meses) de los quesos manchegos elaborados con leche cruda de oveja (serie A), con leche pasteurizada de oveja (serie B) y con leche pasteurizada de vaca, oveja y cabra (serie C) se indican, respectivamente, en los cuadros I, II y III.

Discusión

Aminoácidos libres detectados en el queso manchego.

En el cuadro IV se indican los 13-14 aminoácidos libres detectados cromatográficamente en el curso de la maduración de las tres series de queso, así como los detectados previamente en otras investigaciones sobre esta variedad de queso. En ninguna de las series de queso objeto de estudio se ha detectado tirosina ni fenilalanina; aminoácidos, ambos, detectados en estado libre en todos los estudios precedentes sobre este tipo de queso (15, 29, 17, 21). La no detección de tirosina podría deber-

MARCOS Y MORA: PROTEOLISIS DEL QUESO MANCHEGO: AMINOACIDOS LIBRES.

Cuadro I. Evolución de los aminoácidos libres en los quesos de la serie A^(a) (mg/100 g queso).

Días de maduración	Lys	Orn	Met	Pro	Glu	Arg	Ala	Asp	Val	Gly	Leu	His	Ser	Thr	Total
Cuajada															
0															
3	3	2	87												92
6	2	2	98												102
9	10	5	68	12	5										100
12	1	3	108	7	4		8	3							134
15	9	4	79		3	9	6	3			29				142
19	11	3	63		2	10	6	2	42		12				151
32	32	11	129	15	10	47	10	7	127	200	34	19	2		643
38	24	7	127	9	4	47	13	3	117		35	22			408
46	25	9	121	10	7		11	7	98		26	11			325
60	12	16	167	12	7	36	29	8	197	5	108	59	1		657
99	3		178	13	6	49	22	4	166	4	83	41			569
122	7		248	22	26	97	29	11	336	23	228	38	2	48	1115
152	198	18	184	35	21	36	18	7	298	10	115	38		22	1000
183	156	13	149	11	12		14	8	136		75				574

(a) Elaborados artesanalmente con leche cruda de oveja.

Cuadro II. Evolución de los aminoácidos libres en los quesos de la serie B^(a) (mg/100 g queso).

Días de madura- ción	Lys	Orn	Met	Pro	Glu	Arg	Ala	Asp	Val	Gly	Leu	His	Ser	Thr	Total
Cuajada	9														9
0	2														2
3	12	4		18	11	11									56
6	10	3		19	10		6		144		56				248
9		5			9			3							17
12	10	6		13	8	29	9	2	91	3	31				202
15	4	8		9	8	11	7	2	127	1	40				217
18	24	12		14	16	27	13	4	97	2	21	8			238
24	24	10		25	24	76	10	5	166	5	34	16			395
30	14	7			10	11	6		363		57				468
37	27	10		16	12	48	12		346	2	89	30			592
44	2	18		14	19	56	19	6	397	3	122	70	3		729
59	10	24		28	28	114	29	8	430	5	170	46	4		896
93	8			9	19	26	31	4	387	27	170	53			734
119	17			24	49	183	33	9	148	4	266	72		55	860
149	21	8		27	81	53	19	13	250	15	230				947
180	29	9		17	19		11	10	157		77				329

(a) Fabricados industrialmente con leche pasteurizada de oveja.

Cuadro III. Evolución de los aminoácidos libres en los quesos de la serie C^(a) (mg/100 g queso).

Días de madura- ción	Lys	Orn	Met	Pro	Glu	Arg	Ala	Asp	Val	Gly	Leu	His	Ser	Thr	Total
Cuajada															
0	22	5		26	10	23	13	3							102
3	1	1			5			2							9
6	31	4		19	9		14	2	59	2	24				164
9	23	6		17	6	44	12	2		2	20				132
12	8	5		12	11	24	8	2	45		21				136
15	11	5		13	14	26	9	2	109		36				225
18	49	11		18	27	40	10	3	53	2	20	31	3		267
24	35	10		18	38	45	7	4	68	6	21	15	6		273
30	45	9	59	15	18	50	34	4	229	3	55	78		30	629
38	11	17		23	37	62	46	5	236	4	87	73	3		604
45	28	2		13	19	70	19	4	180	3	49	110	3		500
59				11	37	58	50	2	353	15	140	179	5		850
91				29	37	90	30	4	283	12	122	193			800
113	124	9		27	34	42	13	8	214	5	98	353	2		929
153	101	11		36	34	99	17	8	204	11	122	215			858
182	161	11		16	27	27	7	11	99	10	45				414

(a) Fabricados industrialmente con leche pasteurizada de vaca, oveja y cabra.

Cuadro IV. Aminoácidos libres detectados en el queso manchego.

Aminoácido	López et al. (1962)	Wirota et al. (1973)	Marcos et al. (1979)	Ordoñez y Burgos (1980)	Serie A	Serie B	Serie C
Asp	+	+	+	+	+	+	+
Glu	+	+	+	+	+	+	+
Gly	+	+	+	+	+	+	+
Ala	+	+	+	+	+	+	+
Tyr	+	+	+	+	-	-	-
Ser	+	+	+	+	+	+	+
Pro	+	+	+	+	+	+	+
Leu (E)	+	+	+	+	+	+	+
Phē (E)	+	+	+	+	-	-	-
His (e)	+	+	+	+	+	+	+
Lys (E)	+	+	+	+	+	+	+
Thr (E)	-	+	+	+	+	Trazas	Trazas
Val (E)	-	+	+	+	+	+	+
Arg	+	Trazas	+	+	+	+	+
Met (E)	-	+	+	+	+	-	Trazas
Ile (E)	-	+	-	+	-	-	-
Orn	-	-	+	-	+	+	+
Trp (E)	+	-	-	+	-	-	-
Cys ₂	-	Trazas	-	-	-	-	-

(E) = Esencial para el hombre; (e) = Esencial para el niño.

MARCOS Y MORA: PROTEOLISIS DEL QUESO MANCHEGO: AMINOACIDOS LIBRES.

se a su decarboxilación para formar tiramina y CO_2 , ya que muchas bacterias de la leche poseen aminoácido-decarboxilasas que originan en el queso considerables cantidades de tiramina y otras aminas biógenas (26). La fenilalanina también podría haber sido decarboxilada a la correspondiente amina aromática. La isoleucina, presente en el queso manchego (29, 21) y abundante tanto en la leche de oveja como de vaca, no es distinguible por cromatografía en papel (15, 17), por tener la misma migración que la leucina y formar con ella una mancha única.

Tampoco hemos detectado triptófano libre; aminoácido poco abundante en la caseína entera, que sólo ha sido detectado en el queso manchego por López et al. (15) y por Ordoñez y Burgos (21). La no detección de cistina en el queso manchego (15, 17, 21), sólo hallada vestigialmente por Wirotama et al. (29), no es extraña, puesto que también es un aminoácido poco abundante en la caseína entera y que raramente se encuentra en los quesos madurados por bacterias (2, 23).

La ornitina, detectada en las tres series de quesos, únicamente había sido detectada anteriormente en el queso manchego, por nosotros (17). Este aminoácido, ausente en la caseína, se ha encontrado también en otros tipos de queso (16, 24, 22, 7, 9, 11, 10), y puede originarse por transformación de la arginina en ornitina, amoníaco o urea y dióxido de carbono (5).

La metionina, detectada en cantidad abundante durante la maduración de los quesos elaborados con leche cruda de oveja (serie A), no fue en cambio detectada apenas en los fabricados con leche pasteurizada (sólo se halló en un queso de la serie C). Este aminoácido tampoco fue detectado en el queso manchego por López et al. (15). La metionina es un aminoácido particularmente sensible a la desaminación por la degradación de Strecker, que libera amoníaco y metional (13). Entre los compuestos carbonílicos del queso manchego se han identificado el metional y otros siete aldehídos, así como 10 cetonas diferentes (29).

Cronología de la liberación de aminoácidos.

En los cuadros I a III los aminoácidos libres, del queso manchego, han sido dispuestos en orden de detección a lo largo del proceso madurativo. En los quesos elaborados con leche pasteurizada (series B y C), la liberación de aminoácidos es en general más precoz que en los quesos preparados con leche cruda (serie A). En el queso Cheddar, fabricado con leche cruda, se ha señalado, sin embargo, que los aminoácidos libres

aparecen antes que en el fabricado con leche pasteurizada (14).

Al comienzo de la maduración (día 0) se detectan ya 7 aminoácidos libres en los quesos fabricados con mezcla de leche de vaca, oveja y cabra (serie C), mientras que en la serie B se detecta el mismo número a los 6 días; y en la serie A, a los 12 días.

El aminoácido esencial lisina es el que se libera más precozmente. Se detectó aún en una de las cuajadas. Los hidroxiaminoácidos treonina y serina fueron los de aparición más tardía.

Curso evolutivo de los aminoácidos libres.

Durante la maduración de las tres series de quesos los aminoácidos libres individuales experimentan amplias fluctuaciones si bien, en general, su concentración tiende a aumentar con la edad del queso (particularmente la de los aminoácidos básicos), hasta alcanzar, hacia los 4-5 meses de maduración, una concentración de aminoácidos libres totales de aproximadamente el 1 p.100 (cuadros I-III y figura 1). En el queso manchego maduro la concentración media de aminoácidos libres totales se aproxima también al 1 p.100 (17). En el queso manchego madurado en aceite de oliva, Ordoñez y Burgos (21) comprobaron que todos los aminoácidos incrementaban su concentración a lo largo de los 11 meses de maduración, excepto la arginina, que alcanzaba el máximo nivel a los 6 meses para luego decrecer; y el ácido glutámico, cuyo nivel se estabilizaba a partir del cuarto mes.

La evolución de los aminoácidos libres totales es muy similar en las tres series de quesos. Se incrementa rápidamente su concentración durante el primer mes de maduración; y luego, más lentamente, hasta el cuarto-quinto mes; momento a partir del cual se observa un notable descenso, tanto cualitativo como cuantitativo, de aminoácidos libres (figura 1), a pesar de que entre el quinto y sexto mes de maduración se produce un brusco incremento del nitrógeno amínico en los quesos de las series B y C, fabricados con leche pasteurizada (20). La actividad aminopeptidásica de las bacterias lácticas parece, por tanto, ser similar en las tres series, como ya habíamos señalado (20). El hecho de que al final de la maduración disminuya bruscamente la concentración de aminoácidos, paralelamente al brusco aumento del porcentaje de nitrógeno amínico (20) sugiere una intensa formación de aminas por las aminoácidodecarboxilasas de las bacterias aerobias.

En el queso manchego sumergido en aceite, en el que las condiciones son más anaeróbicas, la formación de la mayoría de los aminoácidos libres se acelera, en cambio, hacia los tres-cinco meses y su concentración sigue aumentando progresivamente hasta los 11 meses (21).

La no detección de tirosina, fenilalanina, podría ser resultado de su decarboxilación a las correspondientes aminas aromáticas presoras, tiramina, fenetilamina, triptamina e histamina. En el queso manchego maduro han sido identificadas cuatro alquilaminas primarias y dos secundarias (29). El consumo de queso manchego maduro podría producir por tanto la "reacción del queso" en consumidores sometidos a tratamiento antidepresivo con inhibidores de la monoamina oxidasa (MAO) (27).

En las series B y C la formación de metional por desaminación de la metionina, no detectada en los quesos de dichas series, contribuiría también a la reducción del nivel total de aminoácidos libres.

Aminoácidos libres predominantes.

Los aminoácidos libres que predominan cuantitativamente en las tres series de quesos son Val, Leu + Ile y Arg. Los detectados en menor cuantía fueron Ser, Gly, Asp y Orn. En los quesos elaborados con leche cruda de oveja (serie A) predominan también la metionina (prácticamente indetectada en los quesos fabricados con leche pasteurizada) y la lisina. En los quesos elaborados con mezcla de leche de vaca, oveja y cabra (serie C) la histidina alcanza mayores niveles que en los quesos hechos con leche de oveja.

Los aminoácidos libres más abundantes en el queso manchego madurado en aceite fueron Lyss, Leu, Val, Phe e Ile (21).

Los valores medios hallados en el análisis semicuantitativo de 15 muestras comerciales de queso manchego indican que en esta variedad los aminoácidos predominantes son la leucina + isoleucina (250 mg/100 g de queso) y la lisina e histidina (ca. 200 mg/100 g) (17). Los detectados en menor cuantía fueron, igualmente, Ser, Gly y Orn (17).

Bibliografía

1. Adamicic, M., D.S. Clark y M. Yaguchi. J. Food Sci. 35, 272 (1970).
2. Alí, L.A.M. Medel. Landb. Wageningen 60, 1 (1960).

3. Aparicio, M^a. y R. Tauler. Rev. Esp. Lechería 20, 71 (1956).
4. Casterberg, H.B. y H.A. Morris. Milchwissenschaft 31, 85 (1976).
5. Cecchi, L. y P. Resmini. Il Latte 47, 391 (1973).
6. Desmazeaud, M.J. y M. Juge. Le Lait 56, 241 (1976).
7. Dongoc, M., J. Lenoir y C. Choisy. Rev. Latie.Franc. 228, 447 (1971).
8. Exterkate, F.A.. Neth. Milk. Dairy J. 29, 303 (1975).
9. Fernández-Salguero, J. Tesis doctoral. Universidad de Córdoba (España) (1975).
10. Fernández-Salguero, J., J. Barreto y B.A. Marsilla. Arch. Zootec. 27, 365 (1979).
11. Fernández-Salguero, J. y A. Marcos. Trab. Cient. Univ. Córdoba. nº 13 (1977).
12. Fisher, R.B., D.S. Parson y G.A. Morrison. Nature 161, 764 (1948).
13. Keeny, M. y E.A. Day. J. Dairy Sci. 40, 874 (1957).
14. Kosikowski, F.V. J. Dairy Sci. 34, 228 (1951).
15. López, P., B. Sanz y J. Burgos. Anal. Bromato. 14, 221 (1962).
16. Mabbit, L.A. J. Dairy Res. 22, 224 (1955).
17. Marcos, A., J. Fernández-Salguero, M^a. T. Mora, M^a. A. Esteban y F. León. Arch. Zootec. 28, 29 (1979).
18. Marcos, A. y M^a. T. Mora. Arch. Zootec. 30, 253 (1981).
19. Mora, M^a. T. y A. Marcos. Arch. Zootec. 30, 139 (1981).
20. Mora, M^a. T. y A. Marcos. Arch. Zootec. 31, 27 (1982).
21. Ordoñez, J.A. y J. Burgos. Milchwissenschaft 35, 69 (1980).
22. Otagalli, G., P. Resmini, R. Bianchi, A. Galli, G. Rondini, P. Salvadori, S. Sarachi y G. Volonterio. Il Latte 45, 776 (1971).
23. Reiteer, B. y M.F. Sharpoe. J. Appl. Bacteriol. 34 63 (1971).

Archivos de zootecnia, vol. 31, núm. 120, 1982, p.128.
MARCOS Y MORA: PROTEOLISIS DEL QUESO MANCHEGO: AMINOACIDOS LIBRES.

24. Resmini, P., S. Sarachi, G. Volonterio y M. Bozzolati. Il Latte 43, 99 (1969).
25. Schormüller, J. Adv. Food Res. 16, 231 (1968).
26. Silverman, G.J. y F.V. Kosikowski. J. Dairy Sci. 39, 1134 (1956).
27. Smith, T.A. Food Chem. 6, 169 (1981).
28. U.N.E. Norma 34 105 hl. (1969).
29. Wirotama, I.P.G., K.H. Ney y W.G. Freytag. Z. Lebesnsm. Unters. J. Forsch. 153, 78 (1973).

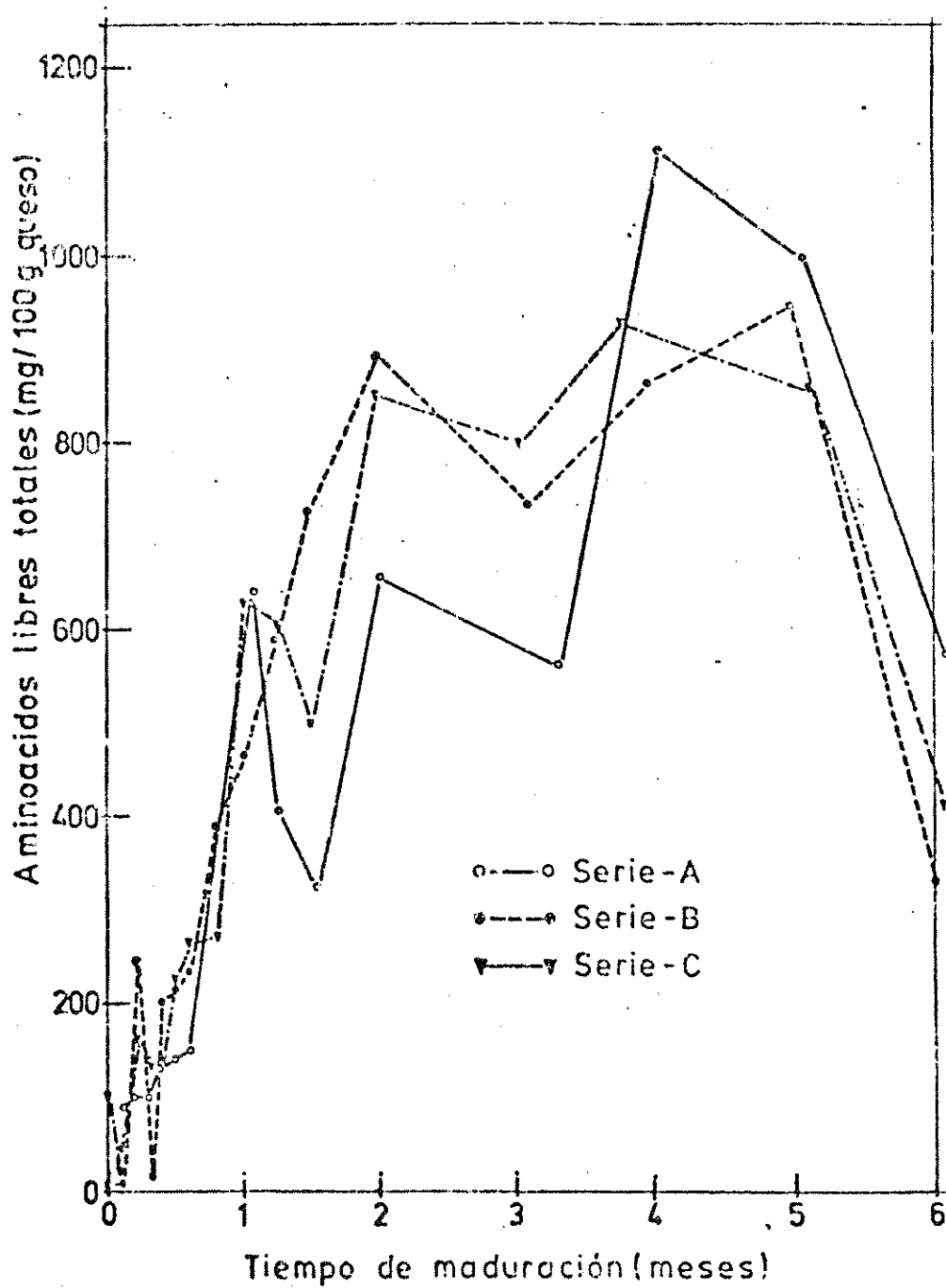


Figura 1. Evolución de los aminoácidos libres totales.