

## PROTEOLISIS DEL QUESO MANCHEGO: PRIMEROS POLI- PEPTIDOS SOLUBLES.

(PROTEOLYSIS IN MANCHEGO CHEESE: FIRST SOLUBLE POLYPEPTIDES).

por

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

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

Palabras clave (Keywords): Queso (Cheese). Polipéptidos (Polypeptides).  
Proteolisis. Manchego.

### Summary

Soluble nitrogen, soluble tyrosine, and soluble tryptophan were measured during the ripening of three different series of Manchego cheese. A theoretical discussion of results was made on the basis of quantitative electrophoretic data obtained in a parallel study on residual caseins and their first insoluble degradation products, and literature data on their respective primary structures and labile bonds to significant proteinases.

### Resumen

Durante la maduración de tres series diferentes de queso manchego se ha seguido la producción de nitrógeno soluble total y de compuestos solubles que contienen tirosina y triptófano. Algunos resultados obtenidos son explicables por la procedencia y naturaleza de los polipéptidos solubles resultantes de la hidrólisis de las caseínas, a juzgar por los datos electroforéticos cuantitativos adquiridos en una investigación paralela sobre las caseínas residuales y sus primeros productos de degradación insolubles, por las estructuras primarias de unas y otros y por los enlaces sensibles a las principales proteinasas.

Recibido para publicación el 12-3-1981.

Los métodos clásicos para medir la extensión de la proteólisis en el queso se basan en la determinación del nitrógeno soluble. Vakaleris y Price (18) desarrollaron un método espectrofotométrico rápido para determinar el grado de proteólisis del queso, basado en la medida de las concentraciones de tirosina y de triptófano solubles de extractos de queso, obtenidos con citrato sódico/ácido clorhídrico, de pH 4,4. Puesto que las relaciones entre estos compuestos y el porcentaje de nitrógeno soluble del queso fueron lineales y altamente significativas, sugirieron que el método espectrofotométrico podía utilizarse para determinar el índice de maduración de los quesos.

En una publicación anterior (13) expusimos los resultados de una investigación electroforética sobre los cambios de las caseínas y sus productos de degradación insolubles durante la maduración de tres partidas diferentes de queso manchego. Seguidamente se expondrán los resultados del estudio espectrofotométrico paralelo, relativo a la liberación de compuestos nitrogenados solubles que contienen tirosina y/o triptófano, con información complementaria sobre la proteólisis del queso manchego.

#### Material y métodos

Quesos. Una serie de quesos (serie A) fue elaborada por un productor artesanal de Piedrabuena (Ciudad Real), con leche cruda de oveja, que se coaguló a 32° C con cuajo de ternero. Otras dos series de quesos fueron fabricadas en una industria quesera de Ciudad Real, con leche pasteurizada a 75° C/ 17 s, que se coaguló por adición de  $Cl_2Ca$ , fermentos lácticos y cuajo de ternero. En la fabricación de una de estas series (serie B) se utilizó leche pura de oveja, y en la otra (C), mezcla de leche de vaca, oveja y cabra, en proporciones que no nos fueron reveladas.

Después de la salazón de los quesos (día 0 de maduración) éstos 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 nitrógeno. Se hizo por el método de Johnson (6) sobre suspensiones de queso (Mogensen (12)), antes (N total) y después de precipitar a pH 4,4 el N insoluble (N soluble).

Medida espectrofotométrica de las concentraciones de tirosina y de triptófano solubles. Se siguió el método de Vakaleris y Price (18) midiendo en espectrofotómetro Beckman DB-G a 270 y 290 nm las extinciones de los extractos de nitrógeno soluble, a pH 4,4  $\pm$  0,05.

Las concentraciones de tirosina y de triptófano soluble fueron calculadas mediante las ecuaciones:

$$C_{\text{Tyr}} = (0,95 \times E_{270} - 1,31 \times E_{290}) \times 10^{-3}$$

$$C_{\text{Trp}} = (0,307 \times E_{290} - 0,02 \times E_{270}) \times 10^{-3}$$

en las que  $C_{\text{Tyr}}$  y  $C_{\text{Trp}}$  son, respectivamente, los moles de tirosina y de triptófano solubles por litro de extracto.

## Resultados y discusión

Liberación de nitrógeno soluble durante la maduración. A juzgar por el porcentaje del nitrógeno total solubilizado durante la maduración de tres series de queso manchego (cuadro I) es evidente que, en una de las series (la serie B), la proteólisis fue más rápida y extensa que en las otras dos.

A partir de la primera semana de maduración, en los quesos de la serie B se observa una cuantiosa solubilización de los compuestos nitrogenados, de forma que al término de la segunda semana se llega ya al índice de maduración alcanzado por las otras series a los 4-6 meses.

Al término del estudio, en la serie B se encuentra en forma soluble el 30 p.100 del nitrógeno total, en tanto que en las restantes series sólo se ha solubilizado un 23 p.100.

Estos resultados concuerdan con los del análisis electroforético de las caseínas y sus productos de degradación insolubles (Mora y Marcos (13) ) puesto que, en la serie B, la proporción relativa tanto de  $\alpha_s$  como de beta-caseína residuales era muy inferior a la de las otras series, mientras que tanto el número como la proporción relativa de productos de degradación insolubles era muy superior en la serie B, sobre todo a partir de los nueve días de maduración.

Cuadro I. Evolución de la concentración del nitrógeno soluble en los quesos manchegos.

Días de maduración			Nitrógeno soluble (p.100 del N total)		
Serie A	Serie B	Serie C	Serie A	Serie B	Serie C
Cuajada	Cuajada	Cuajada	12,64	9,54	9,67
0	0	0	12,24	11,78	11,69
3	3	3	12,68	14,05	11,05
6	6	6	11,24	17,95	13,82
9	9	9	11,37	16,58	13,87
12	12	12	11,32	18,59	15,64
15	15	15	11,88	23,23	15,31
19	18	18	14,76	22,14	15,90
25	24	24	13,55	21,64	15,76
32	30	30	15,69	20,93	17,05
38	37	38	15,97	22,05	15,23
46	44	45	14,58	17,91	17,48
60	59	59	14,25	18,39	20,00
99	93	91	19,21	26,53	20,30
122	119	113	22,06	29,30	20,28
152	149	153	20,12	28,47	23,30
183	180	182	22,53	30,25	23,98

Medias aritméticas de dos determinaciones

Liberación de compuestos nitrogenados solubles que contienen tirosina y/o triptófano. Durante la maduración de los quesos de la serie B la cantidad de tirosina soluble es mucho mayor que en las otras series (cuadro II y figura 1), lo que refleja la mayor extensión de la proteólisis de los quesos de la serie B, detectada electroforéticamente (Mora y Marcos (13) ) y por la evolución del nitrógeno soluble total; hecho no evidenciado, en cambio, por la tasa de compuestos nitrogenados solubles que contienen triptófano, similar en las tres series (cuadro III y figura 2).

También en la serie B la concentración de tirosina soluble, en el curso de la maduración, es mucho mayor que la de triptófano soluble (figura 4), a diferencia de las restantes series en las que predominan alternativamente la tirosina y el triptófano solubles (figuras 3 y 5).

Los resultados precedentes difieren básicamente de los obtenidos en una investigación anterior sobre quesos manchegos comerciales, en los que se encontró una tasa media de triptófano soluble mayor que de tirosina soluble (Millán (11) ).

Relaciones entre el nitrógeno soluble total y la tirosina y el triptófano solubles. Las correlaciones estadísticas entre la evolución del nitrógeno soluble total versus la de tirosina soluble y la del triptófano soluble son (cuadro IV), en general, altamente significativas ( $P < 0,001$ ), como indicaron Vakaleris y Price (13). Ello no debe interpretarse, sin embargo, en el sentido de que las cantidades de nitrógeno soluble total, de tirosina soluble y de triptófano solubles puedan utilizarse indistintamente como índice de la maduración del queso o de extensión de la proteólisis, puesto que no son interconvertibles por tener diferentes significados.

El porcentaje de nitrógeno soluble constituye un índice inespecífico de proteólisis, en tanto que la tirosina y el triptófano solubles constituyen índices específicos de distintos tipos de proteólisis.

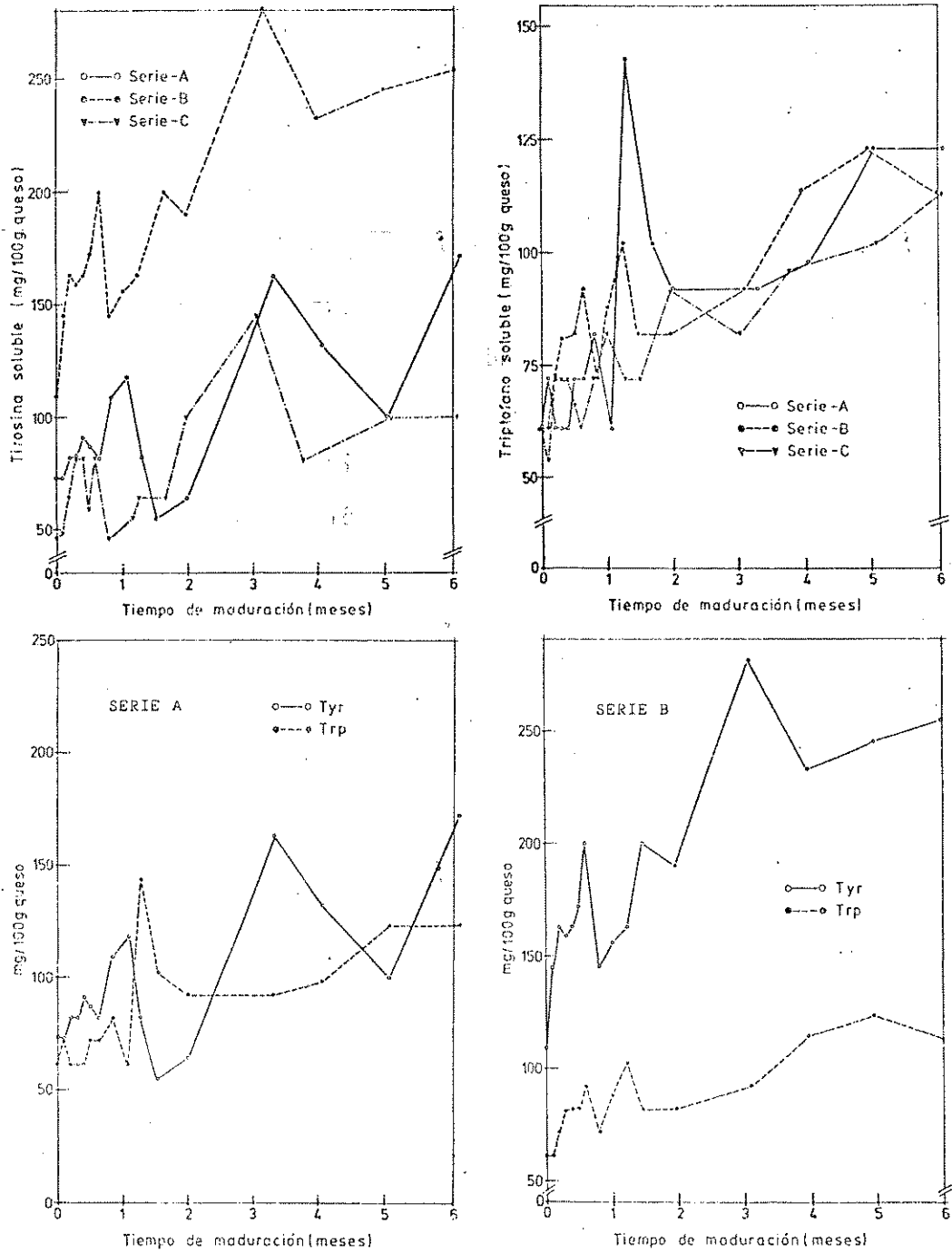
Las diferencias en la especificidad proteolítica permiten explicar lógicamente los resultados aparentemente contradictorios o inconsistentes encontrados en las proporciones relativas de nitrógeno, tirosina y triptófano solubles del queso manchego y de otras muchas variedades de queso.

Cuadro II. Evolución de la concentración de la tirosina soluble, en los quesos manchegos.

Días de maduración			Tirosina soluble (mg/100 g queso)		
Serie A	Serie B	Serie C	Serie A	Serie B	Serie C
Cuajada	Cuajada	Cuajada	82	181	46
0	0	0	73	109	46
3	3	3	73	145	48
6	6	6	82	163	64
9	9	9	82	159	82
12	12	12	91	163	82
15	15	15	87	172	59
19	18	18	82	200	82
25	24	24	109	145	46
32	30	30	118	156	55
38	37	38	82	163	64
46	44	45	55	200	64
60	59	59	64	190	100
99	93	91	163	281	145
122	119	113	132	233	81
152	149	153	100	245	100
183	180	182	172	254	100

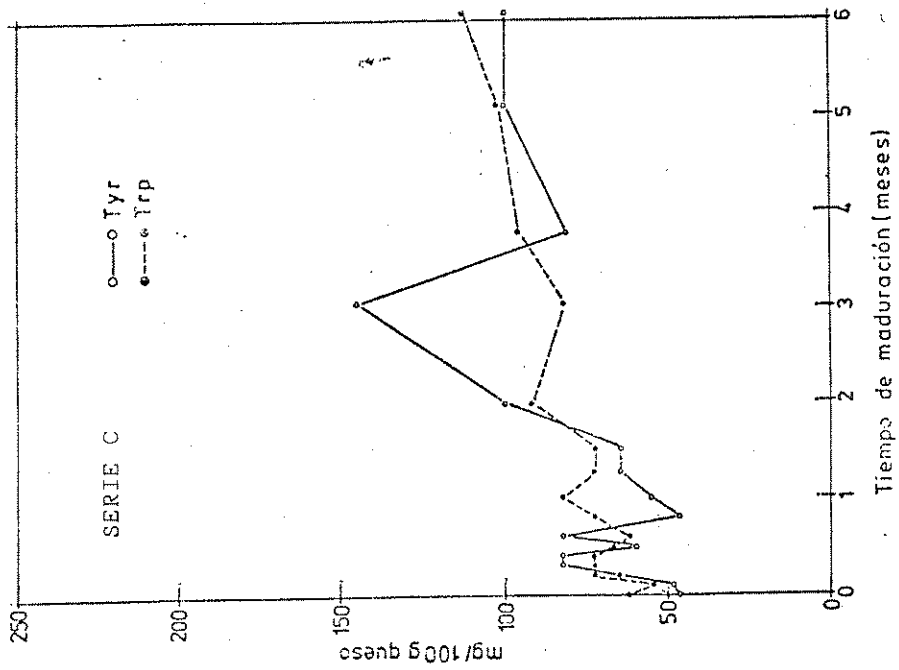
Cuadro III. Evolución de la concentración del triptófano soluble, en los quesos manchegos.

Días de maduración			Triptófano soluble (mg/100 g queso )		
Serie A	Serie B	Serie C	Serie A	Serie B	Serie C
Cuajada	Cuajada	Cuajada	41	41	31
0	0	0	61	61	61
3	3	3	72	61	54
6	6	6	61	72	72
9	9	9	61	81	72
12	12	12	61	82	72
15	15	15	72	82	66
19	18	18	72	92	61
25	24	24	82	72	72
32	30	30	61	88	82
38	37	38	143	102	72
46	44	45	102	82	72
60	59	59	92	82	92
99	93	91	92	92	82
122	119	113	98	114	96
152	149	153	123	123	102
183	180	182	123	113	113

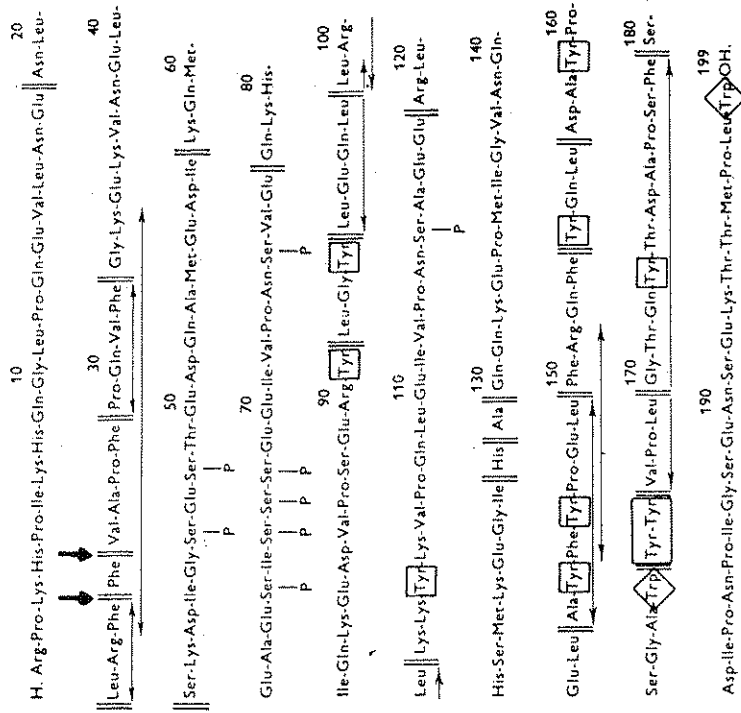


Figuras 1, 2, 3 y 4





Figuras 5 y 6



Cuadro IV. Coeficientes de correlación (r) entre el nitrógeno soluble (cuadro I) y la tirosina soluble (cuadro II) y el triptófano soluble (cuadro III).

X \ Y	Tyr	Trp
NS serie A	0,74***	0,70**
NS serie B	0,74***	0,91***
NS serie C	0,73***	0,93***

En la siguiente discusión se aclararán las razones de la elevada concentración de tirosina soluble observada en los quesos de la serie B, en relación con la de triptófano soluble, y también respecto a las de tirosina y de triptófano solubles de las restantes series.

Procedencia y naturaleza de los primeros polipéptidos resultantes de la proteólisis. Durante la maduración del queso los principales sustratos proteicos (alfa - y beta-caseína) son específicamente hidrolizados por las enzimas del coagulante residual, del sistema proteinasa de la leche (asociado al sustrato) y de las bacterias lácticas añadidas (y otros microorganismos), originando productos de hidrólisis insolubles y solubles.

Por electroforesis cuantitativa se han investigado profundamente las caseínas residuales y sus primeros productos de hidrólisis insolubles. La determinación química del nitrógeno soluble y la medida espectrofotométrica de su absorbancia, debida a la presencia de tirosina y triptófano, proporcionan información complementaria (Marcos y col. (9)) que permite dilucidar la procedencia y naturaleza de los primeros productos de hidrólisis solubles, dado que se conocen las estructuras primarias completas de las caseínas bovinas (y sus homólogas ovinas), los enlaces hidrolizados específicamente por las proteinasas más significativas y las secuencias de los primeros productos de hidrólisis insolubles.

Productos de hidrólisis de las alfa<sub>s</sub>-caseínas. Por electroforesis cuantitativa se ha comprobado (Mora y Marcos (13) ) que en las tres series de quesos (y sobre todo en la B) la alfa<sub>s</sub>-caseína fue hidrolizada mucho más rápidamente y en mayor cuantía que la beta-caseína, originándose, por la acción del cuajo, productos insolubles de mayor movilidad relativa, identificados como alfa<sub>s1</sub>-I bovino y homólogos ovinos.

El polipéptido alfa<sub>s1</sub>-I contiene la secuencia 24-25 a 199 de la alfa<sub>s1</sub>-caseína bovina, donde se localizan todos los residuos de tirosina y triptófano (figura 6). Los polipéptidos básicos N-terminales de las alfa<sub>s</sub>-caseínas, resultantes de la acción del cuajo, aportan por tanto, al comienzo de la maduración, la mayor proporción del nitrógeno soluble total de las tres series de quesos (Mora y Marcos (13) ), sin aportar en cambio tirosina ni triptófano.

La hidrólisis de la alfa<sub>s1</sub>-caseína, por la proteasa ácida de la leche, que puede tener significación en la proteólisis del queso, originaría productos análogos a los de la renina, por ser electroforéticamente indistinguibles (Kaminogawa y col. (7) ). Por otra parte, el producto de degradación de la alfa<sub>s1</sub>-caseína, de menor movilidad que ésta, que resultaría de su hidrólisis por la proteasa alcalina de la leche (Eigel(4)), no fue detectado (Mora y Marcos (13) ).

Posteriormente, debido a la actividad endopeptidásica de las bacterias lácticas (Desmazeaud y col.(3) ) o a la acción prolongada del cuajo (Mulvihill y col.(15) ), podrían formarse, a partir del producto alfa<sub>s1</sub>-I y de la alfa<sub>s1</sub>-caseína, respectivamente, productos solubles que contienen tirosina y/o triptófano.

Productos de hidrólisis de las beta-caseínas. En las series de quesos A y C las beta-caseínas fueron hidrolizadas sólo ligeramente y de forma gradual durante el curso de la maduración, y se originaron esencialmente productos de degradación insolubles, de baja movilidad electroforética, identificados como gamma-caseínas bovinas y productos homólogos ovinos (Mora y Marcos (13) ).

Las gamma<sub>1</sub>-, 2- y 3-caseínas bovinas son, respectivamente, los fragmentos 29-209, 106-209 y 108-209 de la beta-caseína, originados por la

acción de la proteasa alcalina, capaz de hidrolizar a la beta-caseína por tres enlaces susceptibles (figura 7). Los tres tipos de fosfopéptidos N-terminales de las beta-caseínas, liberados a lo largo de la maduración por la acción de la proteasa alcalina, contribuyen a la progresiva formación de nitrógeno soluble en las tres series de quesos, pero sólo los fragmentos liberados al formarse  $\gamma_2$ - y  $\gamma_3$ -caseína contribuyen a la producción de tirosina soluble y ninguno de los tres polipéptidos incrementa el triptófano soluble (figura 7).

En los quesos de la serie C, elaborados con predominio de leche de vaca, la beta-caseína también fue en parte hidrolizada por el cuajo, y se formó cierta cantidad de un producto de degradación de mayor movilidad, identificado como el polipéptido beta-I (Mora y Maros (13) ). Este polipéptido consta de la secuencia 1-189 de la beta-caseína y se forma al hidrolizar la renina el enlace 189:190; uno de los tres sensibles a esta enzima, próximos al extremo C-terminal de la beta-caseína (figura 7), lo que implica la liberación por el cuajo del polipéptido soluble C-terminal (190-209) de la beta-caseína, portador de un residuo de tirosina.

Los productos de degradación insolubles de la beta-caseína que pudieran formarse por la acción de la proteasa ácida, poseerían también idéntica movilidad electroforética que los formados por la acción de la renina (Kaminogawa y col.(7) ). Igualmente la beta-caseína puede ser hidrolizada por enzimas microbianas (Krisna y col.(8) y Moreno y col.(14) ).

Productos de hidrólisis de la gamma-caseína. Aunque la formación de  $\gamma_1$ -caseína (por la acción de la proteasa alcalina sobre la beta-caseína) no libera originariamente tirosina soluble, su ulterior degradación por la proteasa alcalina a  $\gamma_2$ - y  $\gamma_3$ -caseína (que se acumulan al avanzar la maduración a expensas de la  $\gamma_1$ -caseína) sí la produce por liberación de los fragmentos diferenciales 29-106 y 29-108 que contienen el residuo Tyr<sub>60</sub>(figura 7).

Las interpretaciones expuestas concuerdan con las correlaciones estadísticas observadas en los quesos de vaca por Marcos et al.(9), quienes

encontraron que las concentraciones de tirosina y de triptófano soluble estaban directamente relacionadas con la hidrólisis de la beta-caseína y con las cantidades de algunos de sus productos de degradación insolubles ( $\gamma_2$ - y  $\gamma_3$ -caseína), no estando relacionadas con la proteólisis de la alfa<sub>s1</sub>-caseína, ni con las cantidades de sus productos de degradación insolubles o de  $\gamma_1$ -caseína.

Productos de hidrólisis de la kappa-caseína Aunque menos abundante, la kappa-caseína, que contiene 9 residuos de tirosina y 1 de triptófano (figura 8), al ser hidrolizada también, debe contribuir a la formación de tirosina y triptófano solubles. Durante la coagulación de la leche, la kappa-caseína es hidrolizada por la renina en el enlace 105:106 liberando (glico)macropéptidos solubles (que se eliminan con el suero) y para-kappa-caseína insoluble (residuos 1-105) que porta todos los residuos de tirosina y triptófano (figura 8) y queda retenida en la cuajada. La para-kappa-caseína no fue detectada electroforéticamente (Mora y Marcos (13)), por tener migración catiónica.

Más tirosina soluble. La elevada concentración de tirosina soluble hallada en los quesos de la serie B en relación con la de triptófano soluble (figura 4) y respecto a las de tirosina y triptófano solubles de las restantes series (figura 1 y cuadros II y III), se debe a que en los quesos de la serie B, alrededor de un tercio de la beta-caseína resultó hidrolizada por el cuajo, al comienzo de la maduración, y se originó gran cantidad de un producto insoluble de mayor movilidad (designado X), homólogo al beta-I bovino (Mora y Marcos (13)). La liberación simultánea, por la acción del cuajo, de grandes cantidades del polipéptido soluble C-terminal (190-209) de la beta-caseína, que contiene el residuo Tyr<sub>193</sub> (también presente en la beta-caseína ovina), contribuye precoz y sustancialmente a la mayor riqueza de nitrógeno soluble y de tirosina soluble, observada en esta serie de quesos, sin incrementar paralelamente su tasa de triptófano soluble.

Procedencia del triptófano soluble. Aunque en las caseínas existe un marcado predominio de la tirosina frente al triptófano, en el nitrógeno so-

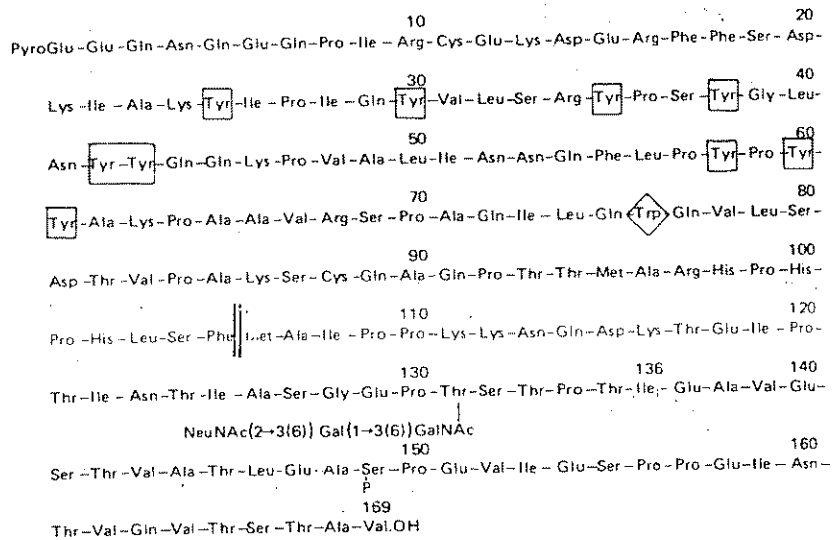
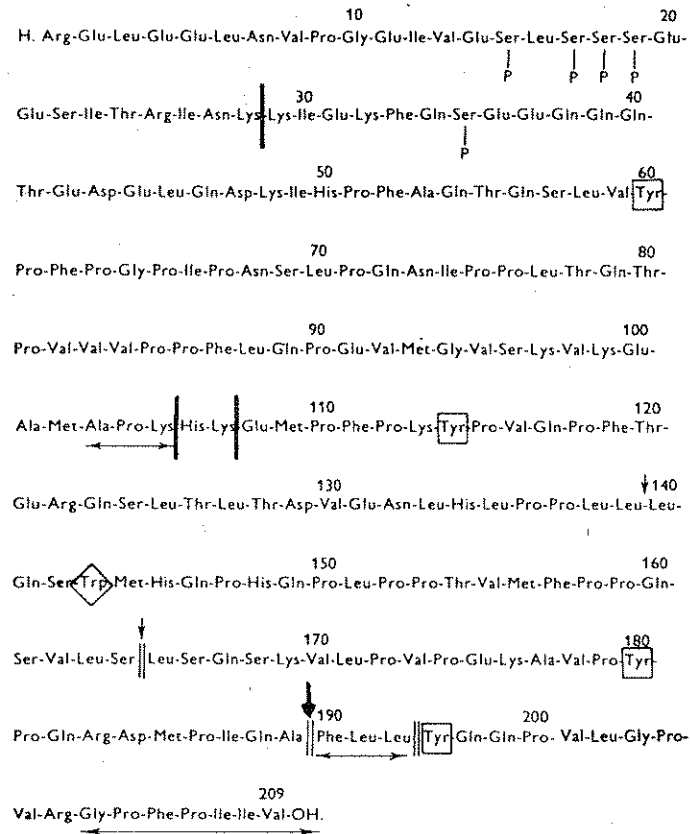
luble ambos aminoácidos se encuentran en proporciones aproximadamente iguales (exceptuada la serie de quesos B).

Todos los primeros productos solubles resultantes de la degradación de las caseínas, a que nos hemos referido, están, sin embargo, desprovistos de triptófano, que queda retenido en los productos insolubles.

El residuo de triptófano C-terminal (Trp 199) de la  $\alpha_{s1}$ -caseína y polipéptido  $\alpha_{s1}$ -I insoluble (y productos análogos) podría ser rápidamente liberado por la actividad carboxipeptidasa de las bacterias, y tanto éste como el residuo Trp 164 podrían también ser solubilizados más lentamente por la acción prolongada de la renina del cuajo (figura 6) o por la actividad endopeptidasa de las bacterias lácticas.

A la última podría deberse igualmente la solubilización de los residuos internos Trp 143 de las beta- y gamma-caseínas y Trp 76 de las para-kappa-caseínas.

MARCOS Y MORA: PROTEOLISIS DEL QUESO MANCHEGO. II.



Figuras 7 y 8

PIE DE LAS FIGURAS

- Figura 1. Evolución de la tirosina soluble, en quesos manchegos.
- Figura 2. Evolución del triptófano soluble, en quesos manchegos.
- Figura 3. Evolución de la tirosina y del triptófano solubles, en quesos manchegos, serie A.
- Figura 4. Evolución de la tirosina y del triptófano solubles, en quesos manchegos, serie B.
- Figura 5. Evolución de la tirosina y del triptófano solubles, en quesos manchegos, serie C.
- Figura 6. Estructura primaria de la  $\alpha_{s1}$ -caseína B bovina (Mercier y col. (10)), en la que se señala la localización de los residuos de tirosina ( $\square$ ) y de triptófano ( $\diamond$ ), de los enlaces hidrolizados por la renina (II) (Creamer (1 y 2) y Pelissier y col. (16) y los péptidos amargos resultantes ( $\leftrightarrow$ ) (Pelissier y col. (16)). Enlaces más sensibles a la hidrólisis por el cuajo ( $\downarrow$ ) (Hill y col. (5)).
- Figura 7. Estructura primaria de la beta-caseína B<sub>2</sub> bovina (Ribadeau-Dumas y col. (17) en la que se señala la localización de los residuos de tirosina ( $\square$ ) y de triptófano ( $\diamond$ ), de los enlaces hidrolizados por la renina (II) (Creamer (1 y 2) y Pelissier y col. (16) y los péptidos amargos resultantes ( $\leftrightarrow$ ) (Pelissier y col. (16)). Enlaces más susceptibles a la hidrólisis por el cuajo ( $\downarrow$ ) (Creamer (1 y 2)) y enlaces hidrolizados por proteasa alcalina de la leche (I) (Ribadeau-Dumas y col. (17)).
- Figura 8. Estructura primaria de la kappa-caseína B bovina, en la que se señala la localización de los residuos de tirosina ( $\square$ ) y de triptófano ( $\diamond$ ) y el enlace hidrolizado por la renina (II).



### Bibliografía

1. Creamer, L.K. N.Z. J. Dairy Sci. Tech. 11, 30 (1976).
2. Creamer, L.K., Mills, O.E. y Richards, E.L. J. Dairy Res. 38, 269 (1971).
3. Desmazeaud, M.J., Gripon, J.C., Le Bars, D. y Bergere, J.L. Le Lait 56, 379 (1976).
4. Eigel, W.N. J. Dairy Sci. 60, 1399 (1977).
5. Hill, R.D., Lahav, E. y Givol, D. J. Dairy Res. 41, 147 (1974).
6. Johnson, M.L. Third Int. Congr. Microbiol., N.Y. 1939 (1941).
7. Kaminogawa, S., Yamauchi, K., Miyazawa, S. y Koga, Y., J. Dairy Sci. 63, 701 (1980).
8. Krisna, B.M. y Dutta, S.M. Milchwissenschaft 29, 273 (1974).
9. Marcos, A., Esteban, M<sup>a</sup>. A., León, F. y J. Fernández-Salguero. J. Dairy Sci. 62, 892 (1979).
10. Mercier, J.C., Grosclaude, F. y Ribadeau-Dumas, B. Eur. J. Biochem. 23, 41 (1971).
11. Millán, R. Tesis doctoral. Univ. Córdoba (España). En redacción. (1981).
12. Mogensen, M.T.S. Proc. 12th Int. Dairy Congr. 2, 849 (1949).
13. Mora, M<sup>a</sup> T. y A. Marcos. Arch. zootec. 117, 139 (1981).
14. Moreno, V. y F.V. Kosikowski. J. Dairy Sci. 65, 33 (1973).

15. Mulvihill, D.M. y P.F. Fox. J. Dairy Res. 46, 641 (1979).
16. Pelissier, J.P., J.C. Mercier y B. Ribadeau-Dumas. Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys. 14, 343 (1974).
17. Ribadeau-Dumas, B., G. Brignon, F. Grosclaude y J.C. Mercier. Eur. J. Biochem. 25, 505 (1972).
18. Vakaleris, D.G. y W.V. Price. J. Dairy Sci. 42, 264 (1959).