

## Péptidos derivados de la troponina T generados en jamón curado

Leticia Mora, Miguel Angel Sentandreu, Fidel Toldrá

Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (CSIC), Apartado de correos 73, 46100, Burjassot, Valencia, España

### Resumen

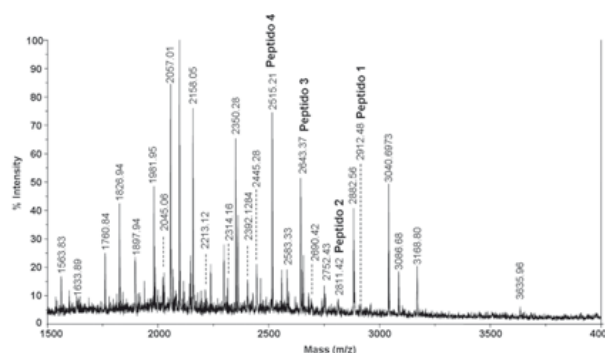
La troponina T es una proteína miofibrilar presente en el músculo estriado con importantes funciones estructurales y reguladoras. Esta proteína se degrada fácilmente durante el condicionamiento post-mortem de la carne aunque todavía se desconocen los detalles de su degradación y la secuencia de los péptidos generados en procesos más largos como el curado del jamón.

La degradación de la troponina T (TnT) se ha correlacionado positivamente con el ablandamiento post-mortem de la carne [1], relacionándola también con la calidad final de la misma [2, 3]. Los cambios que sufren las proteínas musculares durante el procesado del jamón curado han sido ampliamente estudiados, observándose cambios en proteínas estructurales como la TnT [4]. La hidrólisis observada en las proteínas estructurales ayudan a entender como se genera la textura y el flavor típico en el jamón curado. En este trabajo ha sido posible identificar cuatro péptidos generados a partir de la proteólisis de la TnT durante el curado del jamón haciendo uso de la tecnología proteómica.

Se tomaron 50 g de músculo *Biceps femoris* de una pieza de jamón curado para realizar una extracción y posterior desproteinización, obteniendo un extracto de péptidos. Parte del extracto obtenido (5 mL) se fraccionó por medio de cromatografía de exclusión molecular en una columna Sephadex G-25. Las fracciones correspondientes a un mayor tamaño molecular se concentraron e inyectaron en un sistema de cromatografía líquida de alta resolución equipado con una columna Symmetry C18 (250 x 4.6 mm) y un colector de fracciones automático. Las fracciones obtenidas después de esta cromatografía se analizaron posteriormente en un espectrómetro de masas MALDI-TOF/TOF empleando el ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinámico como matriz. La inter-

pretación de los espectros se realizó utilizando el algoritmo MASCOT y la base de datos NCBI.

De los resultados obtenidos se evidencia la intensa degradación proteica que tiene lugar durante la elaboración de jamón curado. La Figura 1 muestra el espectro de masas MALDI-TOF de la fracción eluida a una concentración del 20% de acetonitrilo en la cromatografía de fase reversa. El espectro de masas muestra las masas moleculares de los iones monocargados ( $[M + H]^+$ ) 2811.42, 2690.42, 2583.33, y 2314.16, los cuales se identificaron como los péptidos 1, 2, 3, y 4. En la Tabla 1 se muestran las secuencias de los cuatro fragmentos de TnT identificados a partir de los espectros MS/MS obtenidos por espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF a partir de las fracciones de jamón curado.



**Figura 1.** Espectro de masas MALDI-TOF obtenido a partir de la fracción eluida al 20% de acetonitrilo en cromatografía de fase-reversa.

Las calpaínas (EC 3.4.22.17) participan en la proteólisis del músculo post-mortem principalmente durante la primera etapa del proceso de curado debido a su baja estabilidad en presencia de elevadas concentraciones de sal y pH ácidos, tal como ocurre en las etapas posteriores del curado. De acuerdo con los resultados obtenidos por algunos autores tras incubar TnT de músculo esquelético de conejo bajo condiciones de baja temperatura y alta fuerza iónica [5], la enzima  $\mu$ -calpaina podría ser la responsable del sitio de corte Leu<sub>81</sub>-Met<sub>82</sub>, correspondiente al

**Table 1.** Secuencias de los 4 fragmentos de TnT identificados en jamón curado utilizando espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF.

Péptido	Masa observada (Da)	Residuo en P <sub>1</sub>	Secuencia Identificada	Residuo en P' <sub>1</sub>
1	2912.48	<sup>56</sup> L	<sup>57</sup> TAPKIP <sup>57</sup> EGEKVDFDDIQKKRQNKDL <sup>81</sup>	M <sup>82</sup>
2	2811.42	<sup>57</sup> T	<sup>58</sup> APKIP <sup>58</sup> EGEKVDFDDIQKKRQNKDL <sup>81</sup>	M <sup>82</sup>
3	2643.37	<sup>59</sup> P	<sup>60</sup> KIP <sup>60</sup> EGEKVDFDDIQKKRQNKDL <sup>81</sup>	M <sup>82</sup>
4	2515.27	<sup>60</sup> K	<sup>61</sup> IP <sup>61</sup> EGEKVDFDDIQKKRQNKDL <sup>81</sup>	M <sup>82</sup>

extremo C-terminal de los péptidos identificados en el presente estudio (Tabla 1). Sin embargo, aunque estos autores también identificaron el sitio de corte Thr<sub>57</sub>-Ala<sub>58</sub>, no podemos asegurar que esta enzima sea la responsable del extremo N-terminal del péptido 2, ya que este mismo péptido también ha sido identificado con una threonina adicional en el extremo N-terminal (péptido 1, Tabla 1), lo que sugiere una posible acción de las aminopeptidasas en la generación de este sitio de corte. El efecto de la m-calpaína en músculo de cerdo ha sido también estudiado in vitro [6, 7], confirmando el sitio de corte Thr<sub>57</sub>-Ala<sub>58</sub>.

Este estudio pone de manifiesto la relevancia que pueden tener las calpaínas en la hidrólisis de la TnT durante el curado del jamón. De hecho, parte de los resultados obtenidos confirman algunos de los sitios de corte previamente identificados por otros autores.

### Agradecimientos

Beca FPU del Ministerio de Educación y Ciencia (España), beca AGL2007-65379-C02-01/ALI del Ministerio de Educación y Ciencia (España) y FEDER. Especialmente al Servicio de Proteómica del Centro de Investigación Príncipe Felipe (CIPF) por su contribución al análisis por MALDI-TOF/TOF.

### Referencias

[1] Olson, D. G.; Parrish, F. C.; Dayton, W. R.; Goll, D. E. Effect of Postmortem Storage and Calcium Activated Factor on Myofibrillar Proteins of Bo-

vine Skeletal-Muscle. *Journal of Food Science* 1977;42: 117-124.

[2] Laville, E.; Sayd, T.; Sante-Lhoutellier, V.; Morzel, M.; Labas, R.; Franck, M.; Chambon, C.; Monin, G. Characterisation of PSE zones in semimembranosus pig muscle. *Meat Science* 2005; 70: 167-172.

[3] Hwang, I. H.; Park, B. Y.; Kim, J. H.; Cho, S. H.; Lee, J. M. Assessment of postmortem proteolysis by gel-based proteome analysis and its relationship to meat quality traits in pig longissimus. *Meat Science* 2005;69: 79-91.

[4] Toldrá, F.; Rico, E.; Flores, J. Cathepsin B, D, H and L Activities in the Processing of Dry-Cured Ham. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 1993; 62: 157-161.

[5] Hughes, M. C.; Geary, S.; Dransfield, E.; McSweeney, P. L. H.; O'Neill, E. E. Characterization of peptides released from rabbit skeletal muscle troponin-T by mu-calpain under conditions of low temperature and high ionic strength. *Meat Science* 2001; 59: 61-69.

[6] Kitamura, S. I.; Muroya, S.; Tanabe, S.; Okumura, T.; Chikuni, K.; Nishimura, T. Mechanism of production of troponin T fragments during postmortem aging of porcine muscle. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2005; 53: 4178-4181.

[7] Muroya, S.; Kitamura, S.; Tanabe, S.; Nishimura, T.; Nakajima, I.; Chikuni, K. N-terminal amino acid sequences of troponin T fragments, including 30 kDa one, produced during postmortem aging of bovine longissimus muscle. *Meat Science* 2004; 67: 19-24.