

- 19) PECO, B.; LEVASSOR, C.; CASADO, M.A.; GALIANO, E.F. y PINEDA, F.D. (1983). Influences météorogique et géomorphologique sur la succession de pâturages de thérophytes méditerranéenes. *Ecología Mediterránea* 9 (1): 63-76.
- 20) PEDRO, F. (1963). *Análisis Agrícola, fundamentos y técnicas operatorias*. Dossat. Madrid.
- 21) PICKETT, S.T.A. y BAZZAZ, F.A. (1978). Organization of an assemblage of early successional species on soil moisture gradient. *Ecology* 59 (6): 1.248-1.255.
- 22) PINEDA, F.D.; NICOLAS, J. P.; POU, A. y GALIANO, E.T. (1981). Ecological succession in oligotrophic pastures of central Spain. *Vegetatio* 44: 165-176.
- 23) PUERTO MARTIN, A. (1977). *Sucesión secundaria en ecosistemas de pastizal*. Tesis Doctoral. Universidad de Salamanca.
- 24) PUERTO MARTIN, A.; RICO RODRIGUEZ, M. y ALONSO PELOCHE, H. (1980). Los pastizales semiáridos: un difícil equilibrio entre explotación y sucesión. *An. Edaf. y Agrobiol.* 39: 1.343-1.350.
- 25) REDONDO, B.; LUIS, E.; PUERTO, A. y GOMEZ, J.M. (1974). Descripción de cuatro etapas de la sucesión secundaria en pastizales Sayagueses. *Pastos* 4: 235-245.
- 26) RODRIGUEZ, R. (1986). *Ecología de pastizales del Noroeste salmantino: respuesta a la humedad y los factores físico-químicos del suelo*. Tesis Doctoral. Universidad de Salamanca.

EVOLUCION DE LOS COMPONENTES NITROGENADOS DURANTE LA MADURACION DEL QUESO DE VALDETEJA **

(EVOLUTION OF THE NITROGEN FRACTIONS DURING THE RIPENING PROCESS OF THE VALDETEJA CHEESE)

Por J. M. Fresno *
 J. Rodríguez Tuero *
 J. Carballo *
 A. Bernardo *
 J. González Prieto *
 y R. Martín Sarmiento *

Key words: Goat cheese, Cheese ripening.
 Palabras clave: Queso de cabra, Maduración del queso.

SUMMARY

The evolution of the main nitrogen fractions during the ripening of four batches of the Valdeteja cheese produced by the craft method has been studied. All nitrogen compounds degradation indexes show a progressive increase along the ripening period, but changes observed were not extensive. Final average values obtained for these fractions (as % of the total nitrogen) were: SNT ($9,9 \pm 1,0$), NPN ($4,82 \pm 0,76$), Aminic N ($2,57 \pm 0,28$) and $\text{NH}_3\text{-N}$ ($0,65 \pm 0,03$). These figures prove that Valdeteja cheese undergoes a very mild proteolysis, probably hindered by the low pH values which appear in this product from the beginning of the ripening.

* Dpto. de Higiene y Tecnología de los Alimentos. Universidad de León.

** Este trabajo ha sido realizado en el marco de un proyecto subvencionado por la Consejería de Cultura y Bienestar Social de la Junta de Castilla y León.

An. Fac. Vet. León. 1988, 34, 101-109

RESUMEN

Se han estudiado las modificaciones que experimentan los principales componentes nitrogenados en cuatro partidas de queso de Valdeteja elaboradas por procedimientos artesanales. Todos los índices de degradación de los compuestos nitrogenados aumentaron en el transcurso de la maduración, aunque en una proporción relativamente baja, alcanzando valores finales medios en porcentaje sobre el nitrógeno total de: NST ($9,9 \pm 1,0$), NNP ($4,82 \pm 0,76$), N amínico ($2,57 \pm 0,28$) y N-NH₃ ($0,65 \pm 0,03$). Estas cifras evidencian la escasa proteólisis que experimenta este tipo de queso, probablemente debido a los bajos valores de pH que se instauran en él desde el comienzo de la maduración.

INTRODUCCION

Las modificaciones que sufren las proteínas durante la maduración del queso afectan de forma muy acusada tanto a su sabor y aroma como a su textura. La primera manifestación de la proteólisis consiste en la solubilización de las caseínas, que se pone de manifiesto por el aumento del nitrógeno soluble. Las distintas fracciones nitrogenadas que aparecen durante la maduración ofrecen un perfil diferente y característico para cada variedad de queso, que determinará en gran medida los caracteres organolépticos del mismo.

La profundidad y extensión de la proteólisis se puede conocer a partir de la determinación de las diferentes fracciones nitrogenadas que se forman en el curso del proceso. A este respecto se determinan tradicionalmente el nitrógeno soluble total (NST), nitrógeno no proteico (NNP), nitrógeno amínico y nitrógeno amoniacal (N-NH₃).

El presente trabajo tiene por objeto estudiar las principales modificaciones que experimentan las fracciones nitrogenadas durante el proceso madurativo del queso de Valdeteja.

MATERIAL Y METODOS

Muestras de quesos

Se utilizaron cuatro partidas distintas (A, B, C y D) de seis quesos cada una, fabricadas por el procedimiento tradicional descrito en (4) y maduradas en las bodegas utilizadas a tal fin por los artesanos de Valdeteja (humedad relativa en torno al 75-85% y temperatura de 10-14 °C).

Toma de muestras

Se estudiaron muestras de los cuatro lotes a diferentes tiempos de maduración: cero días, que corresponde a la cuajada inmediatamente antes del prensado, y de los quesos a los dos, cinco, diez, diecisiete y veintisiete días. Cada muestra consistió en un queso entero que fue descortezado según la Norma F.I.L.-I.D.F. 50: 1969 y almacenado en un arcón congelador a -30 °C en recipientes herméticos hasta el momento de su utilización. Los análisis se realizaron sobre la parte principal de cada queso, al menos por duplicado.

TABLA I
Evolución de las fracciones nitrogenadas a lo largo de la maduración. Lote A.

Días de maduración	N-total (**)	N-caseínico (*)	N-soluble total	N-proteosa peptona	NNP total (*)	N-peptídico (*)	N-amínico (*)	N-amoniacal (*)
0	6,43	91,90	8,10	5,77	2,33	0,53	1,32	0,48
2	6,58	91,56	8,44	4,60	3,84	1,87	1,46	0,51
5	6,47	90,21	9,79	5,28	4,51	2,37	1,55	0,59
10	6,40	89	11	5,59	5,51	3,10	1,87	0,56
17	6,58	88,90	11,10	5,29	5,81	3,21	2	0,60
27	6,35	88,80	11,20	5,20	6	3,15	2,20	0,65

(**) Expresado en gramos/100 gramos de extracto seco.

(*) Expresado en porcentaje sobre N-total.

TABLA 2
Evolución de las fracciones nitrogenadas a lo largo de la maduración. Lote B.

Días de maduración	N-total (**)	N-caseínico (*)	N-soluble total	N-proteosa peptona	NNP total (*)	N-peptídico (*)	N-amínico (*)	N-amoniaco (*)
0	6,75	92,93	7,07	4,95	2,12	0,39	1,22	0,51
2	6,52	92,24	7,76	4,26	3,50	1,49	1,45	0,56
5	6,67	91,35	8,65	5,02	3,63	1,31	1,74	0,58
10	6,73	91,06	8,94	5,03	3,91	1,39	1,98	0,54
17	6,73	91,30	8,70	4,64	4,06	0,90	2,60	0,56
27	6,37	91,35	8,65	4,40	4,25	0,85	2,80	0,60

(**) Expresado en gramos/100 gramos de extracto seco.

(*) Expresado en porcentaje sobre N-total.

TABLA 3
Evolución de las fracciones nitrogenadas a lo largo de la maduración. Lote C.

Días de maduración	N-total (**)	N-caseínico (*)	N-soluble total	N-proteosa peptona	NNP total (*)	N-peptídico (*)	N-amínico (*)	N-amoniaco (*)
0	6	92,91	7,09	5,09	2	0,10	1,40	0,54
2	6,14	92,16	7,84	4,35	3,49	1,27	1,62	0,60
5	6,28	91,35	8,65	5,05	3,60	1,12	1,86	0,62
10	5,84	90,21	9,79	6,06	3,73	1,31	1,90	0,52
17	6,05	90,84	9,16	5,18	3,98	1,35	2	0,63
27	6,26	90,80	9,20	5,14	4,06	0,96	2,40	0,70

(**) Expresado en gramos/100 gramos de extracto seco.

(*) Expresado en porcentaje sobre N-total.

TABLA 4
Evolución de las fracciones nitrogenadas a lo largo de la maduración. Lote D

Días de maduración	N-total (**)	N-caseínico (*)	N-soluble total	N-proteosa peptona	NNP total (*)	N-peptídico (*)	N-amínico (*)	N-amoniaco (*)
0	7	91,46	8,54	5,70	2,84	1,09	1,26	0,49
2	6,69	90,80	9,20	6	3,20	1,15	1,50	0,55
5	6,74	90	10	6,37	3,63	1,22	1,80	0,61
10	6,22	89	11	6,50	4,50	1,83	2,11	0,56
17	6,63	89,12	10,88	6,03	4,85	1,65	2,58	0,62
27	6,66	89,56	10,44	5,49	4,95	1,43	2,87	0,65

(**) Expresado en gramos/100 gramos de extracto seco.

(*) Expresado en porcentaje sobre N-total.

Determinación de las fracciones nitrogenadas

El nitrógeno total (NT) se determinó utilizando el método de Kjeldahl. El nitrógeno soluble total (NST) por el método de Johnson, siguiendo el procedimiento de extracción de Vakaleris y Price²⁴. El nitrógeno no proteico (NNP) se determinó utilizando el método de Johnson, tras precipitar las proteínas con ácido tricloroacético al 12%. El nitrógeno amoniaco (N-NH₃) y el nitrógeno amínico (N amínico), según el procedimiento descrito por Ordóñez²⁰. A partir de estos datos se calculó el N proteico (NT-NNP) y el de sus dos componentes, el de las caseínas (NT-NS) y el de la fracción proteosa peptona (NS-NNP), así como el nitrógeno peptídico (NNP-N amínico-N amoniaco).

RESULTADOS Y DISCUSION

Los datos obtenidos sobre la evolución de los diferentes compuestos nitrogenados durante la maduración de las cuatro partidas de queso se muestran en las tablas 1, 2, 3 y 4.

Puede observarse que la evolución de las distintas fracciones es bastante similar para los cuatro lotes estudiados. El nitrógeno soluble y el amoniaco aumentan por un factor de 1,3 y el no proteico y el amínico se duplican, aproximadamente. Al final de la maduración el N proteico representa el $95,18 \pm 0,76$ del NT; el N caseínico el $90,1 \pm 1,0$; el N proteosa peptona el $5,06 \pm 0,4$; el N no proteico el $4,82 \pm 0,76$; el N peptídico $1,6 \pm 0,92$; el N amínico el $2,57 \pm 0,28$ y el N amoniaco $0,65 \pm 0,03$. El coeficiente de maduración (NST x 100/ NT) resultó ser $9,9 \pm 1,0$.

Todos estos valores evidencian que el queso de Valdeteja sufre una proteólisis muy escasa. Para todos los índices de degradación de los compuestos nitrogenados se obtuvieron cifras claramente inferiores a las que han sido descritas en los demás quesos de cabra madurados nacionales^{2, 13-15} y más propias de un queso de pasta fresca^{1, 14-16}. Es bastante sorprendente que un queso que se ha obtenido con dosis de cuajo altas, 25 ml/100 litros de leche, y que cuenta con una flora microbiana abundante, tanto como cualquier otro queso de pasta prensada⁹, muestre una proteólisis tan escasa. En nuestra opinión, este fenómeno es consecuencia de los bajísimos pHs que se implantan en la masa ya desde los primeros momentos de la maduración: 4,6 ya tres días después del desmoldeo y 4,45 por término medio al terminar el afinado⁷. Tanto la actividad proteolítica inespecífica del cuajo, como la de las proteasas autóctonas de la leche y la de las de origen microbiano ha de estar fuertemente inhibida en estas condiciones.

Aunque la enzima del cuajo (quimosina) cataliza "in vitro" la proteólisis inespecífica de todas las caseínas, se ha demostrado que ni la caseína α_s2 ²¹ ni la para k-caseína^{8, 17, 19} son degradadas por ella durante la maduración del queso. De las otras dos caseínas mayoritarias, la más sensible a la acción de la quimosina es la α_s1 , mientras que la β es atacada más lentamente y en menor grado⁵. Dado que el contenido de la leche de cabra en caseína α_s1 es prácticamente nulo¹⁰, el único componente importante de la micela que debe degradarse durante la maduración de los quesos de este origen debe ser la caseína β . La hidrólisis de esta proteína por el cuajo está fuertemente influenciada por el pH: presenta un óptimo de acción a 6,4 y a valores entre 4,85 y 5,75 se ve ya muy restringida^{4, 18}. Además, se ha demostrado que la acción de la quimosina sobre la caseína se ve intensamente inhibida por el cloruro sódico. Se ha comprobado, por ejemplo, que, a pH 5, la hidrólisis de la caseína por la quimosina es 2,4 veces más lenta

a concentraciones de sal/humedad del 4% que en medio sin sal¹⁸; a valores de S/H próximos al 8%, como ocurre en nuestro caso, la velocidad de esta reacción es probablemente hacia una quinta parte de la que se obtiene a concentraciones de un 4%, como se deduce de los datos publicados por Thomas y Pierce²².

La leche contiene dos tipos de actividades proteicas: alcalina (plasmina) y ácida. La más abundante es la plasmina, que presenta un pH óptimo de 7,5-8^{18, 23}. Debido a la mayor abundancia de la plasmina, la degradación de la caseína β por la actividad proteica nativa de la leche transcurre más fácilmente a un pH ligeramente ácido, 6,3, y desciende rápidamente a medida que el pH lo hace, de modo que a pH 5,4 su actividad se reduce de cinco a seis veces¹⁸. Algo similar parece ocurrir con la caseína α_2 , aunque la información sobre su degradación por las proteasas autóctonas es mucho más escasa; de los datos de Snoren²¹ parece deducirse que el pH óptimo de la plasmina cuando actúa sobre la caseína α_2 es similar al que presenta sobre la β , por lo que es de esperar que la actividad proteica de la leche presente frente a ella una respuesta parecida a la descrita para la β -caseína. En cuanto a la para k-caseína, se ha comprobado que las proteasas autóctonas de la leche tampoco la atacan durante la maduración del queso^{8, 17}.

La flora dominante en la maduración del queso de Valdeleja está constituida por microorganismos lácticos², que no son por otra parte de actividad proteolítica especialmente alta²⁵. Las proteasas de las bacterias lácticas presentan pHs óptimos de acción próximos a la neutralidad¹¹, y los pHs de 4,7 son ya claramente desfavorables a su actividad⁶. Es de esperar que a 4,4-4,5 se encuentre aún más restringida.

De todo ello se deduce que un queso de maduración láctica y pH tan bajo como el aquí estudiado debe de sufrir necesariamente una proteolisis poco intensa, con más razón al ser elaborado con leche de cabra y presentar relaciones sal/humedad altas. De hecho, en una experiencia efectuada por Desmazeaud y colaboradores⁶, en la que se siguió la evolución de los componentes nitrogenados en quesos fabricados con cuajo y flora láctica se obtuvieron, al cabo de veintisiete días de maduración, valores de NST, NNP y N amínico algo más altos que los aquí descritos, a pesar de que el pH no bajó de 4,7 y de que se empleó para la fabricación del queso leche de vaca rica en caseína α_1 que es hidrolizada mucho más fácilmente que la β ¹², la mayoritaria en leche de cabra.

BIBLIOGRAFIA

- 1) ALCALA, R.; MARCOS, A.; ESTEBAN, M.A. y MILLAN, R. (1982). Quesos frescos de cabra de Cádiz y de Málaga: III. Caseínas y polipéptidos insolubles. *XIV Jornadas de estudio de la Asociación Interprofesional para el Desarrollo Agrario*. Zaragoza.
- 2) ALONSO CALLEJA, C.; GARCIA, M.L.; CARBALLO, J.; GUTIERREZ, M.L. y DAPORTA, P. (1988). Especies de lactobacilos presentes en el queso de cabra de Valdeleja. *VI Reunión Científica de Microbiología de los Alimentos*. Madrid.
- 3) BARRETO, J. (1979). Componentes nitrogenados del queso de Fuerteventura. *Arch. de Zootecnia*, 28, 287-296.
- 4) CREAMER, K.K. (1986). A further study of the action of rennin on β -casein. *N. Z. Dairy Sci. Technol.*, 11, 30-36.
- 5) DESMAZEAUD, M.J. y GRIPON, J.C. (1977). General mechanism of protein breakdown during cheese ripening. *Milchwissenschaft*, 32, 731-734.
- 6) DESMAZEAUD, M.J.; GRIPON, J.C.; LE BARS, D. y BERGERE, J.C. (1976). Etude du role des micro-organismes et des enzymes au cours de la maturation des fromages. III Influence des micro-organismes. *Le lait*, 557, 379-396.
- 7) FRESNO BARO, J.M. (1988). Tesina de Licenciatura. Universidad de León.

- 8) GREEN, M.L. y FOSTER, P.M.D. (1974). Comparison of the rates of proteolysis during ripening of Cheddar cheeses made with calf rennet and swine pepsin as coagulants. *J. Dairy Res.*, 41, 269-282.
- 9) GUTIERREZ, L.M.; CARBALLO, J.; VIDAL, I.; GONZALEZ PRIETO, J.; MARTIN SARMIENTO, R. y BERNARDO, A. (1988). Evolución de los principales grupos de microorganismos durante la elaboración y maduración del queso de Valdeleja. *An. Fac. Vet.*, 34, en este volumen.
- 10) JENNES, R. (1980). Composition and characteristics of goat milk: Review 1968-1979. *J. Dairy Sci.*, 63, 1.605-1.630.
- 11) LEDFORD, R.A.; O'SULLIVAN, A.C. y NATH, K.R. (1966). Residual casein fractions in ripened cheese determined by polyacrylamide-gel electrophoresis. *J. Dairy Sci.*, 49, 1.098-1.101.
- 12) KIKUCHI, T.; BERGERE, J.L. y DESMAZEAUD, M.J. (1974). Aptitude des streptocoques lactiques à la protéolyse. III. Etude de l'action du système protéolytique des *Streptococcus lactis* sur la casine entière. *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.*, 14, 313-326.
- 13) MARCOS, A.; FERNANDEZ-SALGUERO, J.; ESTEBAN, M.A.; LEON, F.; ALCALA, M. y BELTRAN DE HEREDIA, F.H. (1984). El queso de los Iboreos: composición química, valor nutritivo y estabilidad. *ILE*, 64, 15-20.
- 14) MARCOS, A.; FERNANDEZ-SALGUERO, J.; ESTEBAN, M.A.; LEON, F.; ALCALA, M. y BELTRAN DE HEREDIA, F.H. (1984). El queso de Badaia. Tablas de composición química, valor nutritivo y estabilidad. *ILE*, 65-66, 21-28.
- 15) MARCOS, A.; FERNANDEZ-SALGUERO, J.; ESTEBAN, M.A.; LEON, F.; ALCALA, M. y BELTRAN DE HEREDIA, F.H. (1985). Quesos españoles. Tablas de composición, valor nutritivo y estabilidad. *Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba*. Córdoba.
- 16) MILLAN, R.; ALCALA, M.; ESTEBAN, M.A. y MARCOS, A. (1982). Quesos frescos de Cádiz y de Málaga. IV Compuestos nitrogenados solubles. *XIV Jornadas de estudio de la Asociación Interprofesional para el Desarrollo Agrario*. Zaragoza.
- 17) NATH, D.R. y LEDFORD, R.A. (1973). Growth response of *Lactobacillus casei* var. *casei* to proteolysis products in cheese during ripening. *J. Dairy Sci.*, 56, 710-715.
- 18) NOOMEN, A. (1978). Activity of proteolytic enzymes in simulated soft cheeses (Meshanger type). I. Activity of milk protease. *Neth. Milk Dairy J.*, 32, 26-48.
- 19) O'KEEFFE, A.M.; FOX, P.F. y DAILY, C. (1978). Proteolysis in Cheddar cheese: role of coagulant and starter bacteria. *J. Dairy Res.* 45, 465-477.
- 20) ORDOÑEZ, J.A. (1974). Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria de León. Universidad de Oviedo.
- 21) SNOREN, T.H.M. y VAN RIEL, J.A.M. (1979). Milk proteinase, its isolation and action on α_2 and β -casein. *Milchwissenschaft*, 34, 528-531.
- 22) THOMAS, T.D. y PEARCE, K.N. (1981). Influence of salt on lactose fermentation and proteolysis in Cheddar cheese. *N. Z. J. Dairy Sci. Technol.*, 16, 253-259.
- 23) TRIEU-CUOT, P. y GRIPON, J.C. (1982). A study of proteolysis during Camembert cheese ripening using isoelectric focusing and two dimensional electrophoresis. *J. Dairy Res.*, 49, 501-510.
- 24) VAKALERIS, D.G. y PRICE, W.V. (1959). A rapid spectrophotometric method for measuring cheese ripening. *J. Dairy Sci.*, 42, 264-276.
- 25) VISSER, F.M.W. y GROOT-MOSTERT, A.E.A. (1977). Contribution of enzymes from rennet, starter bacteria and milk to proteolysis and flavour development in Gouda cheese. IV. Protein breakdown: a gel electrophoretical study. *Neth. Milk Dairy J.*, 31, 247-264.