ŻYWNOŚĆ. Nauka. Technologia. Jakość, 2005, 4 (45), 52 - 61

GRAŻYNA CICHOSZ, ANETA KONOPKA, ANNA ZALECKA

DOJRZEWANIE SERA GOUDA – MONITORING Z ZASTOSOWANIEM METODY ODWOŁAWCZEJ I METOD ALTERNATYWNYCH

S t r e s z c z e n i e

Różnorodność procesów mikrobiologicznych i biochemicznych podczas dojrzewania sera, wzajemne pomiędzy nimi zależności oraz zmienność w czasie utrudniają monitorowanie procesów proteolizy i peptydolizy. Z tego powodu w różnych ośrodkach naukowych realizowane są badania nad opracowaniem wiarygodnych metod monitoringu proteolizy podczas dojrzewania różnego typu serów.

Oceniając degradację parakazeiny podczas dojrzewania sera Gouda stwierdzono odmienną dynamikę formowania niskocząsteczkowych związków azotowych. Podczas 6 tygodni dojrzewania przyrosty zawartości N-peptydowego, N-aminokwasowego i N-aminowego wynosiły odpowiednio 280,4; 304,6 i 242,0%. Natomiast przyrosty zawartości peptydów rozpuszczalnych w 2- i 12-procentowym TCA były zdecydowanie mniejsze i wynosiły odpowiednio: 167 oraz 153,8%.

Nie stwierdzono korelacji między zawartością N-rozpuszczalnego, peptydów rozpuszczalnych w 2- i 12-procentowym TCA oraz zawartością niskocząsteczkowych związków azotowych w serach podczas dojrzewania. Natomiast w serach dojrzałych zawartość N-peptydowego i N-aminowego była skorelowana z zawartością N-rozpuszczalnego w pH 4,6. Z kolei zawartość N-aminokwasowego nie była skorelowana z ilością N-rozpuszczalnego, ale korelowała z ilością peptydów rozpuszczalnych w 2- i 12-procentowym TCA.

Metody alternatywne z 2- i 12-procentowym TCA mogą być zatem przydatne do porównywania zakresu i głębokości proteolizy w dojrzałych serach typu holenderskiego. Natomiast w ocenie dynamiki proteolizy podczas dojrzewania sera bardziej przydatny jest tradycyjny (chociaż praco- i czasochłonny) sposób frakcjonowania różnych form związków azotowych i ich oznaczanie odwoławczą metodą Kjeldahla.

W odróżnieniu od serów typu holenderskiego, w serach Cheddar proteoliza i peptydoliza przebiegała znacznie wolniej i równomiernie – w związku z mniejszą aktywnością wody i stałym składem chemicznym w całej masie sera. Umożliwia to stosowanie metod alternatywnych do monitoringu proteolizy podczas dojrzewania sera Cheddar.

Słowa kluczowe: ser Gouda, proteoliza – metody oceny

Wstęp

W produkcji i dojrzewaniu sera aktywne są enzymy pochodzące z różnych źródeł: surowca, zakwasu, mikroflory wtórnej oraz egzogenne proteinazy stosowane we wszystkich serach podpuszczkowych w celu koagulacji. Ukierunkowanie tak różnorodnych i złożonych procesów biochemicznych możliwe jest dzięki stosowaniu

Prof. dr hab. G. Cichosz, mgr inż. A. Konopka, dr inż. A. Zalecka, Katedra Mleczarstwa i Zarządzania Jakością, Wydz. Nauki o Żywności, Uniwersytet Warmińsko –Mazurski, ul. Heweliusza 1, 10-724 Olsztyn

kultur starterowych. Zmiany kwasowości, a zwłaszcza ich dynamika, decydują o stopniu odwapnienia skrzepu oraz wielkości micel kazeiny, co wpływa na zwięzłość skrzepu i jego podatność na synerezę, a w konsekwencji na strukturę sera.

Pomiędzy enzymami aktywnymi w procesie wyrobu i dojrzewania sera istnieje wiele zależności. Produkty metabolizmu kultur starterowych uaktywniają działanie podpuszczki. Mimo, iż niewielka część enzymu zatrzymywana jest w skrzepie, podpuszczka odgrywa istotną rolę w degradacji parakazeiny podczas dojrzewania sera, a efektem jej hydrolitycznej aktywności jest formowanie rozpuszczalnych związków azotowych. Z kolei produkty hydrolizy kazeiny podpuszczką mogą uaktywniać proteinazy i peptydazy bakteryjne odpowiedzialne za formowanie niskocząsteczkowych peptydów (endopeptydazy) oraz wolnych aminokwasów (egzopeptydazy) [11, 20, 21].

Aktywność enzymów bakteryjnych zależna jest od dostępu do odpowiednich substratów; im więcej w masie sera znajduje się wysokocząsteczkowych peptydów powstających pod wpływem podpuszczki, tym większa jest aktywność peptydaz [7, 9].

Wyniki wcześniejszych opracowań autorów dowodzą, że w degradacji parakazeiny do niskocząsteczkowych związków azotowych bardziej istotne są proteinazy i peptydazy niepochodzących z zakwasu pałeczek mlekowych (NSLAB) niż enzymy uwalniane po autolizie kultur zakwasu. Żaden z wyróżników określających zakres degradacji parakazeiny nie korelował ze stopniem autolizy kultur zakwasu. Stwierdzono natomiast występowanie istotnej korelacji między wzrostem niepochodzących z zakwasu pałeczek mlekowych (NSLAB) a zawartością N-rozpuszczalnego, N-peptydowego i N-aminowego oraz peptydów rozpuszczalnych w 12-procentowym TCA [5]. Wymienione produkty degradacji parakazeiny w statystycznie istotnym stopniu determinowały jakość sensoryczną sera Gouda [6, 14, 23].

Różnorodność procesów mikrobiologicznych i biochemicznych podczas dojrzewania sera, wzajemne pomiędzy nimi zależności oraz zmienność w czasie utrudniają śledzenie procesów proteolizy i peptydolizy. Dlatego też, w różnych ośrodkach naukowych realizowane są badania nad opracowaniem wiarygodnych metod monitoringu proteolizy podczas dojrzewania serów [15, 16, 17, 18, 19].

Istnieje potrzeba stosowania szybkich metod alternatywnych, gdyż ocena zawartości poszczególnych form związków azotowych w serze odwoławczą metodą Kjeldahla jest zarówno czaso- i pracochłonna, jak też kosztowna. Wyniki metod alternatywnych powinny być jednak zgodne z wynikami metody odwoławczej.

Wobec powyższego podjęto badania, za cel których postawiono:

– ocenę stopnia degradacji parakazeiny metodą odwoławczą (poprzez oznaczanie N-rozpuszczalnego, N-peptydowego i N-aminokwasowego [w % N ogółem]) po soleniu oraz 2, 4 i 6 tygodniach dojrzewania sera Gouda,
– ocenę stopnia degradacji parakazeiny metodą z 2- i 12-procentowym TCA oraz z TNBS po soleniu, jak również po 2, 4 i 6 tygodniach dojrzewania sera Gouda,

– określenie stopnia korelacji między wynikami uzyskanymi metodami alternatywnymi a zawartością poszczególnych form związków azotowych oznaczanych metodą odwoławczą.

Materiał i metody badań

Sery Gouda (n=12) produkowano w warunkach przemysłowych zgodnie z instrukcją zakładową w Spółdzielni Mleczarskiej Mlekpol w Grajewie, Zakład w Kolnie, z mleka poddanego termizacji, baktofugacji i pasteryzacji, wzbogaconego dodatkiem $CaCl_2$ i KNO_3. Zastosowano podpuszczkę Chymax oraz kultury starterowe typu BD w postaci zakwasów roboczych, (do których propagacji zastosowano podłoża buforowe) lub głęboko mrożonych koncentratów bakterii mlekowych. Kultury starterowe oraz podłoża pochodziły od dwóch różnych producentów.

Ocenę stopnia degradacji parakazeiny podczas dojrzewania sera przeprowadzono metodą odwoławczą (metoda Kjeldahla), uwzględniającą zmiany zawartości poszczególnych form związków azotowych a także metodami alternatywnymi z zastosowaniem kwasu trichlorooctowego o stężeniu 2 i 12% oraz TNBS.

Oznaczano zawartość: związków azotowych ogółem [8], związków azotowych rozpuszczalnych w środowisku o pH 4,6 wg Sode Mogensena [8], związków azotowych peptydowych wg Boulanger i wsp. w roztworze związków azotowych niebiałkowych przygotowanym wg Schobera i wsp. [8], związków azotowych aminokwasowych metodą Sirksa [8], aminowych związków azotowych (wolne grupy aminowe z TNBS) [12], związków azotowych rozpuszczalnych w 2- i 12-procentowym roztworze kwasu trichlorooctowego (TCA) [10].

Obliczono podstawowe miary statystyczne: wartość średnią ($\overline{x}$), odchylenie standardowe (SD), współczynnik zmienności (v). Istotność różnic między zawartością poszczególnych form związków azotowych oznaczonych metodą odwoławczą oraz alternatywną określano wyznaczając współczynnik korelacji przy prawdopodobieństwie $\alpha = 0,05$. Obliczenia wykonano za pomocą programu komputerowego Microsoft Excel 2000.

Wyniki i dyskusja

Porównanie dynamiki degradacji parakazeiny w badanych serach było możliwe dzięki odniesieniu zawartości poszczególnych form związków azotowych do zawartości N ogółem (tab. 1, rys. 1).

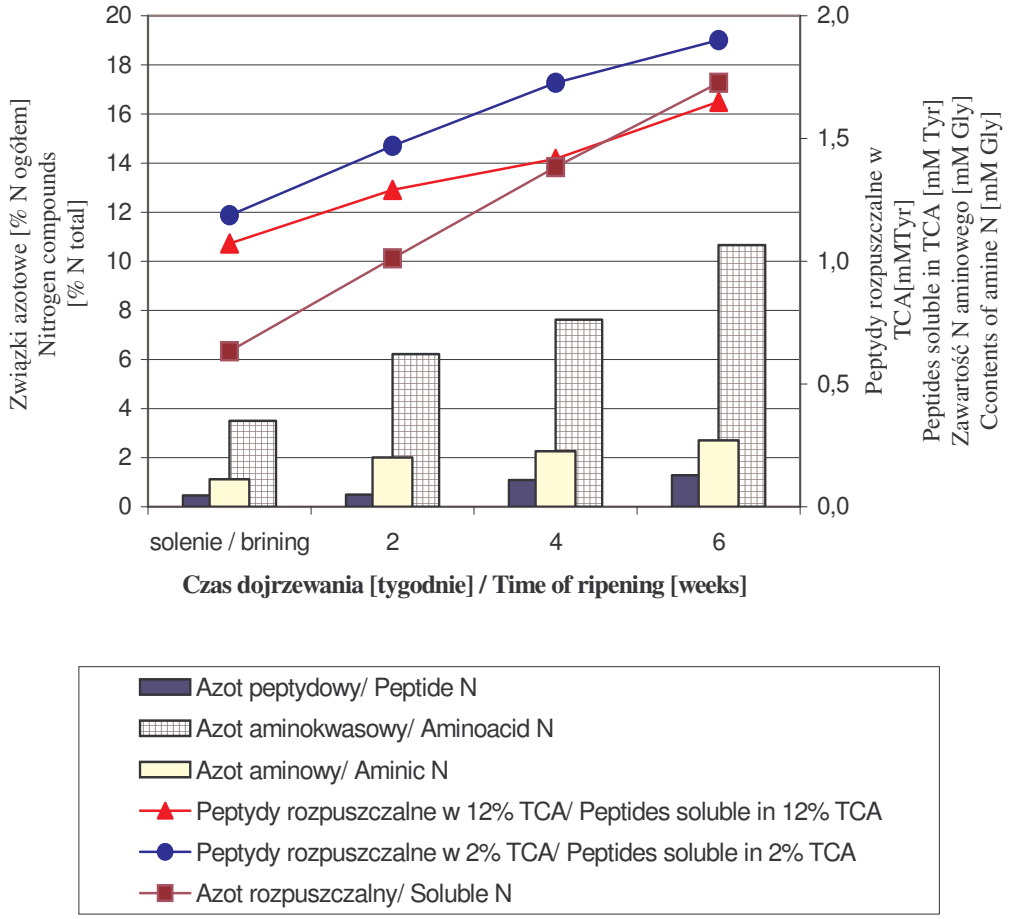
Nie stwierdzono korelacji między ilością niskocząsteczkowych form związków azotowych a zawartością N-rozpuszczalnego (tab. 2). W skład N-rozpuszczalnego, oprócz niskocząsteczkowych produktów degradacji parakazeiny – formowanych przez enzymy bakteryjne – wchodzą także peptydy uwalniane przez podpuszczkę [7, 9]. Enzymy bakteryjne odpowiedzialne za formowanie niskocząsteczkowych peptydów, wolnych aminokwasów i związków aminowych są mało aktywne w początkowych etapach dojrzewania ze względu na brak odpowiednich substratów.

T a b e l a 1

Zawartość związków azotowych podczas dojrzewania sera Gouda (n = 12).
The content of nitrogen compounds when the Gouda cheese ripens (n = 12).

Forma związków azotowych Type of nitrogen compounds	Miary statystyczne Statistical parameters	Czas dojrzewania [tygodnie] Time of ripening [weeks]			
		Solenie Brining	2	4	6
N-rozpuszczalny [% N ogółem] Soluble N [% of total N]	$\bar{x}$	6,33	10,12	13,84	17,27
	SD	1,41	1,65	2,77	2,64
	v [%]	22,1	82,5	69,3	44,0
N-peptydowy [% N ogółem] Peptide N] [% of total N]	$\bar{x}$	0,46	0,49	1,09	1,29
	SD	0,19	0,11	0,36	0,55
	v [%]	0,9	0,1	0,5	1,3
N-aminokwasowy [% N ogółem] Aminoacid N [% of total N]	$\bar{x}$	3,50	6,22	7,62	10,66
	SD	1,38	1,34	0,93	2,84
	v [%]	160,7	1005,0	178,9	227,2
N-aminowy Aminic N [mM Gly]	$\bar{x}$	0,11	0,20	0,23	0,27
	SD	0,04	0,03	0,02	0,05
	v [%]	33,9	16,4	8,8	18,8
Peptydy rozpuszczalne w 2% TCA Peptides soluble in 2 % TCA [mM Tyr]	$\bar{x}$	1,22	1,47	1,73	24,92
	SD	0,22	0,22	0,20	64,36
	v [%]	0,6	1,1	1,7	302,4
Peptydy rozpuszczalne w 12% TCA Peptides soluble in 12 % TCA [mM Tyr]	$\bar{x}$	1,07	1,29	1,42	1,65
	SD	0,28	0,17	0,18	0,14
	v [%]	45,5	15,6	10,7	8,3

Objaśnienia: / Explanatory notes:
$\bar{x}$ – wartość średnia / mean value; SD – odchylenie standardowe / standard deviation;
v – współczynnik zmienności / variability coefficient.



Rys. 1. Zmiany zawartości N-rozpuszczalnego, peptydów rozpuszczalnych w 2- i 12-procentowym TCA w zależności od zawartości niskocząsteczkowych produktów degradacji parakazeiny.

Fig. 1. Changes in the content of soluble N, peptides soluble in 2% and 12% TCA depending on the content of low-molecular products of the paracasein degradation.

W skład frakcji peptydów rozpuszczalnych w 2-procentowym TCA oraz frakcji związków azotowych rozpuszczalnych w środowisku o pH 4,6 weszły produkty degradacji parakazeiny o podobnej masie cząsteczkowej. Mimo to, porównując wymienione wyróżniki stopnia dojrzewania sera, nie stwierdzono zależności statystycznie istotnej. Dodatnią korelację stwierdzono natomiast między ilością peptydów rozpuszczalnych w 2-procentowym TCA a zawartością N-aminokwasowego – ale tylko po 4 i 6 tygodniach dojrzewania (tab. 2).

Frakcja peptydów rozpuszczalnych w 12-procentowym TCA, to przede wszystkim niskocząsteczkowe peptydy (2 do 20 aminokwasów) i wolne aminokwasy [4, 13]. Wbrew oczekiwaniom zmiany zawartości N-peptydowego oraz N-aminokwasowego w badanych serach nie były skorelowane ze zmianami zawartości peptydów rozpuszczalnych w 12-procentowym TCA (tab. 2).

Z porównania zmian zawartości N-rozpuszczalnego oraz peptydów rozpuszczalnych w 2- i 12-procentowym TCA wynika całkowicie odmienna dynamika formowania wymienionych produktów degradacji parakazeiny (rys. 1). W serach bezpośrednio po soleniu stwierdzono zdecydowanie wyższą zawartość peptydów rozpuszczalnych w 2- i 12-procentowym TCA niż ilość N-rozpuszczalnego. Podczas kolejnych etapów dojrzewania zróżnicowanie to sukcesywnie malało. Uzyskane w tym zakresie wyniki są całkowicie zgodne z rezultatami, jakie przedstawili różni autorzy w licznych opracowaniach naukowych dotyczących procesu dojrzewania serów: ementalskiego [15, 16], francuskiego Comte [3], Cheddar [10, 18, 19], greckiego Kefalotyri oraz niedojrzewających serów Feta i Teleme [12].

T a b e l a 2

Współczynniki korelacji między zawartością N-rozpuszczalnego, peptydów rozpuszczalnych w 2 i 12-procentowym TCA a zawartością niskocząsteczkowych form związków azotowych.
Coefficients of correlation among the contents of soluble N, peptides soluble in 2% and 12 % TCA, and of the low – molecular nitrogen compounds.

Forma związków azotowych Type of nitrogen compounds	N-rozpuszczalny Soluble N				Peptydy rozpuszczalne w 2% TCA Peptides soluble in 2% TCA				Peptydy rozpuszczalne w 12% TCA Peptides soluble in 12 % TCA			
	Solenie Brining	2	4	6	Solenie Brining	2	4	6	Solenie Brining	2	4	6
N-peptydowy Peptide N	-0,59	-0,02	0,58	0,58	0,77	-0,21	-0,38	-0,67	0,37	-0,25	-0,15	0,02
N-aminokwasowy Aminoacid N	-0,60	-0,24	0,18	0,16	0,13	-0,46	0,12	0,65	-0,15	-0,49	0,06	0,06
N-aminowy Aminic N	0,49	-0,16	0,07	0,64	-0,62	0,59	0,18	-0,25	-0,39	0,66	0,30	0,36
N-rozpuszczalny Soluble N	-	-	-	-	-0,50	-0,29	-0,68	-0,10	-0,57	-0,14	-0,39	0,53

Wytrącanie produktów degradacji parakazeiny roztworem TCA jest klasyczną, stosowaną przez różnych autorów [4, 13, 15] metodą frakcjonowania związków azotowych rozpuszczalnych w wodzie (WSF). W zależności od koncentracji TCA (2, 2,5 i 12%) wytrącane są produkty hydrolizy kazeiny o różnej masie cząsteczkowej. Stosując 2- i 12-procentowy TCA wytrąca się odpowiednio ok. 10 i 50% N-rozpuszczalnego w środowisku o pH 4,6. Frakcja wytrącona 2-procentowym TCA zawiera w większości peptydy o wysokiej masie cząsteczkowej. Z kolei frakcja

wytrącona 12-procentowym TCA, oprócz wysokocząsteczkowych, zawiera także peptydy o mniejszej masie cząsteczkowej, co udowodniono stosując elektroforezę [10].

Frakcjonowanie 5-procentowym kwasem fosforowolframowym (PTA) jest bardziej selektywne. W przypadku sera Cheddar po 1 i 3 miesiącach dojrzewania frakcja rozpuszczalna w 5-procentowym PTA stanowiła odpowiednio 1,5 i 3,0% N ogółem. W skład omawianej frakcji wchodzą aminokwasy i peptydy o masie cząsteczkowej poniżej 600 Da [4]. W badanych serach Gouda zawartość frakcji rozpuszczalnych w 5% kwasie fosforowolframowym, (czyli zawartość N-aminokwasowego) wynosiła średnio od 3,5 (w serach po soleniu) do 10,66% N-ogółem (w serach po 6 tygodniach dojrzewania) (tab.1). Tak wysokie przyrosty zawartości N-aminokwasowego były konsekwencją wyższej a_w w serach Gouda w porównaniu z serami Cheddar. Skutkiem tego, mimo zaledwie 6 tygodni dojrzewania, procesy hydrolizy parakazeiny są w serach Gouda bardzo intensywne[5].

Statystycznie istotną zależność między ilością N-rozpuszczalnego [% N ogółem] oznaczonego metodą Kjeldhala a ilością N-aminowego oznaczonego z TNBS w niedojrzewających serach Feta i Teleme stwierdziła Polychroniadou [12].

Kuchroo i wsp. [10] stwierdzili powolne tempo formowania N-rozpuszczalnego oraz N-aminowego oznaczanego z TNBS podczas pierwszych tygodni dojrzewania sera Cheddar. Dopiero po 12 tygodniach dojrzewania sera procesy proteolizy i peptydolizy uległy wyraźnej intensyfikacji.

Prace badawcze dotyczące stosowania metod alternatywnych zamiast praco- i czasochłonnego frakcjonowania związków azotowych metodą Kjeldhala w serze ementalskim realizował Rohm i wsp. [15,16]. W dojrzałych serach Groyer zawartość N-rozpuszczalnego korelowała z ilością amoniaku uwalnianego podczas destylacji próbek sera rozpuszczonych w 40-procentowym roztworze NaOH [17].

Frakcjonowanie związków azotowych sera Cheddar oraz identyfikacja peptydów były przedmiotem badań Singh i wsp.[18, 19]. Ekstrakt frakcji rozpuszczalnej w wodzie z sera Cheddar frakcjonowano poprzez ultrafiltrację i diafiltrację. Stosując oznaczanie sekwencji aminokwasów spektrometrią masową oraz chromatografią DEAE na celulozie, identyfikowano peptydy uwalniane przez podpuszczkę oraz proteinazy ściany komórkowej kultur starterowych *Lactococcus* ssp. z poszczególnych frakcji kazeiny.

Z licznych opracowań naukowych wynika, że możliwy jest monitoring degradacji parakazeiny podczas dojrzewania serów przy zastosowaniu metod, których podstawą jest oznaczanie zawartości wolnych aminokwasów [1, 3, 4] lub grup aminowych (TNBS) [10, 22]. Jednak wymienione opracowania naukowe dotyczą sera Cheddar oraz greckich serów niedojrzewających. Tymczasem w serach typu holenderskiego przemiany biochemiczne są bardzo intensywne ze względu na wysoką aktywność wody, czym należy tłumaczyć brak korelacji wyników uzyskanych metodą odwoławczą oraz metodami z 2- i 12-procentowym TCA, a także TNBS.

Również metody instrumentalne: chromatografia, elektroforeza – stosowane we frakcjonowaniu oraz identyfikacji peptydów, a także określaniu ich masy cząstecz-

kowej – w ilościowej ocenie procesu hydrolizy parakazeiny podczas dojrzewania sera nie są przydatne [2, 10, 18].

Wnioski

1. Nie stwierdzono korelacji między zawartością N-rozpuszczalnego, ilością peptydów rozpuszczalnych w 2- i 12-procentowym TCA oraz zawartością niskocząsteczkowych form związków azotowych w serach podczas dojrzewania.
2. W serach dojrzałych zawartość N-rozpuszczalnego skorelowana była z ilością N-eptydowego i N-aminowego, poza tym stwierdzono korelację N-aminokwasowego i peptydów rozpuszczalnych w 2-procentowym TCA.
3. Metody alternatywne nie są przydatne w monitoringu proteolizy i peptydolizy podczas dojrzewania sera Gouda. Mogą być natomiast stosowane przy porównaniach zakresu proteolizy w dojrzałych serach różnego typu.

Pracę zrealizowano w ramach grantu KBN 5P06G01818

Literatura

[1] Ardö Y., Meisel H.: Methods for direct measurement of peptide bond cleavage in cheese. Bulletin IDF, 1991, **261**, 10-13.
[2] Ardö Y, Gripon J.C.: Chromatographic methods used to measure proteolysis in cheese. Bulletin IDF, 1991, **261**, 29-34.
[3] Bouton Y., Grappin R.: Measurement of proteolysis in cheese: relationship between phosphotungstic acid-soluble N fraction by Kjeldahl and 2,4,6- trinitrobenzenesulphonic acid-reactive groups in water-soluble N. J. Dairy Res., 1994, **61**, 437-440.
[4] Christensen T.M.I.E., Bech A.M., Werner H.: Methods for crude fractionation (extraction and precipitation) of nitrogen components in cheese. Bulletin IDF, 1991, **261**, 4-9,
[5] Cichosz G., Zalecka A., Lenkiewicz M.: The influence of streptococci and lactobacilli on proteolysis in Gouda cheese. Milchwissenschaft, 2003, **58 (5/6)**, 297-300.
[6] Cichosz G., Zalecka A., Kornacki M.: Effect of paracasein degradation on sensory properties of Gouda cheese. Nahrung/Food, 2003, **47 (6)**, 383-387.
[7] El Soda M.: Accelerated maturation of cheese. Int. Dairy J., 1993, **(93)**, 531-544.
[8] Heldrich K.: Official methods of analysis of the association of official analytical chemists. Association of Official Analytical Chemists, Inc., Arlington 1990, Virginia.
[9] Khalid N.M., Marth E.H.: Lactobacilli- Their enzymes and role in ripening and spoilage of cheese. A review. J. Dairy Sci., 1990, **73,** 2669-2684.
[10] Kuchroo C.N., Fox P.F.: Soluble nitrogen in Cheddar cheese: comparison of extraction procedures. Milchwissenschaft, 1982, **37**, 331-335.
[11] Law B.A.: 1987; Proteolysis in relation to normal and accelerated cheese ripening in cheese. Chemistry, Physics and Microbiology, 1987, **1**, 365-392.
[12] Polychroniadou A.: A simple procedure using trinitrobenzenesulphonic acid for monitoring proteolysis in cheese. J. Dairy Res., 1988, **55**, 585-596.
[13] Yvon M., Chabenet C., Pelissier J.P.: Solubility of peptides in trichloracetic acid (TCA) solutions. Int. J. Peptide Protein Res., 1989, **39**, 166-176.
[14] Yvon M., Rijnen L.: Cheese flavour formation by amino acid catabolism. Int. Dairy J., 2001, **11**, 185-201.

[15] Rohm H., Jaros D., Rockenbauer Ch., Riedler-Hellrigl M., Uniacke-Lowe T., Fox P.F.: Comparison of ethanol and trichloracetic acid fractionation for measurement of proteolysis in Emmental cheese. Int. Dairy J., 1996, **6**, 1069-1077.
[16] Rohm H., Tschager E., Jaros D.: 1996; Determination of Proteolysis in Swiss Cheese: Comparison of the Kjeldahl Method and a Spectrophotometric OPA Assay. Lebensm.-Wiss. U.-Technol., 1996, **29**, 191-194.
[17] Rohm H, Jaros D., Riedler-Hellrigl M.: A simple distillation method for the assessment of proteolysis in hard cheese. Lebensm.-Wiss. U. Technol., 1997, **30** 767-769.
[18] Singh T.K., Fox P.F., Hojrup P. Healy A.: A scheme for the fractionation of cheese nitrogen and identification of principal peptides. Int. Dairy J., 1994, **4**, 111-122.
[19] Singh T.K., Fox P.F., Healy A.: Water-soluble peptides in Cheddar cheese: isolation and identification of peptides in the diafiltration retentate of the water-soluble fraction. J. Dairy Res., 1995, **62**, 629-640.
[20] Sousa M.J., Ardö Y., McSweeney P.L.H.: Advances in the study of proteolysis during cheese ripening. Int. Dairy J., 2001, **11**, 327-345.
[21] Van der Berg G., Exterkate F.A.: Technological parameters involved in cheese ripening. Int. Dairy J., 1993, **3**, 458-507.
[22] Wallace J.M., Fox P.F.: Rapid spectrophotometric and fluorimetric methods for monitoring nitrogenous (proteinaceous) compounds in cheese and cheese fractions: a review. Food Chem., 1998, **62 (2)**, 217-224.
[23] Williams A.G., Noble J., Banks J.M.: Catabolism of amino acids by lactic acid bacteria isolated from Cheddar cheese. Int. Dairy J., 2001, **11**, 203-215.

RIPENING OF THE GOUDA CHEESE – MONITORING USING AN APPEAL METHOD AND ALTERNATIVE METHODS

S u m m a r y

The diversity of microbiological and biochemical processes occurring while cheeses ripen, interrelations among those processes, as well as their changeability with time make the monitoring of proteolysis and peptidolysis processes difficult. This is why special research projects are performed in many scientific centres aiming at developing a reliable method to monitor the proteolysis process when various types of cheeses ripen.

While evaluating the degradation of paracasein during the ripening of Gouda cheese, it was stated that the dynamics of the process of forming low-molecular nitrogen compounds was different. During a 6 week period of ripening, the rates of increase in the contents of peptide N, aminoacid N, and aminic N amounted to 280.4; 304.6; and 242.0%, respectively. However, the rates of increase in the contents of soluble peptides in 2% and 12% TCA were definitely lower, and amounted to 167 and 153.8%, respectively.

No correlation was found among the content of soluble N, peptides soluble in 2% and 12% TCA, and of the low-molecular nitrogen compounds in cheeses during their ripening. Yet, in the ripe cheeses, the contents of peptide N, aminic N, and of the total content of low-molecular products of the degradation of paracasein were correlated with the content of soluble N at pH 4.6. On the other hand, the content of aminoacid N was not correlated with the content of soluble N, but it was correlated with the amount of soluble peptides in 2% and 12% TCA.

Therefore, those alternative methods with 2% and 12% TCA can be useful when comparing the range and depth of proteolysis in ripe Dutch type cheeses. Yet, for the purpose of evaluating the dynamics of proteolysis occurring whilst cheeses ripen, a traditional method for the fractionation of various forms of nitrogen compounds, and their determination with the Kjeldahl method appears to be more suitable.

Contrary to Dutch type cheeses, the proteolysis and peptidolysis in the Cheddar cheeses run much slower and evenly owing to a lower water activity and thanks to the constant chemical composition throughout the whole mass. This fact makes it possible to apply alternative methods to monitor the proteolysis process whilst the Cheddar cheese ripens.

Key words: Gouda cheese, proteolysis – analytical methods