

AMINOACIDOS LIBRES DEL QUESO MANCHEGO.

(FREE AMINO ACIDS IN COMMERCIAL MANCHEGO CHEESE)

por

A. MARCOS, J. FERNANDEZ-SALGUERO, M. T. MORA, M. A. ESTEBAN
y F. LEON*

El queso contiene en estado libre diferentes cantidades de los diversos aminoácidos comunes, constitutivos de las caseínas, como resultado de la hidrólisis de las paracaseínas durante el proceso de maduración y de reacciones de transaminación. Los aminoácidos libres totales del queso están relacionados con el aroma "de fondo" del producto y se ha señalado que existe una relación definida entre el aroma y la concentración de determinados aminoácidos libres como la tirosina y el triptófano, la prolina y el ácido glutámico. Por su importante contribución a la calidad del producto, los aminoácidos libres del queso han sido investigados en múltiples variedades (véase la revisión de Schormüller, 1968) y siguen siendo actualmente objeto de estudios más exactos, de tipo cuantitativo, mediante analizadores automáticos.

En la mayor parte de las variedades de queso pueden detectarse cromatográficamente de 10 a 20 aminoácidos diferentes, en estado libre, en cantidades que varían entre 0 y 6 miligramos por gramo de queso.

Sobre los aminoácidos libres de los quesos españoles existe muy poca información. El queso manchego, la variedad popular del país, sólo ha sido objeto de tres investigaciones cualitativas: Aparicio y Tauler (1956), aplicando la cromatografía en papel en su modalidad monodimensional descendente, a la separación de los aminoácidos libres del queso manchego, detectaron sólo 6-7 aminoácidos diferentes; López *et al.* (1962) por cromatografía bidimensional en papel identificaron, en un total de 10 muestras de queso manchego, 13 aminoácidos libres diferentes y, más recientemente, en la misma variedad de queso, Wirotama *et al.* (1973) detectaron e identificaron hasta 17 aminoácidos libres, con un analizador automático.

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

Recibido para publicación el 5-6-78.

No existiendo, que nosotros sepamos, información cuantitativa sobre los aminoácidos libres del queso manchego, ofrecemos los datos obtenidos en una investigación semicuantitativa, que consideramos de valor orientativo provisional hasta que se efectúen análisis instrumentales más exactos.

Material y métodos.

Muestras de queso. Quince muestras de queso manchego y tipo manchego fueron adquiridas en el comercio. Después de quitarles la corteza se picó la porción interna comestible. Para la separación cromatográfica de los aminoácidos libres las muestras se trataron siguiendo básicamente el procedimiento descrito por Adamicic *et al.* (1970).

Aminoácidos de referencia. Con aminoácidos puros p. c. (Merck) se preparó una solución mixta en ClH 0,1 N que contiene 800 nanogramos $\mu\text{ l}^{-1}$ de cada aminoácido excepto de histidina, cuya concentración fue de 1.600 ng $\mu\text{ l}^{-1}$. A partir de esta solución madre se prepararon diferentes diluciones.

Separación cromatográfica. Se hizo por cromatografía bidimensional en papel Whatman núm. 3 de 20 x 20 cm. El desarrollo de los cromatogramas se efectuó en cámaras Shandon provistas de bandeja para solvente y bastidor para el desarrollo simultáneo de 10 cromatogramas. En 5 hojas se aplicaron 0,5, 1,0, 2,0, 4,0 y 8,0 ng $\times 10^3$ de cada aminoácido patrón (de histidina doble cantidad) y en las restantes 20 $\mu\text{ l}$ de 5 de las soluciones problema. En el desarrollo de la primera dimensión (realizado en la dirección de la máquina del soporte) se utilizó como sistema solvente n-butanol: ácido acético: agua (80:20:20 v/v); y para la segunda dimensión, fenol: agua (75:25 p/p) con el 0,01 p. 100 de Titriplex III.

Los cromatogramas desarrollados se revelaron con reactivo de ninhidrina con collidina.

Las tres pruebas se repitieron en idénticas condiciones pero aumentando el volumen de las muestras problema a 40 $\mu\text{ l}$.

Semicuantificación de los aminoácidos. Se aplicó el método de Fisher *et al.* (1948) 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}). Con estas ecuaciones se calcularon las cantidades de los aminoácidos problema a partir del área de sus respectivas manchas cromatográficas.

Resultados y discusión.

La figura 1 muestra un cromatograma representativo de los principales aminoácidos libres del queso manchego; dicho cromatograma corresponde a una muestra mixta representativa de los 15 quesos examinados. De los 13 aminoácidos que aparecen en el cromatograma, la leucina, valina, alanina, ácido glutámico, ácido aspártico, lisina, ornitina y arginina han sido detectados en las 15 muestras individuales; la prolina, en 14 muestras; la metionina y la glicina, en 12; la histidina, en 11, y la fenilalanina, en 10. Aunque no aparecen en el citado cromatograma, la tirosina ha sido detectada en 9 muestras individuales, la treonina, en 7 y la serina, en 5.

De los 16 aminoácidos libres detectados, el ácido aspártico, el ácido glutámico, la glicina, alanina y tirosina (véase cuadro I) habían sido encontrados en todos los estudios previos (Aparicio y Tauler, 1956; López *et al.* 1962; Wirotama *et al.* 1973); la serina, prolina, leucina, fenilalanina, histidina y lisina lo habían sido anteriormente por López *et al.* (1962) y por Wirotama *et al.* (1973); la arginina, por López *et al.* (1962) y por Wirotama *et al.* (1973) sólo en trazas; y la metionina sólo por Wirotama *et al.* (1973). Estos resultados son en general bastante concordantes, si bien Wirotama *et al.* (1973) detectaron isoleucina, no revelable por cromatografía en papel, ya que forma una mancha única con la leucina, y trazas de cisteína, raramente detectable por cromatografía en papel, en los quesos; López *et al.* (1962) hallaron triptófano, no encontrado por los demás; y nosotros, ornitina, no detectada previamente.

Sólo en dos de las 15 muestras de queso examinadas se han evidenciado los 16 aminoácidos libres detectados; en las restantes muestras de queso el número de aminoácidos detectados varió entre 9 y 15.

Cromatografiando simultáneamente 10 volúmenes diferentes (comprendidos entre 5 y 50 μ l) del extracto de aminoácidos libres de la muestra mixta de queso, observamos la existencia de una relación lineal entre el logaritmo del volumen (en μ l) de muestra aplicada y la raíz cuadrada del área de difusión de las manchas de cada aminoácido, lo que permite aplicar a la cromatografía bidimensional el método de Fisher *et al.* (1948) con fines semicuantitativos. Dado que la significación de los aminoácidos libres en el queso no exige un análisis rigurosamente exacto, consideramos que el procedimiento puede ser útil como técnica de *screening* en este tipo de estudios, cuando no se dispone de otros medios. Los coeficientes de correlación de las mejores rectas de ajuste, obtenidos por este procedimiento (con la solución de aminoácidos de referencia), son muy aceptables en el caso de la leucina, alanina, arginina, ácido aspártico, prolina, ácido glutámico y ornitina; y suficientemente aceptables, en el caso de los restantes aminoácidos, salvo la serina, histidina y lisina.

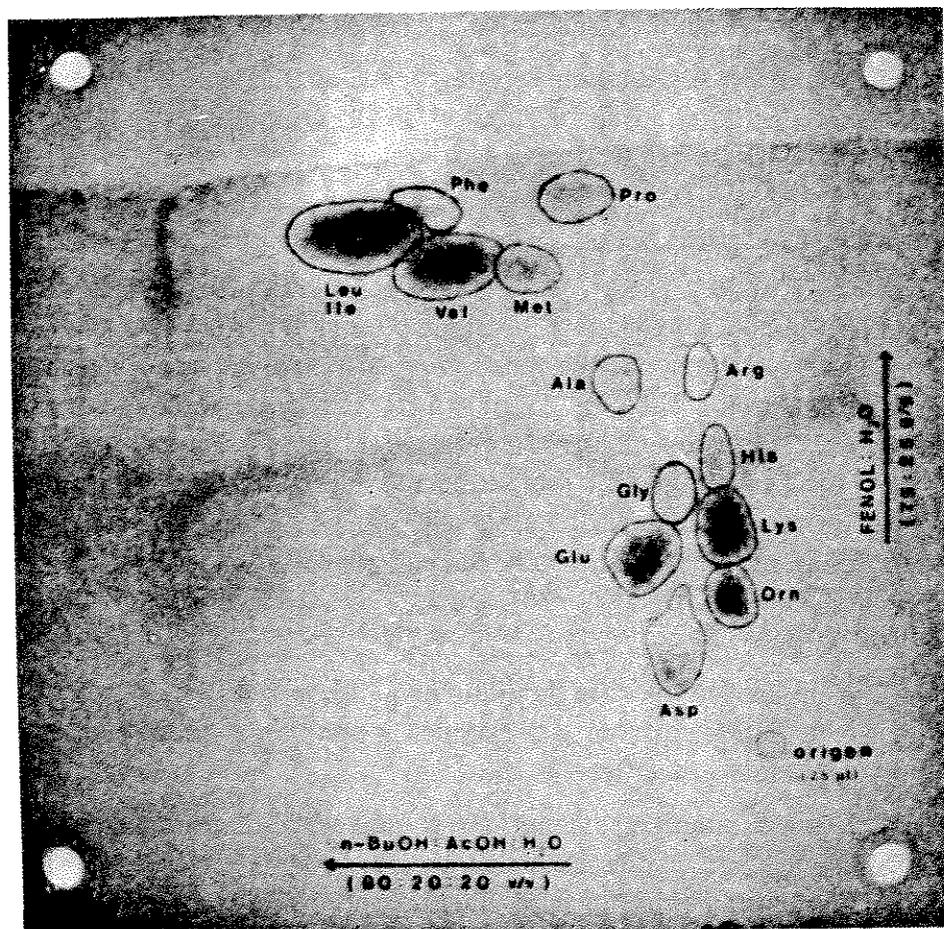


FIGURA 1. Cromatograma bidimensional, en papel, de los principales aminoácidos libres de una muestra mixta representativa de 15 quesos manchegos.

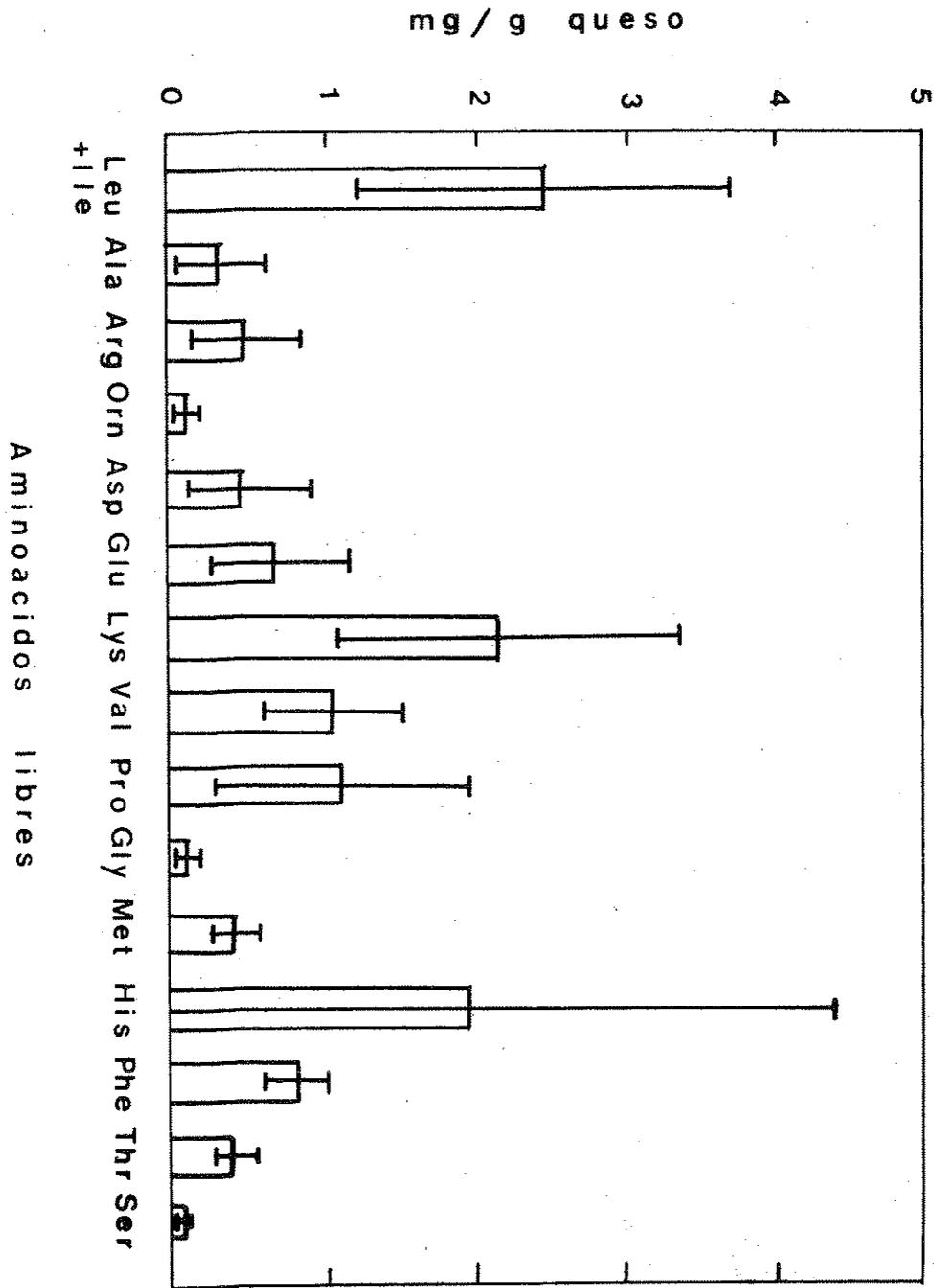


FIGURA 2. Media (y desviación típica) de los aminoácidos libres del queso manchego.

CUADRO I. Aminoácidos libres detectados en el queso manchego.

Aminoácido	Aparicio y Tauler (a) (1956)	López <i>et al.</i> (b) (1962)	Wirostama <i>et al.</i> (c) (1973)	Presente trabajo (d)
Asp	±	±	±	±
Glu	±	±	±	±
Gly	±	±	±	±
Ala	±	±	±	±
Tyr	±	±	±	±
Ser	—	±	±	±
Pro	—	±	±	±
Leu	—	±	±	±
Phe	—	±	±	±
His	—	±	±	±
Lys	—	±	±	±
Thr	±	—	±	±
Val	±	—	±	±
Arg	—	±	Sólo trazas	±
Met	—	—	±	±
Ile	—	—	±	±
Orn	—	—	—	±
Try	—	—	—	—
Cys ₂	—	—	Sólo trazas	—

(a) Cromatografía en papel monodimensional descendente.

(b) Cromatografía en papel bidimensional ascendente.

(c) Analizador automático de aminoácidos (BC 200, Fa. Biocal, Munich).

(d) Cromatografía en papel bidimensional ascendente.

MARCOS *et al.*: AMINOACIDOS LIBRES DEL QUESO MANCHEGO.

CUADRO II. Aminoácidos libres del queso manchego (mg/100 g queso).

Aminoácido	MUESTRA DE QUESO															$\bar{x} \pm S$	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15		
Leu (+ Ile)	395	238	274	179	251	435	117	359	324	414	201	100	83	83	127	249	± 124
Ala	93	43	45	17	12	47	7	54	43	77	34	13	9	8	17	35	± 27
Arg	121	16	91	44	22	67	12	65	23	133	47	27	23	17	45	50	± 37
Orn	25	56	15	11	9	14	1	27	17	21	15	13	3	5	3	15	± 13
Asp	109	106	158	57	11	61	5	51	61	55	26	8	5	16	15	49	± 45
Glu	133	97	133	30	10	101	13	113	121	96	71	25	6	11	31	66	± 49
Lys	234	401	419	48	128	298	108	298	277	355	214	86	74	145	201	219	± 120
Val	127	94	109	57	73	172	95	158	135	210	98	86	52	66	88	108	± 45
Pró	123	75	120	26	24	183	34	217	179	294	124	93	25	—	58	113	± 82
Gly	14	20	14	7	—	12	—	15	12	31	13	4	—	3	5	13	± 7
Met	57	61	47	39	49	49	—	44	35	47	37	—	14	15	—	41	± 15
His	69	333	84	25	899	408	—	79	45	140	48	—	—	—	60	199	± 246
Phe	—	80	—	—	—	103	—	106	54	116	69	61	61	96	78	82	± 22
Thr	63	57	55	—	—	37	—	33	27	45	—	—	—	—	—	45	± 13
Ser	1	—	2	4	—	1	—	—	—	8	—	—	—	—	—	3	± 2
Tyr	+	—	—	—	—	+	—	+	+	+	+	+	—	+	+	+	
TOTAL	1497	1676	1567	547	1488	1987	392	1609	1353	2044	995	515	355	465	729	1148	± 603

Los resultados son medias aritméticas de dos determinaciones.

debido a la escasa pendiente de sus rectas de ajuste, cuyos resultados ofrecen escasa fiabilidad.

La cantidad media de aminoácidos libres totales del queso manchego es de unos 10 mg g^{-1} de queso, variando los valores en los quesos individuales entre un máximo de 20 mg g^{-1} y un mínimo de $3,6 \text{ mg g}^{-1}$ (cuadro II). Los aminoácidos libres cuantitativamente predominantes en el queso manchego son la leucina (que incluye a la isoleucina), cuya concentración media es de $2,5 \text{ mg g}^{-1}$, y la lisina e histidina (próximas a $2,0 \text{ mg g}^{-1}$), seguidos por la prolina y valina (con valores medios de aproximadamente $1,0 \text{ mg g}^{-1}$). Los aminoácidos detectados en menor cantidad son la serina, la glicina y la ornitina. (Fig. 2).

En los quesos frescos o poco madurados la actividad del agua (a_w) se halla reducida casi exclusivamente por la sal añadida, de modo tal que la a_w puede deducirse en muchos casos de la molalidad del cloruro sódico en la fase acuosa del queso (Marcos *et al.* 1979). En el lote de quesos utilizados en el presente trabajo los valores a_w determinados experimentalmente coinciden con los calculados teóricamente, a partir de la concentración de la sal, en 9 de las muestras y difieren sólo una centésima en 2 muestras; en dos centésimas, en 3 muestras, y en tres centésimas, en una sola muestra (Marcos *et al.* 1979). La relación observada entre la a_w y la molalidad del ClNa de los quesos del lote es muy significativa ($r = -0,74^{**}$). En los quesos madurados la a_w se reduce adicionalmente, por debajo del valor que corresponde a la concentración de sal, debido a la presencia de pequeños péptidos, aminoácidos libres y otras sustancias de bajo peso molecular resultantes de la proteólisis.

Puesto que la concentración de aminoácidos libres está en relación con la de sus precursores más inmediatos y la de sus productos de degradación, es de esperar que la cantidad de aminoácidos libres totales esté a su vez relacionada con la a_w de los quesos. El coeficiente de correlación existente entre los aminoácidos libres de los quesos del lote objeto de estudio y sus correspondientes valores a_w (Marcos *et al.* (1979) es altamente significativo ($r = -0,80^{***}$); superior incluso al existente con la concentración salina. Las diferencias observadas entre los valores a_w determinados experimentalmente y los calculados a partir de la molalidad del cloruro sódico están positivamente relacionadas, a nivel muy significativo ($r = -0,64^{**}$), con la cantidad de aminoácidos libres totales.

Resumen.

Se han analizado los aminoácidos libres de un lote de 15 quesos manchegos comerciales y se han detectado e identificado 16 aminoácidos diferentes. Se ha estimado semicuantitativamente que la media de aminoácidos libres totales del queso manchego es de unos 10 mg g^{-1} de queso. Los valores varían en los quesos individuales entre 20 mg g^{-1} y $3,6 \text{ mg g}^{-1}$ aproximadamente. Los aminoácidos libres

cuantitativamente predominantes son la leucina (con una media de 2,5 mg g⁻¹ y la lisina e histidina (con medias próximas a 2,0 mg g⁻¹). Los detectados en menor cantidad son la serina, glicina y ornitina.

La cantidad de aminoácidos libres totales de los quesos del lote está relacionada, a nivel altamente significativo, con sus correspondientes valores a_w .

Summary.

In commercial Manchego cheese 16 different free amino acids have identified and roughly quantified by dimensional paper chromatography; the mean content of total free amino acids is about 10 mg g⁻¹ cheese and the values ranged in individual cheese es from 3,6 mg g⁻¹ to about 20 mg g⁻¹; Manchego cheese is rich in leucine (mean content 2,5 mg g⁻¹), lysine and histidine) mean content about 2,0 mg g⁻¹ each) and is poor in serine, glycine and ornitine.

An inverse highly significant relationship exists between the total quantities of free amino acids and the water activity (a_w) values of Manchego cheeses.

Bibliografía.

- Adamicic, M., D. S. Clark y M. Yaguchi, 1970.—*J. Food Sci.*, 35: 272.
- Aparicio, M. y R. Tauler, 1956.—*Rev. Español. Lechería*. 20: 71.
- Fisher, R. B., D. S. Parsons, y G. A. Morrison, 1948.—*Nature*, 161: 764.
- López, P., B. Sanz y J. Burgos, 1962.—*Anal. Bromatol.*, 14: 221.
- Marcos, A., M. A. Esteban y J. Fernández-Salguero, 1979.—*Anal. Bromatol.*, en prensa.
- Schörmuller, J. 1968.—En "Advances in Food Research" (Ed. C. O. Chichester, E. M. Mrak & G. F. Stewart), p. 231, Academic Press, New York.
- Wirotama, I. P. G., K. H. y Ney y W. G. Freytag, 1973.—*Z. Lebensm. Unters.-Forsch.*, 153: 78.