

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

I.1 INTRODUCCIÓN

La carne es considerada la fuente de proteínas de mayor calidad tanto por sus características nutricionales como por su apreciado sabor. Además de la musculatura esquelética de los animales de sangre caliente, lo que se conoce como carne en sentido estricto, encuentran también utilidad como alimento otras partes que la acompañan como la grasa, las vísceras o la sangre. Las definiciones de carne pueden ser muy diferentes entre sí dependiendo del objetivo de las mismas. Así, desde el punto de vista legal, el concepto de carne incluye todas las partes de los animales de sangre caliente utilizadas por el hombre para su alimentación, mientras que en lenguaje coloquial, carne es solamente el tejido muscular esquelético acompañado de más o menos grasa [1].

Las carnes pueden ser rojas (generalmente de mamíferos adultos) o blancas (mamíferos jóvenes y aves). Según su contenido en lípidos, pueden ser magras o grasas. Además de estas clasificaciones, se suele distinguir claramente entre carnes de primera (tejido muscular predominante), de segunda (tejido muscular con algo de grasa y de tejido conjuntivo) y de tercera (mucho grasa y bastante tejido conjuntivo).

Las proteínas son los constituyentes más importantes de la carne y representan casi un 20 % del peso del tejido muscular. Las proteínas son polímeros de aminoácidos que desempeñan distintas funciones. Así, en primer lugar, dan lugar a enzimas que catalizan reacciones bioquímicas que sustentan la vida. El tejido muscular también contiene grandes cantidades de proteínas involucradas en el proceso de la contracción muscular. Finalmente, como la composición aminoacídica de las proteínas procedentes de los animales es similar a la del tejido muscular humano y el músculo constituye casi un 50 % del peso de nuestro cuerpo, las proteínas de la carne son una excelente fuente de aminoácidos necesarios para el crecimiento, reparación y mantenimiento del organismo. Por todo ello, es necesario determinar el contenido en proteínas de la carne con el fin de determinar su composición y su adecuación para satisfacer las necesidades nutricionales, para formular productos derivados, para cumplir las normativas legales y para investigar el papel de proteínas específicas en alimentos y procesos biológicos [2].

Muchas de las propiedades gastronómicas o nutricionales de la carne, tales como la textura, su comportamiento tras la cocción o la conservación o la pérdida de jugos de la carne están estrechamente ligadas a la estructura proteica del músculo. Por lo tanto, conocer esta estructura y sus reacciones presenta un gran interés desde el punto de vista tecnológico [3, 4].

I.1.1 Estructura y composición del tejido muscular

Los músculos se clasifican en función de su estructura en músculos estriados, que constituyen entre el 30 y el 40 % de la masa del animal (músculos del esqueleto y cardíacos) y músculos lisos, que están presentes en las paredes de los vasos sanguíneos e intestino. La carne corresponde a los músculos estriados y éste será el tipo de músculo del que se hablará en adelante [5].

El músculo está formado principalmente por fibras musculares ordenadas de forma paralela, tejido conjuntivo que lo rodea y contiene los vasos sanguíneos y nervios, y tejido lipídico. Cada fibra muscular es una célula gigante que mide de un milímetro a varios centímetros de longitud y de 10 a 100 μm de diámetro. Las fibras están a su vez, constituidas por manojos de cuerpos filamentosos también orientados paralelamente que se denominan *miofibrillas*. Cada manjo de miofibrillas está recubierto por el *sarcoplasma* [5].

La composición química del tejido muscular depende de la especie animal de la que se trate, la raza, la edad, la región de procedencia y el procedimiento utilizado en su sacrificio. Como promedio, el músculo contiene de 55 a 78 % de agua, de 15 a 22 % de proteínas, de 1 a 15 % de lípidos, de 1 a 2 % de glúcidos y en torno a un 1 % de sales minerales. Estas cifras indican que las proteínas representan del 50 al 95 % de la materia orgánica de la carne.

Las proteínas que contiene el músculo se clasifican en tres grupos en función de su localización [6]: proteínas miofibrilares, proteínas sarcoplasmáticas y proteínas del

estroma. Las proteínas incluidas dentro de cada grupo junto con su masa molecular y el porcentaje que representan respecto a las proteínas totales se recogen en la Tabla I.1.

Las proteínas miofibrilares representan más del 50 % de las proteínas totales del músculo siendo la miosina (27 %) y la actina (11 %) las proteínas mayoritarias de este grupo. Estas proteínas presentan un gran interés desde el punto de vista tecnológico puesto que influyen en la calidad culinaria y, por tanto, en la comercialización de la carne. Así, estas proteínas son responsables de la capacidad de retención de agua, de las propiedades emulsionantes o de la textura de la carne. Además, estas proteínas contienen cantidades importantes de aminoácidos esenciales y contribuyen, en más del 70 % al aporte proteico debido al consumo de carne. Las proteínas miofibrilares participan en la función contráctil del músculo, son casi siempre extraíbles en disoluciones salinas de fuerza iónica baja pero aproximadamente la mitad de ellas son extraíbles en medio acuoso.

Las proteínas sarcoplasmáticas constituyen entre el 30 y el 35 % de las proteínas totales del músculo del esqueleto y algo más del músculo cardíaco. Son un conjunto heterogéneo de varias centenas de proteínas diferentes que contienen todas las enzimas que participan en la glicolisis así como numerosas enzimas asociadas al metabolismo de los glúcidos y proteínas. La pigmentación roja de los músculos de los vertebrados se debe principalmente a la mioglobina siendo la hemoglobina la segunda causa del color rojo de los productos cárnicos. Estas proteínas son solubles y extraíbles con agua o disoluciones salinas diluidas.

Las proteínas del estroma constituyen un 10-15 % del contenido total de proteínas del músculo y engloban a las proteínas del sarcolema, del retículo sarcoplasmático, membranas mitocondriales así como las proteínas del tejido conjuntivo. Las dos proteínas principales del tejido conjuntivo son el colágeno y la elastina que representan más del 50 % de las proteínas del estroma. Estas proteínas son las menos solubles del músculo.

Tabla I.1. Tipos y características de las principales proteínas del músculo [6].

	g por 100 g de proteínas	Masa molecular (kDa)
Proteínas miofibrilares	51.5	
Miosina	27.0	475
Actina	11.0	41.8
Tropomiosina	4.3	70
Troponinas	4.3	72
Proteína M	2.2	160
Proteína C	1.1	140
α -actina	1.1	206
β -actina	0.5	70
Proteínas sarcoplasmáticas	32.5	
Enzimas mitocondriales y proteínas solubles	30.0	
Mioglobina	1.5	17.8
Hemoglobina	0.5	67
Citocromo y flavoproteínas	0.5	
Proteínas de estroma	16.0	
Colágeno	8.0	300
Elastina	0.5	> 70
Proteínas insolubles	7.5	

I.1.2 Los productos cárnicos

Los productos cárnicos son productos alimentarios preparados total o parcialmente con carne u otras partes de especies animales autorizadas por el Código Alimentario y sometidos a operaciones específicas antes de ponerlos a disposición del consumidor. En determinados casos, estos productos pueden contener además otros ingredientes como condimentos, especias y aditivos. Los productos cárnicos se clasifican según la legislación española en: frescos, crudos adobados, crudos curados, tratados con calor, salazones cárnicas, platos preparados cárnicos y otros derivados cárnicos. En efecto, en la elaboración de derivados cárnicos, la carne se suele someter a diferentes tratamientos que la hacen menos perecedera y más agradable a la vista y al paladar: salazonado, secado, ahumado, calentamiento, enlatado, etc. Muchos de estos tratamientos son complementarios, como por ejemplo ocurre en la producción del salchichón que se prepara por un procedimiento de salazonado y secado [1, 3].

Son muy diversos los tipos de productos cárnicos que se pueden preparar por estos procedimientos como conservas cárnicas (magro de cerdo), jamones, embutidos, etc. Los embutidos constituyen un tipo de derivado cárneo con una alta demanda por parte del consumidor. Estos se fabrican, en general, a partir de carnes más o menos picadas, grasa, sal y especias, además de muchos otros componentes. La pasta resultante es embutida en tripas o en latas y se presentan al consumidor tanto curados como cocidos o ahumados. Así, atendiendo al procedimiento de elaboración a partir de la materia prima, se puede hacer una clasificación de los embutidos en curados y cocidos. Dentro de los embutidos curados se encuentran el salchichón y el chorizo. Dentro de los cocidos se encuentran aquellos que se someten a un mayor tratamiento por calor como la morcilla o los patés de hígado y aquellos que se someten a un tratamiento térmico más ligero y se elaboran siempre con adición de agua. Entre estos últimos se encuentran el choped, las salchichas, la mortadela, el jamón cocido, etc. [1, 3].

Esta tesis doctoral se ha centrado en el estudio de productos cárnicos crudos y tratados con calor, haciendo especial énfasis en estos últimos por varios motivos: su

complejidad en cuanto a composición, sus dificultades para ser analizados debido a la desnaturalización de las proteínas por el tratamiento térmico al que han sido sometidos y su elevado grado de consumo en la actualidad. Por ello, a continuación nos referiremos brevemente al proceso de elaboración de estos productos dando algo más de detalle sobre su composición.

Dentro de los aditivos y coadyuvantes tecnológicos autorizados por algunas legislaciones en la elaboración de productos cárnicos tratados con calor se incluyen: conservadores (para mantener el producto libre de gérmenes patógenos), estabilizantes, gelificantes y polifosfatos (para mantener la estructura del producto), antioxidantes (para prevenir el enranciamiento de las grasas), ciertos aromas y modificadores orgánicos y colorantes. También pueden incluir alimentos tales como harinas y almidones de cereales y patata, productos de panadería, leche en polvo desnatada, caseinato de suero, proteínas de huevo, proteínas vegetales comestibles (no texturizadas) sin que sobrepasen en el producto cárneo ciertos límites [7, 8].

En el proceso de fabricación de productos cárnicos tratados con calor se distinguen las siguientes etapas [1, 9]:

- preparación de la pasta
- embutido
- tratamiento térmico

Preparación de la pasta: En esta etapa, la carne, previamente triturada, se mezcla con el agua, sal, especias y resto de ingredientes para formar la masa del producto cárneo.

La mezcla de carne triturada con el resto de los ingredientes puede realizarse en una amasadora, en un *cutter* o en molinos coloidales. La amasadora mezcla los ingredientes mediante la acción de paletas rotatorias o basculantes hasta obtener una masa homogénea. En el *cutter*, los ingredientes se mezclan de tal forma que se obtiene una emulsión. Los molinos coloidales se colocan a la salida del cutre y mediante un gran

número de cuchillas a altas revoluciones permiten la obtención de un picado y emulsionado más rápido.

Embutido: El embutido es la operación mediante la cual la masa obtenida de la trituración y la mezcla se introduce en las denominadas tripas. Las tripas son el envoltorio que permitirá efectuar el posterior tratamiento térmico del producto. Existen diferentes tipos de tripas y de la utilización de una u otra dependerán las características del producto final.

Las tripas pueden ser naturales (generalmente procedentes de intestino de oveja) o artificiales. Las primeras sólo se utilizan en los embutidos que se pueden denominar "tradicionales", tales como butifarras blancas, negras, etc. Las segundas, pueden ser comestibles o no, y son las utilizadas fundamentalmente en la fabricación de salchichas tipo frankfurt. Estas tripas se extraen mecánicamente después de la cocción.

Para hacer el embutido en las tripas se utilizan máquinas embutidoras cuya función es empujar la masa a través de una boquilla instalada a la salida de la embutidora a la tripa.

Tratamiento térmico: Una vez realizada la embutición o envasado, se procede al tratamiento térmico de los productos. Las temperaturas que se suelen alcanzar en esta etapa suelen ser de 70 a 110 °C. El tratamiento térmico tiene por objeto la destrucción de la mayor parte de las formas vegetativas de los microorganismos capaces de alterar los alimentos o interferir en el desarrollo de fermentaciones deseables. En esta fase se suceden fenómenos físicos y químicos que conducen a la coagulación de las proteínas.

I.1.3 La adición de proteínas no cárnicas a productos cárnicos

La adición de proteínas no cárnicas a productos cárnicos es una práctica común y se ha realizado tanto en productos cárnicos crudos como tratados con calor [10, 11].

En lo que se refiere a los productos cárnicos crudos, la adición de proteínas no cárnicas se realizó en un principio sobre todo a la carne picada. Sin embargo, los nuevos desarrollos de los últimos años han hecho posible también la introducción de proteínas no cárnicas en piezas grandes de tejido de músculo (pechuga de pollo, etc.). La principal diferencia en este caso con respecto a la adición de proteínas no cárnicas a la carne picada es la forma de introducir las proteínas. En el primer caso, la carne picada se mezcla directamente con las proteínas no cárnicas mientras que en el segundo caso se inyecta directamente en el tejido del músculo una salmuera que contiene agua, sales y las proteínas no cárnicas. También es posible realizar un masaje de la pieza con la salmuera (*tumble technology*). Esta última tecnología ha sido empleada sobre todo en la industria del pollo y en menor extensión en las industrias del cerdo y la ternera en cuyo caso la inyección es la forma más habitual de introducir las proteínas no cárnicas [12, 13].

Las razones por las cuales se añaden proteínas no cárnicas a productos cárnicos crudos y tratados con calor son las siguientes:

Reducción del contenido en grasa del producto: La demanda en las sociedades modernas de alimentos más saludables y con menos contenido en grasa ha incluido también a los productos cárnicos [14]. Sin embargo, la elaboración de productos cárnicos con bajo contenido en grasa no es tan sencilla como eliminar la grasa de la carne ya que esta juega un papel importante en la consecución de propiedades organolépticas y funcionales adecuadas [15]. Sin grasa, la carne tiende a estar dura y además no posee el sabor esperado de una carne.

Existen diferentes estrategias para la reducción de la grasa: la sustitución de la grasa por carnes más magras, por agua, por sustitutivos de la grasa (proteínas, carbohidratos o grasas alternativas) o por compuestos sintéticos. La posibilidad de utilizar proteínas para sustituir a la grasa ha sido muy utilizada. En estos casos, las proteínas no cárnicas actúan simulando algunas características de la grasa pero no todas ya que su funcionalidad imitando la grasa es limitada (por ejemplo, las proteínas no se comportan como la grasa a elevadas temperaturas como las que se utilizan para freír) [15]. Si se

considera la opción de reemplazar la grasa por agua, hay que decir que la adición de agua sola es perjudicial para el rendimiento de cocinado, su textura y su jugosidad dando como resultado carnes demasiado blandas que se encogen demasiado cuando se cocinan y con exceso de acumulación de purga en los empaquetados [16]. Para hacer posible esta adición de agua evitando los efectos derivados de esta adición, se utilizan compuestos con capacidad de retener agua como las proteínas no cárnicas [12].

Mejora de las características de la carne: Una carne jugosa y tierna se considera una carne de alta calidad. Ello ha hecho que la industria cárnea haya incorporado agua a la carne. Como ya se ha comentado, para poder adicionar agua es necesario adicionar proteínas que proporcionen capacidad para retener este agua [17].

Reducción del precio de la carne: La adición de proteínas de bajo coste puede también dar lugar a beneficios económicos. En ese caso, las proteínas no cárnicas se añaden con el fin de sustituir parcialmente las proteínas cárnicas. Para ello, las proteínas añadidas deben presentar propiedades funcionales similares a las proteínas de la carne. Las proteínas de la soja constituyen candidatas interesantes para suplementar la carne ya que son una fuente de proteínas de bajo coste y presentan propiedades funcionales similares a las de las proteínas cárnicas [18]. Otra posibilidad ha sido el desarrollo de carnes “reestructuradas” que consiste en la utilización de carnes de valor inferior para producir carnes sabrosas a coste reducido. La cohesión entre las piezas de carne de las carnes reestructuradas se lleva a cabo mediante la formación de una matriz proteica tras la extracción de las proteínas del músculo lo cual implica la adición de sales y masajeado (*tumblig*) [19-21]. Sin embargo, debido al daño producido durante este masajeado en la textura del músculo y a la creciente preocupación de los consumidores por los altos contenidos de sodio en los alimentos, las proteínas no cárnicas se utilizan para facilitar la unión que se persigue [22-24].

Por otra parte, también las carnes preparadas con agua mencionadas anteriormente permiten obtener beneficios económicos siendo necesaria como ya se ha explicado la adición de proteínas no cárnicas para poder llevar a cabo esta práctica.

Beneficios sobre la salud: El consumo de algunas proteínas no cárnicas tales como las proteínas de soja puede proporcionar beneficios sobre la salud. Las recomendaciones de la *American Heart Association* para reducir el riesgo de enfermedades cardiovasculares ha favorecido la inclusión en la dieta de alimentos específicos como la soja con efectos cardioprotectores. Existen evidencias de que el consumo diario de 25 gr de proteínas de soja pueden reducir los niveles de colesterol total y LDL en individuos con hipercolesterolemia [12, 25, 26].

Propiedades para estabilizar la emulsión carne-grasa: A pesar de la mala prensa de la grasa desde un punto de vista nutricional, no hay que olvidar que las propiedades de la grasa confieren a la carne buena textura y sabor. Sin embargo, cuando la carne de músculo se mezcla con grasa en algunos productos cárnicos (en especial en carne picada) se hace necesario utilizar proteínas para estabilizar las emulsiones carne-grasa. Las proteínas de soja han sido ampliamente utilizadas con este fin [12].

Además de todas estas razones que pueden ser válidas para productos cárnicos crudos y tratados con calor, en el caso de estos últimos productos también se puede añadir a la lista de razones que justifican la adición de proteínas no cárnicas a productos cárnicos, la siguiente:

Necesidad de estabilizar las emulsiones proteína cárnea-grasa cuando los productos se someten a tratamiento térmico: Los productos cárnicos tratados con calor son emulsiones cárnicas preparadas a partir de una dispersión viscosa de grasa y proteínas en agua, que después del calentamiento se transforma en un gel. En este proceso, las proteínas cárnicas actúan como emulsionantes previniendo la coalescencia de la grasa. Sin embargo, no todas las carnes tienen la misma composición y cuando se emplean carnes con un contenido en proteínas bajo para preparar productos cárnicos, es necesaria la adición de proteínas no cárnicas para prevenir la coalescencia de la grasa durante el calentamiento [27-30].

Por otra parte, las proteínas no cárnicas se añaden también a productos cárnicos tratados con calor con el fin de mejorar las características organolépticas como la textura [31-35], color [30, 36], sabor [37] y, en general, la calidad del producto final [38, 39].

Las proteínas no cárnicas más frecuentemente añadidas a productos cárnicos crudos son las proteínas de soja, el gluten de trigo, las proteínas lácteas y las proteínas de huevo. Las proteínas de la sangre pueden también añadirse aunque éstas se utilizan en mucha menor extensión [16]. En el caso de productos cárnicos procesados, las proteínas de soja, el gluten de trigo y las proteínas lácteas son las más frecuentemente añadidas mientras que se han utilizado también aunque en menor extensión el gluten de maíz, las proteínas de la sangre, las proteínas del guisante y las proteínas de huevo [40]. De todas estas proteínas, las más utilizadas sin duda en la elaboración de productos cárnicos han sido las proteínas de soja. Ello se debe a sus excelentes propiedades nutritivas, sus interesantes propiedades funcionales y su bajo coste.

Las proteínas de soja se introdujeron como aditivos a productos cárnicos en los años 70 con el objeto de reducir el precio de la carne. Los primeros productos de soja utilizados con este fin fueron la harina y los *grits* de soja y la soja texturizada, todos ellos con un contenido en proteína de soja aproximado del 50 %. Sin embargo, como consecuencia de los abusos en la utilización de soja en la industria cárnea y de la modificación del sabor debido a su adición, esta práctica dio lugar a una mala imagen [41]. Actualmente, esta mala imagen está siendo superada por la utilización de productos de soja de alta calidad: concentrados de proteína de soja (70 % de proteína de soja) y aislados de proteína de soja (90 % de proteína de soja), productos en los cuales los compuestos de sabores indeseables y que originan flatulencia en la soja se han eliminado mejorando su sabor y su funcionalidad y convirtiéndolos en suplementos excelentes desde un punto de vista nutricional [41-43].

El concentrado de proteína de soja se prepara a partir de harina de soja desgrasada eluyendo los componentes solubles (carbohidratos, péptidos, ácido fítico) utilizando agentes ácidos a pH 4.5, etanol acuoso (70 %) o agua caliente. Por otra parte, el aislado de

proteína de soja se obtiene a partir de habas de soja sin cáscara y desgrasadas por eliminación de la mayor parte de los componentes no proteicos con agua o medio alcalino suave (pH 8 o 9) seguido de centrifugación para eliminar el residuo de fibra insoluble. Después, la proteína se precipita a pH 4.5 formando una especie de cuajo que se centrifuga y se lava varias veces para eliminar los oligosacáridos solubles y se seca. Habitualmente, el aislado de proteína de soja se neutraliza formando proteinatos de sodio o potasio que son más solubles y funcionales [12]. El aislado de proteína de soja presenta una mayor capacidad de emulsión (6 veces) que el concentrado de proteína de soja. Asimismo, en comparación con otras proteínas no cárnicas tiene la ventaja de que da lugar a una menor pérdida de humedad que el concentrado de proteína de suero y el caseinato sódico [44].

La Figura I. 1 muestra un esquema de los procesos generales seguidos para la elaboración de los productos de soja mencionados.

La solubilidad en agua de las proteínas de soja contribuye de forma significativa a mejorar las propiedades funcionales de los productos que contienen soja: capacidad de retención de agua, propiedades espumantes, apariencia y textura. Además, la modificación de las proteínas de soja por centrifugación, irradiación a bajas dosis o tratamiento con diferentes reactivos químicos (como por ejemplo, enzimas proteolíticas) contribuye a la mejora de las propiedades funcionales de la soja [45, 46]. En efecto, las proteínas de soja hidrolizadas, que poseen una mayor solubilidad en agua, han sido también utilizadas en la industria cárnea. En general, las proteínas vegetales hidrolizadas se utilizan por sus propiedades aromatizantes [47]. Además, las proteínas de soja hidrolizadas presentan interesantes propiedades de retención de agua debido a que los péptidos de soja poseen un fuerte carácter hidrófilo [13].

La Tabla I. 2 muestra los productos de soja utilizados en la elaboración de algunos productos cárnicos así como las propiedades que se han mejorado al adicionar estas proteínas [12].

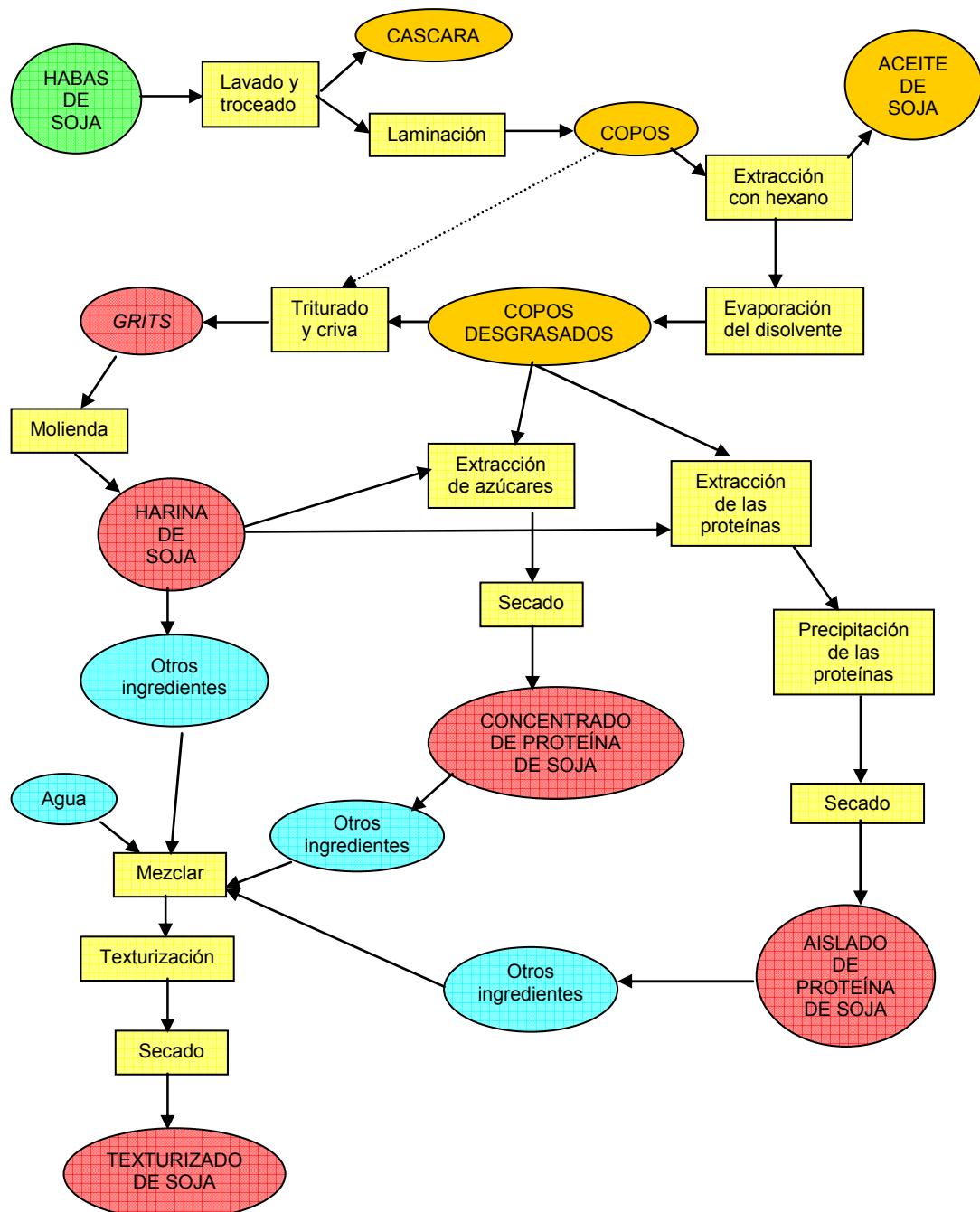


Figura I. 1. Esquema de los procesos generales seguidos para la elaboración de productos de soja [12].

Tabla I. 2. Productos de soja utilizados para la elaboración de diferentes productos cárnicos [12].

Producto de soja	Contenido proteico (%)	Producto cárneo	Propiedad funcional mejorada con la adición de soja
Harina	65	Albóndigas, carne para pizza, conservas de carne.	Absorción de agua, viscosidad, propiedades emulsionantes, etc.
Texturizado	65	Conervas de carne, albóndigas, carne para pizza.	Absorción de agua y grasa, textura y sabor.
Concentrado de proteína	65-90	Salchichas, choped, conservas de carne, albóndigas, pechuga de ave, chorizo, salchichón, carne para pizza, etc.	Absorción de agua y grasa, propiedades gelificantes y emulsionantes y control del sabor.
Aislado de proteína	> 90	Salchichas, choped, chorizo, salchichón, pechuga de ave, carne para pizza, etc.	Viscosidad, propiedades gelificantes, elasticidad, absorción de grasa y agua y control del sabor y el color.

Debido a que las proteínas de soja son las proteínas no cárnicas más empleadas en la elaboración de productos cárnicos y además son el objeto de este trabajo de investigación, a continuación se detallarán con un poco más de profundidad sus principales características.

I.1.4 Las proteínas de soja

La soja (*Glycine max*) es una leguminosa que contiene alrededor de un 40 % de proteínas (referido a base seca). Además de proteínas, la soja también contiene agua, lípidos (principalmente ácidos grasos poliinsaturados), carbohidratos (polisacáridos tales como celulosa, hemicelulosa y pectinas, y oligosacáridos solubles), minerales (hierro, cinc, magnesio, calcio, sodio, potasio, cobre y manganeso), fósforo y vitaminas (tiamina (B1) y riboflavina (B2)) [48]. Hay otros componentes minoritarios como compuestos fenólicos, saponinas, etc. De todos estos componentes, las proteínas han suscitado un gran interés no sólo por ser los componentes mayoritarios de la soja sino también por sus interesantes características.

Tipos de proteínas de soja y características.

Las proteínas de la soja se pueden dividir en tres grupos [49]:

- Las proteínas involucradas en el metabolismo,
- Las proteínas estructurales,
- Las lectinas y proteínas de almacenamiento (sin actividad biológica).

De estos tres grupos, las más importantes y mayoritarias son las proteínas de almacenamiento constituidas por globulinas. A pH ácido, las globulinas de soja precipitan quedando en el sobrenadante las denominadas proteínas del suero.

Es posible separar las globulinas de soja mediante ultracentrifugación a pH 7.6 y fuerza iónica 0.5 M en cuatro fracciones con coeficientes de sedimentación $S_{20,W}$ (unidades

Svedberg medidas a 20 °C en medio acuoso), 15S, 11S, 7S y 2S. Las fracciones 15S y 2S son minoritarias mientras que las fracciones 11S y 7S son las mayoritarias y constituyen el 80 % del contenido de proteínas totales en la soja [12, 50, 51]. La Tabla I. 3 recoge la masa molecular de las globulinas de soja, los componentes de cada proteína, el porcentaje que representa cada componente frente a la proteína correspondiente y el porcentaje frente al total de proteínas del haba de soja.

Tabla I. 3. Características de las principales globulinas de soja [6, 52-54].

Proteínas	Masa molecular (kDa)	Componentes de cada proteína	Peso molecular (kDa) de los componentes y composición	% proteína respecto a globulinas totales
Globulina 11S o Glicinina	350-380	Tres subunidades de carácter ácido	31- 38 (40- 50%)	40%
		Tres subunidades de carácter básico	18-20 (50- 60%)	
Globulina 7S (β -conglicinina)	180	Combinaciones de tres subunidades α , α' , β	α : 57-76 (40- 45%) α' : 57- 83 (25-32%) β : 42-53 (29- 33%)	30%
Globulina 7S (γ -conglicinina)	170	Tres subunidades		3%
Globulina 15S	600			Componente minoritario
Globulina 2S	21	α - conglicinina Inhibidor de la tripsina	21	Componentes minoritarios

Las globulinas 7S y 11S de la soja poseen diferentes características. En primer lugar, la globulina 7S es una glicoproteína mientras que la 11S no lo es. También la composición aminoacídica de ambas proteínas les confiere distintas características nutricionales. Así, las subunidades α y α' de la globulina 7S tienen una composición en aminoácidos muy similar y desprovista de cisteína y cistina. La subunidad β no contiene ni cisteína ni metionina. De forma global, por tanto, se puede decir que la globulina 7S, a diferencia de la 11S, no contiene uniones disulfuro y su contenido en triptófano y en aminoácidos que contiene azufre es muy bajo [6]. El mayor contenido en aminoácidos sulfurados que se encuentra en la 11S le confiere un gran interés nutricional de acuerdo con la atención que recibe la ingesta en aminoácidos sulfurados por parte de la Organización Mundial de la Salud [55] ya que ello la hace aproximarse al perfil aminoacídico de las fuentes proteicas de origen animal de alta calidad. A su vez, la fracción 7S de las proteínas de la soja presenta el interés sobre la 11S de poseer un mayor carácter antioxidante [56], propiedad de gran importancia en la elaboración de ciertos alimentos. Por otra parte, también las propiedades funcionales de las globulinas 7S y 11S de la soja son distintas como se verá a continuación.

Destacar que la relación entre el contenido de proteína 11S y 7S en el haba de soja es un parámetro muy importante ya que su valor es distinto dependiendo de la variedad de haba de soja de que se trate [57-59]. En general, la relación 11S/7S puede variar entre 0.5 y 3.0 dependiendo de la variedad de soja. Esto significa que la caracterización de cultivos de soja presenta un gran interés con fines a la elección de la variedad de soja más adecuada para la preparación de un alimento según que sea más conveniente tener altos o bajos contenidos de proteína 11S respecto a la 7S.

Propiedades funcionales de las proteínas de soja.

Se denomina propiedad funcional a toda propiedad no nutritiva que afecta al uso de un ingrediente en un alimento. La mayoría de las propiedades funcionales afectan al carácter sensorial del alimento y al comportamiento físico del alimento durante su preparación, transformación o almacenamiento [12].

Las propiedades funcionales de las proteínas de uso alimenticio pueden clasificarse en tres grupos [12, 60]:

- Propiedades de hidratación, que dependen de las interacciones proteína-agua (absorción y retención de agua, hinchamiento, adhesión, solubilidad y viscosidad).
- Propiedades basadas en las interacciones proteína-proteína (precipitación, gelificación y formación de diferentes estructuras).
- Propiedades basadas en interacciones superficiales (propiedades emulsionantes y espumantes).

Algunas de las propiedades funcionales más importantes de los productos de soja son las siguientes [61]:

- Adhesividad
- Propiedades antioxidantes
- Cohesividad
- Control del color
- Control de cristalización
- Elasticidad
- Emulsificación
- Absorción de la grasa
- Formación de espumas
- Captador del sabor
- Absorción/retención de humedad
- Propiedades organolépticas
- Solubilidad/dispersabilidad
- Estabilización
- Texturización
- Viscosidad

Sin embargo, como ya se ha mencionado, las globulinas 7S y 11S tienen diferentes propiedades funcionales. Así, por ejemplo, la globulina 11S tiene un mayor poder de gelificación. En efecto, los geles de glicinina parecen más firmes y elásticos que los que se obtienen con la β -conglicinina, debido probablemente a que los primeros están estabilizados por numerosas uniones disulfuro intercatenarias [6, 62]. Esta capacidad de gelificación, así como otras propiedades funcionales de las proteínas de soja pueden variar de forma importante con la temperatura u otras condiciones experimentales como el pH y la fuerza iónica [63-65].

Por otra parte, el poder emulsionante de la proteína 7S es superior al que presenta la 11S, por lo que en aquellas aplicaciones de las proteínas de soja en las que sea deseable un alto poder gelificante (por ejemplo, en la elaboración del tofu) será necesario utilizar habas de soja con alto contenido en 11S. Por el contrario, en aquellas aplicaciones en las que no se desee un elevado poder gelificante (por ejemplo, en la elaboración de leche de soja) será conveniente partir de habas de soja con una baja relación 11S/7S. Finalmente, habas de soja con alto contenido en 7S presentarán propiedades interesantes en las aplicaciones en las que se requiera un importante poder emulsionante (por ejemplo, en la elaboración de productos cárnicos) [66].

Todo lo dicho explica el enorme interés que ha suscitado la caracterización de variedades de habas de soja y la determinación de los contenidos en 7S y 11S de estas variedades.

Desnaturalización de las proteínas de soja.

El proceso de desnaturalización de las proteínas consiste en una alteración, parcial o total, de la estructura tridimensional de las proteínas sin llegar a romper los enlaces peptídicos que mantienen la unión de los aminoácidos. La consecuencia de este proceso es la pérdida de actividad biológica.

La desnaturización de proteínas puede llevarse a cabo no solamente por acción del calor sino también por la acción de valores de pH extremos, de ciertos disolventes orgánicos miscibles en agua como el alcohol o la acetona, de ciertos solutos como la urea, aquellos que poseen grupos tioles (-SH) o mediante exposición de las proteínas a determinados detergentes [67].

La desnaturización de las proteínas de soja es parcialmente reversible, y cuando las proteínas desnaturizadas térmicamente se enfrián, se vuelven a doblar aunque no llegan a recuperar su estructura original [68-70].

Fraccionamiento de proteínas de soja.

Los métodos desarrollados para el fraccionamiento de proteínas de soja se basan en la diferente solubilidad que tienen las globulinas de soja en diferentes condiciones [71-76]:

- Método de Wolf y col. [71], que consiste en una precipitación por enfriamiento seguida de una purificación de la proteína 11S por precipitación con sulfato amónico, y tiene la desventaja de ser muy tedioso debido al elevado número de etapas necesarias.
- Método de Koshiyama [72], que se basa en la purificación de las proteínas 7S mediante enfriamiento, adición de cloruro cálcico y cromatografía de filtración en gel.
- Método de Thanh y col. [73, 74], que consiste en fraccionar las proteínas 11S, 7S y proteínas de suero mediante precipitación isoeléctrica utilizando una disolución reguladora Tris-(hidroximetil)aminometano-HCl.
- Método de Hofland y col. [75, 76], que se basa en poner en contacto la muestra que contiene las proteínas de soja con CO₂ a alta presión, consigiéndose disminuir el pH de la disolución hasta la región isoeléctrica de las proteínas de soja y precipitando así el 80 % y 95 % de glicinina y β-conglicinina puras, respectivamente. Este método requiere una gran complejidad tecnológica.

Entre los métodos de fraccionamiento que se acaban de comentar, el método de Tahn y col. [73, 74] es el más empleado por ser el menos tedioso y permitir el fraccionamiento simultáneo de las fracciones 11S, 7S y de las proteínas del suero. Un esquema del mismo se muestra en la Figura I. 2. En esta Tesis Doctoral se ha empleado este método modificado por nuestro grupo de investigación. Por ello, se describirá con más detalle a continuación.

Extracción de las proteínas de soja. La muestra molida y desgrasada se pone en contacto con una disolución reguladora Tris-HCl 0.03 M, 0.01 M en β -mercaptoetanol (pH 8.0) mediante agitación continua a temperatura ambiente durante 1 hora. A continuación, se centrifuga a 10000 rpm durante 20 min y a 20 °C.

Obtención de la fracción 11S de las proteínas de soja. Se ajusta el pH del sobrenadante obtenido en la etapa anterior a 6.4 con HCl 2 M. A continuación, se centrifuga a 10000 rpm durante 20 min y a una temperatura de 2 a 5 °C, recogiendo el precipitado (fracción 11S) y reservando el sobrenadante a partir del que se obtendrá la fracción 7S de las proteínas de soja.

Obtención de la fracción 7S de las proteínas de soja. Se ajusta el pH del sobrenadante obtenido en la etapa anterior a 4.8 con HCl 2 M. Se centrifuga a 10000 rpm durante 20 min y a temperatura de 2 a 5 °C obteniendo un precipitado (fracción 7S) y un sobrenadante (proteínas de suero).

I.1.5 Interés de la determinación de proteínas de soja en productos cárnicos

La creciente utilización de proteínas no cárnicas durante la elaboración de productos cárnicos ha ido paralela a la demanda de normativas legales que controlen esta práctica. Actualmente, todos los países desarrollados han elaborado normativas que limitan o incluso prohíben la adición de proteínas no cárnicas a productos cárnicos. Estas normativas no sólo regulan la adición de estas proteínas sino que también controlan el

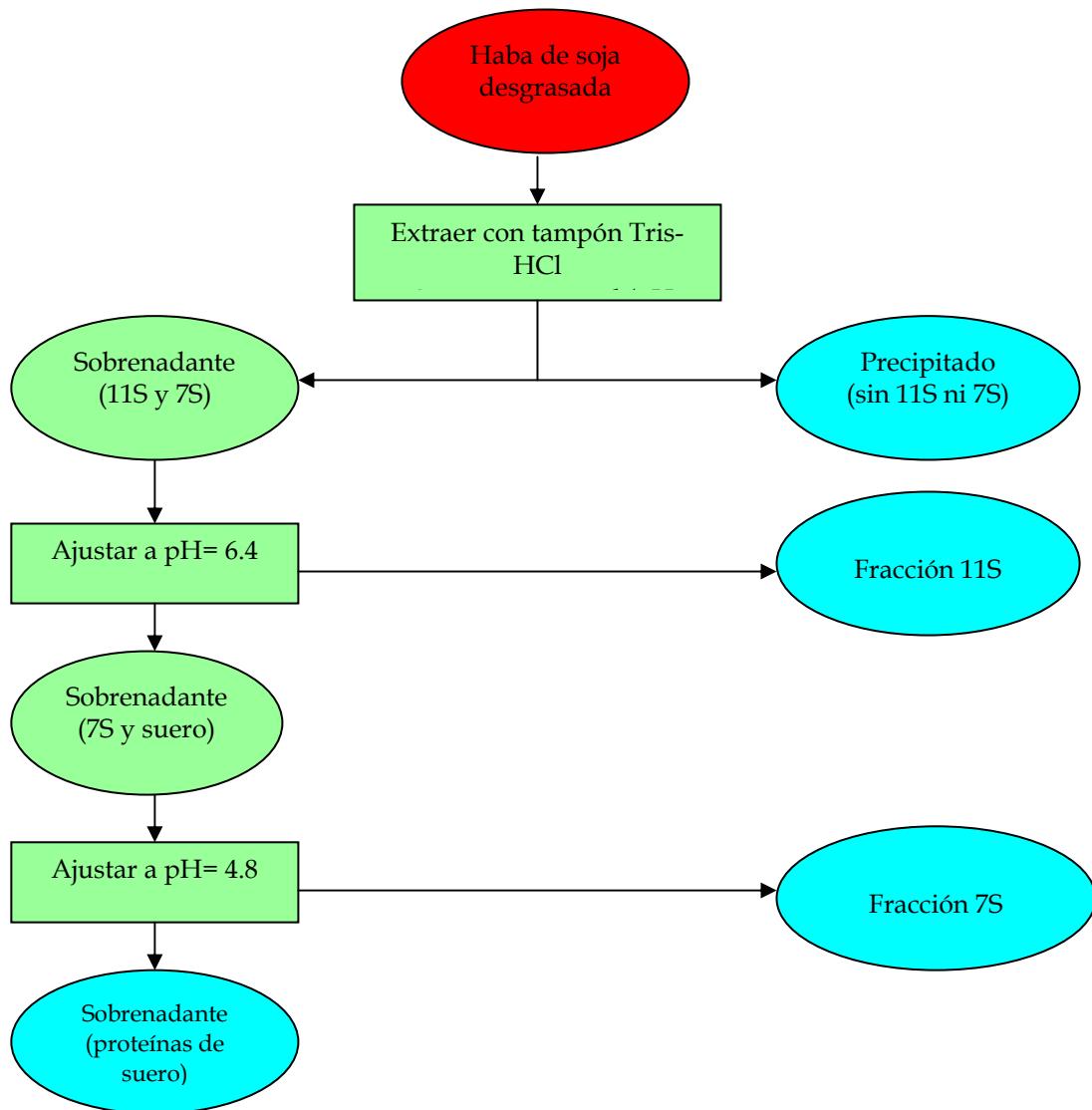


Figura I. 2. Método de fraccionamiento de proteínas de soja propuesto por Thanh y col. [75, 74].

adecuado etiquetado de los productos cárnicos [77]. Existen diversos motivos que justifican la necesidad de disponer de estas normativas legales:

- La sustitución de proteínas cárnicas por otras no cárnicas de menor coste (por ejemplo, proteínas de soja) tiene como consecuencia la obtención de ventajas económicas en la comercialización de productos cárnicos.
- La mayor parte de las proteínas no cárnicas utilizadas en la industria cárnea pueden provocar reacciones alérgicas por lo que su adición no declarada puede tener consecuencias graves para individuos sensibles a dichas proteínas [78, 79]. Por ejemplo, en el caso de las proteínas de soja, se han detectado diferentes alergenos como el inhibidor de la tripsina, Gly m Bd 68 K, Gly m Bd 30 K (también llamado P34), Gly m Bd 28 K, etc. [80-84]. El gluten es otro tipo de proteína utilizada en la manufactura de productos cárnicos y cuya adición no controlada produce desórdenes de nutrición en personas que sufren la enfermedad celíaca [80, 85].
- La Comisión Europea ha propuesto la modificación de la Directiva Europea de etiquetado de alimentos (2000/13/EC) con el fin de obligar a los fabricantes a incluir en la etiqueta de los productos todos los ingredientes que hayan sido adicionados a los productos alimenticios de forma que los consumidores dispongan de información completa acerca del contenido de los alimentos que consumen [82].

La existencia de estas normativas requiere disponer de métodos analíticos adecuados para controlar su cumplimiento. Esto ha constituido un problema dada la ausencia de metodologías analíticas fiables, sensibles y válidas para análisis cuantitativo. En efecto, si la adición de proteínas no cárnicas está prohibida, se necesitan métodos analíticos suficientemente sensibles para detectar pequeñas adiciones. Por ejemplo, en el caso de las proteínas de soja, concentraciones por debajo de 100 ppm (0.01 %) pueden causar reacciones alérgicas y el límite de detección recomendado es 1-2 ppm [86]. Por otra parte, cuando la adición de proteínas no cárnicas está permitida hasta un cierto límite son necesarios métodos cuantitativos de análisis.

Las cantidades permitidas de proteínas no cárnicas varían en función del tipo de producto cárnico, de su calidad y precio y también en función del país. La Tabla I. 4 agrupa los contenidos de proteínas no cárnicas permitidos por la legislación española en productos cárnicos tratados con calor. En esta tabla se pueden distinguir dos tipos de productos cárnicos tratados con calor: productos para los cuales la adición de proteínas no cárnicas está permitida hasta un límite y productos para los cuales la adición de estas proteínas está prohibida.

Tabla I. 4. Porcentajes máximos de proteínas no cárnicas permitidos por la legislación española en productos cárnicos tratados con calor (referido a producto total) [87].

Productos cárnicos tratados con calor	% de proteínas no cárnicas permitido ^a
Jamón cocido: Categoría extra, "Jamón cocido extra"	0
Jamón cocido: Categoría primera, "Jamón cocido I"	0
Fiambre de jamón: Categoría segunda, "Fiambre de jamón II"	1
Paleta cocida: Categoría extra, "Paleta cocida extra"	0
Paleta cocida: Categoría primera, "Paleta cocida I"	0
Fiambre de paleta: Categoría segunda, "Fiambre de paleta II"	1
Magro de cerdo cocido: Categoría extra, "Magro de cerdo cocido extra"	0
Fiambre de magro de cerdo: Categoría tercera, "Fiambre de magro de cerdo III"	2
Mortadelas, lunch, chopped, salchichas, patés de carne, etc.	3
Fiambre de lomo (sometido a tratamiento térmico)	0
Morcilla de Aragón	0

^a Proteínas no cárnicas hace referencia a proteínas lácteas y proteínas de origen vegetal, excepto texturizadas, en proporción conjunta.

Dado que las proteínas de soja como ya se ha mencionado son las más habitualmente adicionadas durante la elaboración de productos cárnicos, a continuación se describirán los antecedentes bibliográficos referidos a la determinación de proteínas de soja en productos cárnicos.

I.1.6 Métodos para la determinación de proteínas de soja en productos cárnicos

La determinación de proteínas de soja en productos cárnicos presenta varias limitaciones. La primera es que estas proteínas se encuentran en estos productos a muy baja concentración con respecto a las proteínas cárnicas de modo que las proteínas mayoritarias pueden interferir de manera importante en su determinación. En este sentido, la mayoría de los esfuerzos se han centrado en la determinación de proteínas de soja en productos cárnicos que en ocasiones pueden contener también otras proteínas no cárnicas añadidas. En este sentido, se han investigado diferentes aproximaciones y se han publicado algunas revisiones [88-90]. Los métodos más antiguos se basaron en la observación de ciertas células al microscopio, en el teñido selectivo de carbohidratos o proteínas (métodos histológicos) o en la determinación indirecta de proteínas de soja. Normalmente, estos métodos se aplicaron a la detección de harina o texturizado de soja y eran de uso limitado cuando se añadían concentrados o aislados de proteína de soja.

Más habitual ha sido la determinación directa de proteínas de soja. Para ello se han desarrollado sobre todo métodos electroforéticos e inmunológicos. Sin embargo, también se han desarrollado métodos cromatográficos basados en la determinación de proteínas, ciertos péptidos o aminoácidos.

Métodos electroforéticos.

La electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) tanto en placa como en tubo ha sido el método electroforético más utilizado para la determinación de proteínas de soja en productos cárnicos. La extracción o solubilización de proteínas del producto cárneo requiere la utilización de detergentes o disoluciones concentradas de urea o hidrocloruro

de guanidina en presencia de un agente reductor como el mercaptoetanol para romper los enlaces disulfuro, de hidrógeno e hidrofóbicos [88, 89, 91]. Además, la mayor parte de los métodos desarrollados han utilizado dodecil sulfato sódico (SDS) que modifica el principio de separación. Así, en ausencia de SDS, las proteínas se mueven hacia los electrodos de acuerdo con su carga neta dependiendo del pH por lo que es necesario un control cuidadoso de este parámetro. En presencia de SDS, las proteínas están rodeadas de moléculas de SDS que neutralizan sus cargas positivas dependiendo el movimiento de las proteínas de su peso molecular. Las separaciones de proteínas basadas en su peso molecular proporcionan separaciones electroforéticas más reproducibles [92].

El primer trabajo en el que se utilizó PAGE para la determinación de proteínas no cárnicas en productos cárnicos fue debido a Olsman que aplicó esta técnica en placa a la detección de caseína y proteínas de soja en productos tratados con calor [93]. Los trabajos siguientes aplicados a la determinación de proteínas de soja en productos cárnicos crudos por métodos electroforéticos se han agrupado en la Tabla I. 5. Asimismo, la Tabla I. 6 recoge los trabajos correspondientes a la determinación electroforética de proteínas de soja en productos cárnicos tratados con calor. Como se observa en estas tablas, aunque PAGE ha sido la técnica más utilizada, también se han empleado membranas de almidón o acetato de celulosa y otros modos electroforéticos como el isoelectroenfoque.

A pesar de los esfuerzos realizados, los métodos electroforéticos desarrollados para determinar proteínas de soja en productos cárnicos presentan importantes inconvenientes:

- elevados tiempos de análisis.
- interferencias habituales debidas a otros componentes del producto cárneo.
- aunque son útiles desde un punto de vista cualitativo, el análisis cuantitativo a partir de las bandas correspondientes a las proteínas de soja presenta considerables dificultades, especialmente a bajas concentraciones.
- métodos que demuestran su validez para productos cárnicos crudos pueden no ser válidos para productos cárnicos tratados con calor.

Tabla I. 5. Métodos electroforéticos utilizados en el análisis de proteínas de soja en carnes crudas.

Muestra	Medio para la extracción de la grasa	Medio para la solubilización de las proteínas	Técnica y detección	Disolución reguladora de separación	Límite de detección	Ref.
Productos cárnicos modelo preparados con carne de ternera, cordero y cerdo mezclada con concentrado de proteína de soja	HCl/EtOH y acetona	Disolución reguladora Tris-citrato 0.05 M (pH 8.6) con urea 10 M y 2% 2-mercaptopetanol.	Urea-PAGE (en placa) con un gradiente de porosidad (3-8% acrilamida) y tinción con Negro de Naftaleno.	Disolución reguladora Tris-citrato 0.05 M (pH 8.6) con urea 10 M y 2% 2-mercaptopetanol.	-	94
Productos cárnicos modelo preparados mezclando carne con caseína, proteína de soja y proteína de clara de huevo	Agua destilada caliente	Proteínas de soja y caseínas: 8 M urea e incubación del extracto en una disolución reguladora acetato (pH 4.6). Proteínas de clara de huevo: 8 M urea/0.15 M tioglicol.	Electroforesis (en placa) sobre membrana de acetato de celulosa y tinción con Nigrosin.	Caseína: disolución reguladora barbitona/urea Proteínas de soja y de clara de huevo: disolución reguladora ácido fórmico/urea	0.1% para caseína y proteínas de soja y 0.5% para proteínas de clara de huevo	95
29 Hamburguesa preparada en el laboratorio con carne de ternera, proteínas de soja, leche en polvo, proteínas de huevo y gluten	Acetona	Método 1: 1% 2-mercaptopetanol y 8 M urea. Método 2: 4% 2-mercaptopetanol y 10 M urea.	Urea-PAGE (en tubo) (6% acrilamida) con 6 M urea (método 1) o 8 M urea (método 2) y tinción con 0.1% Negro de Naftaleno	Disolución reguladora Tris-glicina 0.06M (pH 8.6)	-	96, 97
Producto cárneo modelo preparado con carne de ternera y aislado de proteína de soja o soja texturizada	Acetona	Disolución reguladora Tris-HCl 0.0625 M (pH 6.8) con 3% SDS y 1% 2-mercaptopetanol	SDS-PAGE (en tubo) (10% acrilamida) y detección by tinción con Azul de Coomassie	Disolución reguladora Tris-HCl 0.025 M con 0.1% SDS y glicina 0.192 M.	-	98
Productos cárnicos modelo preparados con proteínas de soja, de semilla de algodón, de cacahuete, caseína, suero láctico, leche en polvo desgrasada y proteínas de clara de huevo						99
Carnes frescas que contenían proteínas de soja	HCl/EtOH y acetona	Fenol:ácido acético:agua (2:1:1) y urea	Urea-PAGE (en tubo) (7.5% acrilamida) y tinción con Azul de Anilina.	10% ácido acético y 0.1% mercaptopetanol.	2%	100

Muestra	Medio para la extracción de la grasa	Medio para la solubilización de las proteínas	Técnica y detección	Disolución reguladora de separación	Límite de detección	Ref.
Productos cárnicos modelo preparados con carnes de cerdo y ternera mezcladas con proteínas de soja, de clara de huevo, de leche, de yema de huevo y de trigo	-	Disolución reguladora Tris-ácido bórico (pH 8.2) y 1% SDS	SDS-PAGE (en placa) (8% acrilamida) y tinción con Azul de Coomassie	Disolución reguladora Tris-ácido bórico (pH 8.2) con 1% SDS	-	92, 101, 102
Productos cárnicos modelo preparados con carne de ternera, pollo, cordero y cerdo mezclados con proteínas de soja	-	Urea y mercaptoetanol	Isoelectrofoque en gel de poliacrilamida (en placa)	Urea y anfolitos de separación (pH 3-11)	1%	103
Productos cárnicos modelo preparados con carnes de cerdo y ternera que contenían también proteínas de soja y caseínas	-	Proteínas de soja: 8 M urea Caseína: agua caliente	PAGE (en tubo) (7.5% acrilamida) y tinción con Amidoblack	Disolución reguladora Tris-HCl (para la caseína) con urea 8 M (para las proteínas de soja)	1% para las proteínas de soja y la caseína	104
Productos cárnicos modelo preparados con carnes frescas de ternera y cerdo que contenían harina de soja, soja texturizada o aislado de proteína de soja y caseína, leche en polvo, sangre, etc.	Acetona	3% SDS y 3% 2-mercaptopetanol en una disolución reguladora Tris borato 0.248 M (pH 8.2)	SDS-PAGE (en placa) (12% acrilamida) y detección por tinción con Azul de Coomassie	Disolución reguladora Tris-HCl 2.1 M (pH 9.18)	1% par a las proteínas de soja	105
Productos cárnicos modelo preparados con soja y carne de ternera	-	Disolución reguladora fosfato 0.01 M (pH 7) con 1% SDS, 1% 2-mercaptopetanol y 8 M urea.	SDS-PAGE (en tubo) (10% acrilamida) y tinción con Azul de Coomasie	Disolución reguladora fosfato 0.01M (pH 7) con 1% SDS	-	106

Tabla I. 6. Métodos electroforéticos para la determinación de proteínas de soja en productos cárnicos tratados con calor.

Muestra	Proteínas no cárnicas	Técnica	Límite de detección	Ref.
Carne en lonchas tratada con calor a 115 °C y pasta de hígado a 105 °C	Proteínas de soja y caseínas	Electroforesis en gel de almidón con urea	0.50% para proteínas de soja y 0.25% para caseínas	93
Productos tratados con calor (110 °C)	Proteínas de soja y caseínas	PAGE (en tubo)	3% para caseínas	107
Salchichas cocinadas	Proteínas de soja	PAGE	-	108
Salchichas (116 °C)	Proteínas de soja	PAGE (en tubo)	-	109
Productos tratados con calor (cerdo y ternera) (100 °C) y salchichas	Proteínas de soja, de huevo, de leche y de trigo	SDS-PAGE	5% para proteínas de soja	92, 101, 102, 110
Productos cárnicos tratados con calor (salchichas, empanadas, hamburguesas) (100 °C)	Proteínas de soja, de judías verdes y albúmina de huevo	SDS-PAGE	-	94
Productos cárnicos tratados con calor (salchichas) (120 °C)	Proteínas de soja y lácteas	PAGE	2% para proteínas de soja y proteínas lácteas	111
Productos cárnicos (paté, jamón y salchichas) esterilizados a 117 °C durante 1 h 15 min.	Proteínas de soja y lácteas	SDS-PAGE (en tubo)	1% para proteínas de soja y proteínas lácteas	112
Productos cárnicos cocidos modelo	Proteínas de soja, lácteas y proteínas de clara de huevo	SDS-PAGE	-	98
Hamburguesas, salchichas, empanadas y carne en lata sometidos a autoclave a 110-115 °C	Proteínas de soja	PAGE	-	96, 97
Productos cárnicos cocinados (paté, ternera acecinada, salsa boloñesa, ravioli, salchichas)	Proteínas de soja, gluten y proteínas lácteas	Urea-PAGE (in tube)	1% para proteínas de soja	100
Salchichas y hamburguesas	Proteínas de soja	Isoelectrofoque-PAGE	-	103, 113, 114
Productos cárnicos de cerdo y ternera tratados con calor (74 °C durante 150 min)	Proteínas de soja y caseínas	PAGE (in tube)	1% para proteínas de soja y caseínas	104
Salchichas cocinadas	Proteínas de soja y caseínas	PAGE (en tubo)	-	115
Productos cárnicos pasteurizados (salchichas y jamón) (70 °C)	Proteínas de soja	SDS-PAGE	0.5 % para proteínas de soja	116
Productos cárnicos de ciervo tratados con calor a 70 °C	Proteínas de soja, caseínas y proteínas de clara de huevo	PAGE (en tubo)	-	117
Productos cárnicos cocidos modelo de ternera y cerdo	Proteínas de soja	SDS-PAGE	-	105
Salchichas Frankfurt	Proteínas de soja	PoroPAGE	-	118

Salchichas Frankfurt	Proteínas de soja	SDS-PAGE	3% para proteínas de soja	119
Productos cárnicos modelo de cerdo y ternera sometidos a autoclave a 118 °C durante 20 min	Proteínas de soja, de girasol y de judías verdes	SDS-PAGE	-	120
Salchichas modelo Frankfurt de ternera	Proteínas de soja	SDS-PAGE	< 1% para las proteínas de soja	121
Productos cárnicos cocidos de cerdo (jamón cocido)	Proteínas de soja, de suero lácteo y caseínas	SDS-PAGE	0.5% para las proteínas de soja y caseínas y 1% para las proteínas del suero lácteo	122
Productos cárnicos modelo cocidos a 100 °C durante 15 min, hamburguesas y salchichas	Proteínas de soja, lácteas, de huevo y gluten	SDS-PAGE	-	123, 124

Métodos inmunoquímicos.

Los métodos inmunoquímicos también se han utilizado ampliamente para la determinación de proteínas de soja en productos cárnicos debido a su elevada especificidad y sensibilidad. Las Tablas I. 7 y I. 8 agrupan los métodos inmunoquímicos desarrollados para la determinación de proteínas de soja en productos cárnicos crudos y tratados con calor, respectivamente. Ha sido en este último caso cuando se ha realizado un mayor esfuerzo habida cuenta de la complejidad de este tipo de productos cárnicos.

En el caso de productos cárnicos crudos, se han desarrollado métodos serológicos, inmunoelectroforéticos o ensayos de inmunoabsorción con enzimas ligadas (ELISA) (Tabla I. 7). Algunos de estos métodos se comprobó que no eran válidos para productos tratados con calor debido a la desnaturización de las proteínas. Con respecto a los productos cárnicos tratados con calor, la Tabla I. 8 muestra que los métodos inmunológicos desarrollados se agrupan en cinco categorías: serología, inmunodifusión, hemaglutinación indirecta, métodos en los que se utiliza una separación electroforética y una reacción inmunológica e inmunoensayos. Puede observarse que estos dos últimos han sido los más utilizados.

Entre los inconvenientes que se pueden atribuir a estos métodos, caben destacar los siguientes:

- cualquier modificación que se produzca en las proteínas de soja durante la extracción de las mismas a partir del producto cárneo puede impedir la formación de los complejos con los anticuerpos. Por ello, con el fin de evitar este riesgo, se han empleado disoluciones tampón diluidas para llevar a cabo la extracción de las proteínas. Sin embargo, el empleo de condiciones suaves de extracción se traduce habitualmente en bajos rendimientos de extracción. Obviamente, la utilización de agentes empleados en electroforesis, como urea o SDS, aumentaría el rendimiento de extracción pero modificaría las proteínas impidiendo su reacción con los anticuerpos.

Tabla I. 7. Métodos inmunoquímicos empleados para la determinación de proteínas de soja en productos cárnicos crudos.

Muestra	Medio de extracción de grasa	Medio para la solubilización de las proteínas	Técnica	Límite de detección	Ref .
Productos cárnicos modelo de salchicha cruda y aislado de proteína de soja	-	Extracción con disolución de NaCl al 2% NaCl	Inmunodifusión doble de Ouchterlony's Anticuerpo utilizado: anti-inhibidor de la tripsina de soja	-	125
Producto cárneo modelo de carne cruda y aislado de proteína de soja	-	Extracción con carbonato sódico (pH 8.5)	Inmunoelectroforesis en tampón barbital (pH 8.7) Anticuerpo utilizado: anti-globulina de soja nativa	0.1%	126
Productos cárnicos modelo de esqueleto de ternera y músculos cardíacos con aislado de proteína de soja	HCl/etanol /acetona	Tampón Tris-HCl 0.05 M (pH 8.6) con urea 10 M y 2% de 2-mercaptoetanol	Inmunoelectroforesis en tampon barbital (pH 8.6) Anticuerpo utilizado: anti-proteínas de soja renaturalizadas	-	127
Hamburguesas modelo con proteínas de soja	Cl ₃ CH/Me OH EtOH/HCl Acetona	Tampón Tris-HCl 1 M (pH 8.6) con urea y mercaptoetanol	ELISA Anticuerpo utilizado: anti-proteínas de soja renaturalizadas	-	128
Bacon y carne picada conteniendo harina de soja o soja texturizada	-	Urea 13.3 M urea, DTT 18.8 mM, tampón Tris-HCl 0.05 M (pH 8.6)	ELISA Anticuerpo utilizado: anti-proteínas de soja renaturalizadas	-	129, 130
Carne de ternera cruda suplementada con proteínas de soja	-	Tampón Tris-HCl 0.1 M (pH 8.1)	ELISA	0.22%	131

DTT: ditiotreitol

SDS: dodecilsulfato sódico

DTE: ditioeritritol

Tabla I. 8. Métodos inmunoquímicos aplicados a la determinación de proteínas de soja en productos cárnicos tratados con calor.

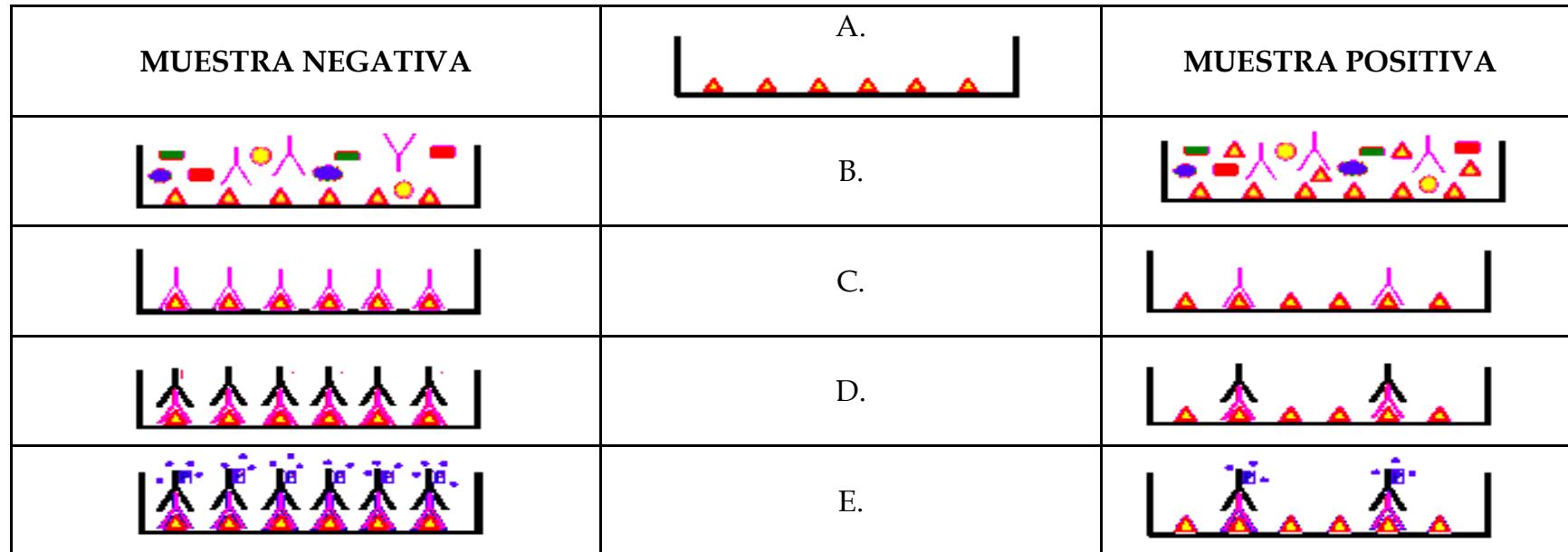
Muestra	Proteínas no cárnicas	Límite de detección	Ref.
SEROLOGÍA			
Salchichas	Proteínas de soja	-	132-134
Salchichas y productos cárnicos en lata tratados con calor a 120 °C	Proteínas de soja	0.2%	135-137
INMUNODIFUSIÓN			
Productos cárnicos en lata	Proteínas de soja	-	138
Salchichas modelo	Proteínas de soja	-	139
Salchichas	Proteínas de soja, proteínas lácteas hidrolizadas y ovoalbúmina	0.3 mg/mL para proteínas de soja y 0.5 mg/mL para proteínas lácteas hidrolizadas y ovoalbúmina	140, 141
Productos cárnicos tratados con calor	Proteínas de soja	-	142
Productos cárnicos modelo tratados con calor y crudos (60 min a 121 °C), hamburguesas comerciales, albóndigas, salchichas, filete estofado en lata, etc.	Proteínas de soja	1%	143
Carne en lata tratada con calor a 120 °C durante 50 min	Proteínas de soja	-	144
HEMAGLUTINACIÓN INDIRECTA			
Salchichas	Proteínas de soja, proteínas lácteas y ovoalbúmina	-	145,146
Salchichas tipo Frankfurt modelo (75-120 °C)	Soybean proteins	-	147
Salchichas	Proteínas de soja, proteínas lácteas hidrolizadas y ovoalbúmina	1.0 mg/mL for soybean and hydrolyzed milk proteins and 5.0 mg/mL for ovalbumin	140
Productos cárnicos tratados con calor (121 °C)	Proteínas de soja	-	148
ELECTROFORESIS + MÉTODOS INMUNOLÓGICOS			
Carne en lonchas	Proteínas de soja y caseínas	-	149
Productos cárnicos tratados con calor modelo (65-125 °C)	Proteínas de soja	-	126
Salchichas tipo Frankfurt modelo (75-120 °C)	Proteínas de soja		147
Salchichas modelo	Proteínas de soja y de mostaza	-	150
Productos cárnicos cocinados modelo (71 °C)	Proteínas de soja	-	127
Productos cárnicos cocinados modelo (60-125 °C)	Proteínas de soja	2.5%	151
Salchitas tratadas con calor (121 °C durante 45 min)	Proteínas de soja	0.1%	152
Productos cárnicos tratados con calor modelo (100 °C)	Proteínas de soja	0.02%	153
Productos cárnicos tratados con calor modelo (100 °C)	Proteínas de soja, caseínas, proteínas de suero, ovoalbúmina y gluten de trigo (modificado y no modificado)	0.1% para cada proteína	154,155

Productos cárnicos tratados con calor modelo (60-100 °C)	Proteínas de soja	0.5%	156
INMUNOENSAYOS			
Productos cárnicos tratados con calor modelo	Proteínas de soja	-	157,158
Hamburguesa pasteurizada y carne en lonchas en lata esterilizada a 120 °C durante 30 min.	Proteínas de soja	0.1%	159
Albóndigas, croquetas de ternera, pollo frito y hamburguesas	Proteínas de soja	-	81
Hamburguesa comercial	Proteínas de soja	2 ppm (0.0002 %)	160
Hamburguesa comercial	Proteínas de soja	-	161
Productos cárnicos modelo sometidos a autoclave (121 °C, 20 min), salchichas, jamón, paté y hamburguesa	Proteínas de soja	-	129,130
Salchichas modelo y comerciales	Proteínas de soja	-	162
Salchichas de cerdo modelo (80 °C durante 20 min)	Proteínas de soja	-	163
Chorizo	Proteínas de soja	1%	164
Salchichas	Proteínas de soja, de guisante y gluten	0.05-0.1% para proteínas de soja y guisante y 0.025-0.5% para gluten de trigo	165

- en el caso del análisis de productos cárnicos tratados con calor, que es el caso más frecuente, existe una limitación adicional relacionada con los cambios estructurales que les ocurren a las proteínas durante el tratamiento térmico. Estos cambios ocasionan también problemas en la reacción con los anticuerpos.
- elevado coste.
- elevados tiempos de análisis.
- elevada complejidad.

A pesar de estos inconvenientes, es un método inmunológico el único que se ha empleado en los laboratorios de control y ha sido seleccionado por la AOAC Internacional (primera acción en 1988) para determinar proteínas de soja en productos cárnicos crudos y tratados con calor. Sin embargo, la propia AOAC indica que el método es semicuantitativo y para obtener resultados fiables necesita conocer la fuente de proteínas de soja en el producto cárneo así como dicho producto para llevar a cabo la calibración para análisis cuantitativo. Ya que este método ha sido utilizado en esta Tesis Doctoral con fines comparativos, se comentarán brevemente sus características.

El método AOAC es un método ELISA en el cual el producto cárneo desgrasado que contiene las proteínas de soja se somete a condiciones desnaturalizantes, condiciones renaturalizantes y finalmente, es analizado por un modo de inhibición de ELISA. En este inmunoensayo, las proteínas de soja reaccionan con un antisuero apropiado adicionado en exceso conocido. El anticuerpo que no ha reaccionado con las proteínas de soja es, posteriormente, determinado tras su aislamiento, a través de una reacción con un segundo anticuerpo conjugado con una enzima. La actividad de la enzima del segundo anticuerpo que ha reaccionado con el primer anticuerpo se determina por adición de un sustrato cromóforo que permite la formación de un compuesto cuya intensidad de color se mide a 405 nm. A partir de esta medida es posible determinar la cantidad del primer anticuerpo que ha reaccionado con proteínas de soja y por diferencia con la cantidad inicial de anticuerpo, es posible saber la concentración de proteínas de soja en el producto cárneo [166]. En la Figura I. 3 se muestra un esquema de las etapas seguidas para la



38

- A. El ensayo se realiza en micropellets de plástico cubiertos con una preparación purificada de proteínas de soja.
- B. En la reacción de competición inicial, el extracto diluido de la muestra se añade dentro del micropellet con el antisuero apropiado.
- C. Con concentraciones crecientes de proteínas de soja en el extracto, la cantidad de anticuerpo enlazado a la soja del pocillo será menor.
- D. La cantidad de anticuerpo enlazado a la soja que cubre el pocillo se determina por reacción con un segundo anticuerpo conjugado con una enzima.
- E. La actividad de la enzima del segundo anticuerpo que ha reaccionado con el primer anticuerpo se determina por adición de un sustrato cromóforo que permite la formación de un compuesto cuya intensidad de color se mide fotométricamente.

Figura I. 3. Esquema en el que se muestran los pasos seguidos en el ensayo de inmunoabsorción con enzimas ligadas (ELISA) en modo competitivo indirecto para llevar a cabo la determinación de proteínas de soja en productos cárnicos crudos y procesados con calor.

determinación de proteínas de soja por el método ELISA de la AOAC. Como puede observarse, este método es complejo, tedioso y caro pero aún así es el único que se utiliza dado que no existen métodos adecuados para la determinación de proteínas de soja en productos cárnicos. Además, existen numerosos factores que pueden afectar a la obtención de resultados cuantitativos fiables.

Métodos cromatográficos.

La cromatografía de líquidos también se ha aplicado a la determinación de proteínas de soja en productos cárnicos a través de la determinación de aminoácidos, péptidos o de las propias proteínas. Las Tablas I. 9 y I. 10 agrupan los trabajos en los que se han desarrollado métodos cromatográficos para la determinación de proteínas de soja en productos cárnicos crudos y tratados por calor, respectivamente. Se observa que el número total de artículos publicados en relación al análisis de ambos tipos de productos ha sido bastante similar aunque en este caso, contrariamente a lo que ha ocurrido con los métodos inmunológicos, los productos cárnicos crudos parecen haber recibido más atención. Asimismo, en el caso de productos cárnicos tratados con calor, los métodos cromatográficos propuestos se han centrado en la determinación de aminoácidos y péptidos mientras que para productos cárnicos crudos también se han propuesto métodos para la determinación de las proteínas de soja como tales. Otro hecho que se puede destacar a la vista de las tablas es que los modos cromatográficos más utilizados para el desarrollo de los métodos propuestos han sido la fase inversa y el intercambio iónico, tanto aniónico como catiónico. En el caso del análisis de aminoácidos casi la totalidad de los trabajos realizados se han llevado a cabo por cromatografía de fase inversa, en la determinación de péptidos se ha empleado la cromatografía de intercambio iónico y en la separación de las proteínas se han utilizado ambos modos.

Tabla I. 9 Métodos cromatográficos desarrollados para la determinación de proteínas de soja en productos cárnicos crudos.

Muestra	Tratamiento de muestra	Condiciones de separación	Detección	Límite de detección	Ref.
DETERMINACIÓN DE AMINOÁCIDOS					
Producto cárnico modelo preparado con carne de ternera picada (músculo y colágeno) mezclada con soja (texturizado y aislado).	Hidrólisis con HCl 6 M y disolución en carbonato de litio 0.04 M (pH 9.5)	Fase-inversa (Hypersyl ODS, 150 x 4 mm). Gradiente de elución: 0-100% B in 15 min. Fases móviles: A, ACN/agua 20:80 con disolución reguladora fosfato 0.03 M (pH 6.5); B, ACN/agua 40:60.	Derivatización con cloruro de dansilo (250 nm)	-	167
Producto cárnico modelo preparado con carne y corteza de cerdo, soja, caseína y suero lácteo.		Fase-inversa (Hypersil C18, 150 x 4 mm). Gradiente de elución: 0-100% B in 25 min. Fases móviles: A, ACN/agua 15:85 con disolución reguladora fosfato 0.03 M (pH 7.5); B, ACN/agua 35:65.		-	168
Producto cárnico modelo preparado con carne de músculo y soja	Extracción de la grasa con Cl ₃ CH/MeOH/agua (1:2:0.8) e hidrólisis con HCl 6 M	-	-	-	169
Producto cárnico modelo preparado con carne de músculo, colágeno, gamba, soja y proteínas de trigo	Hidrólisis con HCl 6 M	Fase-inversa (PICO TAG, 150 x 3.9 mm). Gradiente de elución: 54-100% in 10 min. Fases móviles: A, disolución reguladora acetato/triethylamina (pH 6.4):ACN (47:3); B, ACN:agua (60: 40).	Derivatización con triethylamina-fenilisotiocianato (254 nm)	-	170
DETERMINACIÓN DE PÉPTIDOS					
Producto cárnico modelo preparado como mezcla de soja y carne	Extracción de la grasa con Cl ₃ CH/MeOH, HCl/EtOH, y acetona. Desnaturalización con una disolución reguladora (pH 8.1) y digestión con tripsina	Intercambio catiónico (Aminex A5, 250 x 9 mm) Disolución reguladora de elución: citrato de sodio 0.2 N (pH 5.47)	Derivatization con ninhidrina (570 nm)	5-10%	171-173

Muestra	Tratamiento de muestra	Condiciones de separación	Detección	Límite de detección	Ref.
Producto cárnico modelo preparado como mezcla de carne de ternera y aislado de proteína de soja	Extracción de la grasa con $\text{Cl}_3\text{CH}/\text{MeOH}$ y tratamiento de muestra con disolución reguladora Tris-HCl 0.05 M con CaCl_2 0.0086 M y digestión con tripsina	Intercambio catiónico (Aminex A5, 650 x 6 mm) Gradiente de elución: 0.033-0.067 M citrato de sodio. Flujo, 0.4 mL/min	Derivatización con ninhidrina (570 nm)	2%	174
DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS					
Producto cárnico modelo preparado con carnes de ternera, pollo, cordero y cerdo mezcladas con proteínas de soja	Extracción de las proteínas con disolución reguladora acetato (pH 5)	Intercambio aniónico (Al-Pellionex-wax) Elución con disolución reguladora acetato (pH 5)	UV a 254 nm	-	103
Producto cárnico modelo preparado con carnes de diferentes especies (ternera, cerdo, pollo, y pavo) proteínas de soja, suero lácteo y caseína.	Extracción de la proteína con una disolución reguladora fosfato 0.05 M (pH 7) con 0.5% SDS y 0.1% 2-mercptoetanol	Fase-inversa (Hi-Pore RP-304, 250 x 4.6 mm). Gradiente de elución: 30-75% B en 70 min. Flujo, 1.5 mL/min Fases móviles: A, 0.1% TFA en agua; B, 95:5:0.1 ACN:agua:TFA.	UV a 280 nm.	1% para proteínas de soja y suero lácteo y caseína	175
Producto cárnico modelo preparado con carne de ternera enriquecida con aislado de proteína de soja.	Extracción de la proteína con disolución reguladora Tris-HCl 0.02 M (pH 7) con 8 M urea, 0.01% EDTA y 0.01% DTT	Intercambio aniónico (Aquapore AX-300, 220 x 4.6 mm y 30 x 4.6 mm). Gradiente de elución: 0-0.5 M NaCl (para la columna 200 x 4.6 mm) en 30 min y 0-2.0 M NaCl (para la columna 30 x 4.6 mm) en 20 min. Flujo, 1 mL/min	UV a 280 nm	-	176
	Extracción de la proteína con una disolución reguladora Tris-HCl 0.05 M (pH 7.5) con 0.01% EDTA y 0.1% DTT.	Fase-inversa (Aquapore RP-300, 220 x 4.6 mm). Gradiente de elución: 20-70% B en 50 min. Flujo, 1 mL/min. Fase móviles: A, 0.05% TFA en agua; B, 0.05% TFA en ACN.	Derivatización con 4-vinilpiridina (280 nm)	2%	

Tabla I. 10. Métodos cromatográficos desarrollados para la determinación de proteínas de soja en productos tratados con calor.

Muestra	Proteínas no cárnicas añadidas	Modo cromatográfico	Límite de detection	Ref.
ANÁLISIS DE AMINOÁCIDOS				
Productos cárnicos pasteurizados	Proteínas de soja, de clara de huevo, de trigo, caseínas, protínas de patata y de tendón	Intercambio iónico	-	91
Productos cárnicos modelo tratados con calor	Proteínas de soja, caseínas y suero	Fase inversa	-	167
Productos cárnicos modelo tratados con calor	Proteínas de soja y proteínas de trigo	Fase inversa	-	170
ANÁLISIS DE PÉPTIDOS				
Productos cárnicos modelo tratados con calor (120 °C durante 3 h)	Proteínas de soja	Intercambio iónico	5-10 %	171-173
Productos cárnicos modelo tratados con calor (100 °C durante 30 min)	Proteínas de soja	Intercambio iónico	-	174
Productos cárnicos modelo tratados con calor (120 °C durante for 3 h)	Proteínas de soja	Intercambio iónico	2%	114, 177

La determinación de proteínas de soja en productos cárnicos a partir del análisis cromatográfico de aminoácidos consta de tres etapas: hidrólisis de la muestra, separación cromatográfica de la muestra hidrolizada y comparación del perfil aminoácido obtenido con una colección de perfiles aminoácidicos de diferentes proteínas. Esta comparación se realiza con la ayuda de un programa de ordenador que basado en un método de regresión puede determinar los diferentes tipos de proteínas presentes en una muestra. La principal ventaja de esta estrategia es que funciona igualmente para mezclas de proteínas nativas o desnaturalizadas ya que los aminoácidos son menos susceptibles a sufrir cambios durante el procesamiento de los alimentos que las proteínas. Las principales dificultades se derivan del hecho de que todas las proteínas contienen los 17 aminoácidos mayoritarios, aunque en proporciones variables. Además, otro problema añadido en el caso de la determinación de proteínas de soja en productos cárnicos es que las proteínas de soja y las proteínas cárnicas presentan una composición aminoacídica similar [91].

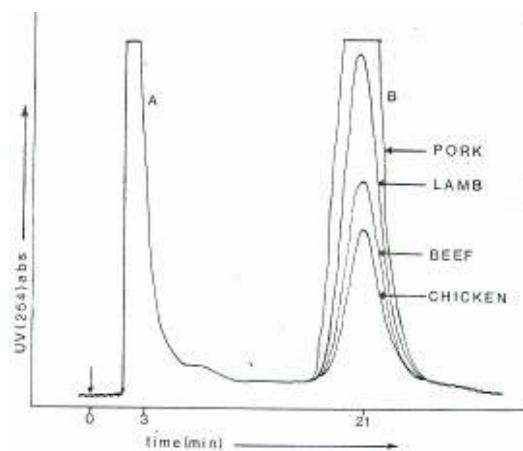
Otra aproximación utilizada para la determinación de proteínas de soja en productos cárnicos ha consistido en la determinación de péptidos característicos de las proteínas de soja. En este caso la muestra se somete a una hidrólisis parcial de las proteínas, normalmente por digestión enzimática, previamente a la separación de los péptidos solubles por HPLC. Es necesario tener especial cuidado en el caso de productos cárnicos tratados con calor para eliminar la agregación de las proteínas individuales ya que este hecho dificulta su solubilización. De hecho se comprobó que la desnaturalización sufrida por las proteínas debida al tratamiento térmico del producto cárneo afectó negativamente a la sensibilidad y exactitud de los métodos analíticos. Con el fin de resolver estos problemas, una estrategia aplicada fue la de utilizar un paso previo de desnaturalización de las proteínas antes de su hidrólisis para llevarlas todas a la misma configuración dando lugar a resultados independientes del procesado del producto cárneo [171]. A pesar de esta mejora, la separación cromatográfica posterior de los péptidos en muchos casos dio lugar a solapamientos entre picos correspondientes a los péptidos de soja y a los péptidos procedentes de las proteínas cárnicas limitando la aplicación de estos métodos con fines cuantitativos, sobre todo en aquellos casos en los que la fuente de proteínas de soja adicionada a los productos cárnicos no era conocida.

Además, los tiempos de análisis fueron muy elevados haciendo imposible la aplicación de los métodos desarrollados al control de rutina de productos cárnicos [174].

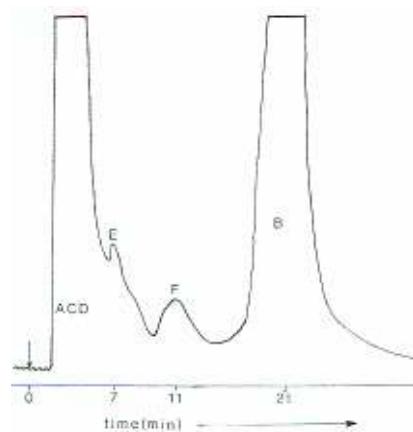
Finalmente, la determinación de proteínas de soja en productos cárnicos se ha llevado a cabo también a través de los perfiles proteicos cromatográficos aunque esta estrategia sólo se había utilizado para productos cárnicos crudos en el momento de comenzar esta Tesis Doctoral. Inicialmente, se utilizaron con el fin de abordar el problema diferentes modos cromatográficos incluyendo la exclusión, el intercambio catiónico y el intercambio aniónico. En los dos primeros casos no fue posible llevar a cabo la separación de las proteínas de soja y las proteínas cárnicas mientras el empleo de una columna de intercambio aniónico débil tras extracción de las proteínas dio lugar a separaciones lo bastante buenas como para permitir la identificación de las proteínas de soja en mezclas soja-producto cárneo [103]. La Figura I. 4 muestra los cromatogramas correspondientes a diferentes carnes (cerdo, cordero, ternera y pollo), a un aislado de proteína de soja y a una mezcla de carne de ternera con proteínas de soja. Se observa que las proteínas de soja eluían con el tiempo muerto (pico A) y en un pico con tiempo de retención próximo a 21 min (pico B). Algunas proteínas de soja no se retenían en la columna y eluían con el pico A mientras que el resto eluían en los picos C, D, E y F. La detección y determinación de proteínas de soja fue posible utilizando el pico F que se separaba totalmente de los picos correspondientes a las proteínas de la carne [103].

Posteriormente, se utilizó el modo de fase inversa para llevar a cabo la determinación de proteínas de soja, proteínas de suero y caseínas en productos cárnicos crudos de diferentes especies (ternera, cerdo, pollo y pavo) por HPLC [175]. El método consistió en un gradiente lineal en 70 min con fases móviles que contenían ácido trifluoroacético como agente formador de pares de iones. Para ello, se prepararon productos cárnicos modelo suplementándolos con las diferentes proteínas no cárnicas. Los resultados mostraron que había tres picos característicos de las proteínas de soja y uno para las caseínas que se separaban bien de las proteínas de la carne. En el caso del suero, el principal pico obtenido coeluía con las proteínas cárnicas. El método se aplicó a la determinación cuantitativa de las proteínas estudiadas con límites de detección del 1 %.

(1)



(2)



(3)

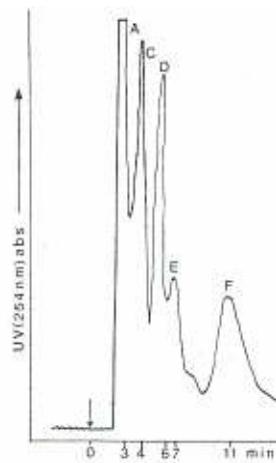


Figura I. 4. Perfiles proteicos obtenidos por RP-HPLC a partir de: (1) distintos extractos cárnicos, (2) aislado de proteína de soja y (3) mezcla carne de ternera-aislado de proteína de soja (15 %). A y B: picos de proteínas cárnicas. A, C, D, E y F: picos de proteínas de soja [103].

Finalmente, la separación simultánea de las proteínas de soja y las proteínas cárnicas se llevó a cabo por HPLC de intercambio aniónico y en fase inversa aunque en el primer caso el importante solapamiento observado para las proteínas de soja no permitió su aplicación con fines cuantitativos. En el caso de la fase inversa, la separación de las proteínas de soja y las proteínas cárnicas requirió un paso previo de derivatización con 4-vinilpiridina. El límite de detección en este caso fue del 2 % [176].

Los problemas encontrados y que se han comentado a lo largo de todo este apartado al intentar desarrollar metodologías analíticas para la determinación de proteínas de soja en productos cárnicos habían impedido hasta el momento establecer un método analítico de rutina adecuado para el control de calidad de estos productos. Por ello, en esta Tesis Doctoral nos propusimos proponer metodologías analíticas rápidas, sencillas y de bajo coste para solucionar este problema y para conseguirlo utilizamos la técnica de HPLC de perfusión por sus interesantes características para la separación de proteínas.

I.1.7 La cromatografía de perfusión

La cromatografía de perfusión surge como consecuencia de los grandes avances que han tenido lugar en el campo de la biotecnología así como debido a la necesidad de acelerar todos los aspectos relacionados con la investigación de biomoléculas, especialmente con su purificación y análisis [178, 179].

En cromatografía líquida convencional, las moléculas se mueven rodeando la superficie de la fase estacionaria mediante convección, pero además, el transporte de moléculas a través de las partículas de la fase estacionaria se lleva a cabo por difusión, el cual es un proceso lento, especialmente en el caso de péptidos y proteínas que poseen elevado peso molecular y bajos coeficientes de difusión [180]. Como consecuencia de este hecho, se produce un incremento en el ensanchamiento de picos y pérdida de resolución cromatográfica [178].

En cromatografía de perfusión, las partículas de la fase estacionaria están diseñadas para permitir un mejor acceso de las moléculas de soluto al interior de éstas a través de poros de dos tamaños diferentes: poros grandes (*throughpores*) de diámetro comprendido entre 6000 y 8000 Å, que atraviesan la partícula de fase estacionaria de extremo a extremo y, como consecuencia, permiten el transporte de las moléculas de soluto en el interior de la partícula por convección, y poros pequeños (*diffusive pores*), con un tamaño de poro de 800 a 1500 Å, que interconectan los anteriores y proporcionan gran capacidad de carga [180, 181]. Así, las moléculas de soluto viajan por convección por la columna hasta alcanzar la partícula de fase estacionaria (como ocurre en cromatografía con fases estacionarias convencionales), y una vez allí, las moléculas de soluto atraviesan las partículas mediante una combinación de transporte convectivo y difusivo. Como consecuencia de todo ello, se tienen las siguientes ventajas en cromatografía de perfusión:

- Las separaciones son de 10 a 100 veces más rápidas que en cromatografía convencional, mientras que la resolución y la capacidad de carga de la columna se mantienen.
- El transporte rápido a través de los *throughpores* y *diffusive pores* permite que tanto la resolución como la capacidad de carga de la columna sean independientes del flujo de la fase móvil. Ello hace posible la utilización de elevados flujos y la reducción drástica de los tiempos de análisis.
- La reducción de los tiempos de análisis con fases perfusivas disminuye el tiempo que las moléculas de soluto permanecen dentro de la columna, y así se evita que moléculas de gran tamaño como las proteínas, se desnaturalicen o que la actividad biológica de las biomoléculas quede mermada [180].
- La reducción de los tiempos de análisis permite la reducción del coste de los procesos cromatográficos a escala analítica y especialmente preparativa [182].

Las fases estacionarias perfusivas están constituidas por poliestireno entrecruzado con divinilbenceno [183] y sus características son [179, 180, 184]:

- Elevada estabilidad mecánica y química.
- Soportan presiones de hasta 170 bar.
- Se pueden emplear a pH entre 1 y 14.
- Soportan elevadas fuerzas iónicas (0 a 3 M).

En el modo de fase inversa, esta matriz no sólo hace de soporte sino también de fase estacionaria [185]. Para obtener fases estacionarias adecuadas para otros modos cromatográficos, la matriz se recubre de una fina película de un copolímero (< 80 Å) compuesto por al menos tres especies monoméricas, cada una de las cuales tiene una función diferente. Uno de los monómeros se utiliza para unir el copolímero a la matriz soporte y previene la erosión del recubrimiento; otro monómero tiene la función de unir los grupos funcionales del copolímero a la fase estacionaria y el tercer monómero entrecruza las cadenas del copolímero para formar una superficie impermeable [184]. En esta película, rica en grupos hidroxilados, se sustituyen los grupos funcionales creando así diferentes modos cromatográficos: intercambio iónico, interacción hidrófoba y afinidad. Esta técnica no se utiliza en el modo de exclusión molecular debido a que el transporte por convección en el interior de la partícula podría afectar a la difusión que se necesita para que tenga lugar la separación de las moléculas en función de su tamaño [186].

Las características tan interesantes de la chromatografía de perfusión han permitido la realización de separaciones cromatográficas de proteínas en cortos tiempos de análisis y en algunos casos incluso ha simplificado la separación [187] o ha permitido el aislamiento de proteínas en un estado más nativo [188].

A pesar del interés de las fases estacionarias perfusivas, éstas no se habían empleado nunca para la separación de proteínas de soja hasta que nuestro grupo de investigación lo hizo siendo pionero en la aplicación de fases estacionarias de alta velocidad en la separación de estas proteínas y aplicando dichas separaciones a la

determinación de proteínas de soja en productos derivados de soja y a la caracterización de variedades de cultivos de soja [189-194].

En esta Tesis Doctoral, se ha abordado por primera vez el estudio de la cromatografía de perfusión como herramienta analítica para el desarrollo de métodos analíticos para la determinación de proteínas de soja en productos cárnicos.

I.2 OBJETIVOS

A pesar de las interesantes propiedades nutritivas y funcionales de las proteínas de soja, la adición de estas proteínas a productos cárnicos está prohibida o limitada por la legislación vigente. Sin embargo, estas proteínas se utilizan frecuentemente en la elaboración de productos cárnicos debido a sus propiedades emulsionantes y bajo coste. Ello implica la necesidad de disponer de metodologías analíticas que permitan la determinación de proteínas de soja en productos cárnicos. La ausencia de metodologías analíticas adecuadas para llevar a cabo el control de calidad hace que la propuesta de métodos sencillos y accesibles a los laboratorios de control presente un gran interés.

Por ello, el objetivo general de este trabajo de investigación ha sido:

Desarrollar metodologías analíticas sencillas, rápidas y de bajo coste para la determinación de proteínas de soja en productos cárnicos utilizando HPLC de perfusión.

Del objetivo general planteado se han derivado los siguientes objetivos concretos:

- Optimizar un método de extracción cuantitativa de las proteínas de soja añadidas a productos cárnicos con la menor interferencia posible de las proteínas cárnicas.

- Diseñar un gradiente de elución y optimizar distintas condiciones cromatográficas en HPLC de perfusión (porcentaje de agente desnaturalizante en las fases móviles y

longitud de onda de detección UV) para llevar a cabo la separación de las proteínas de soja y las proteínas cárnicas en el extracto del producto cárneo.

- Seleccionar un pico “marcador” de proteínas de soja que permita la detección rápida de adulteraciones de productos cárnicos con proteínas de soja o la cuantificación de las mismas en productos cárnicos a los que la adición de proteínas de soja está permitida por la legislación hasta un límite.
- Caracterizar el pico “marcador” de proteínas de soja utilizando como herramienta analítica la espectrometría de masas.
- Desarrollar una metodología analítica de HPLC de perfusión acoplada a un Espectrómetro de Masas de Trampa de Iones con el fin de intentar caracterizar los picos obtenidos en la separación cromatográfica de los extractos obtenidos a partir de habas de soja, en particular, el pico que eluye al mismo tiempo de retención que el pico “marcador” de proteínas de soja en productos cárnicos.
- Identificar inequívocamente las proteínas de soja que eluyen en el pico “marcador” mediante el desarrollo de una metodología analítica de cromatografía multidimensional y Espectrometría de Masas en tandem (aislamiento del pico “marcador” e inyección del hidrolizado peptídico en un sistema de nano-HPLC-MS/MS).
- Validar las metodologías analíticas desarrolladas para productos cárnicos elaborados con carnes de distintas especies (cerdo, pavo, pollo, ternera y mezclas de ellas), en especial, aquellos de mayor complejidad como los productos cárnicos tratados con calor.
- Aplicar las metodologías analíticas propuestas a la determinación de proteínas de soja en productos cárnicos comerciales para consumo humano con el fin de controlar el cumplimiento de la legislación vigente para estos productos.

CAPÍTULO II

PARTE EXPERIMENTAL

II. PARTE EXPERIMENTAL

II. 1 REACTIVOS, PATRONES Y MUESTRAS

II.1.1 Reactivos

Determinación de proteínas de soja en productos cárnicos por HPLC

Las fases móviles empleadas en HPLC se prepararon utilizando acetonitrilo (ACN) (Merck, Darmstadt, Alemania), agua ultrapura obtenida en un equipo Milli-Q (Millipore, Bedford, Massachusetts, EE.UU.), ácido trifluoroacético (TFA) (Sigma-Aldrich, San Luis, Missouri, EE.UU.) y ácido fórmico (Riedel de Haën, Seelze, Alemania).

Para la preparación de los extractos cárnicos a partir de los productos cárnicos se han empleado los siguientes reactivos:

- Acetona, hexano (Merck), etanol y éter de petróleo (ambos de Panreac, Barcelona, España) para la extracción de la grasa.
- La solubilización de las proteínas se realizó con tris(hidroximetil)aminometano (Tris), 2-mercaptoetanol, urea (todo de Merck), hidrogenocarbonato sódico, hidrogenofosfato sódico (ambos de Panreac), ditiotreitol (DTT) (ICN, Aurora, Ohio, EE.UU.) y dodecil sulfato sódico (SDS) (Fluka Biochemica, Buchs, Suiza).

Fraccionamiento de las proteínas de soja

En el fraccionamiento de las proteínas a partir de las habas de soja se utilizó éter de petróleo, Tris, 2-mercaptoetanol (Merck) y ácido clorhídrico (Panreac).

Análisis por SDS-PAGE de proteínas de soja

Para llevar a cabo la separación de componentes proteicos por electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE) se emplearon los siguientes reactivos: SDS, Tris, persulfato de amonio (Merck), disolución de acrilamida/bisacrilamida (30 %T, 2,67 %C) (Biorad, Hercules, California, EE.UU.), disolución reguladora de Laemmli (62.5 mM Tris, pH 6.8, 2 % SDS, 25 % glicerol, 0.01 % azul de bromofenol) (Biorad), disolución reguladora Tris/Glicina/SDS (25 mM Tris, pH 8.3, 192 mM glicina, 0.1 % SDS) (Biorad), N’N’N’N’- tetra-metil-etilenodiamina (TEMED) (Biorad) y azul de Coomassie EZBlue™ (Sigma-Aldrich).

La digestión de las proteínas que eluían en los picos recogidos en el fraccionamiento por RP-HPLC de perfusión, se llevó a cabo utilizando urea, DTT, iodoacetamida, bicarbonato amónico (Fluka Biochemica) y tripsina de grado proteómico (Sigma-Aldrich). La digestión en gel sobre las bandas obtenidas por SDS-PAGE se llevó a cabo con los mismos reactivos y ACN.

II.1.2 Patrones

Como patrón de proteínas de soja se han empleado dos aislados de proteínas de soja (APS): el APS Supro 500E (Anvisa, Madrid, España) y el APS de ICN. El APS de ICN se utilizó con fines cualitativos en el análisis de proteínas de soja en diferentes habas y fracciones por espectrometría de masas. El APS Supro 500E se utilizó con fines cuantitativos para determinar el contenido de proteína de soja adicionada a los productos cárnicos. El contenido en proteínas de este aislado se obtuvo a partir del porcentaje en nitrógeno total determinado por el método Kjeldahl multiplicado por 6.25 (factor de conversión aplicado normalmente a los productos de soja) [195]. El porcentaje de proteína calculado de esta manera en tres lotes distintos fue de 86.7 % (m/m) (RSD = 4.96; 4 determinaciones), 90.9 % (m/m) (RSD = 0.73 %; 6 determinaciones) y 85.4 % (2 replicas), respectivamente. La humedad del aislado de proteína de soja se determinó mediante secado a 130 °C hasta pesada constante [195].

Otras proteínas patrón también empleadas para la caracterización de las proteínas de soja por espectrometría de masas fueron: inhibidores de la soja Kunitz y Bowman-Birk (inhibidores de la quimotripsina y la tripsina), lectinas y lipoxigenasas (todos de Sigma). Asimismo, se ha empleado también una mezcla de proteínas patrón de pesos moleculares conocidos (10 kDa, 15 kDa, 20 kDa, 25 kDa, 37 kDa, 50 kDa, 75 kDa, 100 kDa, 150 kDa, 250 kDa) de laboratorios Biorad para la estimación de los pesos moleculares de las proteínas de soja. Por último, el caseinato sódico, la α -lactoalbúmina y la β -lactoglobulina de leche de vaca, utilizadas para estudiar la interferencia de dichas proteínas en la determinación de proteínas de soja, se compraron en Sigma.

II.1.3 Muestras

Se han utilizado diez habas con cuatro coloraciones diferentes. Ocho de estas habas habían sido comercializadas como habas de soja (tres amarillas, dos verdes, una roja y dos negras) y dos como *azuki* (*Vigna angularis* (Willd.)) y tenían un aspecto similar al de las habas comercializadas como soja roja. Todas las habas fueron adquiridas en comercios de Madrid.

Los productos cárnicos utilizados habían sido elaborados con distintos tipos de carne (cerdo, pollo, pavo, ternera) y mezclas de las mismas, agua, sal, azúcares (dextrosa, lactosa), almidón (trigo, patata, maíz), especias, conservantes, estabilizantes, antioxidantes y colorantes. La mayor parte de estos productos contenían proteínas de soja. Algunos de ellos, también contenían proteínas lácteas. Todos estos productos fueron adquiridos en comercios de Madrid o suministrados por Campofrío Alimentación S.A. (Burgos). En la Tabla II.1 se ha incluido la lista de los productos utilizados que contenían proteínas no cárnicas. En esta tabla también se han incluido cuatro productos modelo que contenían proteínas de soja y que no habían sido sometidos a ningún tratamiento térmico. Asimismo, se han utilizado tres productos cárnicos modelo que contenían carnes de cerdo, pavo y pollo, respectivamente, y que no contenían proteínas de soja u otro tipo de proteína no cárnicia. Todos los productos modelo fueron preparados en la Planta Piloto de la empresa Campofrío Alimentación S.A. (Burgos).

Tabla II. 1. Número y características de los productos cárnicos utilizados que contenían proteínas no cárnicas.

Productos cárnicos	Proteínas no cárnicas que contienen	
	Proteínas de soja ¹	Proteínas de soja y lácteas ^{1,2}
Con carne de cerdo ³	13	-----
Con carne de pavo ³	8	6
Con carne de pollo ³	10	1
Con carne de ternera ³	1	1
Con carne de pavo y cerdo ³	1	4
Con carne de cerdo y pollo ³	1	-----
Con carne de pavo y ternera ³	-----	1
Con carne de ternera, pavo y pollo ³	1	-----
Con carne de cerdo, pollo y pavo ³	-----	1
Con carne de cerdo, ternera, pollo y pavo ³	-----	1
Modelo con carne de cerdo	1	-----
Modelo con carne de pavo	1	-----
Modelo con carne de pollo	2	-----
Total	39	15

¹ En la mayoría de estos productos se indicaba directamente la adición de aislado de proteína de soja. En algunos casos sólo se indicaba que se había añadido proteína vegetal y posteriormente en el laboratorio se comprobó que contenían proteínas de soja.

² Las proteínas lácteas se adicionaron como tales o también en forma de leche en polvo.

³ Productos cárnicos sometidos a tratamiento térmico.

II. 2 INSTRUMENTACIÓN

II.2.1 HPLC

Se han empleado diferentes cromatógrafos de líquidos modelo 1100 de Agilent Technologies (Palo Alto, CA, EE.UU.), todos equipados con sistema de inyección automático, sistema de desgasificación a vacío, compartimento termostatizado para la columna, detector de diodos en serie y bomba cuaternaria o binaria. Los equipos fueron controlados con un sistema de adquisición de datos HP-Chemstation. Además, el equipo con la bomba binaria estaba conectado a un espectrómetro de masas de trampa de iones a través de una interfase ortogonal de electrospray (ESI, modelo G1607A, Agilent Technologies) (ver Figura II. 1). El control del equipo y el análisis y adquisición de datos se realizó con el LC/MSD Trap Software 5.2.

Se han empleado dos columnas cromatográficas de perfusión en fase inversa Poros R2/H de Perseptive Biosystems (Framingham, Massachussets, EE.UU.), ambas empaquetadas con partículas de fase estacionaria de poliestireno-divinilbenceno de 10 µm de tamaño y de dimensiones: 50 x 4.6 mm d. i. y 100 x 2.1 mm d. i.

II.2.2 Nano-HPLC-MS/MS

Se ha utilizado un equipo de nano cromatografía líquida (nano-LC) de la serie 1100 de Agilent Technologies (Figura II. 2A) acoplado a una trampa de iones modelo SL de Agilent equipada con una fuente ortogonal de nanoelectrospray (Figura II. 2B). El sistema estaba equipado con dos bombas, una de un solo canal para régimen isocrático y otra que proporcionaba flujos del orden de los nano-litros y que estaba conectada a un micro-desgasificador a vacío, un micro-inyector termostatizado y un compartimento de columna termostatizado con una micro-válvula de seis vías.

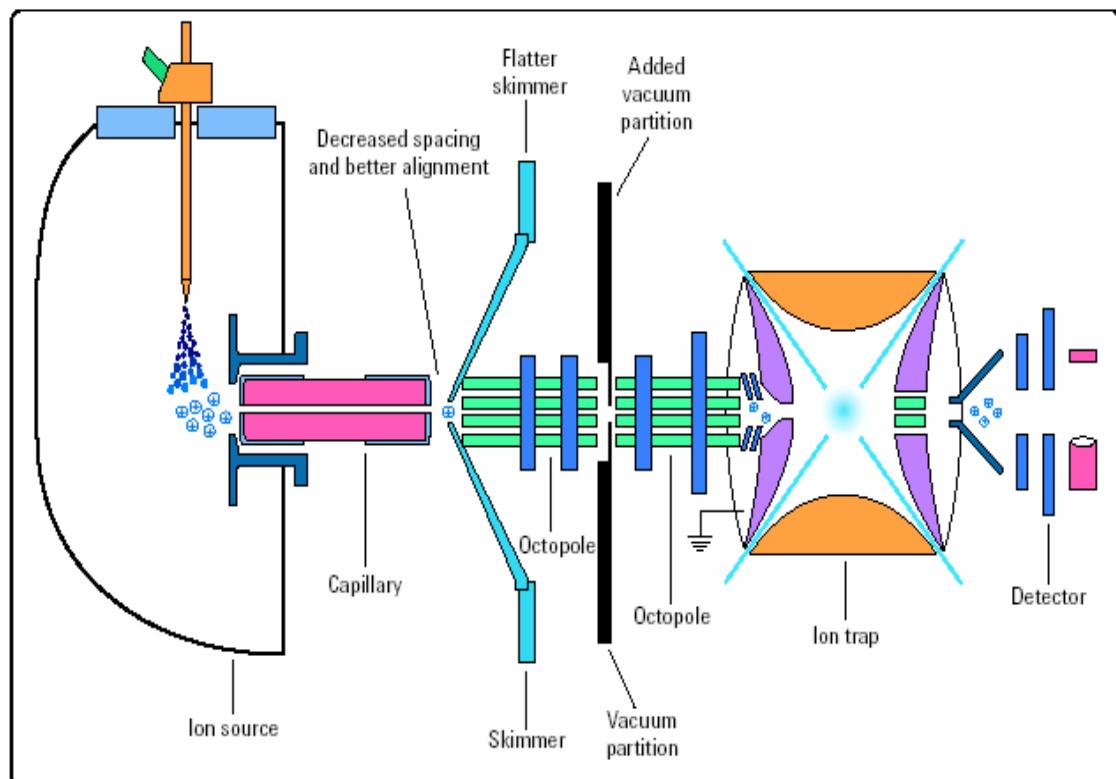


Figura II. 1. Esquema del espectrómetro de masas de trampa de iones con interfase ortogonal de electrospray.

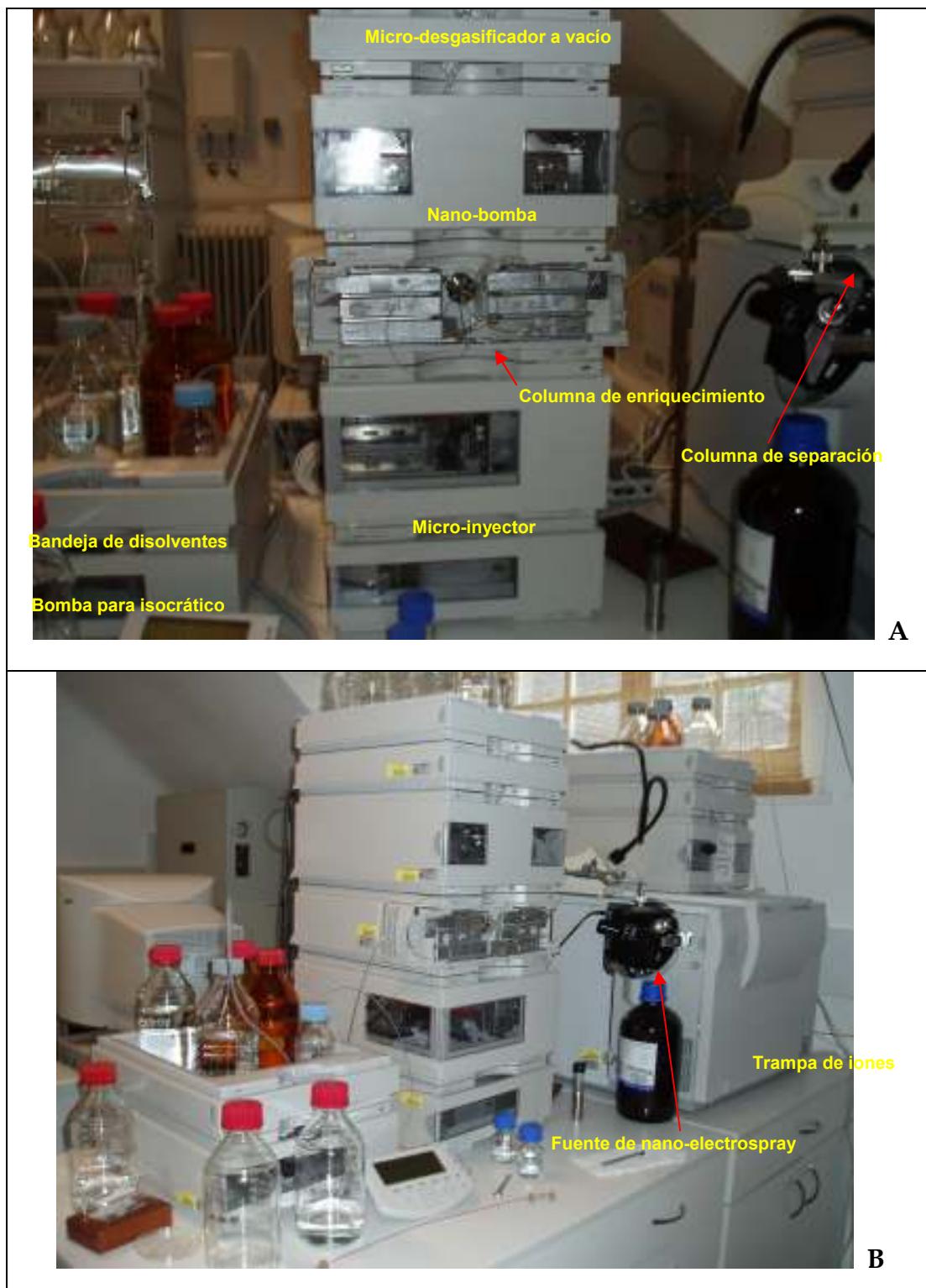


Figura II. 2. Componentes del sistema de nanoLC (A) y conexión con la trampa de iones equipada con una fuente ortogonal de nano-electrospray (B).

Se utilizaron tres columnas de fase inversa (Agilent Technologies), una columna C18 Zorbax de 5 mm x 300 µm d. i. para preconcentrar las muestras y dos columnas C18 Zorbax de 50 mm x 75 µm d. i. y de 150 mm x 75 µm d. i. que se utilizaron para separar las muestras previamente preconcentradas. Las tres columnas estaban empaquetadas con partículas de 3.5 o 5 µm y presentaban poros de 300 Å. La columna utilizada en la preconcentración de muestras se situó en el compartimento de la columna conectada a una micro-válvula de seis vías. La nano-columna se colocó en la cámara de la fuente de nano-electrospray conectada directamente a la aguja con fines a reducir al máximo el volumen muerto (Figura II. 2).

II.2.3 Otros

Para llevar a cabo la electroforesis de proteínas por SDS-PAGE se utilizó el sistema Mini-Protean de BioRad.

Asimismo, también se ha utilizado el siguiente material: sistema de filtración de disolventes, filtros de nylon de 0.45 µm (Gelman Sciences, EE.UU.), pH-metro modelo 654 de Metrohm (Herisau, Suiza), baño de ultrasonidos KM de Raypa (Barcelona, España), centrifuga Megafuge 2.0R de Heraeus (Alemania), estufa de secado Memmert VE 300, balanza analítica AE260 Delta Range (Greifensee, Suiza), homogeneizador Ultraturrax modelo T-25B de IKA (Alemania), picadora moulinette de Moulinex (Francia), Molinillo de Braun (Alemania), Agitador magnético Agimatic-N de J. P. Selecta (Barcelona, España), granatario de Mettler (Toledo, España), cartuchos de extracción en fase sólida C18 de Phenomenex (California, EE. UU.), sistema de vacío de Vac Master para llevar a cabo la extracción en fase sólida, baño de agua M12 de LAUDA, microbalanza Sartorius, montaje para la evaporación de la fase móvil de las muestras mediante una corriente de nitrógeno, centrífuga Biofuge 28 RS (rotor 3745) de Heraeus, placa calefactora con agitación magnética, termómetro de mercurio y membranas de ultrafiltración de Millipore de peso molecular nominal 5 kDa.

II. 3. PROCEDIMIENTO

II.3.1 Preparación de los extractos cárnicos

La eliminación de la grasa de los productos cárnicos se llevó a cabo mediante el siguiente procedimiento: se trituraron 10 g de producto cárnicoo en la picadora, se homogeneizaron con 25 mL de acetona en el Ultraturrax (3 min), se agitaron durante 15 minutos y se centrifugaron a 3362g durante 30 min. Después de eliminar el sobrenadante, se llevó a cabo otra extracción con otros 25 mL de acetona siguiendo el mismo procedimiento. El residuo obtenido después de esta segunda extracción de la grasa se secó durante una noche en estufa a 60 °C con fines a eliminar la acetona residual. Finalmente, el producto cárnicoo desgrasado y seco se pasó por un molinillo para obtener un polvo fino. La relación entre el peso del producto inicial y el producto desgrasado y seco estaba comprendido entre 5 y 6. Este factor se tuvo en cuenta a la hora de expresar las concentraciones de las muestra referidas al producto inicial.

Los extractos cárnicos fueron preparados por pesada de una cantidad apropiada del producto cárnicoo desgrasado y seco (comprendida entre 0.1 y 1 g), solubilización de las proteínas en una disolución reguladora Tris-HCl (pH=8) con agitación ultrasónica a 50 °C durante 10 min y centrifugación a 3362g durante 10 min. Las disoluciones empleadas presentaban concentraciones comprendidas entre 20 y 250 mg/mL (relativo al producto inicial). En la Figura II. 3 se esquematiza el proceso completo de preparación de la muestra.

II.3.2 Preparación de las disoluciones de APS y habas de soja

El protocolo para preparar las disoluciones de aislado de proteína de soja utilizadas en los calibrados para las proteínas de soja y las disoluciones de las habas empleadas consistía en pesar y disolver la cantidad necesaria de muestra en el medio adecuado, sonicar durante 5 min y centrifugar a 3362g durante 10 min. Las disoluciones preparadas a partir de las habas presentaban concentraciones comprendidas entre 20 y 30 mg/mL.

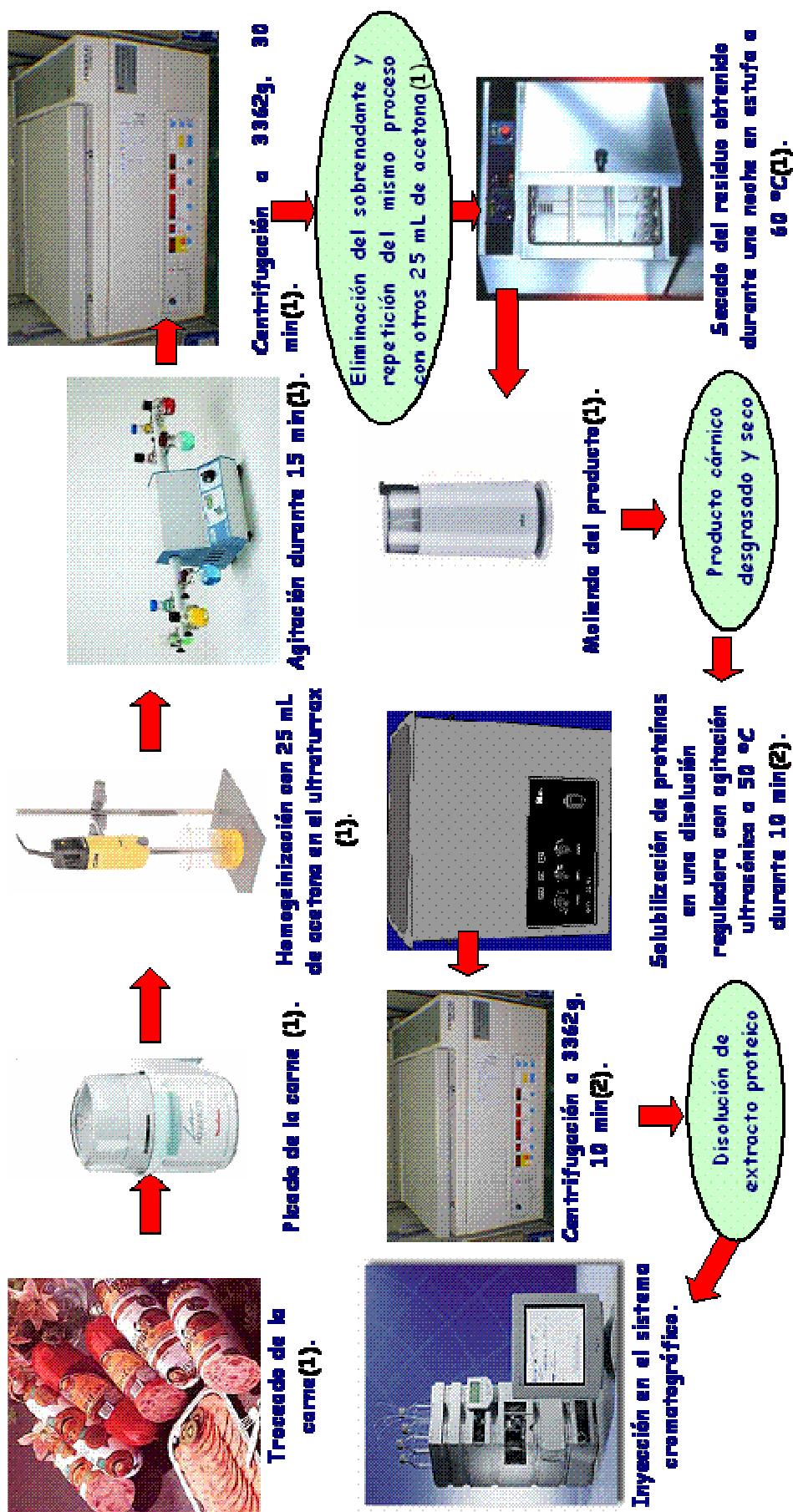


Figura II.3. Método de preparación de la muestra en dos etapas: (1) Extracción de la grasa y (2) Extracción de las proteínas.

La preparación de las disoluciones para el calibrado por adiciones patrón consistía en pesar la misma cantidad de disolución de extracto proteico y cantidades crecientes del APS, sonicar durante 5 min y centrifugar a 3362g durante 10 min.

II.3.3 Fraccionamiento de las proteínas de soja

El fraccionamiento de las proteínas de soja en las habas se llevó a cabo siguiendo el procedimiento descrito por Thahn y col. para el aislamiento de las globulinas 7S y 11S de la soja [74] ligeramente modificado por nuestro grupo de investigación [193].

El procedimiento seguido fue el siguiente:

- Eliminación de la grasa de la muestra a fraccionar mediante una extracción en tres etapas con éter de petróleo (50 g de muestra en 100 mL x 3 de éter de petróleo). Cada extracción se realizaba mediante agitación continua en una placa durante 30 min. Después de cada extracción, la mezcla se centrifugaba a 3362g durante 30 min y se separaba por decantación el disolvente de la soja.
- Extracción de las proteínas de soja con 1 L de una disolución reguladora Tris-HCl 0.03 M que contenía 2-mercaptoetanol 0.01 M (pH = 8.0), mediante agitación continua en placa a temperatura ambiente durante 1 hora.
- Centrifugación a 16250g durante 20 min a una temperatura de 20 °C.
- Recolección del sobrenadante (donde se supone que han quedado las proteínas de soja).
- Ajuste del pH del sobrenadante a un valor de 6.4 (HCl 2 M). Dejar en reposo durante unos 15 min y centrifugar a 16250g durante 20 min a una temperatura entre 2 y 5 °C.
- Disolver el residuo sólido obtenido en disolución reguladora Tris-HCl (pH = 8), volver a ajustar el pH a 6.4 y centrifugar. El precipitado obtenido se etiqueta como fracción 11S y se almacena en el congelador.
- Ajustar el pH del sobrenadante que ha quedado tras ajustar el pH a 6.4 hasta un valor de 4.8 (HCl 2 M), dejar en reposo durante 15 min y centrifugar a 16250g

durante 20 min a una temperatura entre 2 y 5 °C. El sobrenadante (o suero proteico) que se obtiene se almacena en el congelador.

- Disolver el residuo sólido obtenido en la etapa anterior en disolución reguladora Tris-HCl (pH = 8), ajustar el pH a 4.8 y centrifugar. El residuo sólido obtenido se almacena en el congelador como fracción 7S.

Las disoluciones correspondientes a las fracciones proteicas obtenidas se prepararon por pesada de una cantidad apropiada de muestra, solubilización de las proteínas en agua con agitación ultrasónica a 25 °C durante 5 min y centrifugación a 3362g durante 10 min. Las disoluciones de globulinas 11S y 7S presentaban concentraciones próximas a 60 mg/mL.

II.3.4 Análisis por RP-HPLC de perfusión

Se han utilizado tres métodos de RP-HPLC de perfusión diferentes. Un primer método se desarrolló con fines a separar las proteínas de soja de otros componentes presentes en los productos cárnicos, un segundo método se utilizó para el fraccionamiento del extracto proteico y recolección del pico de interés y un tercer método se aplicó a la separación de proteínas de soja en habas de soja para su análisis por MS. En todos los casos, las fases móviles utilizadas consistieron en disoluciones de TFA en agua Milli-Q a una concentración de 0.05 % (v/v) (fase móvil A) y disoluciones de TFA en ACN a una concentración de 0.05 % (v/v) (fase móvil B). Las fases móviles se filtraron a través de membranas de nylon de 0.45 µm y se desgasificaron de forma continua a vacío durante su utilización.

El método cromatográfico utilizado con fines a separar las proteínas de soja de los otros componentes de la carne se llevó a cabo en una columna de perfusión de fase inversa de 50 mm de longitud y consistía en un gradiente lineal y binario de 5% a 25% B en 0.8 min, 25 % a 42 % B en 0.8 min y de 42 % a 50 % B en 0.6 min. La columna se reequilibró con las condiciones iniciales entre inyecciones utilizando un gradiente de 50 % a 5 % B en 0.5 minutos, seguido por un paso a 5 % B en 0.5 min. El flujo de fase móvil fue de 3

mL/min, el volumen de inyección de 20 µL, la temperatura de trabajo de 50 °C y la longitud de onda de detección de 280 nm.

El método cromatográfico utilizado con fines a fraccionar el extracto proteico y recoger el pico de interés a la salida del detector se llevó a cabo en una columna de perfusión de fase inversa de 100 mm de longitud. El método utilizado fue el mismo que el anterior pero a un flujo de fase móvil menor (0.5 mL/min) y un volumen de inyección de 100 µL. Con fines a mantener la pendiente del gradiente, los tiempos de cada etapa de éste se modificaron convenientemente quedando el gradiente así: de 5 % a 25 % B en 4.8 min, 25 % a 42 % B en 4.8 min y de 42 % a 50 % B en 3.6 min.

La separación de las proteínas de la soja en las habas de soja y en sus fracciones se realizó utilizando una columna de perfusión de fase inversa de 100 mm de longitud. El método cromatográfico utilizado [193] consistía en un gradiente lineal y binario de 5 % a 14 % B en 12 min, de 14 % a 16 % B en 1 min, de 16 % a 20 % B en 2 min, de 20 % a 28 % B en 1 min, de 28 % a 40 % B en 8 min, de 40 % a 45 % B en 2 min y de 45 % a 95 % B en 0.5 min. La temperatura de separación fue 60 °C, el volumen de inyección 5 µL, el flujo de fase móvil 0.5 mL/min y la detección se llevó a cabo a 254 nm.

II.3.5 Digestión enzimática de las fracciones recogidas por RP-HPLC de perfusión

Las fracciones recogidas por RP-HPLC se sometieron a evaporación mediante la aplicación de una corriente de nitrógeno hasta obtener un residuo que posteriormente se digirió enzimáticamente. Para realizar la digestión enzimática fue necesaria la preparación de las siguientes disoluciones:

- Disolución 8 M de urea (se prepara el mismo día que va a ser utilizada).
- Disolución 100 mM de DDT (se prepara el mismo día que va a ser utilizada).
- Disolución 50 mM de NH₄HCO₃ (pH=10) (almacenar a 4 °C).
- Disolución de 11 µg/mL de tripsina en NH₄HCO₃.

Además de estas disoluciones también se utilizaron 500 µg (cantidad pesada en microbalanza) de iodoacetamida.

El protocolo utilizado para llevar a cabo la digestión enzimática fue el siguiente:

- Disolver las fracciones recogidas por RP-HPLC (residuo seco) en 50 µL de la disolución 8 M de urea.
- Adicionar 15 µL de la disolución 10 mM de DTT para reducir los enlaces disulfuro. La reducción se realizó a 55 °C durante 60 min.
- Enfriar la disolución a temperatura ambiente y añadir 500 µg de iodoacetamida para la alquilación de los grupos tiol libres de los aminoácidos cisteína e histidina. Este proceso se llevó a cabo a temperatura ambiente durante 90 min y en la oscuridad para prevenir la formación de radicales libres catalizados por la luz que darían origen a la formación de iodina.
- Adición de 450 µL de la disolución de 11 µg/mL de tripsina preparada en NH₄HCO₃. La digestión enzimática se llevó a cabo a 37 °C durante toda la noche. Las cantidades de proteína total utilizadas en este proceso de digestión enzimática oscilaban entre 94 y 744 µg aproximadamente.
- Purificación de la muestra por eliminación de la urea por extracción en fase sólida. El proceso de preacondicionado de los cartuchos consistía en pasar 2 mL de metanol y 2 mL de agua ultrapura. La muestra digerida se trataba con 1 µL de ácido fórmico y se pasaba a través del cartucho. A continuación, se lavaba el cartucho con 2 mL de agua ultrapura y, por último, se eluían los péptidos retenidos haciendo pasar primero 500 µL de ACN/H₂O 50/50 con 0.1 % (v/v) de TFA y después 500 µL de ACN/H₂O 75/25 con 0.1 % (v/v) de TFA. Finalmente, la fase móvil de los eluyentes se evaporó con una corriente de nitrógeno hasta sequedad. Antes del análisis por nanoLC-MS/MS, las muestras se disolvieron en volúmenes comprendidos entre 20-100 µL de agua/ACN/ácido fórmico en una proporción 95:5:0.1 (v/v).

Alguna de las muestras se sometió a un proceso de purificación utilizando membranas de ultrafiltración previamente a la digestión enzimática. Para ello, se colocaba 100 µL de muestra en cada cartucho de ultrafiltración, y se centrifugaba durante 20 min a 8.6 rpm. En esta etapa todos los componentes con un peso molecular menor de 5 kDa pasaban a través de la membrana. Tras una etapa de lavado realizada pasando 100 µL de agua ultrapura por el cartucho se centrifugaba durante 15 min a 8.6 rpm. Este proceso de lavado se repitió dos veces. Finalmente, los componentes proteicos que no atravesaron la membrana se disolvieron en 50 µL de agua ultrapura y se transfirieron a otro tubo eppendorf. Para terminar se evaporó el agua de las muestras hasta sequedad mediante una corriente de nitrógeno.

II.3.6 Separación por SDS-PAGE de las fracciones recogidas por RP-HPLC de perfusión

El método electroforético utilizado fue el de Laemmli [196] que se lleva a cabo en presencia de SDS. El dispositivo empleado se muestra en la Figura II. 4. Todas las disoluciones que se utilizaron en esta etapa se prepararon con agua bidestilada, filtrada con filtros de 0.2 µm y ultrasonicada.

Preparación de los geles de concentración y separación

El sistema de Laemmli utiliza dos geles: el gel de concentración (*stacking gel*) y el gel de separación (*resolving gel*). El gel de concentración tiene la función de concentrar la muestra en una línea antes de que tenga lugar la separación en el gel de separación de las cadenas polipeptídicas. El gel de concentración contiene una concentración más baja de acrilamida (tamaño de poro mayor), un pH más bajo y un contenido iónico diferente al gel de separación.

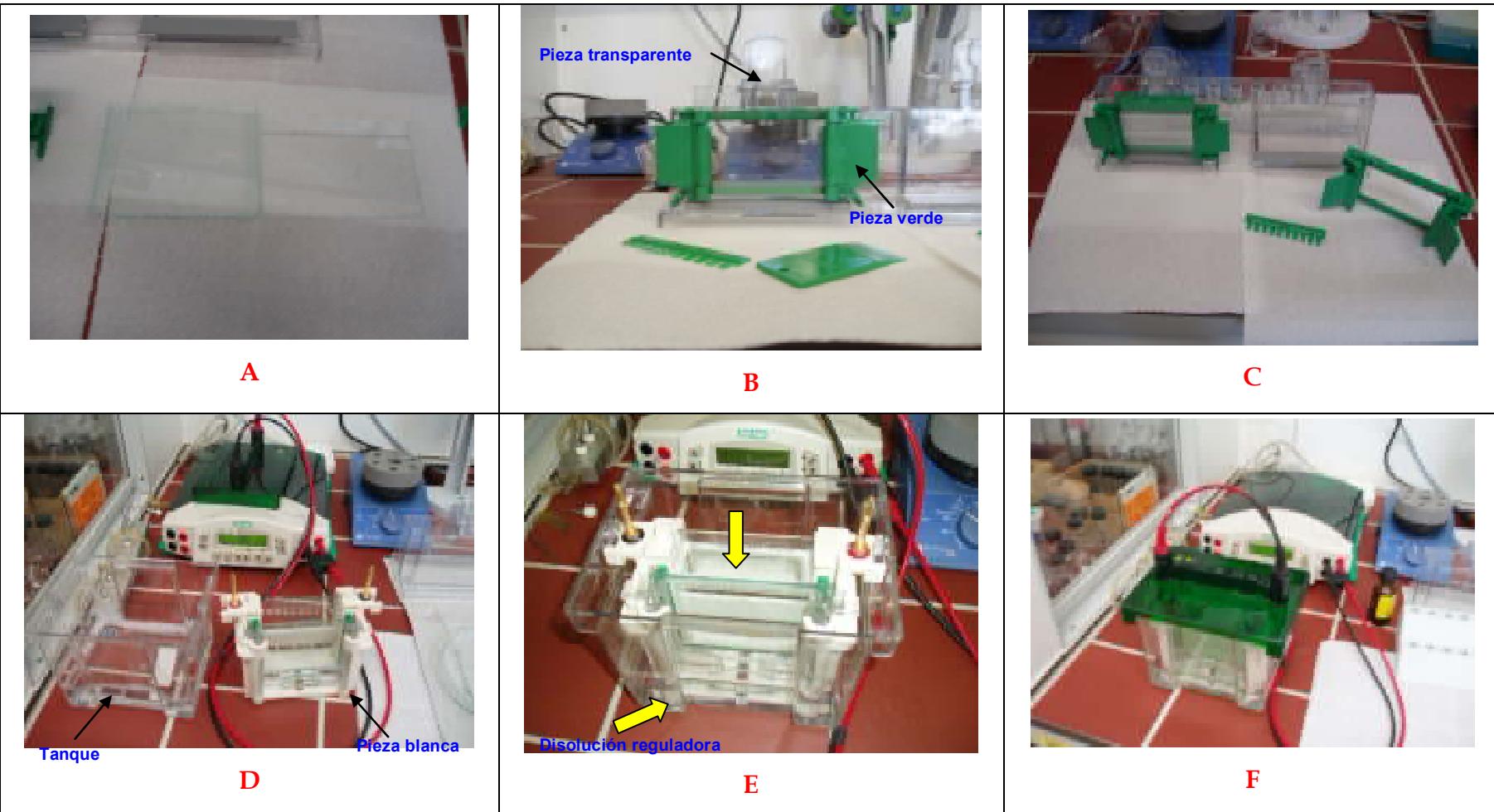


Figura II. 4. Componentes del sistema Mini-PROTEAN 3 de Biorad para llevar a cabo la electroforesis de proteínas en mini-geles por SDS-PAGE por el método de Laemmli.

Para la preparación de los geles se utilizaron las siguientes disoluciones:

- Disolución de SDS al 10 % (m/v)
- Disolución reguladora utilizada para la preparación del gel de concentración: Tris-HCl 0.5 M, pH 6.8.
- Disolución reguladora utilizada para la preparación del gel de separación: Tris-HCl 1.5 M, pH 8.8.
- Dilución 1:10 de la disolución reguladora empleada para correr el gel Tris/glicina/SDS.
- Disolución de persulfato amónico 10% (p/v).

Además de estas disoluciones, también se utilizaron otras comerciales que se han citado en el apartado de Reactivos, patrones y muestras: disolución de acrilamida/bisacrilamida y disolución reguladora Laemmli para la muestra.

La concentración de acrilamida/bisacrilamida en el gel de separación y en el de concentración fueron un 8 % y un 5 %, respectivamente. Las cantidades de cada disolución requeridas para la preparación de 10 mL de cada gel se indican a continuación:

	H ₂ O destilada (mL) ¹	30% acrilamida/bis (mL) ²	Tris-HCl (mL)	10% SDS (mL)
Gel de separación (8% acrilamida/bis)	4.7	2.7	2.5 ³	0.1
Gel de concentración (5% acrilamida/bis)	5.7	1.7	2.5 ⁴	0.1

¹ Agua destilada dos veces y filtrada con filtros de 0.2 µm y ultrasonicada. ² Esta disolución se añadió al final.

³ La disolución reguladora empleada en la preparación del gel de separación fue Tris-HCl 1.5 M y pH 8.8. ⁴ La disolución reguladora empleada en la preparación del gel de concentración fue Tris-HCl 0.5 M y pH 6.8

Las disoluciones se mezclaron y desgasificaron durante 15 min. A continuación, se añadió 10 µL de TEMED y 50 µL de persulfato amónico al 10% (m/v).

La disolución del gel de separación recién preparada se vertió con una pipeta pasteur hasta una altura de 6 cm en el espacio que queda entre las dos placas de vidrio colocadas una encima de la otra como un sándwich (ver Figura II. 4A) y fijadas en la pieza de color verde (Figura II. 4B). Para evitar la formación de meniscos durante la polimerización se añadió encima del gel una disolución de n-butanol saturada con agua. Tras la polimerización del gel (30 min), se decantaba la capa de n-butanol-agua. A continuación, se vierte sobre el gel de separación polimerizado la disolución del gel de concentración y con la ayuda de un peine se hacen los pocillos en el gel de concentración (Figura II. 4C). Por último, se deja que el gel polimerice durante 30 min.

Preparación y carga de la muestra, aplicación de voltaje y teñido del gel

Las fracciones recogidas por RP-HPLC de perfusión evaporadas hasta sequedad se disolvieron en 50 µL o 10 µL (cuando las bandas obtenidas eran poco intensas) de la disolución reguladora Tris/glicina/SDS y se mezclaron en una proporción 1:2 con la disolución reguladora de la muestra Laemmlí. En el caso de las proteínas patrón de Biorad no fue necesario ningún tipo de preparación. Las muestras así preparadas se depositaron en los pocillos del gel. Las cantidades de muestra depositadas estaban comprendidas entre 10 µL y 6 µL (78 - 125 µg cantidad aproximada de proteína total). El volumen depositado en cada pocillo para los patrones fue de 3 µL.

A continuación, se colocaron los geles preparados en un dispositivo como el que se muestra en las Figuras II. 4D y E. El equipo constaba de dos electrodos dorados entre los que se colocaron los geles preparados y un tanque transparente en el que se introdujeron el gel que contenía la disolución reguladora Tris/Glicina/SDS. Para correr el gel se aplicó un voltaje de 150 V entre los electrodos que producía una corriente de 50 mA (Figura II. 4F). El tiempo empleado para correr el gel fue de 45 min aproximadamente.

Para poder visualizar las bandas de las proteínas después de la electroforesis se llevó a cabo una etapa de tinción. Para ello se utilizó el reactivo azul de Coomassie

EZBlue™ que es muy sensible y permite detectar pequeñas cantidades de proteínas (hasta 5 ng). Al terminar la electroforesis, el gel se retiró de las dos placas de vidrio, se colocó en un vidrio de reloj grande y se lavó tres veces con agua destilada. A continuación, se adicionó el reactivo de tinción EZBlue™ en el vidrio de reloj hasta cubrir el gel y se incubó durante una hora aproximadamente. Con fines a eliminar el reactivo de tinción del fondo del gel y aumentar la intensidad de las bandas, el gel se dejó cubierto de agua durante toda la noche.

II.3.7 Análisis por nano-HPLC de las fracciones digeridas enzimáticamente

Las fracciones digeridas enzimáticamente se inyectaban en la columna de preconcentración utilizando la bomba de un solo canal que proporcionaba flujos altos y con la micro-válvula conectada al desecho (ver Figura II. 5). El volumen inyectado en esta etapa estaba comprendido entre 1 y 4 µL. A continuación se aplicó una etapa de lavado de 5 min con una disolución constituida por agua-ACN al 98:2 (v/v) y 0.05% (v/v) de ácido fórmico a un flujo de fase móvil de 30 µL/min. Utilizando la micro-válvula se conectó la columna de preconcentración con la columna de separación, se puso en funcionamiento la nano-bomba y se aplicó un gradiente de elución (previamente optimizado por el grupo de investigación del Prof. Wolfgang Lindner, laboratorio de Química Analítica y Química de los Alimentos, Universidad de Viena) que permitía arrastrar los péptidos concentrados en la columna de preconcentración a la columna de separación (Figura II. 5). Las fases móviles empleadas en la separación fueron: una fase móvil A de 0.1% (v/v) de ácido fórmico en agua ultrapura y una fase móvil B de 0.1% (v/v) de ácido fórmico en ACN. El gradiente empleado con la columna de separación de 50 mm de longitud fue: de 5 a 50% de B en 30 min, 50% de B durante 5 min y de 50 a 80% de B en 5 min. El gradiente utilizado con la columna de separación de 150 mm de longitud iba de 5 a 50% en 90 min y de 50 a 80% de B en 5 min. Se utilizó un flujo de fase móvil de 250 nL/min con ambas columnas.

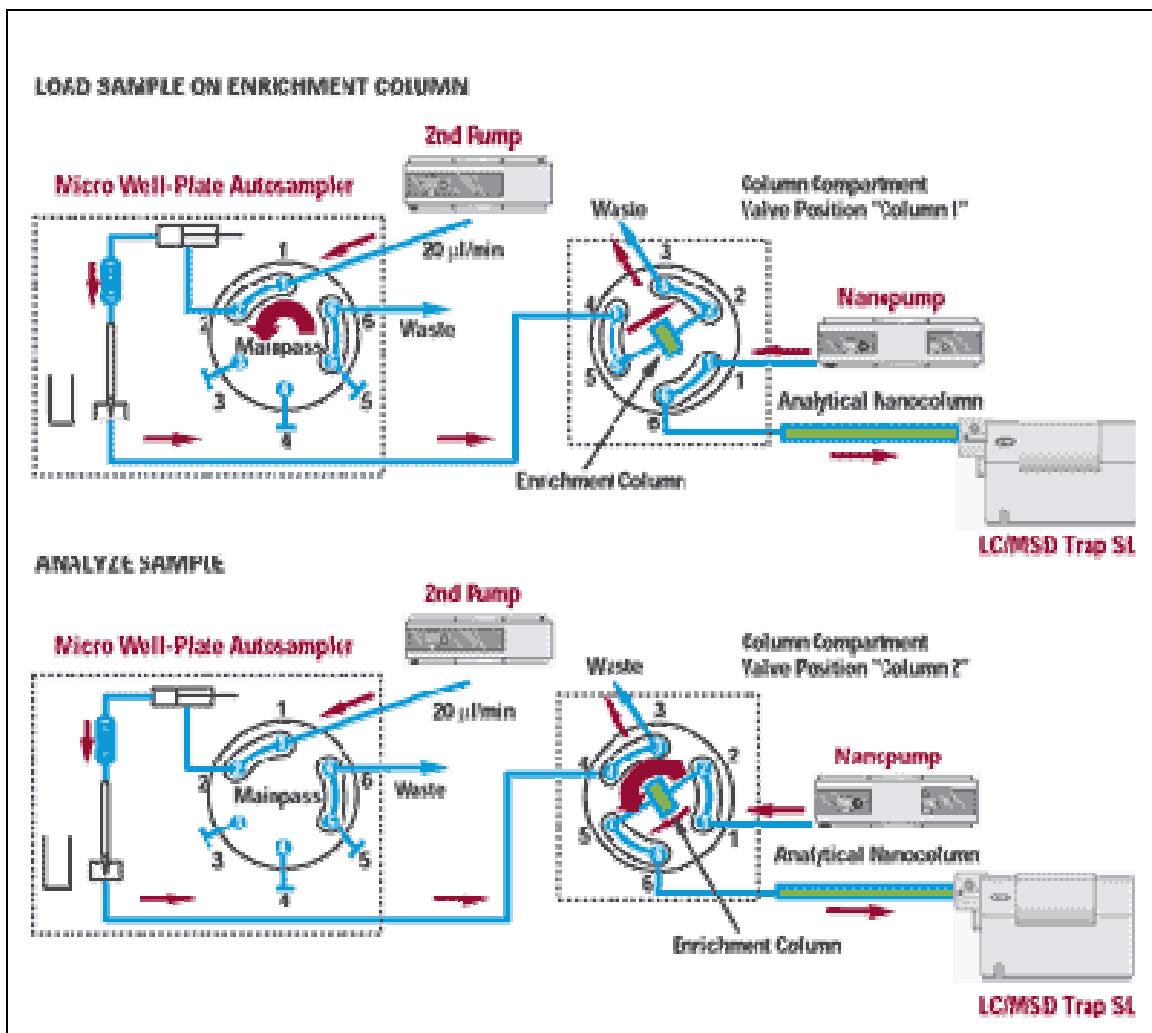


Figura II. 5. Esquema de funcionamiento del equipo de HPLC en el que se distinguen dos etapas, carga de la muestra sobre la columna de preconcentración e inyección de la muestra en la columna analítica.

II.3.8 Espectrometría de masas

Se ha utilizado la espectrometría de masas con dos fines diferentes: elucidar la identidad de las proteínas/péptidos contenidos en los picos seleccionados y previamente aislados que permitía la detección de la adición de proteínas de soja en productos cárnicos procesados (nanoLC-MS/MS) y, en segundo lugar, analizar las proteínas de soja en diferentes habas comerciales y en sus fracciones proteicas.

Para llevar a cabo el análisis por espectrometría de masas en tandem el espectrómetro de masas se configuró para adquirir un espectro de masas en el modo de barrido completo (full scan) (200 a 2000 m/z, máximo tiempo de acumulación 300 ms) seguido por un espectro de masas-masas (MS/MS) de los dos iones más abundantes desde cada espectro de masas de barrido completo en el intervalo de 400-1500 m/z. Se recogieron tres espectros MS/MS para cada ión precursor y se utilizó la exclusión dinámica durante dos minutos después de cada dos procesos de fragmentación. Los espectros de MS/MS también fueron adquiridos en el intervalo de 200-2000 m/z. Se trabajó en el modo positivo de trabajo y las condiciones empleadas fueron: potencial del capilar de la sonda ESI, 2.3 kV, flujo del gas de secado, 5 L/min y temperatura de secado, 280 °C.

Para el análisis por espectrometría de masas de las proteínas de soja contenidas en las habas y en sus fracciones se optimizaron previamente los parámetros del instrumento. Se trabajó en el modo positivo y las condiciones optimizadas fueron: el potencial de sonda ESI, el potencial de los octapolos, el potencial del *skimmer* y el potencial a la salida del capilar. Otros parámetros fueron: el flujo del gas de secado, 10 L/min y la temperatura de secado, 350 °C. Los espectros de masas obtenidos fueron procesados con el programa de deconvolución de Agilent Technologies.

II.3.9 Estudio de las características analíticas de los métodos desarrollados y validación de los mismos

La validación del método optimizado con fines a determinar proteínas de soja en productos cárnicos procesados se llevó a cabo siguiendo, en la medida de lo posible, un procedimiento normalizado de validación de métodos cuantitativos para laboratorios alimentarios. En realidad se trata de un procedimiento de validación para métodos de análisis cuantitativos de aplicación en alimentos y desarrollados como alternativa a un método de referencia. Este procedimiento fue desarrollado por Feinberg y Raguènès [197] y se realizó en el marco de la Association Française de Normalization (Afnor). El procedimiento consta de tres conjuntos de experimentos cuya finalidad es determinar las características del método propuesto (el alternativo) y verificar que los resultados concuerdan con los del método de referencia.

Bloque A: Las medidas realizadas en este bloque estaban enfocadas a caracterizar la recta de calibrado y en este bloque se sugiere la determinación de la linealidad, y los límites de detección y cuantificación.

Bloque B: las medidas realizadas en este bloque están enfocadas a la determinación de la especificidad del método y en este bloque se sugiere un estudio de la presencia de interferencias de matriz del método alternativo.

Bloque C: Las medidas realizadas en este bloque están enfocadas a la determinación de la precisión y veracidad del método y en él se sugiere la determinación de la precisión y la exactitud del método alternativo y su comparación con la del método de referencia.

En base a esto, en este trabajo se han evaluado los siguientes parámetros: linealidad, límites de detección y cuantificación, existencia de interferencias de matriz, precisión,

robustez y exactitud. La definición y modo de determinación de cada uno de estos parámetros aparecen en la Tabla II. 2.

La evaluación de la linealidad del método se llevó a cabo utilizando el método de calibrado del patrón externo. Para ello, se prepararon tres disoluciones independientes de cada patrón y se inyectó cada una por triplicado en el sistema cromatográfico. El modelo lineal fue validado mediante el análisis de los residuos y el análisis de la varianza (ANOVA) ($\alpha = 5\%$).

En la evaluación de la exactitud, se compararon los contenidos de proteínas de soja obtenidos en distintas muestras por el método optimizado con los obtenidos por el método de análisis ELISA utilizando un test-t pareado. Además, se representaron los contenidos obtenidos por el método optimizado (Y) frente a los obtenidos por el método ELISA (X) y se aplicó un test-t para comprobar que la ordenada y la pendiente no presentaban diferencias significativas respecto a 0 y 1, respectivamente [204]. Finalmente, se determinaron también los porcentajes de recuperación de las proteínas de soja en productos cárnicos suplementados.

Asimismo, también se estudió la existencia de interferencias de matriz. Para ello, se compararon las pendientes de las rectas obtenidas por el método de calibración del patrón externo y el método de calibración de adiciones patrón utilizando un test-t. También se compararon los contenidos de proteínas de soja obtenidos en distintos productos cárnicos por ambos métodos de calibración utilizando un test-t pareado [204, 205].

Tabla II.2. Definición y modo de determinación de los parámetros empleados para la validación del método desarrollado [198-203].

Parámetro	Definición	Determinación
Linealidad	El estudio de linealidad verifica que en un intervalo de concentraciones dado la respuesta del analito es directamente proporcional a la concentración.	Al menos cinco niveles de concentración que abarque el intervalo establecido en los criterios mínimos. Estas disoluciones se analizan un mínimo de tres veces (disoluciones independientes para un ANOVA de la regresión).
Límite de detección	Es la cantidad más baja de analito en una muestra que puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada como un valor exacto.	Calculado a partir de la recta de calibrado como la concentración correspondiente a una señal igual a la ordenada más tres veces el error estándar de la recta.
Límite de cuantificación	Es la cantidad más baja de analito en una muestra que puede ser determinada cuantitativamente con una precisión y exactitud adecuada.	Calculado a partir de la recta de calibrado como la concentración correspondiente a una señal igual a la ordenada más diez veces el error estándar de la recta.
Precisión	Expresa el grado de concordancia entre resultados de ensayos obtenidos independientemente bajo condiciones establecidas.	La precisión puede ser expresada en términos de repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad.
Repetibilidad	Expresa la precisión obtenida cuando se realizan múltiples medidas de una muestra por el mismo operador bajo las mismas condiciones analíticas y en un periodo corto de tiempo.	La repetibilidad se determinó a partir de diez inyecciones consecutivas de un extracto de un producto cárneo.
Precisión intermedia	Expresa variaciones dentro de un laboratorio: diferentes días, diferentes analistas, diferentes equipos, etc.	Se determinó inyectando una disolución de APS y disoluciones de extracto cárneo en diferentes días.
Robustez	Capacidad de un método para proporcionar resultados inalterados por pequeñas, pero intencionadas, variaciones en alguno de sus parámetros. Proporciona una indicación de su fiabilidad durante un uso normal. En el caso de la cromatografía líquida, ejemplos de variaciones típicas son: variación del pH en una fase móvil, variación de la composición de la fase móvil, variación de la columna (diferentes lotes y/o distribuidor), variación de la temperatura, variación del flujo, etc.	En este trabajo, la robustez se determinó utilizando dos columnas de perfusión de diferentes lotes, dos celdas de detección de volúmenes diferentes y diferentes concentraciones de la disolución reguladora empleada para la extracción de las proteínas.
Exactitud	Expresa el grado de concordancia entre el resultado del ensayo y el valor de referencia aceptado.	La exactitud se determinó de dos formas diferentes: a través de estudios de recuperación y comparando los contenidos de proteína de soja obtenidos en diferentes productos cárneos por el método optimizado de HPLC y el método de análisis ELISA.
Recuperación	Porcentaje de la concentración real de una sustancia recuperada durante el procedimiento analítico.	La recuperación se determinó adicionando a un producto cárneo procesado con calor que no contenía proteínas de soja una cantidad conocida de proteínas de soja.

II.3.10 Análisis cuantitativo de proteínas de soja en productos cárnicos

La determinación del contenido de proteínas de soja en los productos cárnicos se llevó a cabo por el método de calibrado del patrón externo en los productos de cerdo, pollo y ternera y en sus respectivas mezclas (cerdo y pollo, ternera y pavo, ternera, pavo y pollo, cerdo, pollo y pavo y cerdo, ternera, pollo y pavo) y por el método de adiciones patrón en los productos de pavo y en las mezclas de cerdo y pavo.

Debido a la ausencia de un patrón de referencia certificado para las proteínas de soja, se utilizó un aislado de proteína de soja como patrón. Tres razones apoyan la elección de este producto como patrón: es el producto de soja con mayor contenido en proteínas, está disponible comercialmente y además es el producto de soja que se adiciona mayoritariamente en la fabricación de productos cárnicos procesados con calor. A pesar de la existencia de varios tipos de aislados de proteínas de soja disponibles comercialmente, se utilizó el APS Supro 500E por ser el producto de soja que se había empleado en la fabricación de algunos de los productos utilizados (concretamente los suministrados por la empresa Campofrío Alimentación S. A.).

El calibrado por el método del patrón externo se llevó a cabo inyectando disoluciones de APS en el intervalo comprendido entre 0.1 y 6.5 mg/mL de proteínas de soja. La integración del pico cromatográfico se realizó estableciendo la línea base de valle a valle. Con el fin de obtener la recta de calibrado se representó el área (media de tres inyecciones consecutivas) del pico correspondiente a las proteínas de soja que aparecía en los extractos de los productos cárnicos en función de la concentración de APS (corregida con la pureza y humedad). El calibrado por el método de adiciones patrón se llevó a cabo inyectando extractos de los productos cárnicos comerciales (con concentraciones de muestra comprendidas entre 20 y 250 mg/mL referidos a producto inicial) suplementados con cantidades conocidas y crecientes de aislado de proteína de soja (entre 0 y 6.0 mg/mL corregida con la pureza y humedad). El contenido de proteínas de soja se determinó extrapolando la recta obtenida para cada producto a señal cero.

En todos los casos las disoluciones se inyectaron por triplicado.

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

III.1 DESARROLLO DE METODOLOGÍAS ANALÍTICAS DE HPLC DE PERFUSIÓN PARA LA DETERMINACIÓN RÁPIDA DE PROTEÍNAS DE SOJA EN PRODUCTOS CÁRNICOS

Como se ha indicado en la Introducción de esta memoria, a pesar de las interesantes propiedades nutritivas de las proteínas de soja, su adición a productos cárnicos está prohibida o limitada por la legislación por lo que se hace necesario disponer de metodologías analíticas adecuadas para el control de calidad de estos productos. Hay que indicar que el incumplimiento de estas normativas legales adulterando productos cárnicos con proteínas de soja o excediendo los límites legales establecidos puede implicar no sólo un fraude económico (las proteínas de soja tienen un menor coste que las proteínas cárnicas) sino también un perjuicio para la salud en aquellos casos en los que el individuo que las ingiere es alérgico a las proteínas de soja. En cualquier caso, la Comisión Europea ha modificado la *European Food Labelling Directive 2000/13/EC* para asegurar que todos los consumidores sean informados de todos los componentes de los alimentos. Todo ello unido a la escasez de metodologías analíticas existentes y a sus inconvenientes, nos llevaron a afrontar el reto de desarrollar nuevas metodologías analíticas rápidas, sencillas y de bajo coste para la determinación de proteínas de soja en productos cárnicos. Nuestro trabajo se centró fundamentalmente en productos cárnicos tratados con calor por su particular dificultad si bien las metodologías analíticas desarrolladas mostraron también su validez para productos cárnicos crudos.

Con el fin de conseguir nuestros objetivos, se desarrollaron metodologías analíticas que consistieron en un paso previo de preparación de muestra cuyo objetivo era extraer cuantitativamente las proteínas de soja del producto cárnico con la menor interferencia posible de las proteínas cárnicas, y la separación y determinación posterior de las proteínas de soja utilizando HPLC de perfusión con el fin de poder seleccionar uno o varios picos cromatográficos que únicamente correspondieran a proteínas de soja en tiempos de análisis lo más bajos posible.

Las condiciones de preparación de los productos cárnicos antes de su análisis por HPLC se optimizaron para distintos tipos de productos seleccionándose aquellos de mayor consumo. Aunque estas condiciones optimizadas de preparación de muestra podían variar ligeramente de unas a otras, básicamente los productos cárnicos se sometieron al siguiente tratamiento:

- eliminación de la grasa realizando una extracción con acetona tras la trituración del producto cárnicoo,
- extracción de las proteínas de soja del producto desgrasado utilizando una disolución reguladora Tris-HCl a pH 8.0 con agitación ultrasónica durante 10 min a 50 °C y centrifugación,
- inyección directa en el cromatógrafo del sobrenadante obtenido en el paso anterior.

La separación cromatográfica se realizó en un sistema de HPLC con una columna de fase inversa de perfusión. Las proteínas del extracto proteico obtenido a partir del producto cárnicoo se eluyeron de la columna cromatográfica utilizando un gradiente optimizado de composición de fase móvil lineal y binario: 5-25 % B en 0.8 min, 25-42 % B en 0.8 min, 42-50 % B en 0.6 min, y finalmente 50-5 % B en 0.5 min para reequilibrar la columna con las condiciones iniciales. Las fases móviles fueron: fase móvil A, agua con 0.05 % (v/v) de ácido trifluoroacético y fase móvil B, acetonitrilo con 0.05 % (v/v) de ácido trifluoroacético. Otras condiciones experimentales en las que se llevó a cabo la separación cromatográfica de las proteínas contenidas en el extracto fueron las siguientes: flujo de fase móvil de 3 mL/min, temperatura de 50 °C y detección UV a 280 nm (detector de diodos en fila).

En las condiciones cromatográficas indicadas fue posible seleccionar al menos un pico cromatográfico que correspondía a las proteínas de soja y que se separaba de otros picos cromatográficos en los que eluían proteínas cárnicas. En este punto, fueron muy valiosos los productos cárnicos elaborados de forma totalmente idéntica sin y con proteínas de soja añadidas en la Planta Piloto de la empresa Campofrío Alimentación y que permitieron comprobar que el pico seleccionado aparecía únicamente en los

productos elaborados con proteínas de soja y no en los que no contenían dichas proteínas. Por otra parte, también se comprobó que las proteínas lácteas no interferían tampoco con el pico “marcador” de proteínas de soja lo cual fue muy interesante ya que estas proteínas pueden adicionarse junto con las proteínas de soja en algunos productos cárnicos.

En un primer paso la pureza del pico seleccionado para las proteínas de soja se comprobó realizando el espectro de absorción UV con el detector de diodos en fila y comparándolo (así como su primera y segunda derivada) con el correspondiente al pico cromatográfico de un aislado de proteína de soja que eluía al mismo tiempo de retención. Posteriormente, se estudió el pico cromatográfico “marcador” de proteínas de soja utilizando diferentes estrategias que implicaban la utilización de detección por Espectrometría de Masas, resultados que se presentan en los siguientes apartados de la memoria.

Las metodologías analíticas desarrolladas se validaron siguiendo un procedimiento de validación estandarizado para métodos cuantitativos en laboratorios de alimentos. Los parámetros evaluados fueron: linealidad, límites de detección y cuantificación, existencia de interferencias de matriz, especificidad, precisión, robustez y exactitud. La exactitud se evaluó realizando estudios de recuperación de proteínas de soja en productos cárnicos así como comparando los resultados obtenidos para la determinación de proteínas de soja en productos cárnicos mediante el método de HPLC de perfusión desarrollado y el método ELISA de la AOAC.

Los resultados obtenidos para el desarrollo y validación de las metodologías analíticas para la determinación de proteínas de soja en productos cárnicos crudos y tratados con calor y elaborados con carnes de cerdo, de pavo, de pollo, de ternera y con mezclas de ellos que además podían contener proteínas lácteas, se recogen en los siguientes artículos científicos:

- “Simple and inexpensive method for the reliable determination of additions of soybean proteins in heat-processed meat products: an alternative to the AOAC official method”.
F. Castro-Rubio, M. C. García, R. Rodríguez, M. L. Marina.
J. Agric. & Food Chem., 53 (2005) 220-226.

- “Easy determination of the addition of soybean proteins to heat-processed meat products prepared with turkey meat or port-turkey meat blends that could also contain milk proteins”.
F. Castro-Rubio, M. L. Marina, J. Rodríguez, M. C. García.
Food Additives & Contaminants, 22 (2005) 1209-1218.

- “Determination of soybean proteins in commercial heat-processed meat products prepared with chicken, beef or complex mixtures of meats from different species”. F. Castro-Rubio, M. C. García, R. Rodríguez, J. Rodríguez, M. L. Marina.
Food Chem., 100 (2007) 468-476.

A partir de los resultados que se presentan en estos artículos científicos es posible afirmar que las metodologías analíticas desarrolladas en este trabajo de investigación mediante HPLC de perfusión en fase inversa han demostrado su validez para determinar proteínas de soja en productos cárnicos crudos y tratados con calor y elaborados con carnes de diferentes especies. Además, en aquellos productos en los que se habían adicionado proteínas lácteas, éstas no interferían. Destacar que en comparación con el método ELISA, las metodologías desarrolladas no sólo reducen los tiempos de análisis (separación cromatográfica en unos 2 min) y los costes sino también la complejidad del propio método. Además, los métodos de HPLC de perfusión permiten detectar hasta un 0.08 % (m/m) y cuantificar hasta un 0.3 % (m/m) de proteínas de soja.

La aplicación de las metodologías analíticas desarrolladas a productos cárnicos comerciales de diferente marca y adquiridos en distintos establecimientos comerciales y que habían sido sometidos a diferente tratamiento y tenían distinta composición (carnes de cerdo, pavo, pollo, ternera o mezclas de ellos) permitió poner de manifiesto que los

contenidos de proteínas de soja determinados no superaban los límites establecidos por la legislación.

Artículo científico 1

Simple and inexpensive method for the reliable determination of additions of soybean proteins in heat-processed meat products: an alternative to the AOAC official method.

F. Castro-Rubio, M. C. García, R. Rodríguez, M. L. Marina.

J. Agric. & Food Chem., 53 (2005) 220-226.

Simple and Inexpensive Method for the Reliable Determination of Additions of Soybean Proteins in Heat-Processed Meat Products: An Alternative to the AOAC Official Method

FLORENTINA CASTRO-RUBIO,[†] M^A CONCEPCIÓN GARCÍA,[†]
ROBERTO RODRÍGUEZ,[‡] AND M^A LUISA MARINA^{*,†}

Departamento de Química Analítica, Facultad de Química, Universidad de Alcalá,
28871 Alcalá de Henares, Madrid, Spain, and Campofrío Alimentación S. A.,
Pol. Ind. Gamonal-Villímar, C/La Bureba, s/n. 09007 Burgos, Spain

Despite the existence of an AOAC official method based on an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the determination of additions of soybean proteins in meat products, its use for quantitative assessment is limited. Accordingly, a simple and inexpensive method has been developed and validated in this work. The method involves defatting the meat samples with acetone, solubilization of soybean proteins in a 30 mM Tris-HCl buffer (pH 8) containing 0.5% (v/v) 2-mercaptoethanol, and the identification of two peaks from soybean proteins in the chromatogram obtained by perfusion reversed-phase chromatography and UV detection. Determination of soybean proteins by the proposed method did not suffer from matrix interferences, with a good linear correlation up to a concentration of 12.50 mg/mL soybean proteins being observed. The proposed method was proven to be specific, precise, accurate, robust, and sensitive, making possible the detection and the quantitation of additions of 0.07% (w/w) and 0.25% (w/w), respectively, of soybean proteins in meat products (related to 1 g of initial product). The method has been applied to the determination of the soybean protein content in commercial heat-processed meat products, obtaining results that were statistically similar to those obtained by the official ELISA method but with a higher reliability and simplicity and a lower cost and analysis time.

KEYWORDS: soybean proteins; meat product; perfusion chromatography; adulteration

INTRODUCTION

The addition of soybean proteins to processed meat products is a common practice (1, 2). Processed meat products normally present high fat content, and their content in meat proteins is low. Since meat proteins play an important role as emulsifiers, preventing the coalescence of fat during heating, when the lean meat content (and meat protein content) is low, the addition of foreign proteins such as soybean proteins can supply the needed emulsion power (2). On the other hand, the demands of consumers for healthier and safer products have also promoted the use of soybean proteins in processed meat products as fat replacers (3–5).

Regarding safety, regulatory agencies are aware of illegal additions of soybean proteins in meat products and, consequently, regulations establishing maximum levels of soybean proteins and controlling the accurate labeling of these products have appeared (3, 6). Obviously, the implementation of these regulations involves having an adequate methodology for monitoring the amounts of soybean protein added to processed

meat products (3, 7). Nevertheless, and despite the fact that many methods have been proposed for the identification of soybean proteins in meat products, to date, there is not a reliable one.

Methods developed for the determination of soybean proteins in meat products can be classified into two broad categories: (1) indirect methods involving the detection of substances accompanying soybean proteins such as some chemical and microscopic methods and (2) those methods focused on the examination of the protein itself. Chemical methods used in the detection of soybean proteins in meat products suffer from low specificity, and microscopic methods are effective only when the whole soybean is involved. Thus, direct methods are preferred as opposed to the indirect approaches (8).

Polyacrylamide gel electrophoresis has been the electrophoretic technique most applied for the detection of soybean proteins in processed meat products. However, these methods yield very crowded electropherograms, making it extremely difficult to detect the presence of bands originating from added soybean proteins, of minor intensity compared with bands originating from the meat proteins themselves (2, 9).

Immunochemical methods have become very popular for the detection of soybean proteins in processed meat products,

* Corresponding author.

[†] Universidad de Alcalá.

[‡] Campofrío Alimentación S. A.

offering high specificity and sensitivity. In fact, the AOAC International granted an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) as the AOAC Official Method (first action in 1988) for measuring soybean proteins in raw and heat-processed meat products (10). In this method, soybean proteins from a defatted meat product are submitted to denaturing conditions and then renaturing conditions and are finally analyzed by an inhibition mode of ELISA. In this immunoassay, soybean proteins are made to react with an appropriate antiserum in excess and the unreacted antibody is determined, after isolation, by its reaction with a second antibody conjugated with an enzyme. Capture enzyme activity is determined by adding a chromogenic substrate, yielding a product whose color intensity is measured at 405 nm (10). Despite the complexity, tediousness, and cost of this method, it continues to be applied by food control agencies in order to detect additions of soybean proteins in meat products. Furthermore, this method presents an additional limitation, since numerous factors can affect the quantitative results (9, 11, 12). In fact, the method has been considered as semiquantitative and, therefore, not reliable for the analysis of soybean proteins in meat products (10).

Chromatographic methods have also been applied for the detection of soybean proteins in meat products. Some of these methods were based on amino acid composition and sequence and others on the direct detection of the soybean proteins themselves. Chromatographic methods have been developed for the analysis of soybean proteins by the detection of certain peptides in trypsin hydrolysates. Although these methods were useful for qualitative assessment, quantitative results were not accurate. Total hydrolysis and analysis of the amino acidic pattern of soybean proteins has also been tried, although the sensitivity was very low and similarities between soybean and meat amino acidic compositions yielded interferences (2, 9). The few attempts for the direct determination of soybean proteins in meats by high-performance liquid chromatography (HPLC) have been focused on raw meats and were never applied to commercial meat products but to synthetic meat–soybean blends (13–15).

Thus, despite the efforts carried out, all the methods proposed suffered for nonreliability or were very tedious and difficult to standardize. A method capable of yielding the soybean protein content added to a heat-processed meat product with suitable accuracy, sensitivity, simplicity, and speed and at a low cost so as to fulfill quality control requirements still did not exist. Therefore, the aim of this work has been the development of a simple and inexpensive method for the reliable determination of additions of soybean proteins in heat-processed meat products. For that purpose, the ordinary analytical technique HPLC has been used with perfusion columns, enabling the drastic reduction of analysis times (16).

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Chemicals and Samples. HPLC grade acetonitrile (ACN) (Merck, Darmstadt, Germany), trifluoroacetic acid (TFA) (Sigma, St. Louis, MO), and water obtained from a Milli-Q system (Millipore, Bedford, MA) were used in the preparation of mobile phases. Tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris), 2-mercaptoethanol, and urea from Merck (Darmstadt, Germany), dithiothreitol from ICN (Aurora, OH), sodium dodecyl sulfate (SDS) from Fluka (Barcelona, Spain), and sodium hydrogen carbonate and sodium hydrogen phosphate from Panreac (Barcelona, Spain) were used for the solubilization of proteins. Hexane and acetone (Merck, Darmstadt, Germany) and ethanol and petroleum ether (Panreac, Barcelona, Spain) were employed for fat extraction. Thirty commercial heat-processed meat products (chopped pork meats) containing pork meat, water, soybean proteins, and additives (meat

products A–M), that were purchased in local markets in Madrid, Spain, or supplied by a meat company (Campofrío Alimentación S. A., Spain), were used. Moreover, model meat products with the same composition as the previous processed meats but without soybean proteins (model meat product 1) and with the same composition as the previous processed meats (including soybean proteins) but not submitted to any heat processing (model meat product 2) were also supplied by the meat company. All meat products were defatted before their analysis by the following procedure: 10 g of meat was ground with an automatic miller, homogenized with 25 mL of acetone in an Ultraturrax mixer (3 min), submitted to agitation for 15 min, and centrifuged (3362 g, 30 min, 25 °C). The supernatant was removed, and the pellet was extracted again with another 25 mL of acetone following the same procedure. Finally, the pellet was dried overnight at 60 °C to remove the remaining acetone. Meat solutions with concentrations ranging from 70 to 190 mg/mL (related to initial product) from meat products containing 1–2% (w/w) soybean proteins were used in this work. These solutions were prepared by weighing the appropriate amount of the defatted and dried meat product (0.3–0.7 g), solubilizing it in 30 mM Tris–HCl buffer (pH 8) containing 0.5% (v/v) 2-mercaptoethanol with ultrasonic agitation for 10 min at 50 °C, and centrifuging it at 3362g for 20 min to inject the supernatant in the chromatographic system. The soybean protein content in meat samples was also determined by the ELISA procedure described in the AOAC method 988.10 (10). The soybean protein isolate (SPI) Supro 500E (Anvisa, Madrid, Spain) was used as the standard of soybean proteins. Its protein content, determined by Kjeldahl analysis (six replicates), was 90.93% (relative standard deviation (RSD), 0.73%). The dry matter content of the SPI was determined by drying at 130 °C to constant weight. The protocol for preparing standard solutions consisted of weighing and dissolving the standard in 30 mM Tris–HCl buffer (pH 8) containing 0.5% (v/v) 2-mercaptoethanol, sonicating for 5 min, and centrifuging at 3362g for 10 min.

High-Performance Liquid Chromatography. A Hewlett-Packard 1100 Series liquid chromatograph (Hewlett-Packard, Pittsburgh, PA) equipped with a diode array detector was used. The injected volume was 20 µL, and the detection was performed at 280 nm. The separation was accomplished with a POROS R2/H column (50 × 4.6 mm i.d.) from Perseptive Biosystems (Framingham, MA) packed with 10 µm diameter polystyrene divinylbenzene beads. The reversed-phase HPLC (RP-HPLC) method consisted of a linear binary gradient in three steps: 5–25% B in 0.8 min, 25–42% B in 0.8 min, 42–50% B in 0.6 min, and finally 50–5% B in 0.5 min to equilibrate the column to initial conditions between runs. The flow rate was 3 mL/min, and the temperature was 50 °C. The mobile phases were the following: phase A, 0.05% TFA (v/v) in Milli-Q water; phase B, 0.05% TFA (v/v) in ACN. The organic modifier was filtered through 0.45 µm nylon filters before use.

Calibration. Calibration was performed by the external standard and standard additions methods. Calibration by the external standard method was performed by injecting (seven) SPI solutions over the range 0.5–6.0 mg/mL. Integration was carried out by setting the baseline from valley to valley, and the average of the area corresponding to three consecutive injections was calculated. The soybean protein content in heat-processed meat products was determined by interpolation of the area of the peaks corresponding to soybean proteins in the calibration curve. Meat solutions were prepared (see the Chemicals and Samples section) by taking into account that the signal was interpolated in the middle part (less error) of the calibration plot. Calibration by the standard additions method was performed by injecting extracts of the meat products spiked with known and increasing amounts of the SPI (five standard solutions in the range 0–5.0 mg/mL).

Data Treatment. The peak area corresponding to soybean proteins was plotted against the injected concentrations. The linearity in this relationship was obtained by least-squares regression analysis. The linear model was validated by means of the analysis of residuals and variance when three replicates of every standard were injected by triplicate.

RESULTS AND DISCUSSION

The development of a method for the determination of soybean proteins added to processed meat products involves

distinguishing these proteins from the meat proteins. This is not expected to be an easy task, since the samples under study are very complex (insoluble mixture of denatured cross-linked proteins and other components), the soybean proteins are present in a minor proportion compared to the meat proteins, and the soybean proteins could become altered during the processing of these meat products. Taking into account these premises, the proposal of this work was to develop a chromatographic method enabling the separation of soybean proteins from the rest of meat components from a meat extract. For that purpose, denaturing conditions were used for both the preparation of meat extracts and the chromatographic separation in order to have soybean proteins in the same random-coil conformation.

Chromatographic Separation. The knowledge accumulated by our research team in the determination of soybean proteins in foodstuffs helped to establish some initial separation conditions for the determination of soybean proteins in heat-processed meat products. Thus, the separation of soybean proteins from meat components was first tried with a previously optimized gradient used to separate soybean proteins: 5–25% B in 1.7 min (11.8%/min) and 25–45% B in 1.3 min (18%/min).¹⁷ For that purpose, proteic extracts prepared from a heat-processed meat product (processed meat product M) containing the SPI and an identical meat product without the SPI (model meat product 1) were employed. The extraction conditions initially applied were selected from the information obtained in a previous bibliographic review.² The preparation of the sample solution consisted of (i) fat extraction with acetone followed by (ii) protein solubilization with a Tris–HCl buffer (pH 9) in a thermostated bath at 60 °C for 30 min and centrifugation at 3362g for 30 min. Although the initial gradient conditions did not enable the separation of soybean proteins in the heat-processed meat product, they were quite useful for the selection of the final gradient conditions. Thus, the gradient was modified by decreasing the gradient range and among the different gradients attempted, that from 5 to 25% B in 0.8 min, from 25 to 42% B in 0.8 min, and from 42 to 50% B in 0.6 min, followed by a linear gradient from 50 to 5% B in 0.5 min was chosen. The chromatograms obtained when applying this gradient to extracts obtained from heat-processed meat products with and without the SPI and from the SPI itself are shown in **Figure 1**. The chromatograms corresponding to meat products with and without the SPI were clearly different in two peaks at approximately 1.7 and 2 min. These two peaks appeared at retention times identical to the last two peaks of the SPI. When the UV spectra and first and second derivatives obtained for these two peaks in the SPI and the meat product containing the SPI were compared, it was observed that only those corresponding to the peak at 1.7 min in the meat product containing the SPI and the SPI were identical.

The effect of the variation of other parameters such as the percentage of TFA in the mobile phase (0.025–0.2% (v/v)) and the detection wavelength (254 and 280 nm) was also studied, with no significant improvement being observed in the sensitivity of the method when trying values different from the initially selected ones (0.05% (v/v) TFA and 280 nm) (results not shown).

Sample Preparation Optimization. The initial conditions used for the preparation of the sample were modified in order to increase the sensitivity of the method. For that purpose, different media (buffers at different pHs and concentrations or containing denaturing agents) for protein solubilization, different protein extraction conditions (extraction time, temperature, and number of extractions), and different fat extraction conditions

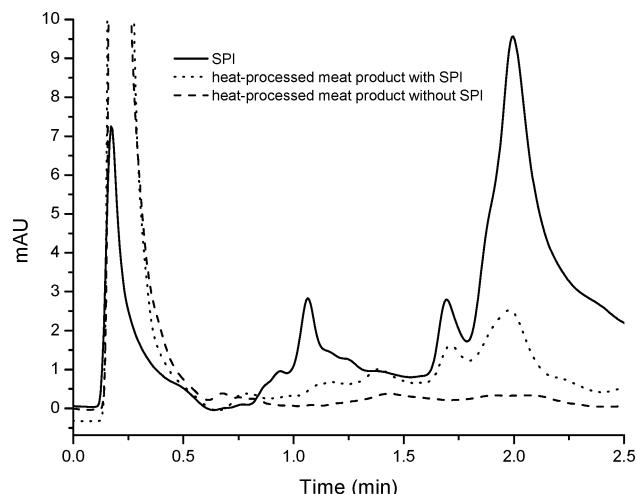


Figure 1. Chromatograms corresponding to a heat-processed meat product containing the SPI, a heat-processed meat product without the SPI, and the SPI itself. Chromatographic conditions: temperature, 50 °C; flow rate, 3 mL/min; gradient, 5–25% B in 0.8 min, 25–42% B in 0.8 min, 42–50% B in 0.6 min, and 50–5% B in 0.5 min; mobile phases, (phase A) 0.05% (v/v) TFA in water and (phase B) 0.05% (v/v) TFA in ACN; injected volume, 20 μL; detection, 280 nm. Sample preparation: fat extraction with acetone followed by protein solubilization in 50 mM Tris–HCl buffer (pH 9) for 30 min.

Table 1. Relative Response (%) of Soybean Proteins with the Proposed Method When Using Different Media for Protein Solubilization

solvent	pH	concн (mM)	relative response ^a (%)
Milli-Q water	6.4		3.6
phosphate buffer	7.0	50	22.1
Tris–HCl buffer	8.0	50	26.0
Tris–HCl buffer	9.0	50	22.1
bicarbonate buffer	10.0	50	22.1
bicarbonate buffer	11.0	50	10.3
Tris–HCl buffer + 8 M urea	8.0	50	
Tris–HCl buffer + 0.5% SDS	8.0	50	
Tris–HCl buffer + 0.1% dithiothreitol	8.0	50	33.5
Tris–HCl buffer + 0.1% 2-mercaptoethanol	8.0	50	33.2
Tris–HCl buffer + 0.5% 2-mercaptoethanol	8.0	50	50.2
Tris–HCl buffer + 1% 2-mercaptoethanol	8.0	50	46.8
Tris–HCl buffer + 0.5% 2-mercaptopethanol	8.0	10	90.6
Tris–HCl buffer + 0.5% 2-mercaptopethanol	8.0	20	97.6
Tris–HCl buffer + 0.5% 2-mercaptopethanol	8.0	30	100.0
Tris–HCl buffer + 0.5% 2-mercaptopethanol	8.0	40	94.6
Tris–HCl buffer + 0.5% 2-mercaptopethanol	8.0	100	54.4

^a Determined as the ratio (area of the peak at 1.7 min/concentration of processed meat product) expressed as the percentage related to the highest value of this parameter.

(the solvent used and number of extractions) were tried when using one heat-processed meat product containing the SPI and one heat-processed meat product without the SPI (model meat product 1) for control purposes. Different media for protein solubilization with pHs ranging from 6.4 to 11.0 were tried. The relative responses (%) of soybean proteins when using these media for protein solubilization are grouped in **Table 1**. Relative responses were calculated as the ratio (area of the peak at 1.7 min/concentration of processed meat product) expressed as the percentage related to the highest value of this parameter. The highest response was observed when solubilizing proteins at pH 8 with a Tris–HCl buffer. Using this buffer, the effect of the addition of different denaturing agents (urea, SDS, dithio-

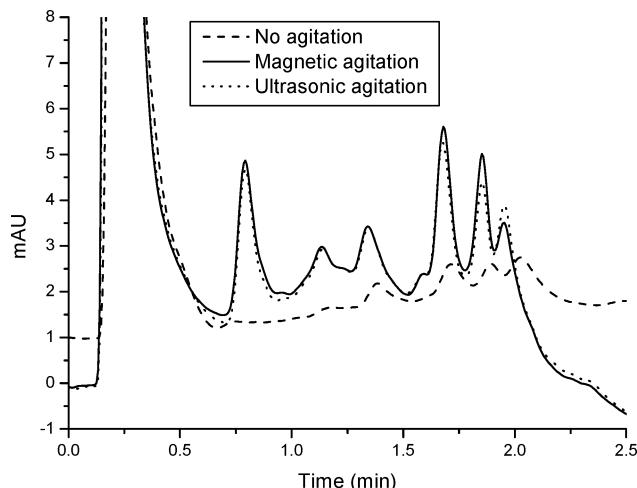


Figure 2. Chromatograms corresponding to a heat-processed meat product when not using agitation and when using magnetic or ultrasonic agitation for protein solubilization for 10 min. The chromatographic conditions are the same as those in **Figure 1**. Sample preparation: fat extraction with acetone followed by protein solubilization in 30 mM Tris-HCl buffer (pH 8) containing 0.5% (v/v) 2-mercaptoethanol.

threitol, and 2-mercaptoethanol) at concentrations normally used was studied. Regarding urea and SDS, the calculation of the relative response was not possible, since the peak of interest overlapped with the peak at 2 min. Dithiothreitol and 2-mercaptoethanol enabled an increase in the area of the peak at 1.7 min in comparison with the area obtained without these agents (26.0). Moreover, it was also observed that the peak at 2 min defolded when using these agents. Three different concentrations of 2-mercaptoethanol were also tried; it was observed that the increase in the concentration of this agent enabled a significant improvement in peak area. Other experiments using combinations of denaturing agents were also performed, although no increase in peak area was observed (results not shown). Finally, the concentration of the buffer itself was modified from 10 to 100 mM, observing that concentrations higher than 30 mM presented a negative effect on the area of the peak of interest. From these studies, a 30 mM Tris-HCl buffer (pH 8) with 0.5% (v/v) 2-mercaptoethanol was chosen for the solubilization of soybean proteins in heat-processed meat products.

The solubilization conditions were also optimized to get a further increase in sensitivity. As observed in **Figure 2**, the use of magnetic agitation or ultrasonication for the solubilization of soybean proteins allowed a significant increase in peak area as well as the appearance of a tiny peak close to the peak at 1.7 min, both in standard and sample solutions, that was also taken into account from now in the determination of the soybean protein content. Extractions for more than 10 min and temperatures higher than 50 °C did not result in an increase in protein extraction percentages, as observed in **Figures 3** and **4**, respectively. Finally, successive extractions of soybean proteins with the optimized conditions were also tried, but better results than those obtained with just one extraction were not observed.

Fat extraction solvents different from acetone were tried (hexane, petroleum ether, and ethanol), and the results are compared in **Figure 5** with those obtained with acetone. Acetone was the solvent yielding the highest peak area. Moreover, extracting more than twice with acetone did not result in a significant increase in responses.

Method Validation. Once the suitability of the method for the detection of soybean proteins in heat-processed meat products was proven, the method was validated for its applica-

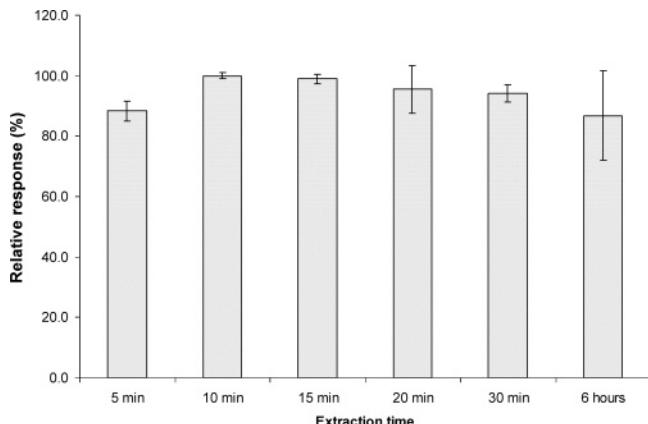


Figure 3. Effect of the extraction time used for the solubilization of soybean proteins on the relative response of soybean proteins determined as the ratio (area/concentration of processed meat product). The chromatographic and sample preparation conditions are the same as those in **Figure 2**.

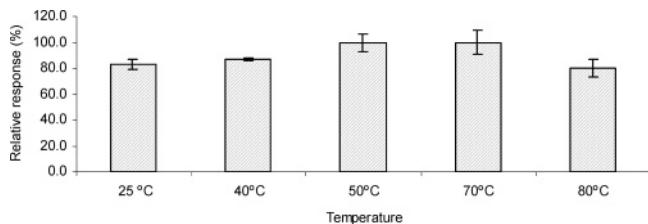


Figure 4. Influence of the temperature used for the solubilization of soybean proteins on the relative response of soybean proteins determined as the ratio (area/concentration of processed meat product). The chromatographic and sample preparation conditions are the same as those in **Figure 2**.

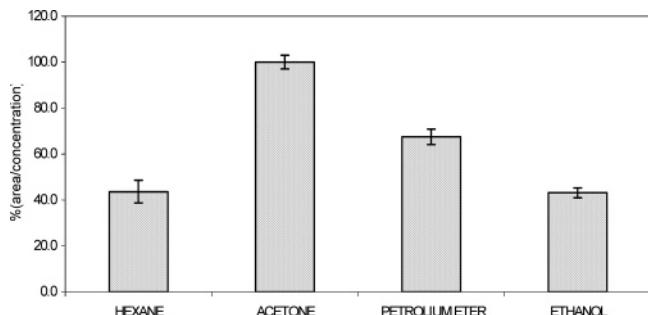


Figure 5. Relative response of soybean proteins determined as the ratio (area/concentration of processed meat product) obtained when using different solvents for fat extraction. The chromatographic conditions and the rest of the sample preparation conditions are the same as those in **Figure 2**.

tion as a quality control method. For that purpose, the SPI Supro 500E was used as the standard of soybean proteins. Method validation was mainly performed following a standardized validation procedure for quantitative methods for food chemistry laboratories (18). The parameters evaluated were the linearity of the calibration plot, detection and quantitation limits, presence of matrix interferences, specificity, precision, robustness, and accuracy. **Table 2** groups the results obtained in the determination of all of these parameters.

Good linear correlation ($r^2 > 0.99$) was observed between the signal and the concentration of soybean proteins up to 12.50 mg/mL soybean proteins. Moreover, the linear model was successfully validated in the working concentration range (0.50–6.0 mg/mL) by means of the analysis of residuals and variance (p -value, 0.28 ($P < 0.05$)) (19). The lowest concentration of

Table 2. Characteristics of the Perfusion RP-HPLC Method for the Analysis of Soybean Protein in Processed Meat Products

linear concentration range	up to 12.50 mg/mL
detection limit	0.20 mg/mL (0.07% (w/w)) ^a
quantitation limit	0.68 mg/mL (0.25% (w/w)) ^a
existence of matrix interferences ^b	
slope by the external standard method	8.09 ± 0.08 (<i>n</i> = 7)
slope by the standard additions method	8.04 ± 0.36 (<i>n</i> = 5)
specificity ^c	$y = 0.924(0.093)x + 0.057(0.156)$
repeatability ^d (RSD, %) (<i>n</i> = 10)	
retention time	0.16
peak area	3.95
intermediate precision ^e (RSD, %) (<i>n</i> = 7)	
retention time	sample ^f 0.61
peak area	standard ^g 0.26 4.74
concentration	10.76
slope	0.93
internal reproducibility ^h (RSD, %) (<i>n</i> = 4)	
retention time	1.79
peak area	4.49
robustness ⁱ	
column lot	conventional parameters 1.07 ± 0.14 (<i>n</i> = 7)
buffer concentration	1.07 ± 0.14 (<i>n</i> = 7)
detection wavelength	1.14 ± 0.12 (<i>n</i> = 7)
recovery ^j (%)	heat-processed meat 91.6 ± 4.6
0.90 mg/mL soybean proteins	97.4 ± 4.4
1.65 mg/mL soybean proteins	98.0 ± 1.9
2.53 mg/mL soybean proteins	98.4 ± 2.4
absolute recovery ^k (%)	raw meat 93.8 ± 3.2
processed meat spiked with 2.04% soybean proteins	92.4 ± 3.6
	94.1 ± 1.4
	92.4 ± 1.2

^a Limits of detection and quantitation expressed as w/w units were determined relative to 1 g of sample. ^b An *F*-test for the comparison of variances and *t*-test for the comparison of slopes were employed. ^c The *t*-tests for the verification of slope and intercept were statistically equal to the unit and zero, respectively. The standard deviations of the slope and intercept are given in parentheses. ^d Number of injections of a solution of 190 mg/mL heat-processed meat product. ^e Analysis performed by the external standard method in 7 different days in a period of 12 days. ^f Injection of a solution of 70 mg/mL heat-processed meat product. ^g Injection of a 3.33 mg/mL SPI solution. ^h Analysis of four individual samples of 120 mg/mL heat-processed meat product in the same day. ⁱ Concentration of soybean proteins determined when varying the column lot, buffer concentration (30 and 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8)), or detection wavelength (280 and 254 nm). ^j Recovery of soybean proteins when different amounts of the SPI were added to the extract obtained from a heat-processed meat product. ^k Recovery of soybean proteins when different amounts of the SPI were initially added to heat-processed meat products.

soybean proteins detected by this method was 0.20 mg/mL (calculated from the calibration plot as the concentration corresponding to a signal equal to the intercept plus 3 times the standard error) which means that the method enabled the detection of an addition of 0.07% (w/w) soybean proteins in a meat product (related to 1 g of initial product). The lowest concentration of soybean proteins that could be reliably determined by the proposed method was 0.68 mg/mL (calculated as the concentration corresponding to a signal equal to the intercept plus 10 times the standard error of the calibration plot) and corresponded to an addition of 0.25% (w/w) soybean proteins in a meat product (related to 1 g of initial product). Moreover, the slopes of the calibration plots obtained by the external and standard additions calibration methods were compared in order to detect the existence of matrix interferences. The comparison of these slopes by *t*- and *F*-tests (*P* < 0.05) (17) suggested the proposed method did not suffer from matrix interferences. For control of the specificity of the analytical method, 10 processed meat products were used. For each sample, one standard addition covering the range from 2.00 to 4.00 mg/mL was made. The specificity was verified by adjusting a straight line between added and recovered concentrations of soybean proteins in these samples. The specificity of the method was considered acceptable, since the slope and the intercept did not significantly differ from the unit and zero (*t*-test, *P* < 0.05), respectively.

The precision of the method was determined by the evaluation of repeatability, intermediate precision, and internal reproducibility (Table 2). The repeatability (expressed as the relative standard deviation (RSD, %)) in 10 consecutive injections of a

solution obtained from a heat-processed meat product was better than 4.0% in peak area and retention time. Intermediate precision was determined by injecting one meat solution and one standard solution in 7 days during a period of 12 days, and a RSD better than 5% in peak area and retention time for both samples was observed. In the case of the meat solution, the variability in the soybean protein content determined seven times in a 12-day period was 10.76%. Another parameter evaluated was the slope reproducibility, yielding a RSD lower than 1% in 12 days. Internal reproducibility was determined by the injection of four individual solutions of a heat-processed meat product and was better than 5% in peak area and retention time.

The robustness of the method was evaluated by the deliberated and systematic variation of three method parameters: column lot, buffer concentration (30 and 50 mM Tris-HCl buffer), and detection wavelength (254 and 280 nm). Since the soybean protein contents determined for one processed meat product when varying these parameters did not differ significantly (*F*- and *t*-tests (*P* < 0.05)) from the values observed with the optimized conditions, the method was supposed to be robust enough for its utilization as a routine method for the quality control of meat products.

The accuracy of the method was determined in two different ways: by spiking meat extracts or the meat product directly with known amounts of the SPI (absolute recovery) or by comparing the soybean protein content determined by the HPLC method with that obtained by the official method of analysis (10). The recoveries of soybean proteins when extracts obtained from a heat-processed meat product containing soybean proteins were spiked at different levels with the SPI ranged from 97 to

Table 3. Soybean Protein Content Determined in Five Meat Products by the Official ELISA Method and the Proposed HPLC Method

meat product	protein concn ^a (mg/100 mg of sample)	
	ELISA ^b	perfusion HPLC ^c
meat product A ^d	1.04	1.10 (0.20) ^e
meat product B ^d	1.67	1.67 (0.22) ^e
model meat product 2 ^f	1.44	1.15
meat product C ^d	1.80	1.42 (0.06) ^e
meat product D ^d	0.85	0.96 (0.11) ^e

^a Results expressed as is basis. ^b Determined following the official AOAC method 998.10.¹⁰ ^c Determined by the external standard calibration method following the proposed method. ^d Heat-processed meat products. ^e Mean of two individual determinations. Standard deviation given in parentheses. ^f Raw meat product. One determination.

Table 4. Soybean Protein Content Determined in Different Commercial Heat-Processed Meat Products by the Perfusion HPLC Method

processed meat product	protein concn ^a (mg/100 mg of sample)
A	1.10
B	1.67
C	1.42
D	0.96
E	1.60
F	1.46
G	1.71
H	1.67
I	1.33
J	1.85
K	1.30
L	1.73
M	1.14

^a Results expressed as is basis.

99% with the exception of the smallest addition in which case a recovery of 91.6% was observed. These recoveries were compared with those obtained with a meat product (model meat product 2) not submitted to any heat treatment, with similar recoveries (92–95%) being observed. These results suggested that the reliability of the proposed analytical method seemed not to be affected by the heating process to which the meat product was submitted. Absolute recovery, obtained when one heat-processed meat product not containing soybean proteins was initially spiked with the SPI, was also close to 100%. For the comparison of the proposed method with the official ELISA method (10), four commercial heat-processed meat products (meat products A–D) and one raw meat product (model meat product 2) were analyzed by both methods, and the results obtained are shown in **Table 3**. No statistical difference between the contents determined by both methods were detected when applying a paired *t*-test (*P* < 0.05).

Application to Edible Samples. The optimized method has proven successful in the determination of soybean proteins in heat-processed meat products, which is useful for controlling these samples' full legal limitations and also to prevent potential frauds. Thus, the method described has been applied to the determination of the soybean protein content in 30 heat-processed meat products commercially available in Spanish markets by injecting extracts obtained from these samples into the chromatographic system. The concentration of soybean proteins was calculated by interpolating in calibration plots obtained by the external standard method using the SPI Supro 500E as the standard of soybean proteins. As observed in **Table 4**, these contents were below the maximum allowance by the

Spanish regulations, 3% soybean proteins in the meat product as is basis (6).

A final comment from the results obtained can also be extracted. One difficulty found when developing a method of these characteristics is the election of a suitable standard. Unfortunately, there is not any certified reference material for the determination of soybean proteins in meat products and all optimization and validation results shown in this work have been obtained when using a commercial SPI (Supro 500E from Anvisa, Madrid, Spain) as the soybean protein standard. As stated in the Experimental Procedures, this SPI had been employed in the elaboration of some of the meat products used in this work but the rest of the commercial meat products studied were prepared with an unknown SPI. The results obtained in this work indicated no difference between the contents obtained for processed meat products prepared with the SPI Supro 500E and the others, concluding that the method enabled the determination of the soybean protein content even when the SPI used in the elaboration of the meat product was unknown. This supposed an additional advantage of the proposed method regarding the official ELISA method in which case the relative responses of the immunoassay varied depending on the soybean protein source used (9, 12).

Conclusions. An alternative to the official ELISA method for the determination of soybean proteins in commercial heat-processed meat products has been developed. The proposed method involved the preparation of an extract from the processed meat product and its injection in a chromatographic system. In comparison with the AOAC method, this method not only enabled a significant reduction in analysis time and price but also the complexity of the process itself was reduced. The proposed method has been validated following a standardized procedure for food chemistry laboratories. The method enabled the detection of up to 0.07% (w/w) soybean proteins and the quantitation of up to 0.25% (w/w) soybean proteins in meat products, which is more sensitive than the official method. Method specificity has been successfully proven. The precision of the method was also evaluated, with reproducible results being observed when varying analysis time and sample solution. The results obtained when varying different parameters of the method (column lot, buffer concentration, and detection wavelength) enabled us to ensure the robustness of the method. The trueness of the method was verified when spiking meat products, with recoveries close to 100% being observed. When comparing the soybean protein content in different meat products obtained by the proposed and official methods, no significant differences were found. All these results suggested that the proposed method provided a convenient alternative for the quantitative estimation of soybean proteins in food products.

LITERATURE CITED

- Pearson, A. M.; Gillett, T. A. *Processed Meats*; Chapman & Hall: New York, 1996; pp 210–241.
- Belloque, J.; García, M. C.; Torre, M.; Marina, M. L. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2002**, *42*, 507–532.
- Pearson, A. M.; Dutson, T. R., Eds. *Production and Processing of Healthy Meat, Poultry and Fish Products*; Chapman & Hall: London, 1997.
- Pietrasik, Z.; Duda, Z. *Meat Sci.* **2000**, *56*, 181–188.
- Keeton, J. T. *Meat Sci.* **1994**, *36*, 261–276.
- Legislación Alimentaria de Aplicación en España (Clasificación por Alimentos). Carne, aves, caza y derivados: norma genérica de calidad para productos cárnicos tratados por el calor; Eypasa: Madrid, 2002.

- (7) Endres, J. G. *Soy protein products. Characteristics, Nutritional Aspects and Utilization*; AOAC Press and the Soy Protein Council: Champaign, IL, 2001.
- (8) Olsman, W. *J. J. Am. Oil Chem. Soc.* **1979**, *56*, 285–287.
- (9) Hitchcock, C. H. S.; Bailey, F. J.; Crimes, A. A.; Dean, D. A. G.; Davis, P. *J. J. Sci. Food Agric.* **1981**, *32*, 157–165.
- (10) AOAC Official Method 998.10, Soy protein in raw and heat processed meat products, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, Official Methods of Analysis, 16th ed., Rev. 1996, 1997, 1998; AOAC International: Gaithersburg, MD.
- (11) Olsman, W. J.; Dobbelaero, S.; Hitchcock, C. H. S. *J. Sci. Food Agric.* **1985**, *36*, 499–507.
- (12) Griffith, N. M.; Billington, M. J.; Crimes, A. A.; Hitchcock, C. H. S. *J. Sci. Food Agric.* **1984**, *35*, 1255–1260.
- (13) Flaherty, B. *Chem. Ind.* **1975**, *12*, 495–497.
- (14) Parris, N.; Gillespie, P. J. In *Methods for Protein Analysis*; Chemy, J. P., Barford, R. A., Eds.; Am. Oil Chem. Soc.: Champaign, IL, 1988; pp 142–155.
- (15) Ashoor, S. H.; Stiles, P. G. *J. Chromatogr.* **1987**, *393*, 321–328.
- (16) García, M. C.; Marina, M. L.; Torre, M. *J. Chromatogr., A* **2000**, *880*, 169–187.
- (17) García, M. C.; Torre, M.; Marina, M. L. *J. Chromatogr. Sci.* **1998**, *36*, 527–534.
- (18) Feinberg, M.; Raguènès, N. *Anal. Chim. Acta* **1999**, *391*, 239–252.
- (19) Miller, J. N.; Miller, J. C. *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*; Pearson Education: Essex, U.K., 2000.

Received for review March 17, 2004. Revised manuscript received October 28, 2004. Accepted November 9, 2004. This research has been supported by the Comunidad Autónoma de Madrid (Spain) (project 07G/0025/2003) and the Ministerio de Ciencia y Tecnología (Spain) (project FIT-060000-2002-37, Programa de Fomento de la Investigación Técnica (PROFIT)). PROFIT project has been developed in collaboration with Campofrío Alimentación S. A. (Spain). F.C.-R. also thanks the Ministerio de Educación, Cultura y Deporte (Spain) for a grant.

JF049557E

Artículo científico 2

Easy determination of the addition of soybean proteins to heat-processed meat products prepared with turkey meat or pork-turkey meat blends that could also contain milk proteins.

F. Castro-Rubio, M. L. Marina, J. Rodríguez, M. C. García.

Food Additives & Contaminants, 22(2005) 1209-1218.

Easy determination of the addition of soybean proteins to heat-processed meat products prepared with turkey meat or pork–turkey meat blends that could also contain milk proteins

F. CASTRO¹, M. L. MARINA¹, J. RODRÍGUEZ², & M. C. GARCÍA¹

¹Facultad de Química, Departamento de Química Analítica, Universidad de Alcalá, E-28871 Alcalá de Henares, Madrid, Spain and ²Campofrío Alimentación, S. A., Pol. Ind. Gamonal-Villímar, C/La Bureba, s/n. E-09007 Burgos, Spain

(Received 18 April 2005; revised 8 June 2005; accepted 12 June 2005)

Abstract

The addition of non-meat proteins to processed meat products is limited by regulations. Therefore, this work has investigated the determination of added soybean proteins in commercial heat-processed meat products prepared with turkey meat or pork–turkey meat blends that could also contain milk proteins. The method consisted of extracting proteins from the meat products in a Tris-HCl buffer (pH 8) and analysing the extract by high-performance liquid chromatography with a linear gradient water–acetonitrile containing 0.05% (v/v) TFA. This method enabled the detection and quantitation of up to 0.08 and 0.28% (w/w), respectively, of soybean proteins (related to 6 g initial product) in these products. Satisfactory precision and recovery data were established. Accuracy was evaluated by a comparison of soybean protein contents determined by the proposed method and the existing AOAC official method based on an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) from which no statistically significant differences were observed.

Keywords: Soybean proteins, meat products, perfusion chromatography, turkey meat, milk proteins, adulteration

Introduction

The addition of foreign proteins such as milk and soybean proteins to meat products is a common practice. In fact, heat-processed meat products are meat emulsions prepared from a coarse and viscous dispersion of fat and proteins in water, which after heating is transformed into a gel filled with fat particles. In this process, meat proteins play an important role as emulsifiers to prevent the coalescence of fat. Nevertheless, not all meats have the same composition, and when meats with low protein content (e.g. offals) are used to prepare meat products, non-meat proteins are added to prevent the coalescence of fat during heating (Pearson and Gillett 1996; Yusof and Babji 1996).

Dietary health concerns and consumer demands for reduced-fat products have prompted meat companies to develop low-fat meat products (Chin et al. 1999). Fat provides succulence, texture and flavour to meat products that are altered when fat is

removed (Pietrasik and Duda 2000). In these cases, the addition of non-meat proteins (e.g. milk and/or soybean proteins) to meat systems enables a reduction of the fat content yet keeping the physical properties of the meat products unaltered (Keeton 1994; Shand 1997).

Nevertheless, the addition of soybean and milk proteins to meat products is regulated since they pose potential risk for allergic individuals. Moreover, the European Commission has amended The European Food Labelling Directive 2000/13/EC to ensure all consumers are informed of the complete contents of foodstuffs (Poms et al. 2004).

In order to ensure that a meat product is within the legal limitations and prevent potential frauds, different analytical methods for the determination of soybean proteins in meat products have been developed. Most of these methods are based on electrophoretic, immunochemical or chromatographic techniques. Nevertheless, none of these

methods can completely satisfy the required needs. The main problem appearing when using electrophoretic methods is the presence of interferences due to other components of the meat product. Moreover, although under a qualitative scope these electrophoretic methods could be useful, an absolute measurement from soybean bands is very difficult, especially at low concentrations. Furthermore, although reliable quantitation of soybean proteins has been achieved in fresh meats, the technique failed when it was applied to heated meat products (Belloque et al. 2002).

Regarding immunochemical methods, an inhibition mode of ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) has been adopted by AOAC International for the determination of soybean proteins in raw and heat-processed meat products (since 1988). This method is commonly used in food laboratories and is based on a very tedious and time-consuming assay. In this method, soybean proteins from a defatted meat product are submitted to denaturing conditions, renatured conditions and, finally, analysed by an inhibition mode of ELISA. In this immunoassay, soybean proteins are made to react with an appropriate antiserum in excess and the unreacted antibody is determined, after isolation, by its reaction with a second antibody conjugated with an enzyme. Capture enzyme activity is determined by adding a chromogenic substrate yielding a product whose colour intensity is measured at 405 nm. In addition to its tediousness, cost, and complexity, the method has been considered as semiquantitative (AOAC Official Method 998.10, 1996, 1997, 1998).

High-performance liquid chromatography (HPLC) has also been applied for soybean and meat proteins separation being reversed-phase and anion-exchange the chromatographic modes most used for this purpose. Nevertheless, none of these methods enabled the clear separation of soybean proteins and the quantitation assessment was not possible. Furthermore, these methods were used with samples synthetically prepared by adding soybean proteins to raw meats and they have never been applied to commercial meat products or heated meats (Ashoor and Stiles 1987; Parris and Gillespie 1988; Belloque et al. 2002).

Our research team has developed an analytical method based on perfusion chromatography enabling the reliable determination of soybean proteins in heat-processed products made exclusively with pork meat. Since heat-processed meat products commercially available may contain not only pork meat but also another kinds of meats and even mixtures of them, our group have extended its interest to meat products prepared with turkey meat or pork–turkey meat blends. Moreover,

heat-processed meat products could contain milk proteins in addition to soybean proteins. The determination of soybean proteins in presence of milk and meat proteins have also been approached in this work.

Materials and methods

Chemicals and samples

HPLC-grade acetonitrile (ACN) (Merck, Darmstadt, Germany), trifluoroacetic acid (TFA) (Sigma, St Louis, MO, USA), and water obtained from a Milli-Q system (Millipore, Bedford, MA, USA) were used in the preparation of mobile phases. Tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris), 2-mercaptoethanol from Merck, and sodium hydrogen carbonate and sodium hydrogen phosphate from Panreac (Barcelona, Spain) were employed for the optimization of the sample preparation. Acetone (Merck) was employed for fat extraction. Eighteen heat-processed meat products containing turkey or pork–turkey meats and purchased in local markets in Madrid, Spain, or supplied by Campofrío Alimentación S. A. (Burgos, Spain) were used. The composition and information appearing in the label of every product are indicated in Table I. Moreover, a model meat product containing turkey meat without soybean proteins (model meat product 1), a model meat product containing pork–turkey meat blends without soybean proteins (model meat product 2), both submitted to heat treatments, and a model meat product with the same composition as the model meat product 1 but including soybean proteins and not submitted to any heat-processing (model meat product 3) were also supplied by Campofrío Alimentación S. A. These model meat products have a general composition identical to meat products A–H. All meat products were defatted as follows: 10 g meat were ground with an automatic miller, homogenized with 25 ml acetone in an Ultraturrax mixer (3 min), submitted to agitation for 15 min, and centrifuged (3362g, 30 min, 25°C). The supernatant was removed and the pellet extracted again with another 25 ml acetone following the same procedure. Finally, the pellet was dried overnight at 60°C to remove the remaining acetone. Meat solutions with concentration ranging from 90 to 250 mg ml⁻¹ (related to initial product) were used. These solutions were prepared by weighing approximately 1 g of the defatted and dried meat product (this amount corresponded to approximately 6 g initial product), solubilizing in 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8) with ultrasonic agitation for 10 min at 50°C, and centrifuging at 3362g for 10 min to inject the supernatant in the chromatographic system. The soybean protein content in meat samples was also determined

Table I. Composition of meat products used.

Meat product	Composition
A–H and model meat product 3	Turkey meat, water, salt, soybean protein isolate, sugars (dextrose), stabilizers, antioxidants, preservatives
I	Turkey meat (60%), water, vegetable oil, starch potato, salt, soybean proteins, powdered milk, stabilizers (E-450, E-407), aroma, preservative (E-250), antioxidant (E-301)
J	Turkey meat, water, sunflower oil, milk proteins, soybean proteins, salt, dextrose, stabilizers (E-450, E-407, E-420), antioxidants (E-325, E-316), sugar, aroma, preservative (E-250)
K	Turkey meat (60%), water, vegetable oil, starch, salt, vegetable proteins, milk proteins, lactose, sugar, natural spices, stabilizers (E-450, E-407), antioxidant (E-316), preservatives (E-250, E-252)
L	Turkey breast (55%), water, starch, salt, powdered milk, vegetable proteins, sugar, dextrose, natural spices, stabilizers (E-450 and carragenate), preservatives (E-250, E-252), antioxidant
M	Turkey thighs (55%), water, starch, vegetable proteins, powdered milk, salt, sugar, dextrose, natural spices
N	Turkey meat (49%), water, starch, vegetable oil, powdered milk, salt, natural spices, vegetable proteins, stabilizers (E-450), sugar, flavour powder (E-621), antioxidant (E-316), natural spices (E-120), preservatives (E-250, E-252)
O	Pork meat (48.6%), turkey meat (5%), pork fat, water, salt, vegetable proteins, milk proteins, sugar, natural spices, stabilizers (E-450, E-407), preservatives (E-250, E-252), antioxidant (E-316), natural colouring (E-120)
P	Pork meat (60%), turkey meat (5%), water, salt, vegetable proteins, milk proteins, lactose, dextrose, sugar, natural spices, stabilizers (E-450, E-407), preservatives (E-250, E-252), antioxidant (E-316)
Q	Pork meat (60%), turkey meat (5%), water, salt, vegetable proteins, milk proteins, sugar, natural spices, stabilizers (E-450 and carragen), preservatives (E-250, E-252), antioxidant
R	Pork meat (58%), turkey meat (7%), water, salt, vegetable proteins, milk proteins, sugar, natural spices, stabilizers (E-450 and carragen), preservatives (E-250, E-252), antioxidant, natural colouring

by the ELISA procedure described in the AOAC method 988.10 (1996, 1997, 1998). The soybean protein isolate (SPI) Supro 500E (Anvisa, Madrid, Spain), used as standard of soybean proteins, presented a protein content of 86.7% (determined by Kjeldahl analysis, four replicates). Sodium caseinate, α -lactalbumin, and β -lactoglobulin from bovine milk were obtained from Sigma. The dry matter content of the SPI was determined by drying at 130°C to constant weight. Standard solutions were prepared by weighing and dissolving the standard in 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8), sonicating for 5 min, and centrifuging at 3362g for 10 min.

High-performance liquid chromatography

A Hewlett-Packard 1100 Series liquid chromatograph (Hewlett-Packard, Pittsburgh, PA, USA) equipped with a diode array detector was used. The injected volume was 20 μ l and the detection was performed at 280 nm. The separation was accomplished with a POROS R2/H column (50 \times 4.6 mm i.d.) from Perceptive Biosystems (Framingham, MA, USA) packed with 10- μ m diameter polystyrene divinylbenzene beads. The reversed-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) method consisted of a linear binary gradient in three steps: 5–25% B in 0.8 min, 25–42% B in 0.8 min, and 42–50% B in 0.6 min. The flow-rate was 3 ml min $^{-1}$ and temperature was 50°C. Mobile phases were: A, 0.05% TFA (v/v) in Milli-Q water; and B, 0.05% TFA (v/v) in ACN. The organic modifier was filtered through 0.45- μ m nylon filters before use.

Calibration

Calibration was performed by the external standard and by the standard additions methods. Calibration by the external standard method was carried out by injecting (seven) SPI solutions over the range 0.3–6.5 mg ml $^{-1}$. Calibration by the standard additions was carried out by injecting extracts of the meat products spiked with known and increasing amounts of SPI (five standard solutions in the range 0–6.0 mg ml $^{-1}$). Integration was carried out by setting the baseline from valley to valley and the average of the area corresponding to three consecutive injections was calculated.

Data treatment

The peak area corresponding to soybean proteins was plotted against the injected concentrations (external standard calibration) or spiked SPI concentrations (standard additions calibration). The linearity in this relationship was obtained by least-squares regression analysis. The linear model was validated by means of the analysis of residuals and variance when three replicates of every standard were injected by triplicate.

Results and discussion

Detection of soybean proteins in heat-processed turkey meat

At the starting point for the determination of soybean proteins in heat-processed turkey meat products, the experimental conditions previously optimized for

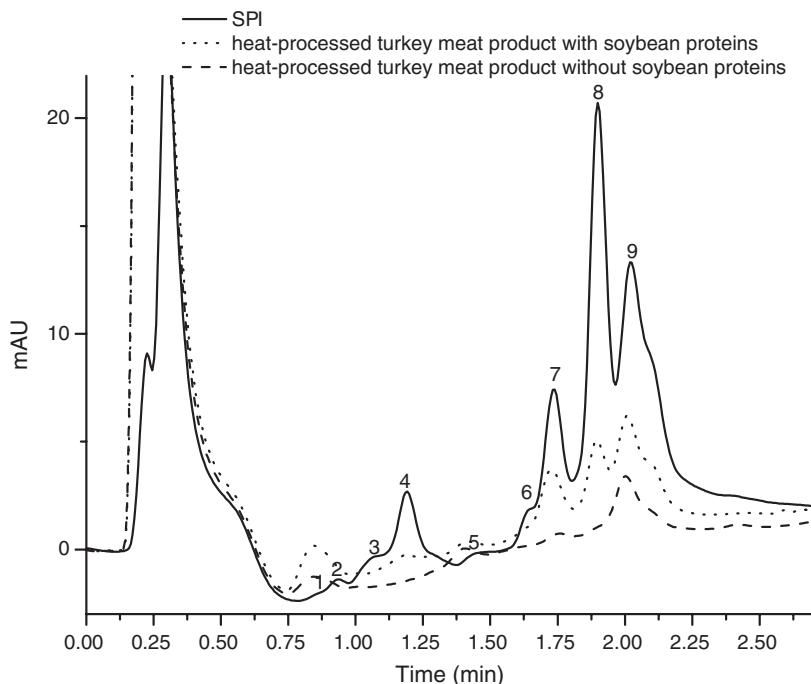


Figure 1. Chromatograms corresponding to heat-processed turkey meats with (meat product B) and without (model meat product 1) soybean proteins, and to the SPI. Chromatographic conditions: temperature, 50°C; flow-rate, 3 ml min⁻¹; gradient: 5–25% B in 0.8 min, 25–42% B in 0.8 min, 42–50% B in 0.6 min; mobile phases: A, 0.05% (v/v) TFA in water; B, 0.05% (v/v) TFA in ACN; injected volume, 20 µl; detection, 280 nm. Samples were defatted with acetone and the proteins were extracted in 30 mM Tris-HCl buffer (pH 8) with 0.5% (v/v) 2-mercaptoethanol for 10 min.

the determination of soybean proteins in heat-processed pork meat products were used (Castro et al. 2005). These conditions consisted of a gradient from 5 to 25% B in 0.8 min, from 25 to 42% B in 0.8 min, and from 42 to 50% B in 0.6 min, followed by a reversed gradient from 50 to 5% B in 0.5 min to equilibrate the column to initial conditions. Samples were defatted with acetone and the proteins extracted in a 30 mM Tris-HCl buffer (pH 8) containing 0.5% (v/v) 2-mercaptoethanol with ultrasonic agitation (at 50°C for 10 min) and centrifuged (3362g for 10 min). Figure 1 shows the chromatograms obtained under these conditions for heat-processed turkey meat products with (meat product B) and without (model meat product 1) soybean proteins and for the SPI itself. Soybean proteins in the SPI were separated in nine peaks (1–9). The chromatogram corresponding to the heat-processed turkey meat product containing soybean proteins presented two peaks at retention times close to peaks 7 and 8 of SPI that did not appear in the heat-processed meat product without soybean proteins. Nevertheless, the comparison of ultraviolet light spectra and derivatives of these peaks in the SPI and the meat product containing soybean proteins yielded different signals. These differences were attributed to interferences from meat components. Although the modification of the gradient improved the separation of target peaks (peaks 7 and 8), this was not enough to eliminate these

interferences. For that purpose, the solubilization media was modified. Water, 50 mM phosphate buffer (pH 7), 50 mM Tris-HCl buffer at pH 8 and 9, and 50 mM bicarbonate buffer at pH 10 and 11 were used and the chromatograms obtained with every one for a heat-processed turkey meat and the SPI are showed in Figures 2(a) and 2(b), respectively. In comparison with Figure 1, SPI separates in less peaks being now peaks from 6 to 9 eluted in two peaks and being the peak at 1.70 min (signalled in Figure 2 with an arrow) that enabling the detection of soybean proteins in meat products. The highest response of this peak and better resolution between this peak and neighbouring peaks were observed at pH 8 with Tris-HCl buffer. Chromatograms obtained when injecting into the chromatographic system extracts from SPI and heat-processed turkey meats with and without soybean proteins using the optimized extraction media are shown in Figure 3. The peak at 1.70 min appearing in the heat-processed meat product with soybean proteins presented an ultraviolet light spectra and first and second derivatives identical to the peak at the same time in the SPI.

Detection of soybean proteins in heat-processed products containing pork and turkey meat

The optimized conditions for the detection of soybean proteins in heat-processed turkey meat

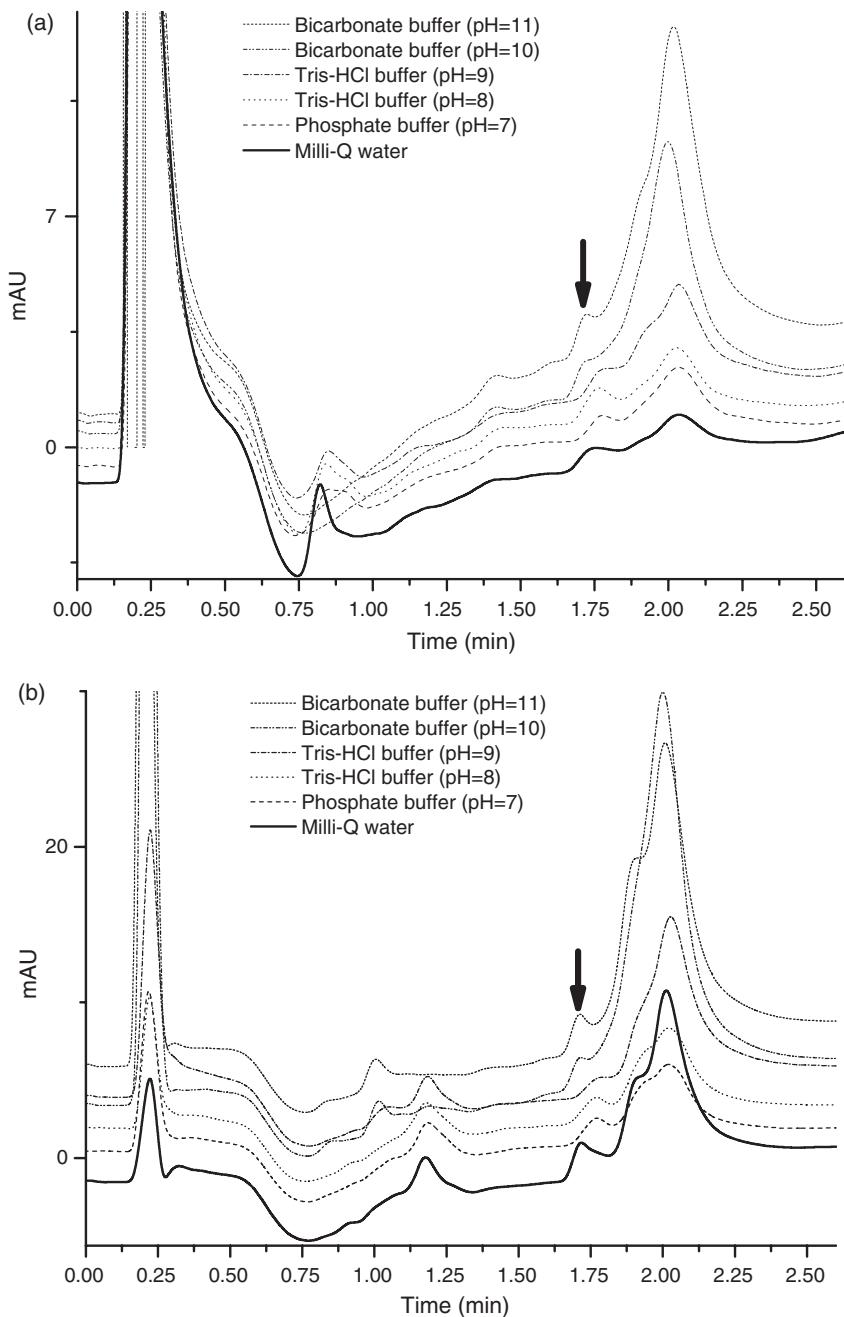


Figure 2. Chromatograms corresponding to a heat-processed turkey meat containing soybean proteins (meat product B) (a) and to the SPI (b) when using buffers at different pHs for protein solubilization. Experimental conditions as in Figure 1. The peak at approximately 1.70 min is indicated by a arrow.

products were applied to the detection of these vegetable proteins in more complex meat systems consisted of heat-processed products containing mixtures of pork and turkey meats. Figure 4 shows the chromatograms corresponding to extracts from heat-processed products with and without (model meat product 2) soybean proteins prepared with both kinds of meats. As observed, the peak appearing at 1.70 min in this meat product with soybean proteins was again that enabling the detection of the presence of soybean proteins. Thus, the method enabled the

clear detection of the presence of soybean proteins not only in turkey meat products but also in products containing pork and turkey meats.

Detection of soybean proteins in presence of milk proteins in heat-processed meat products

As stated in the Introduction, milk proteins are sometimes added to meat products in addition to soybean proteins. In order to prove the optimized method enabled the detection of soybean proteins

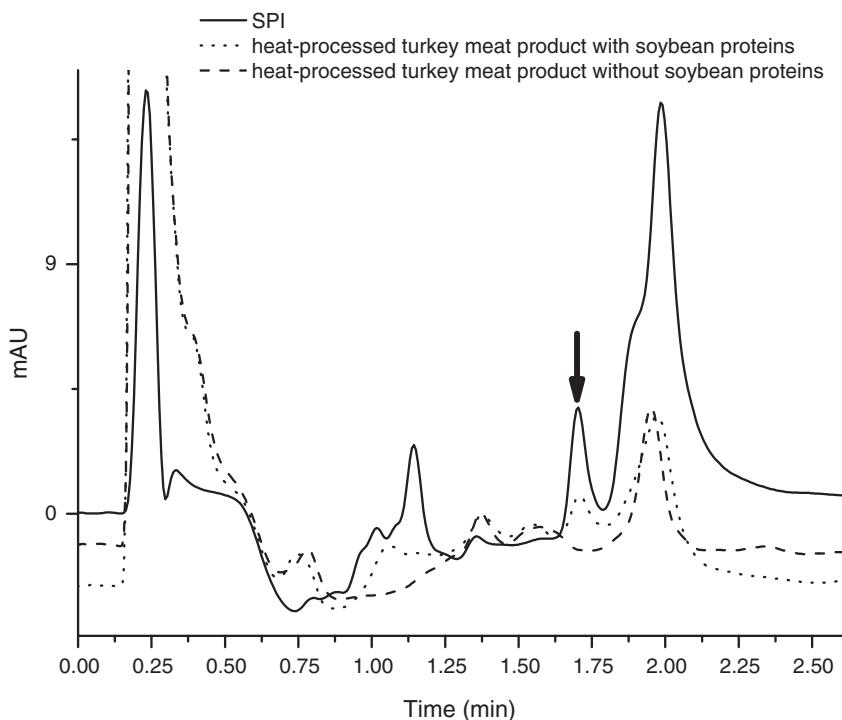


Figure 3. Chromatograms corresponding to heat-processed turkey meats with (meat product H) and without soybean proteins (model meat product 1), and to the SPI. Chromatographic conditions as in Figure 1. Samples were defatted with acetone and the proteins were extracted in 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8) for 10 min.

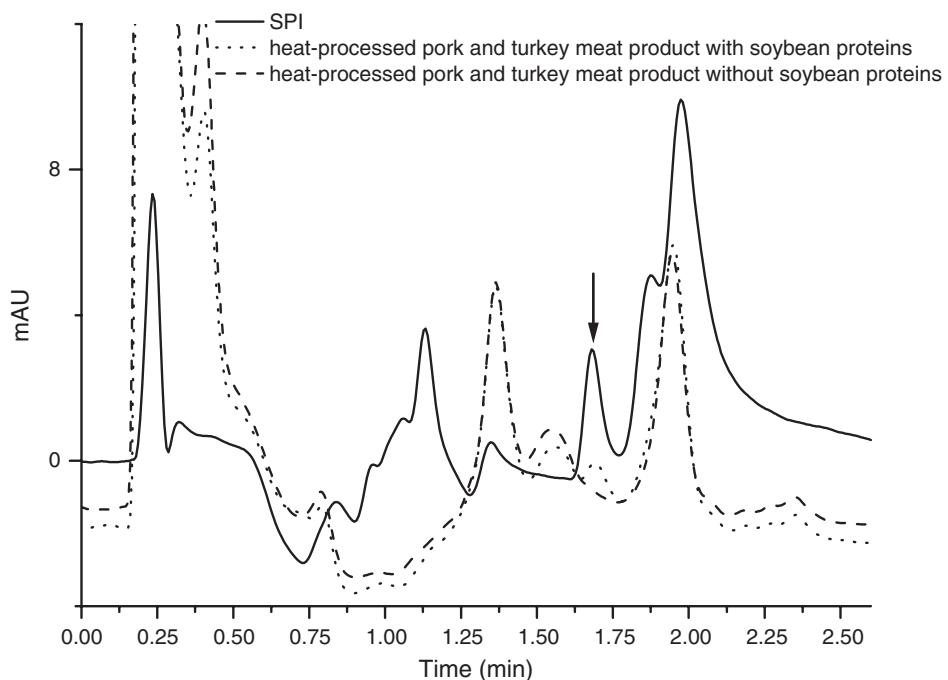


Figure 4. Chromatograms corresponding to extracts obtained from heat-processed products with and without soybean proteins containing mixtures of pork and turkey meats (model meat product 2) and to the SPI. Experimental conditions as in Figure 3.

in meat products containing milk proteins, it was used for the analysis of a commercial heat-processed meat product containing both soybean and milk proteins. Figure 5(a) shows such separation and

the chromatogram obtained for a solution of bovine caseins (which are the majority proteins in cow milks). Bovine caseins were separated into three peaks (A–C) appearing at the end of the

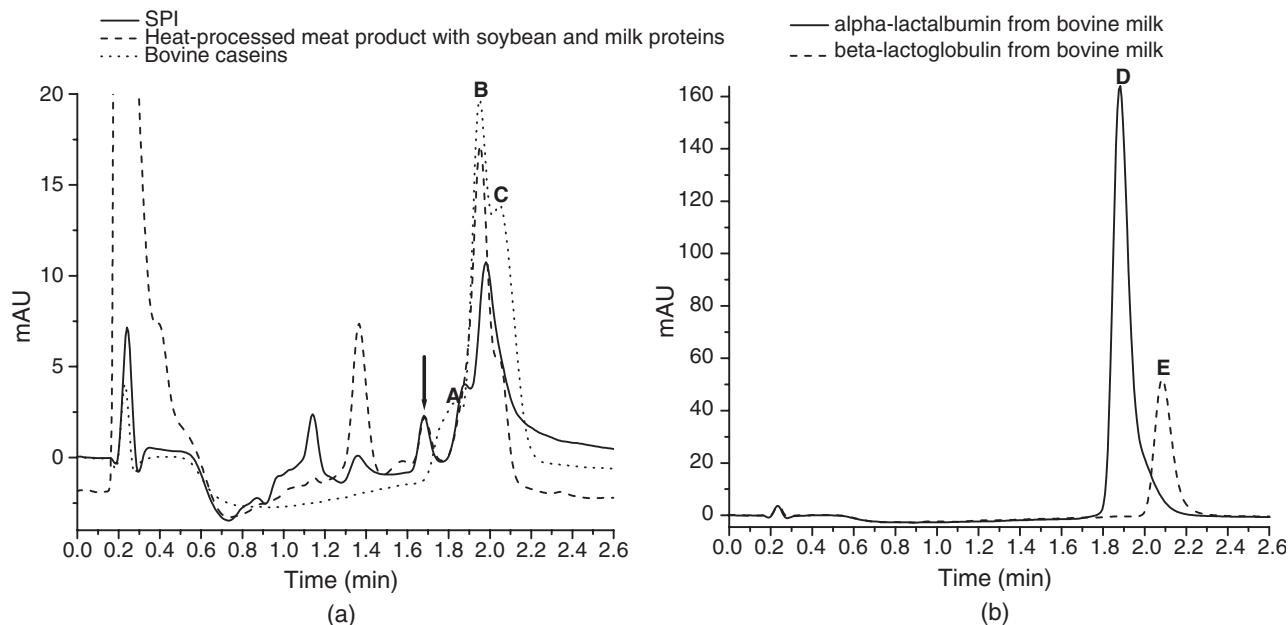


Figure 5. Chromatograms corresponding to a heat-processed meat product containing soybean and milk proteins (meat product Q), to the SPI, and to 1.12 mg ml^{-1} bovine caseins (corresponding to a casein content of 0.5% (w/w) related to 6 g initial product) (a). Chromatograms corresponding to 1.34 mg ml^{-1} α -lactalbumin (corresponding to an α -lactalbumin content of 0.5% (w/w) related to 6 g initial product) and 1.00 mg ml^{-1} β -lactoglobulin (corresponding to a β -lactoglobulin content of 0.5% (w/w) related to 6 g initial product) (b). Experimental conditions as in Figure 3.

chromatogram. Peak at 1.70 min of soybean proteins (indicated with a arrow) did not overlap with the peak appearing at the end of the chromatogram in the meat product, therefore, these proteins seemed not to interfere in detection of soybean proteins. Nevertheless, bovine milk proteins do not only consist of caseins but also of whey proteins (mainly α -lactalbumin and β -lactoglobulin) which, although they are present in a lower proportion, could interfere in the detection of soybean proteins. The chromatograms corresponding to these proteins are shown in Figure 5(b) and presented only one peak (peaks D and E) which appeared at the same retention times than peaks B and C from bovine caseins. Therefore, the method seemed to be useful for the detection of soybean proteins in these meat samples containing milk proteins.

Method validation

In order to assure the proposed method was useful for routine analysis, a standardized validation procedure for quantitative methods for food chemistry laboratories was applied (Feinberg and Raguénès 1999). For this purpose, the SPI Supro 500E was used as standard of soybean proteins and the linearity of the calibration plot, the limits of detection and quantitation, existence of matrix interferences, robustness, precision, and accuracy were evaluated. Tables II and III group the results obtained in the determination of all of these parameters.

The linearity between the signal and the concentration of soybean proteins up to 10.46 mg ml^{-1} was good ($r^2 > 0.99$). Furthermore, the analysis of the residuals and variance of the linear model enabled its validation ($p (\%) = 5.69$) in the linear concentration range. The detection limit, calculated as the concentration corresponding to a signal equal to the intercept plus three times the standard error of the calibration plot, was 0.20 mg ml^{-1} . This concentration corresponded to an addition of 0.08% (w/w) of soybean proteins in a meat product (related to 6 g initial product). The quantitation limit was 0.71 mg ml^{-1} (calculated as the concentration corresponding to a signal equal to the intercept plus ten times the standard error of the calibration plot) which means that the method enabled the quantitation of an addition of 0.28% (w/w) of soybean proteins in a meat product (related to 6 g initial product).

The slopes corresponding to the external standard and the standard additions calibration methods obtained for nine representative heat-processed meat products chosen on a set of 18 were compared for the determination of the presence of matrix interferences (Table III). For that purpose, t - and F -tests were used and t -values and significance levels (p) observed have been included in Table III. Since significance levels were lower than 5% for most heat-processed meat products, the standard additions method was selected for the determination of soybean proteins in these meat products containing

Table II. Characteristics of the proposed perfusion RP-HPLC method for the analysis of soybean proteins in heat-processed turkey or pork–turkey meat products.

Linear concentration range	Up to 10.46 mg ml ⁻¹	
Detection limit	0.20 mg ml ⁻¹ (0.08%, w/w) ¹	
Quantitation limit	0.71 mg ml ⁻¹ (0.28%, w/w) ¹	
Repeatability (RSD, %) (<i>n</i> =10) ²	Sample ³	
Retention time	0.11	
Peak area	3.62	
Intermediate precision (RSD, %)	Sample ⁴	Standard ⁵
Retention time	0.38	0.27
Peak area	11.3	4.03
Concentration	10.56	—
Internal reproducibility (RSD, %) (<i>n</i> =3) ⁶	Sample	
Retention time	0.08	
Peak area	0.38	
Robustness ⁷	Conventional parameters	Modified parameters
Column lot	0.72	0.76
Recovery (%) ⁸	Processed meat spiked with 2.40% soybean proteins	
	92.8±8.2(<i>n</i> =4)	

¹Limits of detection and quantitation expressed as w/w units were determined related 6 g initial product.²Number of injections.³Solution of 230 mg ml⁻¹ of a heat-processed meat product containing pork and turkey meats and milk and soybean proteins.⁴Injection of a solution of 229 mg ml⁻¹ of a heat-processed meat product prepared with pork–turkey meat blends in 3 days in 1 month.⁵Injection of a SPI solution of 3.5 mg ml⁻¹ in 8 days in 3 months.⁶Analysis of three individual samples of 90.6 mg ml⁻¹ of a heat-processed meat product prepared with pork–turkey meat blends in the same day.⁷Protein concentration (mg/100 mg sample) expressed as is basis determined when different lots of column were used.⁸Average recovery of soybean proteins when 2.4% of soybean proteins (from SPI) were added to a heat-processed turkey meat product not containing these proteins.Table III. Existence of matrix interferences using calibration by the external standard and standard additions methods in different heat-processed meat products by perfusion RP-HPLC¹.

Meat product sample	Equation of the straight line obtained by the external standard calibration method ²	Equation of the straight line obtained by the standard additions method ²	<i>t</i> ³	<i>p</i> (%) ⁴	Existence of a proportional bias for $\alpha=5\%$
A ^{5,6}	$y=-0.559(0.202)+5.768(0.057)x$	$y=1.867(0.218)+3.045(0.177)x$	7.1	0.00	Yes
C ^{5,6}	$y=-0.329(0.189)+5.330(0.053)x$	$y=9.058(0.203)+3.329(0.081)x$	10.6	0.00	Yes
K ^{5,7}	$y=-0.147(0.017)+5.557(0.045)x$	$y=5.280(0.136)+4.009(0.084)x$	6.9	0.00	Yes
L ^{5,7}	$y=-0.147(0.017)+5.557(0.045)x$	$y=1.037(0.111)+4.076(0.066)x$	6.4	0.00	Yes
M ^{5,7}	$y=0.156(0.219)+5.667(0.058)x$	$y=8.645(0.437)+5.284(0.184)x$	2.0	8.11	No
O ^{7,8}	$y=-0.329(0.189)+5.330(0.053)x$	$y=5.024(0.107)+4.386(0.083)x$	9.6	0.01	Yes
P ^{7,8}	$y=-0.329(0.189)+5.330(0.053)x$	$y=8.932(0.112)+4.395(0.044)x$	13.5	0.00	Yes
Q ^{7,8}	$y=-0.051(0.140)+5.672(0.039)x$	$y=8.867(0.092)+4.771(0.036)x$	16.9	0.00	Yes
R ^{7,8}	$y=-0.051(0.140)+5.672(0.039)x$	$y=13.42(0.246)+4.509(0.097)x$	7.03	0.00	Yes

¹Experimental conditions as in Figure 3.²Errors in the slope and intercept of the regression lines are given in parentheses.³Calculated *t*-value.⁴Significance level (*p*) associated.⁵Heat-processed meat products containing turkey meat.⁶Heat-processed meat products containing soybean proteins.⁷Heat-processed meat products containing soybean and milk proteins.⁸Heat-processed meat products containing pork and turkey meats.

turkey meat and pork–turkey meat blends. In order to minimize these matrix interferences, the amount of initial sample used in these experiments for the preparation of standard solutions in standard additions calibration was reduced up to 0.5 g. Despite this, results observed did not significantly improve.

Precision of the method was determined by the evaluation of repeatability and intermediate

precision. The repeatability in peak area and retention time (expressed as relative standard deviation (RSD, %)) for ten consecutive injections of an extract obtained from a heat-processed meat product with soybean proteins was better than 0.20% in retention time and than 4.00% in peak area. In order to evaluate the intermediate precision one meat solution was injected in 3 days during 1 month and

Table IV. Soybean protein content determined in turkey or pork–turkey meat products by the official ELISA method and the proposed HPLC method¹.

Meat product	Protein concentration (mg/100 mg sample) ²	
	ELISA ³	Perfusion HPLC ⁴
A ^{5,6}	0.98	0.62(0.08) ⁷
C ^{5,6}	1.04	0.87
D ^{5,6}	1.18	1.09
F ^{5,6}	1.12	1.11 ⁸
G ^{5,6}	1.67	1.18
Model meat product 3 ^{5,6,9}	0.63	0.75
K ^{5,10}	0.61	0.68 ⁸
L ^{5,10}	0.34	<LDQ*
M ^{5,10}	0.86	0.69 ⁸
Q ^{10,11}	0.70	0.82 ⁸
R ^{10,11}	1.22	1.31

¹All meat products were heat-processed with the exception of model meat product 3.

²Results expressed as is basis.

³Determined following the official AOAC method 998.10.

⁴Determined by the proposed method.

⁵Meat product containing turkey meat.

⁶Meat products containing soybean proteins.

⁷Mean of three individual determinations; standard deviation given in parentheses.

⁸Mean of two individual determinations.

⁹Raw meat product.

¹⁰Meat products containing soybean and milk proteins.

¹¹Meat product containing turkey and pork meat.

*Quantitation limit (LDQ).

one standard solution was injected in 8 days during 3 months. RSD values observed were better than 0.40% in retention time and better than 12.0% in peak area. The variability in the soybean protein content determined three times in one month was 10.56%. Inter-day reproducibility of the slopes of the straight lines obtained by the standard additions calibrations was 1.86%. Internal reproducibility was determined by injecting three samples of a meat product individually extracted and the RSD obtained was better than 0.40% in peak area and retention time.

The determination of the soybean protein content was performed with an identical column from another lot in order to evaluate the robustness of the method. A *t*-test was applied for comparing the soybean protein contents obtained with both columns observing no significant differences.

Recovery was determined by spiking a commercial heat-processed turkey meat product with 2.40% of soybean proteins (from SPI) observing an average media of 92.8%.

The accuracy of the method was determined by comparison of the soybean protein content obtained by the proposed method and by the official ELISA method (AOAC Official Method 998.10, 1996, 1997, 1998). For this purpose, ten commercial heat-processed meat products and one raw meat product (model meat product 3) were analysed by

both methods and results obtained are shown in Table IV. No statistical differences between the contents determined by both methods were detected when applying a paired *t*-test (*p* > 5%). Moreover, the slope and intercept of the equation corresponding to the best straight line obtained when plotting the contents determined by the ELISA method versus the obtained by the proposed method did not significantly differ from 1 and 0, respectively (*t*-test). The comparison of the soybean protein contents determined by the proposed method in the raw meat product and in the heat-processed meat products suggested the method was not affected by the processing conditions used in the manufacture of these products containing turkey or pork–turkey meats.

Application to edible samples

The developed method was applied to the determination of the soybean protein content in heat-processed meat products prepared with turkey or pork–turkey meats that could also contain milk proteins. For that purpose, 18 heat-processed meat products commercially available were used and the SPI Supro 500E was employed as standard of soybean proteins. Table V shows the results obtained observing these contents were always lower than 1.31%. Furthermore, Table V also shows the soybean protein contents obtained by the external standard calibration method. These contents were always lower than the obtained by the standard additions method observing that the differences between them ranged from 9 to 28% with the exception of products C and E. Despite this and although the accurate determination of the soybean protein content is obtained only with the standard additions method, the external calibration one could be useful for the rapid estimation of this content or screening in these meat samples. Therefore, only for those samples whose protein contents determined by the external standard method were higher than a certain value (e.g. 1%), the standard additions method could be used to confirm whether these meat products satisfy establish regulations.

Conclusions

The detection of soybean proteins in the presence of pork and turkey proteins and milk proteins has been possible, for the first time, in this work. The analytical method was successfully applied to the determination of additions of soybean proteins in commercial heat-processed meat products containing turkey meat or pork–turkey meat blends and that could also contain milk proteins. The method consisted of the extraction of soybean proteins from

Table V. Soybean protein content determined in different commercial heat-processed turkey or pork–turkey meat products using standard additions calibration and external standard calibration by the perfusion HPLC method.

Processed meat product	Protein concentration (mg/100 mg sample) ¹	
	Standard additions calibration	External standard calibration
A ^{2,3}	0.62(0.08) ⁴	0.47(0.05) ⁴
B ^{2,3}	0.74 ⁵	0.60 ⁵
C ^{2,3}	0.87	0.56
D ^{2,3}	1.09	0.84
E ^{2,3}	1.25	0.81
F ^{2,3}	1.11 ⁵	0.96 ⁵
G ^{2,3}	1.18	0.91
H ^{2,3}	1.02	0.79
I ^{2,6}	0.60 ⁵	0.49 ⁵
J ^{2,6}	<LDQ*	
K ^{2,6}	0.68 ⁵	0.50 ⁵
L ^{2,6}	<LDQ	<LDQ
M ^{2,6}	0.69 ⁵	0.50 ⁵
N ^{2,6}	<LDQ	<LDQ
O ^{6,7}	1.27(0.04) ⁴	1.16(0.01) ⁴
P ^{6,7}	0.84(0.08) ⁸	0.68(0.09) ⁸
Q ^{6,7}	0.82 ⁵	0.69 ⁵
R ^{6,7}	1.31	1.07

¹Results expressed as is basis.

²Heat-processed products containing turkey meat.

³Heat-processed meat products containing soybean proteins.

⁴Mean of three individual determinations; standard deviation given in parentheses.

⁵Mean of two individual determinations.

⁶Heat-processed meat products containing soybean and milk proteins.

⁷Heat-processed products containing turkey and pork meats.

⁸Mean of four individual determinations. Standard deviation given in parenthesis.

*Quantitation limit (LDQ).

the defatted meat product with an aqueous buffer and its injection in a reversed-phase perfusion column. The method enabled the detection and quantitation of additions of soybean proteins up to 0.08 and 0.28% (w/w), respectively, in meat products. The proposed method was proven to be precise, accurate and robust. In comparison with the ELISA method, the proposed method enabled the reliable determination of the soybean protein content in these meat products in the cheapest and simplest way. Furthermore, the analysis time needed in the proposed method is significantly lower than the needed when using the ELISA method. Moreover, the determination of soybean proteins by the proposed method was not affected by the processing conditions used in the manufacture of meat products neither by the soybean protein source added. Consequently, the method can be considered as suitable for routine analysis and an alternative to the ELISA method for the quality control of these products.

Acknowledgements

The authors thank the Comunidad Autónoma de Madrid, Spain (Project No. 07G/0025/2003) and the Ministerio de Ciencia y Tecnología, Spain (Project No. FIT-060000-2002-37, Programa de Fomento de la Investigación Técnica (PROFIT)) for financial support. The PROFIT project was developed in collaboration with Campofrío Alimentación S. A., Spain. F. C.-R. also thanks the Ministerio de Educación y Ciencia, Spain, for a grant.

References

- AOAC. 1996, 1997, 1998. Official Method 998.10, Soy protein in raw and heat-processed meat products, enzyme-linked immunosorbent assay. In *Official methods of analysis*, 16th ed., rev. 1996, 1997, 1998. Gaithersburg, MD: AOAC International.
- Ashoor SH, Stiles PG. 1987. Determination of soy protein, whey protein, and casein in unheated meats by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography* 393: 321–328.
- Belloque J, García MC, Torre M, Marina ML. 2002. Analysis of soya bean proteins in meat products. A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 42:507–532.
- Castro F, García MC, Rodríguez R, Marina ML. 2005. Simple and inexpensive method for the reliable determination of additions of soybean proteins in heat-processed meat products: An alternative to the AOAC official method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53:220–226.
- Chin KB, Keeton JT, Longnecker MT, Lamkey JW. 1999. Utilization of soy protein isolate and konjac blends in a low-fat bologna (model system). *Meat Science* 53:45–57.
- Feinberg M, Raguénès N. 1999. Development and application of a standardized validation procedure for food chemistry laboratories. *Analytica Chimica Acta* 391:239–252.
- Keeton JT. 1994. Low-fat meat products—technological problems with processing. *Meat Science* 36:261–276.
- Parris N, Gillespie PJ. 1988. HPLC separation of soy and beef protein isolates. In: Cherry JP, Bardford RA, editors. *Methods for protein analysis*. Champaign, IL: American Oil Chemists Society. p 142.
- Pearson AM, Gillett TA. 1996. Sausages. In: Pearson AM, Gillett TA, editors. *Processed meats*. New York, NY: Chapman & Hall. p 210.
- Pietrasik Z, Duda Z. 2000. Effect of fat content and soy protein/carrageenan mix on the quality characteristics of comminuted, scalped sausages. *Meat Science* 56:181–188.
- Poms RE, Klein CL, Anklam E. 2004. Methods for allergen analysis in food: A review. *Food Additives and Contaminants* 21:1–31.
- Shand PJ. 1997. Mimetic and synthetic fat replacers for the meat industry. In: Pearson AM, Dutson TR, editors. *Advanced in meat research*. London: Chapman & Hall. p 191.
- Yusof SCM, Babji AS. 1996. Effect of non-meat proteins, soy protein isolate and sodium caseinate, on the textural properties of chicken bologna. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 47:323–329.

Copyright of Food Additives & Contaminants is the property of Taylor & Francis Ltd. The copyright in an individual article may be maintained by the author in certain cases. Content may not be copied or emailed to multiple sites or posted to a listserv without the copyright holder's express written permission. However, users may print, download, or email articles for individual use.

Artículo científico 3

Determination of soybean proteins in commercial heat-processed meat products prepared with chicken, beef or complex mixtures of meats from different species.

F. Castro-Rubio, M. C. García, R. Rodríguez, J. Rodríguez, M. L. Marina.

Food Chem., 100 (2007) 468-476.

Determination of soybean proteins in commercial heat-processed meat products prepared with chicken, beef or complex mixtures of meats from different species

F. Castro ^a, M.C. García ^a, R. Rodríguez ^b, J. Rodríguez ^b, M.L. Marina ^{a,*}

^a Departamento de Química Analítica, Facultad de Química, Universidad de Alcalá, Ctra. Madrid-Barcelona Km. 33.600, 28871 Alcalá de Henares, Madrid, Spain

^b Campofrío Alimentación, S.A., Pol. Ind. Gamonal-Villamar, C/La Bureba, s/n. 09007 Burgos, Spain

Received 13 June 2005; received in revised form 20 September 2005; accepted 20 September 2005

Abstract

The addition of foreign proteins (mainly soybean proteins and milk proteins) to heat-processed meat products is a common practice. This work approaches the determination of additions of soybean proteins in heat-processed meat products prepared with chicken meat, beef meat, and complex mixtures of meats from different species (chicken, pork, beef, and turkey) by perfusion reversed-phase high-performance liquid chromatography. The applied method was previously developed for the determination of soybean proteins in pork and turkey meat products but it has never been tested for the determination of soybean proteins in other heat-processed meat products containing other kinds of meats. This paper demonstrates the validity of this method for the detection of soybean proteins in heat-processed meat products containing different varieties of meats and even in the presence of other foreign proteins such as milk proteins. The specificity and existence of matrix interferences have been checked for these samples and accuracy has been evaluated by the comparison of the soybean protein contents determined by the proposed method and the official ELISA method.

© 2005 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Heat-processed meat products; Soybean proteins; Quantitation; Perfusion reversed-phase high-performance liquid chromatography; Chicken; Beef; Pork; Turkey

1. Introduction

Heat-processed meat products consist of emulsions prepared with meats of different qualities and from one or several species. During the elaboration process, meats are ground in a cutter and mixed with ice/water, spices, and other ingredients. After homogenization, the mixture is stuffed into casings, clipped at both ends, and cooked in a humid oven with 100% water vapour between 60 and 80 °C or in a water bath to 90 °C until the internal temperature reaches 72 °C (Andersson, Andersson, & Tornberg, 2000; Pearson & Gillett, 1996). Among other

ingredients, heat-processed meat products can also contain foreign proteins such as soybean and milk proteins. The addition of these proteins can be justified in different ways:

- Foreign proteins can be added to improve the emulsification of fat and water, thus, preventing the coalescence of the fat during heating when the lean meat content of the product is low (Pearson & Gillett, 1996; Yusof & Babji, 1996).
- Some non-meat proteins can also be used as fat replacers owing to their ability to bind water and to form gels, thus, responding to consumers demands for healthier and low fat products (Egbert, Huffman, Chen, & Dylewski, 1991; Pietrasik & Duda, 2000; Shand, 1997). More-

* Corresponding author. Tel.: +34 91 8854935; fax: +34 91 8854971.

E-mail address: m Luisa.marina@uah.es (M.L. Marina).

over, there are also well known benefits associated with the consumption of soybean: reduction of cholesterol levels and menopause symptoms and reduction of risk for several chronic diseases, i.e., cancer, heart disease, and osteoporosis (Riaz, 1999).

The addition of foreign proteins to meat products has resulted in regulations limiting this practice (Legislación Alimentaria de Aplicación en España, 2002). The application of established regulations implies the use of methods enabling the determination of soybean proteins in these products.

Detection of soybean proteins in meat products has been performed by different techniques such as polyacrylamide gel electrophoresis, immunochemical techniques, and chromatographic techniques (Belloque, García, Torre, & Marina, 2002). Nevertheless, none of these methods are completely satisfactory being, in most of cases, very tedious and time consuming or even not enabling the quantitative analysis of soybean proteins. The method commonly used in food laboratories for the determination of soybean proteins in heat-processed meat products is an AOAC method based on an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (AOAC Official Method; Koppelman, Lakemond, Vlooswijk, & Hefle, 2004; Yman, 2004). In this method, soybean proteins from a meat product are submitted to denaturing conditions, renatured conditions, and, finally, analysed by an inhibition mode of ELISA. In this immunoassay, soybean proteins are made to react with an appropriate antiserum in excess and the unreacted antibody is determined, after isolation, by its reaction with a second antibody conjugated with an enzyme. Capture enzyme activity is determined by adding a chromogenic substrate yielding a product whose color intensity is measured at 450 nm. In addition to its complexity and length, this method has been considered as semiquantitative (AOAC Official Method).

During the last years our research team has focussed on the development of analytical methods enabling the detection of the soybean protein content in heat-processed meat products (Castro, García, Rodríguez, & Marina, 2005; Castro, Marina, Rodríguez, & García, in press) and cured meat products (Criado, Castro, García-Ruiz, García, & Marina, 2005). Thus, it has been possible to reliably determine soybean proteins in heat-processed meat products prepared with pork and turkey meats by the use of a simple chromatographic method that constitutes a promising alternative to the ELISA method. Nevertheless, this method has never been applied to the analysis of heat-processed products prepared with other kind of meats or with complex mixtures of meats.

The aim of this work was the determination of soybean proteins in heat-processed meat products prepared with chicken, beef or complex mixtures of meats from different species (chicken, pork, beef, and turkey).

2. Materials and methods

2.1. Chemicals and samples

Acetonitrile (ACN, HPLC gradient grade) (Merck, Darmstadt, Germany), trifluoroacetic acid (TFA) (99.5 atom% D in 0.5 ml blisters (Sigma, St. Louis, MO)), and high-purity water ($>18 \text{ M}\Omega/\text{cm}$) obtained from a Milli-Q purification system (Millipore, Bedford, MA) were used in the preparation of mobile phases. Tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris) was employed for sample preparation. Acetone (Merck, Darmstadt, Germany) was necessary for fat extraction. The soybean protein isolate (SPI) Supro 500E (Anvisa, Madrid, Spain) (85.37% of proteins determined by Kjeldahl analysis (2 replicates)) was used for the quantitation of soybean proteins. Sodium caseinate, α -lactalbumin, and β -lactoglobulin from bovine milk were obtained from Sigma (St. Louis, MO). Seventeen commercial meat products made with chicken, beef or different meat blends were used. These products were purchased in local markets in Madrid (Spain) or supplied by Campofrío Alimentación S.A. (Burgos, Spain). The composition of these products is detailed in Table 1. Moreover, in the case of chicken products, a model meat product without soybean proteins (model meat product 1) and two model meat products with the same composition as the model meat product 1 but including soybean proteins and not submitted to any heat-processing (model meat products 2 and 3) were also supplied by Campofrío Alimentación S.A. The composition of these model products is also detailed in Table 1. The protocol for the preparation of the samples was the following: 10 g of meat were ground with an automatic miller, homogenised with 25 ml of acetone in an Ultraturrax mixer (3 min), submitted to agitation for 15 min, and centrifuged (3362 g, 30 min, 25 °C). The supernatant was removed and the pellet was extracted again with another 25 ml of acetone following the same procedure. Finally, the pellet was dried overnight at 60 °C to remove the remaining acetone. Meat solutions with concentrations ranging from 20 to 176 mg/ml (related to initial product) were used. These solutions were prepared by weighing the appropriate amount of the defatted and dried meat product (0.1–1.0 g), solubilising in 25 ml of 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8) with ultrasonic agitation for 10 min at 50 °C, and centrifuging at 3362 g for 10 min to inject the supernatant in the chromatographic system. The soybean protein content in meat samples was also determined by the ELISA procedure described in the AOAC method 988.10 (AOAC Official Method).

2.2. High-performance liquid chromatography

Two Hewlett-Packard 1100 Series liquid chromatographs (Hewlett-Packard, Pittsburgh, PA) equipped with a diode array detector (one of them with a microcell and the other with a standard flow cell), an injection system, a degassing system, a quaternary pump, and a compartment

Table 1
Composition of meat products used

Meat products	Composition
Meat product A–H and model meat products 2 and 3	Chicken meat, water, salt, soybean protein isolate, sugars (dextrose), stabilizers, antioxidants, preservatives
Model meat product 1	Chicken meat, water, salt, sugars (dextrose), stabilizers, antioxidants, preservatives
Meat product I	Chicken meat, water, corn starch, vegetable proteins, stabilizers, antioxidants, preservatives
Meat product J	Chicken meat, water, potato starch, wheat starch, vegetable proteins, milk proteins, sugars (dextrose), natural spices, gelling powder, emulsion powder, antioxidants, flavor powder, preservatives, coloring
Meat product K	Beef meat, water, corn starch, vegetable proteins, stabilizers, antioxidants, preservative
Meat product L	Beef meat, olives, water, potato starch, wheat starch, vegetable proteins, milk proteins, sugars (dextrose), natural spices, gelling powder, emulsion powder, antioxidants, flavor powder, preservatives, coloring
Meat product M	Pork meat, chicken meat, water, starch, salt, vegetable proteins, spices, sugar, stabilizer, antioxidant, flavor powder, preservatives
Meat product N	Beef meat and turkey meat (56%), water, starch, vegetable oil, vegetable proteins, milk proteins, salt, sugars (dextrose and lactose), aromas, spices, stabilizers, flavor powder, antioxidant, preservatives, natural coloring
Meat product O	Beef (veal) meat, turkey meat and chicken meat (65%), water, starch, vegetable oil, vegetable proteins, salt, dextrose, sugar, spices, stabilizer, flavor powder, antioxidant, preservatives
Meat product P	Pork meat, chicken meat, turkey meat, fat, water, olives (11%), starch, salt, soybean proteins, sugars, (lactose), stabilizers, milk proteins, flavor powder, spices, antioxidant, coloring, preservative
Meat product Q	Pork meat, beef meat (8%), chicken meat, turkey meat, water, starch, salt, soybean proteins, sugars (dextrose), stabilizers, aroma, flavor powder, antioxidant, preservative, powdered milk

for the column were employed. The injected volume was 20 µl and the detection was performed at 280 nm. The separation was accomplished with a POROS R2/H column (50 × 4.6 mm i.d.) from Perseptive Biosystems (Framingham, MA) packed with 10 µm diameter polystyrene divinylbenzene beads. The RP-HPLC method consisted of a linear binary gradient in three steps: 5–25% B in 0.8 min, 25–42% B in 0.8 min, and 42–50% B in 0.6 min. The flow-rate was 3 ml/min and temperature was 50 °C. Mobile phases were: phase A, 0.05% TFA (v/v) in Milli-Q water; phase B, 0.05% TFA (v/v) in ACN. The organic modifier was filtered through 0.45 µm nylon filters before use.

2.3. Calibration

Calibration by the external standard method was carried out by injecting SPI solutions over the range 0.10–6.5 mg/ml of soybean proteins (corrected for the purity and moisture). The peak corresponding to soybean proteins (peak at 1.70 min) was integrated by setting the baseline from valley to valley and the average area of three consecutive injections was calculated. The content of soybean proteins in the meat products was determined by interpolation of the area of that peak in the calibration curve. Calibration by the standard additions method was performed by injecting meat extracts spiked with known and increasing amounts of SPI (0–6.5 mg/ml of soybean proteins). All determinations were performed, at least, by duplicate and every solution was injected three times into the chromatographic system.

2.4. Data treatment

The peak area corresponding to soybean proteins was plotted against the injected concentrations (external

standard calibration) or spiked SPI concentrations (standard additions calibration).

3. Results and discussion

3.1. General

The determination of soybean proteins in heat-processed meat products prepared with pork meat, turkey meat, and pork–turkey meat blends that can also contain milk proteins has been demonstrated (Castro et al., 2005, *in press*). In addition to these products, heat-processed meat products prepared with chicken or beef meats are also very popular, being very interesting the determination of soybean proteins in these products.

In order to prove that the previously developed method for the determination of soybean proteins in pork and turkey meat products is valid for other kinds of heat-processed meat products, it was applied to the analysis of heat-processed meat products prepared with chicken and beef meats. The chromatogram obtained for a heat-processed chicken meat product with (meat product D) and without SPI (model meat product 1) and the SPI itself are shown in Fig. 1(a). The chromatogram obtained for the meat product with SPI showed a broad peak at approximately 1.10 min and a peak at 1.70 min (indicated with an arrow) that disappeared in the chromatogram corresponding to the meat product without soybean proteins. These peaks could be attributed to soybean proteins since peaks at similar retention times appeared in the chromatogram corresponding to the SPI. Nevertheless, only the UV spectra and first and second derivatives obtained for the peak at 1.70 min in the SPI and the meat product containing soybean proteins matched (see Fig. 2(a)).

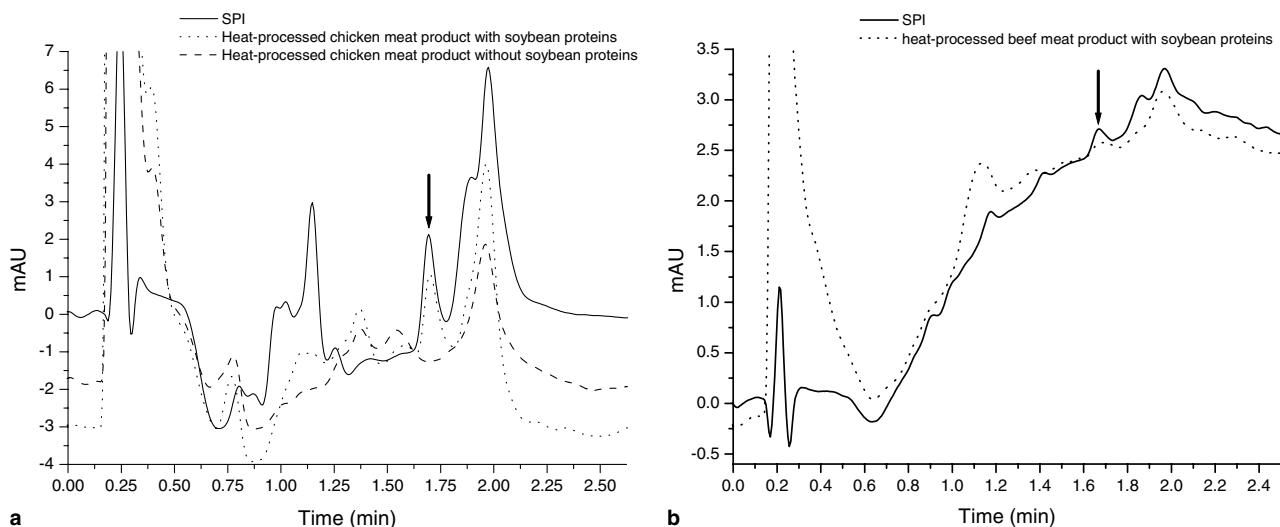


Fig. 1. Chromatograms corresponding to a heat-processed chicken meat product with (meat product D) (272 mg/ml referred to initial product) and without soybean proteins (model meat product 1) (248 mg/ml referred to initial product), and to SPI (2 mg/ml of soybean proteins) (a) and chromatograms corresponding to a heat-processed beef meat product containing soybean proteins (meat product K) (35 mg/ml referred to initial product) and to SPI (1.5 mg/ml) (b). Chromatographic conditions: temperature, 50 °C; flow-rate, 3 ml/min; gradient: 5–25% B in 0.8 min, 25–42% B in 0.8 min, 42–50% B in 0.6 min; mobile phases: A, 0.05% (v/v) TFA in water; B, 0.05% (v/v) TFA in ACN; injected volume, 20 µl; detection, 280 nm. Sample preparation: fat extraction with acetone followed by protein solubilisation in 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8) with ultrasonic agitation for 10 min at 50 °C.

These experimental conditions were also applied to one heat-processed meat product prepared with beef meat (meat product K) (see Fig. 1(b)). A peak at approximately 1.70 min was again observed in the chromatogram of the meat product that could correspond to soybean proteins. The comparison of the UV spectra and first and second derivatives obtained for this peak in the SPI and in the meat product containing soybean proteins showed that they were identical (Fig. 2(b)).

3.2. Detection of soybean proteins in heat-processed meat products prepared with chicken or beef meats in the presence of milk proteins

The Spanish Legislation allows the addition of milk proteins to heat-processed meat products in place of or in addition to soybean proteins; therefore, the presence of both kinds of foreign proteins is very common (Legislación Alimentaria de Aplicación en España, 2002). In order to prove the validity of the proposed method for chicken or beef meat products containing milk proteins, it was applied to the analysis of one heat-processed meat product prepared with chicken and one heat-processed meat product prepared with beef that contained both soybean and milk proteins. Fig. 3(a) shows the chromatograms obtained for both products and for the SPI and Fig. 3(b) shows the chromatograms corresponding to milk proteins (bovine caseins, α -lactalbumin, and β -lactoglobulins (A + B)). All milk proteins appeared at the end of the chromatogram at retention times higher than 1.70 min. Therefore, it was possible to detect soybean proteins in these products without interference of milk proteins.

3.3. Detection of soybean proteins in heat-processed meat products prepared with complex meat blends that could also contain milk proteins

Nowadays, it is quite common to find heat-processed meat products prepared with meats from different species. The higher complexity of these products could affect the detection of soybean proteins. In order to test whether the proposed method is affected by this fact, it has been applied to the analysis of heat-processed products prepared with different meat blends. The chromatograms obtained for a product prepared with a pork/chicken blend (product M), a product prepared with a beef/turkey/chicken blend (product O) and for the SPI are shown in Fig. 4(a).

As examples of products prepared with meat blends and containing milk proteins, Fig. 4(b) shows the chromatograms corresponding to a beef/turkey product (meat product N) and to a pork/chicken/turkey product (meat product P). In all cases, the peak at 1.70 min corresponding to soybean proteins was clearly detected and separated from meat components and milk proteins (in the case of Fig. 4(b)).

3.4. Analytical characteristics of the method

The chromatographic method applied in this work has previously been validated by the determination of the linearity of the calibration plot, detection and quantitation limits, existence of matrix interferences, specificity, precision (repeatability and internal reproducibility), and accuracy using the SPI Supro 500E as standard of soybean proteins and when samples contained only pork or/and

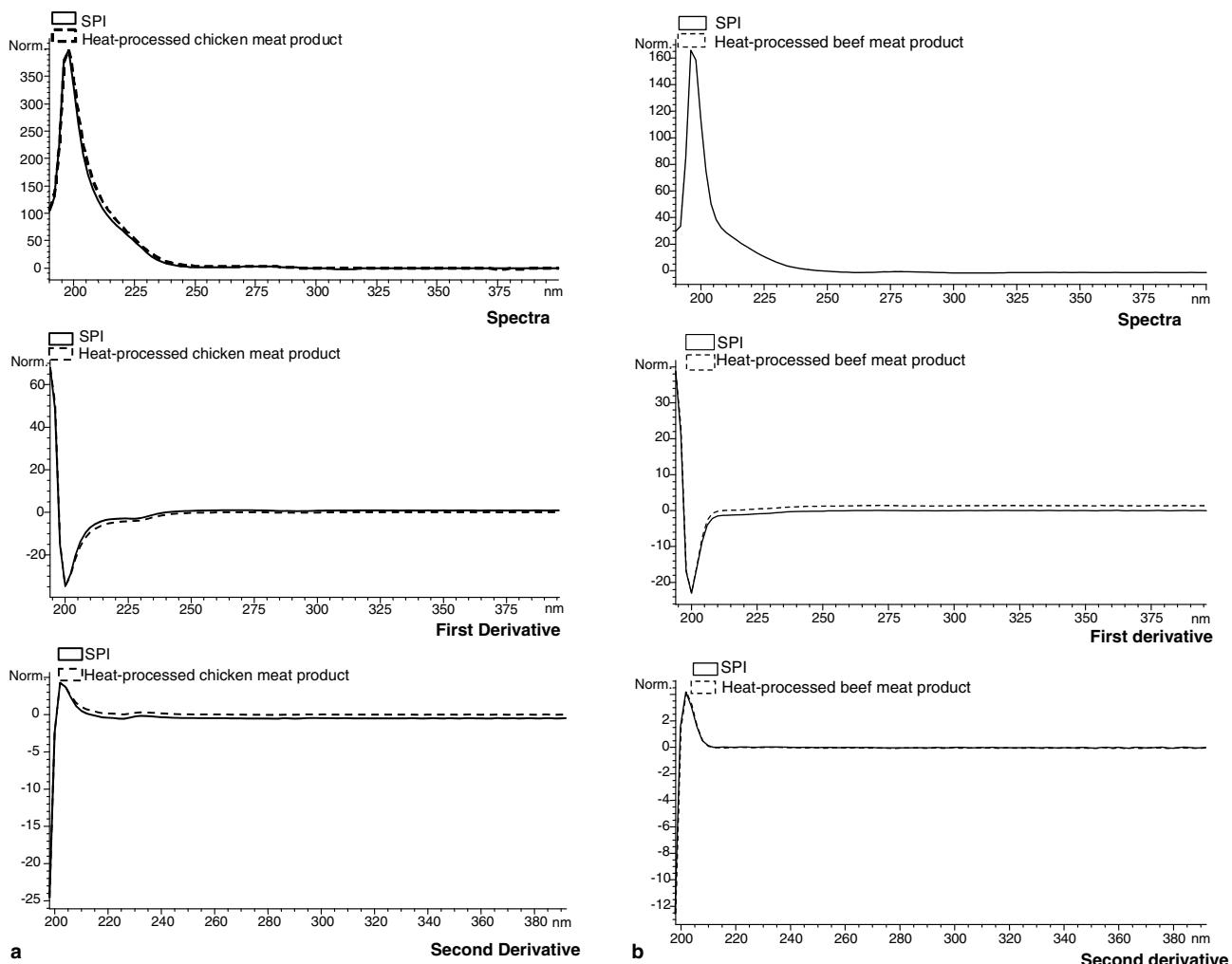


Fig. 2. UV spectra and first and second derivatives obtained for the peak at 1.7 min in a heat-processed chicken meat product with soybean proteins (meat product D), and in a heat-processed beef meat product with soybean proteins (meat product K) in comparison with the SPI. Experimental conditions as in Fig. 1.

turkey meats (Castro et al., 2005, in press). Some of these parameters (linearity and detection and quantitation limits) remain when the method was applied to other kind of meats. Nevertheless, it was necessary to check whether matrix interferences, precision, specificity, and accuracy were adequate for the application of this method to meat products prepared with other meats different to pork or turkey alone.

The presence of matrix interferences was checked by comparison of the slopes and the contents of soybean proteins obtained for the external standard and the standard additions calibration methods for five heat-processed meat products using *t*- and *F*-tests. The chosen products contained only beef or chicken meats or consisted of pork-chicken blends, beef-turkey blends or beef-turkey-chicken blends. Table 2 groups the results obtained. Since the *P*-value was greater than 5%, the absence of proportional systematic errors was confirmed and the external standard method was chosen for quantitation of soybean proteins in these meat products. In previous works, it was observed

that the method resulted affected by the matrix of the product when analysing turkey products or meat blends containing high concentrations of this meat, while there were no matrix interferences when the method was applied to meat products containing only pork (Castro et al., 2005, in press).

The method specificity was verified with 12 heat-processed meat products performing one addition of SPI over every meat product covering the range from 1.50 to 6.20 mg/ml. The specificity was determined by adjusting a straight line between added and recovered concentrations of soybean proteins in these samples (see Table 3). As the slope and the intercept obtained were not statistically different from 1.0 and 0.0, respectively, the method was considered specific.

For the evaluation of the precision of the method, the repeatability and intermediate precision were determined (Table 3). Repeatability, expressed as relative standard deviation (RSD, %) in retention time and peak area and calculated by injecting 10 consecutive times a solution of

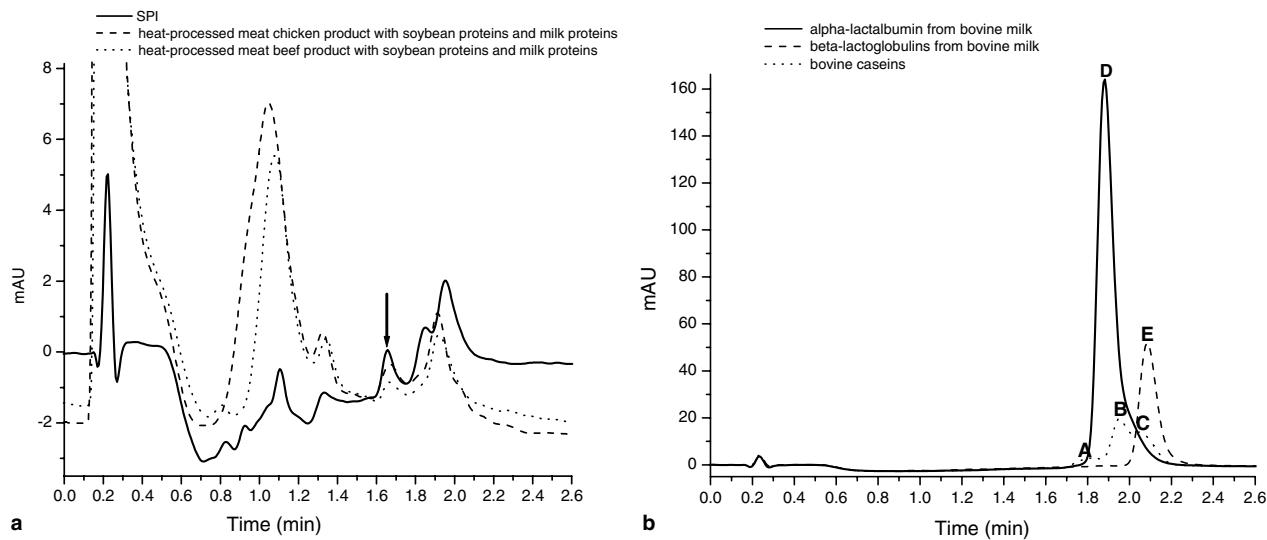


Fig. 3. Chromatograms corresponding to a heat-processed chicken meat product containing soybean and milk proteins (meat product J) (152 mg/ml referred to initial product), a heat-processed beef meat product containing soybean and milk proteins (meat product L) (31 mg/ml referred to initial product), and the SPI (1.0 mg/ml of soybean proteins) (a). Chromatograms obtained from a solution of 1.12 mg/ml of bovine caseins (corresponding to a casein content of 0.5% (w/w) related to 6 g of initial product), a solution of 1.34 mg/ml of α -lactalbumin (corresponding to a α -lactalbumin content of 0.5% (w/w) related to 6 g of initial product), and a solution of 1.00 mg/ml of β -lactoglobulin (corresponding to a β -lactoglobulin content of 0.5% (w/w) related to 6 g of initial product) (b). Experimental conditions as in Fig. 1.

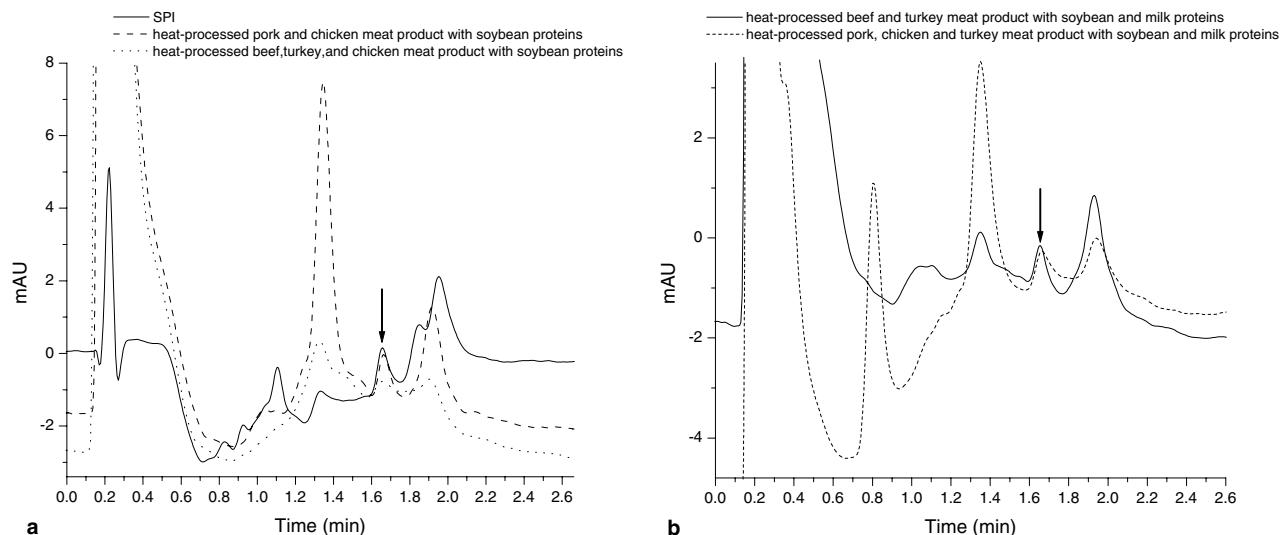


Fig. 4. Chromatograms obtained for heat-processed meat products with soybean proteins containing mixtures of pork and chicken meats (meat product M) (185 mg/ml referred to initial product) and containing mixtures of beef, turkey and chicken meats (meat product O) (176 mg/ml referred to initial product) and to SPI (1 mg/ml of soybean proteins) (a). Chromatograms obtained for heat-processed meat products with soybean and milk proteins containing mixtures of beef and turkey meats (meat product N) (192 mg/ml referred to initial product) and containing mixtures of pork, chicken, and turkey meats (meat product P) (212 mg/ml referred to initial product) (b). Experimental conditions as in Fig. 1.

32 mg/ml of a heat-processed chicken meat product (meat product J), was better than 0.9% in retention time and better than 5% in peak area. The intermediate precision in different days was determined by injecting a solution of 39 mg/ml of a heat-processed pork and chicken meat product (meat product M) in three days. The RSD values observed were better than 0.4% in retention time and close to 3.0% in peak area. The variability in the content determined in three days was close to 4.5%. The robustness of

the method was determined by comparison of the results obtained by the intentional use of two different detector flow cell volumes. The soybean protein contents determined with both flow cells for a heat-processed pork and chicken meat product with soybean proteins did not differ significantly (F - and t -tests (P value, 9.3% > 5%).

The recovery of the method was evaluated by spiking with different amounts of SPI the extracts obtained from five heat-processed meat products and from a raw meat

Table 2

Investigation of the existence of matrix interferences^a

Sample	Slopes of the calibration lines ^b		Comparison of slopes (proportional bias)		Soybean protein concentration (mg/100 mg sample) ^c		Comparison of soybean protein contents	
	External standard method (ES)	Standard additions method (SA)	t-Value ^d	P-value (%) ^e	ES	SA	t-Value ^d	P-value (%) ^e
Meat product I	4.44 ± 0.09 ^f	4.45 ± 0.08 ^f	0.19	87.0	0.59 ± 0.17	0.37 ± 0.07	1.71	23.6
Meat product K	2.86 ± 0.16 ^g	2.83 ± 0.02 ^g	0.31	80.0	0.58 ± 0.03	0.57 ± 0.29	0.06	>90.0
Meat product M	4.74 ± 0.06 ^f	4.61 ± 0.04 ^f	2.60	13.1	0.71 ± 0.00	0.63 ± 0.08	1.49	39.9
Meat product N	4.54 ± 0.19 ^f	4.43 ± 0.02 ^f	0.82	49.9	0.39 ± 0.11	0.34 ± 0.19	0.23	85.0
Meat product O	2.94 ± 0.16 ^g	2.67 ± 0.03 ^g	2.30	16.0	0.40 ± 0.06	0.31 ± 0.01	2.02	18.7

^a Results expressed as is basis.^b Average value of the slopes of two straight lines.^c Mean of two individual determinations.^d Calculated t-value.^e Significance level (P-value) associated.^f Slope obtained by using a diode-array detector with a standard flow cell.^g Slope obtained by using a diode-array detector with a microcell.

Table 3

Analytical characteristics of the perfusion RP-HPLC method for the analysis of soybean proteins in complex heat-processed meat products

Specificity ^a	$y = 0.969(0.015)x - 0.045(0.059)$			
Repeatability (RSD, %) (n = 10) ^b	Sample			
Retention time	0.81			
Peak area	4.80			
Intermediate precision (different days) (RSD, %) ^c				
Retention time	0.34			
Peak area	3.02			
Concentration	4.56			
Robustness (%) ^{d,e}				
Detector flow cell volume	Conventional parameters ^f 0.708(0.003)			
Recovery (%) ^h	Modified parameters ^g 0.761(0.024)			
Model meat product 2	1.61 (mg/ml)	3.24 (mg/ml)	4.85 (mg/ml)	6.47 (mg/ml)
Meat product J	95.7 ± 0.1	94.7 ± 2.3	95.8 ± 0.4	—
Meat product L	95.3 ± 0.7	95.2 ± 1.5	96.5 ± 0.7	—
Meat product N	99.9 ± 2.8	97.8 ± 1.7	—	97.0 ± 1.8
Meat product M	96.7 ± 2.7	106.3 ± 0.8	99.6 ± 0.7	100.3 ± 0.4
Meat product O	100.2 ± 1.7	96.1 ± 0.9	97.2 ± 0.5	96.1 ± 0.5
	96.7 ± 1.3	98.0 ± 1.1	95.3 ± 1.7	—
Absolute recovery (%) ⁱ				
Processed meat spiked with 1.95% soybean proteins	104.3 ± 0.0			
Processed meat spiked with 2.89% soybean proteins	87.2 ± 1.7			

^a A t-test for the verification of slope and intercept were statistically equal to the unit and zero, respectively. Standard deviation of slope and intercept are given in parenthesis.^b Number of injections of a solution of a heat-processed chicken product with soybean and milk proteins (meat product J) (32 mg/ml referred to initial product).^c Analysis performed by the external standard method in different days.^d Injection of a solution of 39.3 mg/ml of a heat-processed pork and chicken meat product with soybean proteins (meat product M) in three days.^e Concentration of soybean proteins determined by the external standard method using detector flow cells of different volumes and a heat-processed pork and chicken meat product with soybean proteins (meat product M).^f Analysis performed using a diode array detector with a standard flow cell of 10 mm of way length and a volume of 13 µl.^g Analysis performed using a diode array detector with a flow microcell of 6 mm of way lenght and a volume of 1.7 µl.^h Recovery of soybean proteins when different amounts of SPI were added to the extract obtained from a heat-processed meat product.ⁱ Recovery of soybean proteins when different amounts of SPI were initially added to heat-processed meat products.

product (model product 2). Recoveries obtained ranged from 95% to 106% not observing any difference between the recoveries obtained for the raw meat product and for the products submitted to heat processing. Moreover, the recovery (absolute recovery) was also determined by directly spiking a heat-processed meat product with two

different amounts of SPI. Values of recovery of 104% and 87% were obtained.

The accuracy was also checked by comparing the soybean protein contents obtained by the proposed method and by the official ELISA for seven heat-processed meat products and for two raw meat products and the results

Table 4

Soybean protein contents determined in different commercial heat-processed meat products and in two raw meat products by the ELISA method and the proposed HPLC method^a

Meat products	Protein concentration (mg/100 mg sample)	
	ELISA ^b	Perfusion HPLC ^c
Processed meat products with soybean proteins		
Meat product A	—	1.11
Meat product B	0.88	1.05 ^d
Meat product C	—	1.89
Meat product D	1.06	0.83(0.26) ^e
Meat product E	0.98	0.87
Meat product F	—	0.61 ^d
Meat product G	—	0.76
Meat product H	0.62	0.64
Meat product I	—	0.59
Meat product M	—	0.71
Meat product K	—	0.58
Meat product O	—	0.31
Meat product Q	—	<LDQ ^f
Processed meat product with soybean and milk proteins		
Meat product J	0.98	0.81
Meat product L	—	0.68 ^d
Meat product N	0.44	0.38
Meat product P	1.23	0.89 ^d
Raw meat products with soybean proteins		
Model meat product 2	1.12	1.22
Model meat product 3	1.24	1.16

^a Results expressed as is basis.

^b Determined following the official AOAC method 998.10.

^c Determined by the proposed method. Most determinations were performed by duplicate.

^d Only one determination.

^e Mean of three individual determinations. Standard deviation given in parenthesis.

^f Soybean protein content lower than the quantitation limit of the method (0.28%, w/w).

obtained are shown in Table 4. No statistically significant differences between the contents determined by both methods were detected when applying a paired *t*-test (*P* value = 18.6% > 5%). The slope and intercept of the equation of the straight line obtained by plotting of the soybean protein contents obtained by the proposed method against the contents obtained by the ELISA method were 0.834 (0.167) and 0.067 (0.164), respectively. These values did not significantly differ from the unit and zero, respectively, when a *t*-test was applied.

3.5. Application to edible samples

The method was applied to the determination of the soybean protein content in 17 commercial heat-processed meat products (A–Q). Since there was not a reference certified standard of soybean proteins, a soybean protein isolate was chosen as standard of soybean proteins. Three were the reasons supporting this selection: the SPI is the soybean product with the highest protein content, the SPI is commercially available, and the SPI is the soybean product most widely added in the manufacturing of heat-processed

meat products. The SPI Supro 500E was chosen as standard, since it had been used in the preparation of some of the meat products studied (those prepared by Campofrío Alimentación S.A.). The soybean protein contents obtained are also shown in Table 4. The concentrations of soybean proteins determined in the meat samples containing only soybean proteins ranged from 0.40% to 1.89%. These values were within the limits authorised by the Spanish law, 3% of soybean proteins referred to the product as is basis (Legislación Alimentaria de Aplicación en España, 2002). For the meat products containing soybean and milk proteins, lower contents of soybean proteins ranging from 0.38% to 0.86% were observed. In these cases, the Spanish law admits the addition of up to a 3% of soybean + milk proteins. Thus, the lower content in soybean proteins in these samples is justified.

4. Conclusion

The validity of a previous method developed for the determination of soybean proteins in heat-processed pork and turkey meat products has been shown for the analysis of products prepared with chicken meat, beef meat, or complex mixtures of meats from different species (chicken, pork, beef, and turkey). The presence of milk proteins did not interfere in the determination of soybean proteins in these products. The proposed method did not suffer from matrix interferences and was specific and reproducible when it was applied to the analysis of these samples. Trueness of the method was checked by means of recovery studies observing values close to 100%. Furthermore, the soybean protein contents obtained for several meat-products by the proposed method and by the ELISA method were compared and no statistically significant differences were found. The main advantages of the proposed method are easy sample preparation, short analysis time, and low cost resulting in an interesting alternative to the ELISA method.

Acknowledgements

The authors thank the Comunidad Autónoma de Madrid (Spain) (Project 07G/0025/2003) and the Ministerio de Ciencia y Tecnología (Spain) (Project FIT-060000-2002-37, Programa de Fomento de la Investigación Técnica (PROFIT)) for financial support. PROFIT project has been developed in collaboration with Campofrío Alimentación S.A. (Spain). The authors also thank the Laboratorio de Salud Pública (Madrid, Spain) for its collaboration in the application of the ELISA method and F. Castro-Rubio thanks the Ministerio de Educación y Ciencia (Spain) for her Predoctoral fellowship.

References

- Andersson, A., Andersson, K., & Tornberg, E. (2000). A comparison of fat-holding between beefburgers and emulsion sausages. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 555–560.

- AOAC Official Method, 998.10. Soy protein in raw and heat-processed meat products, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. In Official Methods of Analysis, (16th ed., Rev. 1996, 1997, 1998). Gaithersburg, MD: AOAC International.
- Belloque, J., García, M. C., Torre, M., & Marina, M. L. (2002). Analysis of soyabean proteins in meat products. A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 42, 507–532.
- Castro, F., García, M. C., Rodríguez, R., & Marina, M. L. (2005). Simple and inexpensive method for the reliable determination of additions of soybean proteins in heat-processed meat products: an alternative to the AOAC official method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 220–226.
- Castro, F., Marina, M. L., Rodríguez, J., & García, M. C. (in press). Easy determination of additions of soybean proteins in heat-processed meat products prepared with turkey meat or pork–turkey meat blends that could also contain milk proteins. *Food Additives and Contaminants*.
- Criado, M., Castro, F., García-Ruiz, C., García, M. C., & Marina, M. L. (2005). Detection and quantitation of additions of soybean proteins in cured-meat products by perfusion reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Separation Science*, 25, 987–995.
- Egbert, W. R., Huffman, D. L., Chen, C. M., & Dylewski, D. P. (1991). Development of low-fat ground beef. *Food Technology*, 45, 64–73.
- Koppelman, S. J., Lakemond, C. M. M., Vlooswijk, R., & Hefle, S. L. (2004). Detection of soybean proteins in processed foods: literature overview and new experimental work. *Journal of AOAC International*, 87, 1398–1407.
- Legislación Alimentaria de Aplicación en España. (2002). (Clasificación por Alimentos). Carne, aves, caza y derivados: norma genérica de calidad para productos cárnicos tratados por el calor, Eypasa: Madrid.
- Pearson, A. M., & Gillett, T. A. (1996). Sausages. In A. M. Pearson & T. A. Gillett (Eds.), *Processed meats* (pp. 210–241). New York: Chapman & Hall.
- Pietrasik, Z., & Duda, Z. (2000). Effect of fat content and soy protein/carrageenan mix on the quality characteristics of comminuted, scalped sausages. *Meat Science*, 56, 181–188.
- Riaz, M. N. (1999). Soybeans as functional foods. *Cereal Foods World*, 44, 88–92.
- Shand, P. J. (1997). Mimetic and synthetic fat replacers for the meat industry. In A. M. Pearson & T. R. Dutson (Eds.), *Advanced in meat research* (pp. 191). London: Chapman & Hall.
- Yman, M. Y. (2004). Detection of inadequate labelling and contamination as causes of allergic reactions to food. *Acta Alimentaria*, 33, 347–357.
- Yusof, S. C. M., & Babji, A. S. (1996). Effect of non-meat proteins, soy protein isolate and sodium caseinate, on the textural properties of chicken bologna. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 47, 323–329.

III.2 CARACTERIZACIÓN DE PROTEÍNAS DE SOJA POR HPLC DE PERFUSIÓN ACOPLADA A LA ESPECTROMETRÍA DE MASAS

Una vez desarrolladas las metodologías analíticas para la determinación de proteínas de soja en productos cárnicos por HPLC de perfusión, se consideró interesante llevar a cabo la caracterización del pico correspondiente a las proteínas de soja seleccionado para su cuantificación utilizando para ello la Espectrometría de Masas. En efecto, los distintos picos cromatográficos en los que se separan las proteínas de soja procedentes del haba de soja o de un aislado de proteína de soja deben corresponder a las proteínas mayoritarias de soja, la globulina 7S o β -conglicinina y la globulina 11S o glicinina. Aunque nuestro grupo de investigación estableció a partir de la inyección en el sistema cromatográfico de las fracciones 7S y 11S de la soja que los primeros picos del cromatograma podrían corresponder principalmente a la fracción 7S mientras que los últimos picos en eluir de la columna podrían corresponder a la fracción 11S, este hecho aún no había sido demostrado. Por tanto, nos propusimos como objetivo de esta parte del trabajo de investigación llevar a cabo la caracterización de los picos cromatográficos obtenidos para distintas habas de soja y las fracciones 7S y 11S obtenidas a partir de dichas habas utilizando la Espectrometría de Masas.

Con el fin de conseguir los objetivos propuestos, se acopló por primera vez la HPLC de perfusión a un detector de Espectrometría de Masas de Trampa de Iones (IT-MS) y se llevó a cabo también por primera vez la caracterización de habas de soja mediante análisis de las proteínas de soja intactas.

En primer lugar, fue necesario modificar el método cromatográfico desarrollado en el apartado anterior con el fin de poder adaptarlo a su acoplamiento con detección IT-MS. En efecto, el método anterior se basaba en la utilización de una columna de 50 mm x 4.6 mm de diámetro interno y un flujo de 3 mL/min. Las modificaciones que se realizaron consistieron en la utilización de una columna de perfusión de 100 mm x 2.1 mm de diámetro interno y un flujo de fase móvil de 0.5 mL/min. Además, el gradiente de elución

se optimizó de modo que en estas condiciones se pudiera llevar a cabo la separación adecuada de las proteínas de soja.

Por otra parte, al ser la primera vez que se analizaban por MS proteínas intactas de soja, se llevó a cabo también la optimización de las condiciones de detección por MS. Los parámetros optimizados fueron: el potencial de la sonda ESI, el potencial de los octapolos, el potencial aplicado a la salida del capilar y el potencial del skim. De todos los valores que se probaron para estos parámetros, se eligieron aquellos que permitían obtener la mayor respuesta para las proteínas de soja.

Utilizando este nuevo método optimizado para la separación de las proteínas de soja por HPLC de perfusión-IT-MS, se analizaron diferentes habas de soja con distinta pigmentación, habas amarillas, habas verdes, habas rojas y habas negras. Asimismo, se analizaron las fracciones 7S y 11S obtenidas a partir de dichas habas.

Los resultados obtenidos en esta parte del trabajo de investigación se recogen en el siguiente artículo científico:

- *"Perfusion reversed-phase high-performance liquid chromatography/mass spectrometry analysis of intact soybean proteins for the characterization of soybean cultivars"*.
F. Castro-Rubio, M. L. Marina y M. C. García.
J. Chromatogr. A, 1170 (2007) 34-43.

A partir de los resultados descritos en este artículo se pudo confirmar que los últimos picos en el cromatograma de un haba de soja correspondían a la globulina 11S y que por tanto, el pico seleccionado en el apartado anterior para la determinación de las proteínas de soja en productos cárnicos debían corresponder a esta proteína. Sin embargo, la identificación de picos cromatográficos característicos de las habas de soja sólo fue posible para las habas amarillas mientras que no se pudo llevar a cabo para el resto de las habas con diferente pigmentación.

Además, se pudo observar que los cromatogramas obtenidos fueron característicos de la pigmentación de las habas de modo que los cromatogramas correspondientes a las habas amarillas fueron muy distintos de los obtenidos para las habas verdes, rojas y negras excepto en el caso de un tipo de habas negras. Los cromatogramas obtenidos para habas de una misma pigmentación fueron idénticos independientemente de que esas habas hubieran sido vendidas como soja o como otro cultivo (*azuki* en el caso de habas rojas o *mungbean* en el caso de habas verdes). Estas diferencias entre las habas de soja amarillas y las habas con distinta pigmentación se confirmaron al analizar las fracciones 7S y 11S de las habas estudiadas.

Por tanto, es posible indicar que a partir de los resultados obtenidos en esta parte del trabajo de investigación además de establecer la posibilidad de que el pico seleccionado como “marcador” para determinar proteínas de soja en productos cárnicos corresponde a la globulina 11S, también se derivó una aplicación muy interesante: la posibilidad de identificar habas de soja diferenciándolas de otros cultivos similares en apariencia pero que pueden tener distintas propiedades nutricionales o funcionales: el *azuki* y el *mungbean*. En efecto, la identificación de proteínas características de la soja en las habas analizadas permitió autentificar las habas de soja y diferenciarlas de otros cultivos similares.

Artículo científico 4

Perfusion reversed-phase high-performance liquid chromatography/mass spectrometry analysis of intact soybean proteins for the characterization of soybean cultivars.

F. Castro-Rubio, M. L. Marina, M. C. García.

J. Chromatogr. A, 1170 (2007) 34-43.

Provided for non-commercial research and education use.
Not for reproduction, distribution or commercial use.



Volume 1170, issues 1–2, 2 November 2007 ISSN 0021-9673

Complete in one issue

JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY A

INCLUDING ELECTROPHORESIS, MASS SPECTROMETRY AND
OTHER SEPARATION AND DETECTION METHODS

EDITORS

J.G. Dorsey (Tallahassee, FL)
S. Fanali (Rome)
R.W. Giese (Boston, MA)
P.R. Haddad (Hobart)
C.F. Poole (Detroit, MI)
M.-L. Riekkola (Helsinki)
P.J. Schoenmakers (Amsterdam)
V. Schurig (Tübingen)
N. Tanaka (Kyoto)
S. Terabe (Hyogo)

EDITORS, SPECIAL VOLUMES

U.A.Th. Brinkman (Amsterdam)

E. Heimann (Walnut Creek, CA)

EDITORIAL BOARD

K.D. Alna (Nedow)
A. Bartovics (Vienna)
D. Beavis (Victoria)
T. Cova (Giverny, FR)
F. Dangelmaier (Vienna)
G.J. de Jong (Utrecht)
G.L. Dunn (Madison)
A. Felzani (Pavia)
F. Foret (Brno)
B. Freitag (Freiburg)
M.-J. Gallois (Barcelona)
M.S. Gatzke (Madison, WI)
C.A. Goodeon (Kensington, MD)
A. Grushko (Jerusalem)
B. Hahn (Vienna)
S. Jardine (Perth)
H. Koenigsberg (Berlin)
A. Kunkle (Farmington Hills, MI)
R.T. Kennedy (Ann Arbor, MI)
H.K. Lee (Singapore)
C.A. Lucy (London)
D. Massart (Maastricht)
I. Mestal (Madrid, Spain)
U.O. Neue (Münster, Germany)
W.H. Orlitzky (Austin)
H. Oishi (Osaka)
S. Otsuka (Tokyo)
H. Pernarau (Vienna)
M. Peticola (Vienna)
D. Pichler (Vienna)
M. Riva (Bari)
L.C. Rios (Gaithersburg, MD)
R. Sandhu (Kurtis)
A. Schmid (Heidelberg)
R.M. Smith (Edinburgh)
J.R. Snyder (Orinda, CA)
R. Stalder (Zürich)
R.E. Symons (Seattle, WA)
D.J. Tingle (Edinburgh)
E. van Zoonen (Edmonton)
S.T. Westermark (Research Triangle Park, NC)
S.Y. Zheng (Dalian)
H. Zou (Zhejiang)

Available online at

ScienceDirect
www.sciencedirect.com

This article was published in an Elsevier journal. The attached copy is furnished to the author for non-commercial research and education use, including for instruction at the author's institution, sharing with colleagues and providing to institution administration.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/copyright>



Perfusion reversed-phase high-performance liquid chromatography/mass spectrometry analysis of intact soybean proteins for the characterization of soybean cultivars

Florentina Castro-Rubio, M^a Luisa Marina, M^a Concepción García *

Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, University of Alcalá, Ctra. Madrid-Barcelona, Km. 33.600. 28871 Alcalá de Henares (Madrid) Spain

Received 4 June 2007; received in revised form 5 September 2007; accepted 6 September 2007

Available online 19 September 2007

Abstract

Perfusion reversed-phase HPLC (RP-HPLC)-electrospray mass spectrometry (ESI-MS) was employed for the characterization of soybean cultivars through the analysis of intact soybean proteins. The similarities and differences between yellow soybeans (the most usual soybeans) and other beans with different pigmentation (green, red, and black) commercialized as soybean were investigated. Red beans commercialized as *azuki* that are frequently sold as red soybean were also analyzed. Separation was carried out using a perfusion column at a flow-rate of 0.5 mL/min and a gradient elution. A step-by-step procedure was used for the optimization of the mass spectrometry parameters enabling the most sensitive detection. The method was applied to the analysis of the above-mentioned beans and the main soybean proteins (11S and 7S globulins) obtained by a fractionation procedure. MS spectra obtained from every peak in the beans and in their fractions were compared observing clear differences between yellow soybeans and the other beans with different pigmentation. The identification of some soybean proteins in yellow soybeans was also possible.

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Soybean; Intact proteins; Mass spectrometry; RP-HPLC; Chromatography; Perfusion

1. Introduction

Soybean is a highly appreciated legume due to its valuable functional and nutritional properties. In addition to the most usual yellow soybean, it is possible to find other beans with different pigmentation that are also marketed as soybean. According to Williams [1] soybean seed coat can present different colours: black, brown or red, green, and yellow. All these beans are considered to be different varieties of soybean cultivars [2,3]. Genetically, the seed coat colour in soybean is controlled by the gen I locus. The coats of most commercial soybean varieties are yellow due to the presence of a dominant allele of the I locus gen which inhibits seed coat pigmentation by avoiding the accumulation of anthocyanin pigments in the epidermal layer of soybean seed coat [4–6]. However, green, red, and black soybeans are considered by other authors [7,8] and,

especially in their original countries (mainly China), as other kinds of legumes. In fact, green soybean could be a different legume called *mung bean* (*Vigna radiata* (L.) Wilezek) while the marketed as red soybean could be a legume called *azuki bean* (*Vigna angularis* (Willd.) Ohwi & Ohashi) [7]. Similarly, black soybeans can be purchased as black soybeans or as *black soybean frijoles*.

Differentiation among soybean cultivars has been performed by analyzing different parts of the seed. The most accurate studies were based on the analysis of DNA or on the analysis of soybean proteins. Main proteins in soybean are 11S globulin or glycinin and 7S globulin or conglycinin. Both proteins are storage proteins not presenting any biological activity. 11S globulin presents a molecular weight ranging from 350 to 380 kDa and has a quaternary structure constituted by twelve subunits forming a dimer of two identical hexamers. Six of these subunits are acid (A₁, A₂, and A₄ with a molecular weight of 37 kDa, A₃ with 43 kDa, and A₅ with 13 kDa) while the other six subunits are basic (18–20 kDa). Acid and basic subunits are joined by disulphuric bonds [9–11]. On the other hand, the main

* Corresponding author. Fax: +34 91 8854971.
E-mail address: concepcion.garcia@uah.es (M^a.C. García).

constituent of 7S globulin is β -conglycinin, a glycoprotein with a molecular weight of 180 kDa. This protein forms trimeric structures constituted by a combination of the following acid subunits: α subunit (75–76 kDa), α' subunit (57–83 kDa), and β subunit (42–53 kDa). In addition to these storage proteins, there are other minor proteins including protease inhibitors (Kunitz inhibitor (19.6 kDa) and Bowman-Birk inhibitor (7.8 kDa)), lectins (110–120 kDa, constituted by four subunits of 30 kDa each), lipoxygenase (94–97 kDa), etc. [12,13].

Soybean protein analysis for cultivar differentiation has been carried out mainly using chromatographic methods. HPLC in the reversed-phase (RP-HPLC) or in the exclusion-size modes were used by Buelher et al. [14] and Oomah et al. [15] for this purpose. Results demonstrated the difficulty in the differentiation among similar soybean cultivars from their chromatographic profile. Our research group analyzed soybean varieties with different coat pigmentation (yellow, green, red, and black) by HPLC in the reversed-phase [16] and in the ion-exchange (IE-HPLC) [17] modes. In RP-HPLC, seeds presenting the same coat pigmentation showed, in general, the same chromatographic profile that was different to that observed for other pigmented beans. The application of IE-HPLC for the same purpose did not enable any clear differentiation since all seeds showed similar chromatographic separations. More recently, capillary electrophoresis was also used for this purpose observing very different electrophoretic profiles for those seeds presenting different coat pigmentation [18].

The application of mass spectrometry (MS) to the analysis of food proteins (especially milk proteins) has resulted in an extensive number of research articles [19–23]. Regarding soybean proteins, MS has been used for the characterization of some standard soybean proteins such as soybean agglutinin and soybean trypsin inhibitor [23–29]. Other works reported the proteomic analysis of some soybean proteins mainly based on the trypsin digestion of soybean proteins, electrophoretic separation of fragments, and mass spectrometry analysis of spots [30–34]. Nevertheless, to our knowledge, there is no work devoted to the characterization of soybeans through the analysis of intact soybean proteins.

The aim of this work was to characterize soybeans and to study the similarities and differences between yellow soybeans and other similar beans with different coat pigmentation marketed as soybeans. Perfusion RP-HPLC–ESI-MS will be used for the separation and detection of intact proteins in different beans marketed as soybeans and in their protein fractions.

2. Experimental

2.1. Chemicals and samples

HPLC-grade acetonitrile (ACN) (Merck, Darmstadt, Germany), Milli-Q water (Milli-Q system, Millipore, Bedford, MA, USA), and trifluoroacetic acid (TFA) (Sigma, St. Louis, MO, USA) were employed for the preparation of mobile phases. Petroleum ether, *tris*-(hydroxymethyl)aminomethane (Tris), 2-mercaptoethanol (Merk), and hydrochloric acid (Panreac,

Barcelona, Spain) were employed for the fractionation of soybean proteins. Protein standards (soybean trypsin–chimotrypsin inhibitor, lectin, and lipoxygenase) were from Sigma. The soybean protein isolate was from ICN (Aurora, OH, USA).

Ten different beans, eight commercialized as soybean (three yellow, two green, one red, and two black) and two commercialized as *azuki*, were purchased in local markets in Madrid (Spain). The characteristics of these beans are grouped in Table 1.

The fractionation of proteins from these beans was performed following a procedure based on a method described by Thanh and Shibasaki for the isolation of the 7S and 11S globulins in soybeans [35] that was modified by our research group [16].

Solutions were prepared by dissolving the appropriate amount of sample (ground seed or fraction) in an appropriate volume of water by sonication at 25 °C for 5 min and centrifugation (3362 g) for 10 min. The concentration of solutions prepared from the whole beans ranged from 20 to 30 mg/mL while solutions prepared from the precipitated 11S and 7S fractions were around 60 mg/mL. Whey fractions (supernatant remaining after precipitation of 7S and 11S globulins) were injected as they were.

2.2. High-performance liquid chromatography

An 1100 Hewlett-Packard liquid chromatograph (Hewlett-Packard, Pittsburgh, PA, USA) equipped with a binary delivery solvent system and a diode-array detector was employed. A Poros R2/H perfusion column (100 mm × 2.1 mm I.D.) (Perseptive Biosystems, Framingham, MA, USA) was used for the separation of proteins. These separations were performed at a flow-rate of 0.5 mL/min using a solvent gradient from 5 to 14% B in 12 min, 14–16% B in 1 min, 16–20% B in 2 min, 20–28% B in 1 min, 28–40% B in 8 min, 40–45% B in 2 min, and 45–95% B in 0.5 min. Mobile phase A consisted of Milli-Q water and 0.05% (v/v) TFA and mobile phase B was ACN with 0.05% (v/v) TFA. The injected volume was 5 μ L, the separation temperature was 60 °C and UV detection was performed at 254 nm.

Table 1
Seed morphological traits of the studied beans

Commercial name	Pigmentation		Size (mm)	Shape
	External	Internal		
Yellow soybean (yellow A)	Yellow	Yellow	7	Round
Yellow soybean (yellow B)	Yellow	Yellow	7	Round
Yellow soybean (yellow C)	Yellow	Yellow	7	Round
Green soybean (green A)	Green	Green	5	Oval
Green soybean (green B)	Green	Yellow	5	Oval
Red soybean (red A)	Red	Yellow	7	Oval
<i>Azuki</i> (red B)	Red	Yellow	7	Oval
<i>Azuki</i> (red C)	Red	Yellow	7	Oval
Black soybean (black A)	Black	Green	7	Round
Black soybean frijoles (black B)	Black	Yellow	10–12	Oval

2.3. Mass spectrometry

HPLC was connected to an ion-trap mass spectrometer equipped with an orthogonal electrospray ionization interface (model 1100 from Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA). MS control, data acquisition, and data analysis were carried out using the LC/MSD Trap Software 5.2. The instrument was firstly tuned to get the MS conditions enabling the highest responses in the ion positive mode. These MS conditions were: capillary voltage, -3000 V; end plate offset, -500 V; skim 1 voltage, 45 V; capillary exit offset voltage, 50 V; octopole voltage, 3 V; octopole delta voltage, 0.5 V. Mass spectra were registered in the full-scan mode (m/z , 600–2000; the maximum accumulation time was 300 ms). The dry gas flow-rate was 10 L/min, the dry temperature was 350 °C, the target mass was 1500 m/z , and the nebulizer pressure was 40 psi.

Mass spectra deconvolution was performed with the LC1100/MSD Trap Deconvolution and Bioanalysis software from Agilent Technologies.

3. Results and discussion

3.1. Optimization of the chromatographic conditions

A perfusion RP-HPLC method enabling the separation of soybean proteins and their detection by ESI-MS was designed. Perfusion RP-HPLC has only been employed by our research team in order to separate soybean proteins [16]. However, the previously employed experimental conditions using UV detection were not adequate when MS detection was tried. In fact, the separation of soybean proteins was achieved using a 50 mm × 4.6 mm I.D. column and a flow-rate of 3 mL/min and mobile phases contained a high proportion of TFA [16]. These experimental conditions were modified in the present article in order to do them compatible with MS detection. Thus, a 2.1 mm I.D. perfusion column commercially available with a 100 mm length was used enabling a flow-rate of 0.5 mL/min. Moreover, mobile phase composition was also changed by reducing the percentage of TFA from 0.1% (v/v) to 0.05% (v/v). Finally, the elution gradient was reoptimized for the suitable separation of soybean proteins (see Section 2). As examples, the chromatographic separations obtained under these conditions using UV detection at 254 nm for yellow bean A, green bean A, red bean B, and black bean B are shown in Fig. 1. Chromatograms obtained were characteristics of every pigmentation with the exception of black soybean A and all yellow soybeans that presented identical chromatograms.

3.2. Optimization of mass spectrometry conditions

This is the first time that intact soybean proteins were analyzed with MS detection. For this reason, the following parameters were optimized: capillary voltage, octopole voltage, octopole delta voltage, capillary exit offset voltage, and skim voltage. Optimization was performed using a solution 20 mg/mL of a soybean protein isolate. Fig. 2 shows the results obtained at every value of every studied parameter. The values yielding the

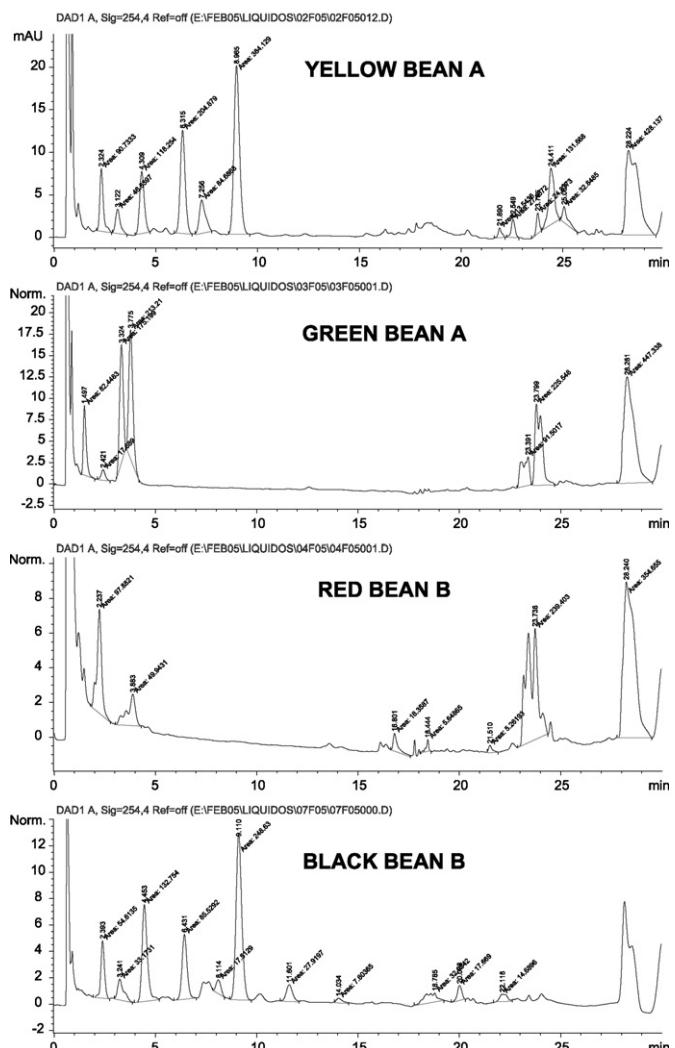


Fig. 1. Separations obtained from the yellow bean A, the green bean A, the red bean B, and the black bean B by RP-HPLC and UV detection at 254 nm. Experimental conditions indicated in the text.

best results in every case are highlighted in the table included in Fig. 2.

The use of a capillary voltage of -3000 V enabled to observe the highest signal not obtaining any significant improvement when using more negative capillary voltages. The selected octopole voltage was 4 V for the sensitive detection of soybean proteins and the octopole delta voltage showing the best results was 0.5 V. The lowest capillary exit offset voltage tried (50 V) resulted to yield the highest response. Regarding the skim voltage, the highest responses were observed at intermediate values selecting 45 V for following measurements.

3.3. Application of the method to the analysis of different beans

Total ion chromatograms (TICs) obtained for yellow soybean A, green soybean A, red soybean A, and black soybean B are shown in Fig. 3. Unlike UV detection at 254 nm and regardless of the pigmentation, the first peaks in all cases were negligi-

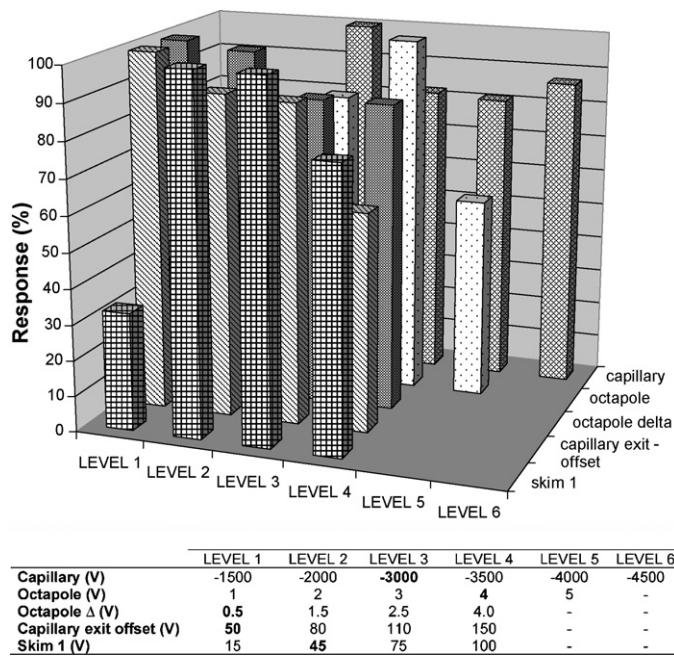


Fig. 2. Optimization of detection conditions by mass spectrometry. Chromatographic conditions as in Fig. 1. Injected sample, 20 mg/mL of soybean protein isolate. The values yielding the best results for every parameter were highlighted in the table.

ble while the last peaks were the predominant when using MS detection. This could be explained taking into account the variable mobile phase composition. In fact, mobile phase was more aqueous at the beginning of the separation than at the end. Since

the ionization procedure is easier in presence of an organic modifier such as ACN, this could result in a better ionization of last peaks eluting with a higher ACN proportion than least retained peaks. Moreover, and similarly to that observed when using UV-detection, the TIC was characteristic of those beans having the same coat pigmentation. Thus, the profiles observed for the yellow seeds (the most common soybean) were very different to those corresponding to the other pigmented beans studied. In the case of red beans, the TIC obtained for the red bean commercialized as soybean was identical to the observed for the two red seeds commercialized as azuki. The two black seeds, as in UV detection, presented different TICs. In fact, the TIC corresponding to the black soybean A was similar to that observed for yellow soybeans while black soybean B presented a different TIC.

Table 2 shows main signals obtained from those peaks in the TIC whose spectra for all beans having the same pigmentation were similar with the exception of black beans. Moreover, the molecular mass was included in the cases in which the spectra enabled it. Additionally, in the case of yellow soybeans, some of the spectra could be assigned to certain subunits or proteins (peaks at 17.2, 17.5, 20.0, 21.6, 23.3–23.6). As an example, Fig. 4 shows the signals of the peaks yielding similar spectra for yellow soybeans.

The comparison of the spectrum corresponding to the peak at 17.5 min with those observed in Fig. 5 corresponding to some antinutritional compounds present in soybean (trypsin inhibitors (Kunitz and Bowman-Birk), lectin, and lipoxygenase), enabled to conclude that the Bowman-Birk trypsin inhibitor was likely

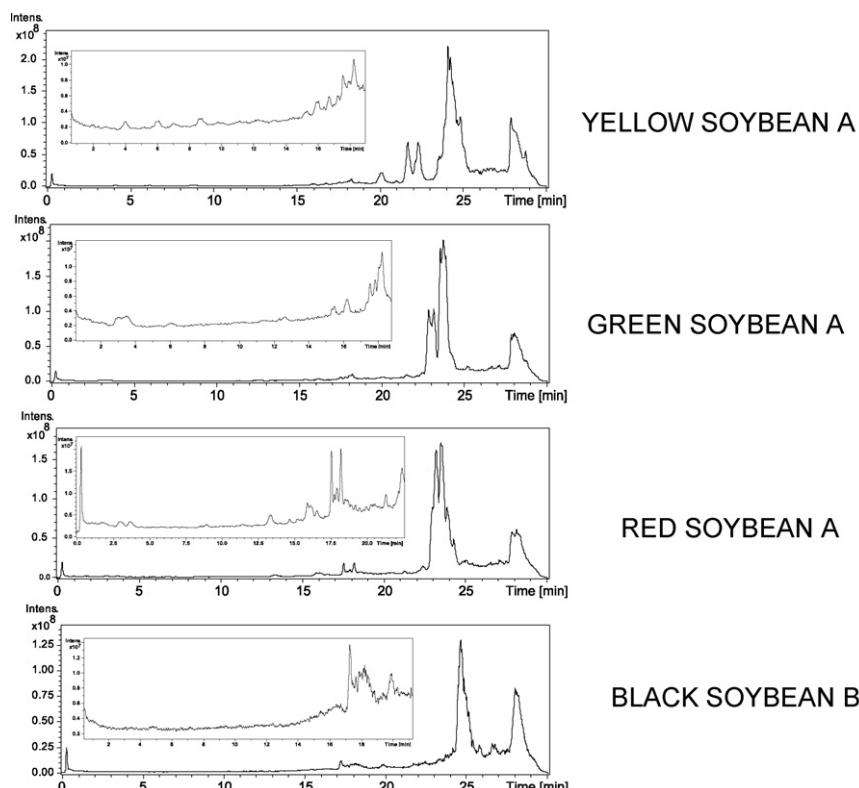


Fig. 3. TICs obtained for the yellow bean A, the green bean A, the red bean A, and the black bean B by perfusion RP-HPLC and MS detection. Experimental conditions indicated in the text.

Table 2
Molecular weights and peak assignation

Yellow beans	Peak (min)	Characteristic signals (<i>m/z</i>)	Mol. weight (kDa) and assignation
	6.0	1090	—
	8.7	1091	—
	15.8	935.4; 1704.1; 1883.3	—
	17.2	1662.8 (8+) 1889.0 (7+)	13.3 (acidic A ₅ subunit of 11S globulin)
	17.5	1572.3 (5+) 1964.8 (4+)	7.8 (Bowman-Birk trypsin inhibitor)
	20.0	797.4; 943.3; 1438.0	43 (Acidic A ₃ subunit of 11S globulin)
	21.6	1288.4 1563.0 (13+) 1693.1 (12+)	20.3 (Basic subunit of 11S globulin)
	22.3	1067.7 (29+) 1146.9 (27+) 1190.8 (26+) (13+) 1290.0 (24+) (12+) 1407.0 (22+) (11+) 1474.4 (21+)	15.5 and 30.9 kDa
	23.3–23.6 ^a	1175.7 (17+) 1263.8 (16+) 1332.3 (15+) 1427.8 (14+) 1665.4 (12+) 1198.2 (10+) 1747.0 (23+) 1826.5 (22+) 1915.0 (21+)	20 (basic subunit of 11S globulin)
	28.8	782.5	—
Green beans	2.6–4.0 ^a	889.0; 1342.8	—
	13.0	1023.4 (5+) 1278.8 (4+) 1704.8 (3+)	5.1
	15.4	1328.6 1480.7 (6+) 1777.1 (5+)	8.9
	16.2	1146.7 (40+) 1271.7 (36+) 1390.0 (33+) 1581.2 (29+) 1697.8 (27+)	45.8
	28.8	758.4	—
Red beans	1.6–2.4 ^a	649.1	25
	3.8	633.1; 681.2	—
	9.0	1370.3 (10+) 1521.4 (9+)	13.7
	13.6	1081.4 (5+) 1351.6 (4+) 1801.8 (3+)	5.4
	14.6	962.4 (4+) 1283.4 (3+)	3.8
	15.2	891.3 (3+) 1338.4 (2+)	2.7
	16.0	1254.0 (7+) (14+) 1463.1 (6+) (12+) 1598.1 (11+) 1755.5 (5+) (10+) 1997.4 (9+)	8.8 and 17.6
	16.7	1519.8 (6+) 1823.2 (5+)	9.1
	21.3	1223.0 (11+) 1345.5 (10+) 1494.6 (9+) 1681.2 (8+)	13.4
	28.8	758.8; 1162.7; 1264.5; 1403.6; 1562.1; 1758.2	—
Black bean B	17.3	1253.1	25
		1673.4 (15+) 1792.8 (14+)	—
	19.9	959.2	—
	27.8	1254.2; 1365.2; 1850.3	—
	28.7	613.3; 967.2; 1178.2; 1711.3	—

^a A range in retention time was given when it was not referred to a whole peak but to a part of a peak or band.

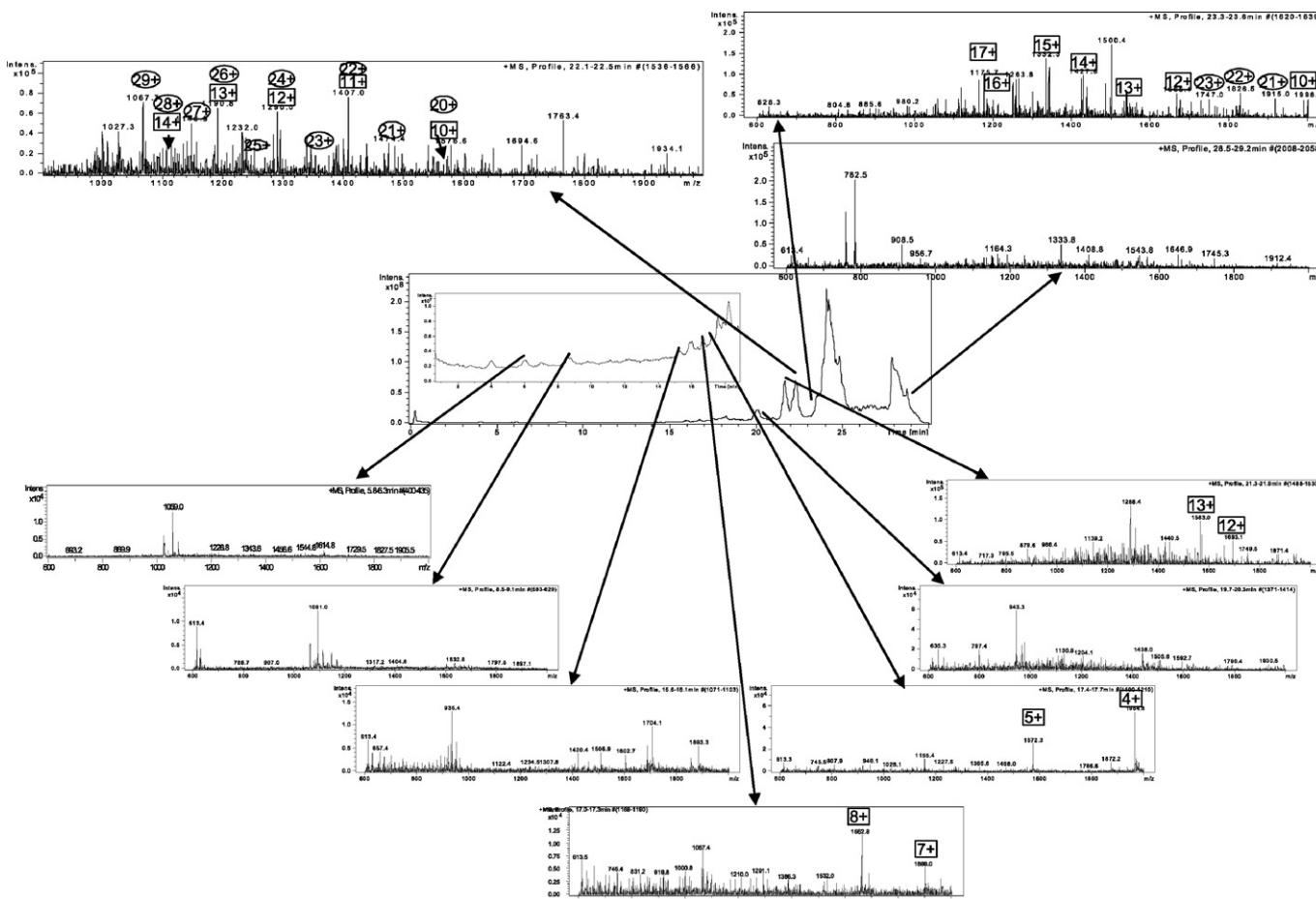


Fig. 4. Characteristic spectra of the peaks yielded by the yellow soybean A. Experimental conditions indicated in the text.

eluting in this peak. The peak at 20.0 min showed a spectrum with a huge signal at 943 m/z whose deconvolution resulted, in all yellow seeds, in a molecular mass of around 43 kDa that could correspond to the A_3 acidic subunit of the 11S globulin. The peak at 22.3 min showed a spectrum enabling the clear identification of a molecule with a molecular mass of 15.5 kDa and its dimer (30.9 kDa) in all yellow seeds while the shoulder of the next peak (23.3–23.6 min) yielded a mass spectrum that corresponded to two different molecules of 20.0 and 40.1 kDa, respectively.

According to Fig. 5 that groups the TIC and spectra of some soybean standards, Kunitz inhibitor and lipoxygenase should appear at a retention time of 26.5 min while lectins should elute between 25.5 and 26.5 min. The search for these proteins in the TICs of the yellow soybeans enabled to think that these antinutritional compounds were not present at a high enough concentration to be detected.

Regarding green and red beans, in some cases it was possible to assign a spectrum to a molecular mass but in no case, these spectra could be attributed to any protein or subunit expected in soybean as it was for yellow soybeans.

The spectra observed for the black soybean A at 8.8, 15.8, 17.5 (trypsin inhibitor), and 22.3 min, that of the shoulder at 23.3–23.6 min, and that corresponding to the last part of the last peak (at 28.6–28.9 min) were very similar or identical to those

of yellow soybeans grouped in Table 2 and shown in Fig. 4. Moreover, at 16.7 min, some of the signals observed in the spectrum of the black soybean A also appeared in all (1682 m/z) or in some ($1023, 1183, 1313, 1391\text{ m/z}$) of the yellow soybeans. None of these signals were detected in the black soybean B. The rest of peaks in the black soybean A yielded different spectra to the given for any of the yellow soybeans. The spectra obtained from some of the peaks observed for the black seed B are shown in Table 2. At 27.8 min, both black soybean A and B presented a spectrum with a main signal at 1365.2 m/z that was not detected in any of the yellow beans.

3.4. Study of mass spectra from peaks of the chromatograms obtained for the proteic fractions from different beans

Proteins contained in the ten different beans used in this work were fractionated as described in Section 2. As example, the TICs corresponding to the 7S fraction, 11S fraction, and the whey fraction obtained from the yellow soybean A are shown in Fig. 6. The TICs corresponding to the 7S fractions always presented the peaks appearing in the first half of the whole seed TICs, while the 11S fractions mainly showed the last peaks. The main signals observed in the spectra of the main peaks appearing in the fractions obtained from the different pigmented beans are grouped in Table 3.

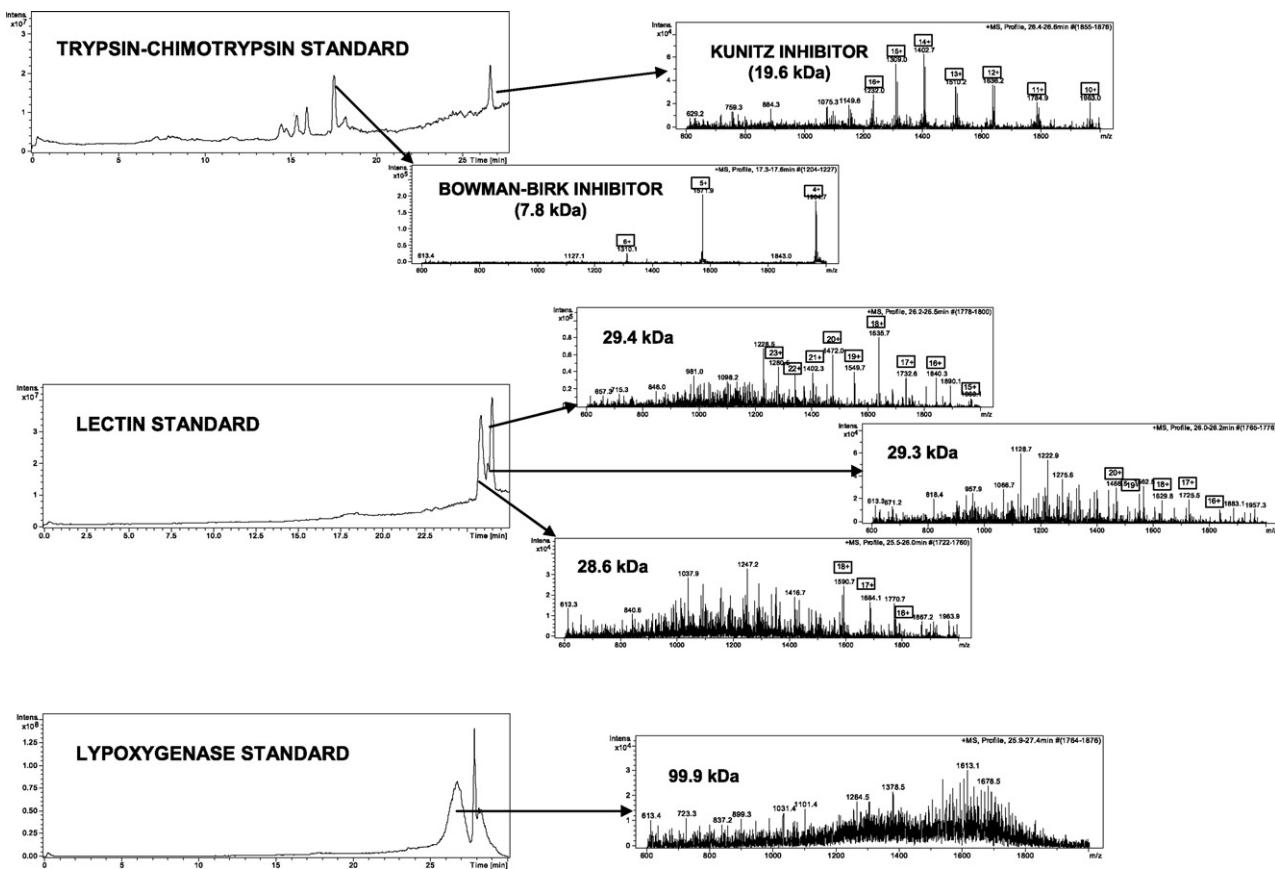


Fig. 5. TIC and spectra obtained by the injection of soybean trypsin-chimotrypsin inhibitors, lectins, and lipoxygenase. Experimental conditions indicated in the text.

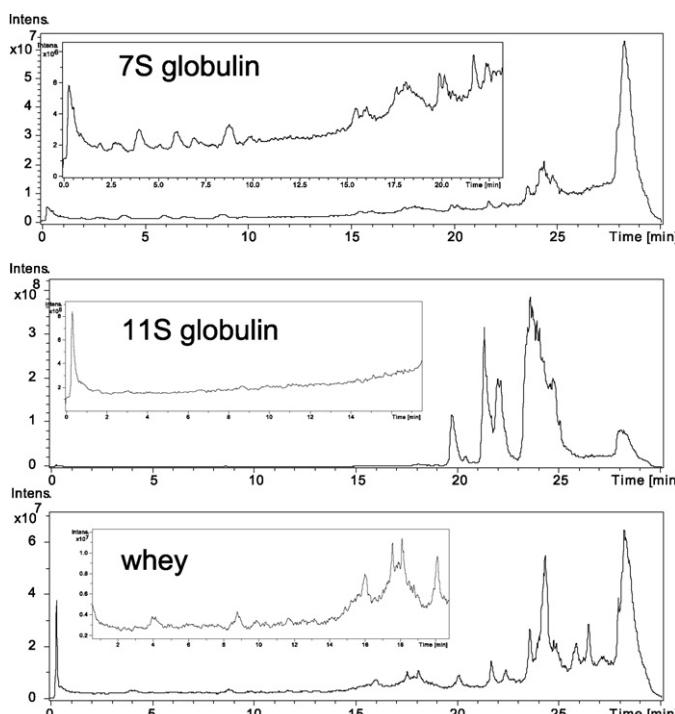


Fig. 6. Characteristic TICs obtained for the 11S globulin, 7S globulin, and the whey fraction obtained from the yellow seeds. Experimental conditions indicated in the text.

In the case of yellow soybeans, the 7S fractions showed some minor peaks not observed in the whole yellow soybeans in addition to the first peaks. The spectra for peaks at 6.1 and 8.8 min were similar to those shown in Fig. 4 for the yellow soybean A. Moreover, at 23.7 min, a common signal at 1332 m/z was observed in all 7S fractions and in all whole yellow seeds. The most important feature in the 11S fractions was the peak at 22.3 min yielding the spectra that could correspond to a molecule of 15 kDa and its dimer (30 kDa). These results were identical to the extracted for the same peak in the whole yellow soybeans.

Whey fractions from yellow soybeans presented tiny peaks in common with the 7S and 11S fractions that could be from contamination with the previous precipitated fractions or that could correspond to molecules present in the whey fraction but eluting at the same retention times than other present in the 7S and 11S fractions. At 17.5 min, the only whey fraction showing a peak was that from the yellow soybean A. The spectra corresponding to this peak was identical to the trypsin inhibitor. The peak at 23.7 min showed identical spectra in the three wheys and clearly corresponded to a protein of 20 kDa. These spectra were also very similar to the observed for the same peak in the whole soybeans. Peaks at 25.7, 26.4, and 27.1 min appeared only in the whey of the yellow soybean A and their retention times were those at which lectins, lipoxygenase, and Kunitz trypsin inhibitors appeared (see Fig. 5). The spectra of peaks at 25.7 and 26.4 min were similar to the observed in Fig. 5 for the lectin

Table 3

Main signals observed in the spectra of the main peaks appearing in the different fractions obtained from yellow and red beans

<i>t_R</i>	2.0	3.0	4.1	5.0	6.1 ^a	8.0 ^c	8.8 ^a	9.2 ^d	11.0 ^e	15.4	15.8	17.5	18–19	19.8	21.7	22.3	23.7	24–25	25.7	26.4	28–29
Yellow beans																					
7S fraction	1522	946	1522		1522	1059 ^b	778	1091 ^b	975	776	891	847 ^e	Noise	Noise	Noise	No common signal	1332	No common signal	–	–	No common signal
	1522					1556	1299	845	935			975 ^e									
						1747		3.9 kDa	1163	1402		1269 ^e									
									1576		1385 ^e										12.6 kDa
11S fraction	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	No common signal	No common signal	1789 ^e	1032	23–25	–	–	–	No common signal	
															1067	No common signal					
															1106						
															1190						
															1238						
															1290						
															1407						
															1474						
															1548						
															1629						
															1719						
															1820						
															1934						
															31/15.4 kDa						
Whey fraction	–	–	No common signal	–	–	–	1160	–	–	–	935 ^g	1572 ^b	1107 ^a	975 ^a	No common signal	No common signal	1111	No common signal	1591	1280	No common signal
				–	–	–		–	–	–	1091 ^f		975	1965	1437 ^a		1176	1684	1339		
													1269	7.8 kDa			1249	1790	1402		
											1389	Trypsin inhibitor					1332	28.6 kDa	1473		
																	1427	Lectin	1550		
																	1537		1736		
																	1665		1732		
																	1817		1840		
																	1998		29.4 kDa		
																	20 kDa	Lectin			
Red beans																					
7S fraction	2.4 ^h	–	4.8	7.2	–	1048	–	–	–	–	17.4–19	–	–	–	–	23–24.5	–	–	–	No common signal	
	707		652 ⁱ	993 ⁱ		1571					1441										
	843		791 ⁱ	1140 ⁱ		3.1 kDa															
	1263		956 ⁱ																		
			1433 ^j																		
			2.9 kDa																		

References

- [1] L.F. Williams, in: K.S. Markley (Ed.), *Structure and Genetic Characteristics of the Soybean, Soybeans and Soybean Products*, Interscience Publishers, New York, 1950, p. 111.
- [2] N. Van Huan, H. Sugimoto, K. Harada, *Breeding Sci.* 55 (2005) 441.
- [3] J.D. Lee, Y.H. Yoon, I.K. Chung, S.K. Park, Y.H. Hwang, *Breeding Sci.* 55 (2005) 21.
- [4] M. Senda, A. Jumonji, S. Yumoto, R. Ishikawa, T. Harada, M. Niizeki, S. Akada, *Theor. Appl. Genet.* 104 (2002) 1086.
- [5] J.J. Todd, L.O. Vodkin, *Plant Physiol.* 102 (1993) 663.
- [6] J.T. Lindstrom, L.O. Vodkin, *Plant Cell* 3 (1991) 561.
- [7] S.J. Lee, K.G. Lee, *Food Chem. Toxicol.* 43 (2005) 515.
- [8] P.Y. Lin, H.M. Lai, *J. Agric. Food Chem.* 54 (2006) 3807.
- [9] S. Petruccelli, M.C. Añón, *J. Agric. Food Chem.* 43 (1995) 1762.
- [10] E.L. Arrese, D.A. Sorgentini, J.R. Wagner, M.C. Añón, *J. Agric. Food Chem.* 39 (1991) 1029.
- [11] J.C. Cheftel, in: J.C. Cheftel, J.L. Cuq, D. Lorient (Eds.), *Proteínas Alimentarias. Bioquímica. Propiedades Funcionales. Valor Nutritivo. Modificaciones Químicas*, Acribia, Zaragoza, 1989, p. 257.
- [12] I.E. Liener, *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 34 (1994) 31.
- [13] D.F. Hildebrand, W. Liu, W. Deng, W.S. Grayburn, G.B. Collins, in: J. Ratnay (Ed.), *Progress in Biotechnological Approaches in the Improvement of Soybean Seed Quality*, in: *Biotechnol. Plants Fats Oils*, Am. Oil Chem. Soc., Champaign, IL, 1991, p. 58.
- [14] R.E. Buehler, M.B. McDonald, T.T. Van Toai, S.K. St. Martin, *Crop Sci.* 29 (1989) 32.
- [15] B.D. Oomah, H. Voldeng, J.A. Fregeau-Reid, *Plant Foods Hum. Nutr.* 45 (1994) 251.
- [16] M.C. García, J.M. Heras, M.L. Marina, *J. Sep. Sci.* 30 (2007) 475.
- [17] J.M. Heras, M.L. Marina, M.C. García, *J. Chromatogr. A* 1153 (2007) 97.
- [18] C. García-Ruiz, M.C. García, A. Cifuentes, M.L. Marina, *Electrophoresis* 28 (2007) 2314.
- [19] D.N. Nguyen, G.W. Becker, R.M. Riggan, *J. Chromatogr. A* 705 (1995) 21.
- [20] J. Leónil, V. Gagnaire, D. Mollé, S. Pezennec, S. Bouhallab, *J. Chromatogr. A* 881 (2000) 1.
- [21] M. Careri, A. Mangia, *J. Chromatogr. A* 1000 (2003) 609.
- [22] M. Carbonaro, *Trends Food Sci. Technol.* 15 (2004) 209.
- [23] H.F. Alomirah, I. Alli, Y. Konishi, *J. Chromatogr. A* 893 (2000) 1.
- [24] D.K. Mandal, E. Nieves, L. Bhattacharyya, G.A. Orr, J. Roboz, Q.T. Yu, C.F. Breweer, *Eur. J. Biochem.* 221 (1994) 547.
- [25] X.J. Tang, C.F. Brewer, S. Saha, I. Chernushevich, W. Ens, K.G. Standing, *Rapid Commun. Mass Spectr.* 8 (1994) 750.
- [26] S. Natarajan, C.P. Xu, H. Bae, T.J. Caverne, W.M. Garrett, *J. Plant Biochem. Biotech.* 15 (2006) 103.
- [27] S.S. Gray, R. Montgomery, *Carbohydr. Res.* 341 (2006) 198.
- [28] J.A.E. Kraunsoe, R.T. Aplin, B. Green, G. Lowe, *FEBS Lett.* 396 (1996) 108.
- [29] D. Bergeron, S.S. Nielsen, *J. Agric. Food Chem.* 41 (1993) 1544.
- [30] A. Leitner, F. Castro-Rubio, M.L. Marina, L. Wolfgang, *J. Proteome Res.* 5 (2006) 2424.
- [31] M. Hajduch, A. Ganapathy, J.W. Stein, J.J. Thelen, *Plant Physiol.* 137 (2005) 1397.
- [32] S. Natarajan, C. Xu, T.J. Caperna, W.M. Garrett, *Anal. Biochem.* 342 (2005) 214.
- [33] B.P. Money, J.J. Thelen, *Phytochemistry* 65 (2004) 1733.
- [34] E. Gianazza, I. Enerini, A. Arnoldi, R. Wait, C.R. Sirtori, *J. Nutr.* 133 (2003) 9.
- [35] V.H. Thanh, K. Shibasaki, *J. Agric. Food Chem.* 24 (1976) 1117.

III.3 IDENTIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE SOJA EN EL PICO CROMATOGRÁFICO UTILIZADO COMO “MARCADOR” EN PRODUCTOS CÁRNICOS POR CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS MULTIDIMENSIONAL ACOPLADA A LA ESPECTROMETRÍA DE MASAS EN TÁNDREM

Una vez establecido en el apartado anterior por HPLC de perfusión-IT-MS que el pico seleccionado para la determinación de las proteínas de soja en productos cárnicos eluye al mismo tiempo de retención que los picos del haba de soja que corresponden a la globulina 11S, nos propusimos confirmar este resultado caracterizando el pico “marcador” de proteínas de soja en productos cárnicos elaborados con proteínas de soja e identificar exactamente las subunidades proteicas que estaríamos proponiendo como marcadores de proteínas de soja en productos cárnicos.

Como ya se ha mencionado, la globulina 7S o β -conglicinina y la globulina 11S o glicinina son las proteínas de almacenamiento mayoritarias en la soja. La β -conglicinina forma trímeros no específicos de las tres subunidades mayoritarias (α , α' y β) que no están ligados covalentemente. La glicinina está usualmente presente como un heterodímero de 2 subunidades, A y B, que se unen mediante un enlace disulfuro. Estos heterodímeros forman hexámeros *in vivo*. En total, se conocen cinco variantes para esta proteína. Tanto las variantes de la β -conglicinina como de la glicinina poseen secuencias bastante homólogas y por tanto fue necesario diseñar una estrategia que permitiera identificar inequívocamente las distintas variantes.

Con este fin, se procedió a aislar el pico cromatográfico que habíamos seleccionado como “marcador” de proteínas de soja en distintos productos cárnicos con distinta composición y también en un aislado de proteína de soja con el fin de comparar los resultados. Los picos aislados se sometieron a hidrólisis enzimática con tripsina y la mezcla peptídica resultante se analizó por nano-HPLC acoplada a Espectrometría de Masas en tandem (nano-HPLC-MS/MS) constituyendo prácticamente el primer estudio proteómico de la soja llevado a cabo. De esta forma se aseguraba tener suficiente capacidad de picos para identificar inequívocamente los péptidos obtenidos cosa que

probablemente no hubiera sido posible realizando la digestión enzimática de todas las proteínas de soja a la vez.

Los resultados obtenidos se recogen en el artículo científico:

- *"Identification of marker proteins for the adulteration of meat products with soybean proteins by multidimensional liquid chromatography-tandem mass spectrometry".*
A. Leitner, F. Castro-Rubio, M. L. Marina y W. Lindner.
J. Proteome Research, 5 (2006) 2424-2430.

Siguiendo la estrategia descrita en este artículo, fue posible identificar diferentes subunidades A de la glicinina en el pico “marcador” de proteínas de soja en productos cárnicos elaborados con estas proteínas. De estas subunidades, la glicinina G4 subunidad A4 fue la que se encontró en todos los productos cárnicos analizados, independientemente de su composición. En consecuencia, esta subunidad proteica se consideró la mejor candidata para ser utilizada como “marcador” de proteínas de soja en productos cárnicos. De esta forma sería posible detectar adulteraciones de productos cárnicos a través del pico seleccionado que pondría de manifiesto la adición de proteínas de soja a productos a los que la legislación prohíbe su adición. Por otra parte, el mismo pico permitiría establecer el porcentaje de proteínas de soja añadido durante la elaboración de un producto cárneo al cual la legislación permite la adición de proteínas de soja hasta un límite, poniendo de manifiesto si dicho porcentaje excede o no el límite establecido por la legislación.

Artículo científico 5

Identification of marker proteins for the adulteration of meat products with soybean proteins by multidimensional liquid chromatography-tandem mass spectrometry.

A. Leitner, F. Castro-Rubio, M. L. Marina, W. Lindner.

J. Proteome Research, 5 (2006) 2424-2430.

Identification of Marker Proteins for the Adulteration of Meat Products with Soybean Proteins by Multidimensional Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry[†]

Alexander Leitner,^{*,‡} Florentina Castro-Rubio,[§] Maria Luisa Marina,[§] and Wolfgang Lindner[‡]

Department of Analytical Chemistry and Food Chemistry, University of Vienna, 1090 Vienna, Austria, and Departamento de Química Analítica, Facultad de Química, Universidad de Alcalá, 28871 Alcalá de Henares, Madrid, Spain

Received April 5, 2006

Soybean proteins are frequently added to processed meat products for economic reasons and to improve their functional properties. Monitoring of the addition of soybean protein to meat products is of high interest due to the existence of regulations forbidding or limiting the amount of soybean proteins that can be added during the processing of meat products. We have used chromatographic prefractionation on the protein level by perfusion liquid chromatography to isolate peaks of interest from extracts of soybean protein isolate (SPI) and of meat products containing SPI. After enzymatic digestion using trypsin, the collected fractions were analyzed by nanoflow liquid chromatography–tandem mass spectrometry. Several variants and subunits of the major seed proteins, glycinin and β -conglycinin, were identified in SPI, along with two other proteins. In soybean-protein-containing meat samples, different glycinin A subunits could be identified from the peak discriminating between samples with and without soybean proteins added. Among those, glycinin G4 subunit A4 was consistently found in all samples. Consequently, this protein (subunit) can be used as a target for new analytical techniques in the course of identifying the addition of soybean protein to meat products.

Keywords: multidimensional chromatography • tandem mass spectrometry • soybean proteins • meat products • glycinin

Introduction

Soybean proteins are added to a variety of food products due to their interesting functional properties and low cost.¹ In meat products, for example, they serve as emulsifiers to avoid fat coalescence during heat treatment. However, regulatory authorities in some countries have forbidden soy protein or limited the amount that can be added, and if such threshold levels for soybean protein content in foodstuff have been established, appropriate analytical techniques are needed for the reliable detection or/and quantitation of soybean proteins in meat products. Currently, there are only a limited number of methods available for the (semi)quantitative determination of soybean proteins in processed meat products. The AOAC Official Method,² based on an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), has been criticized by regulatory authorities (e.g., the US Food and Drug Administration) because of its limited reliability and accuracy. In addition, highly sensitive assays would be desirable to be able to detect low ppm amounts of soybean proteins due to their allergenic potential.³ Liquid chromatographic assays have also been proposed.^{4–5} Neverthe-

less, raw meats were analyzed in these works, and the direct determination of soybean proteins in commercial heat-processed meat products was not attempted. Recently, a perfusion chromatography method introduced by Marina and co-workers enabled the reliable quantitation of soybean proteins in commercial heat-processed meat products.⁶ This wide-pore polymeric separation material tolerates high flow rates, thus allowing for short run times (typically less than 5 min), although at a price of relatively low loadability. Applying perfusion LC in combination with UV detection, a “marker” peak was identified that unambiguously differentiates between samples with and without added soybean proteins.^{6–8} The method has since been applied to other foodstuffs.^{9–10}

Chromatographic techniques that employ UV detection do not reveal any structural information about the compound(s) responsible for the signal or the potential soybean proteins, respectively. Therefore, combining the above-mentioned perfusion LC method with downstream mass spectrometric detection would significantly enhance the information content available from this method. So far, proteomic analysis of soybeans has predominantly relied on two-dimensional gel electrophoresis as a separation technique.^{11–14} The most comprehensive study to date by Hajduch et al. identified more than 200 nonredundant proteins by MALDI-TOF peptide mass fingerprinting.¹³ In the present method, we have used a gel-

* To whom correspondence should be addressed. E-mail: alexander.leitner@univie.ac.at.

[†] Dedicated to Professor Klaus Albert on the occasion of his 60th birthday.

[‡] University of Vienna.

[§] Universidad de Alcalá.

free approach to identify proteins contained in the marker peak of the perfusion chromatography separation developed by Marina et al. for the determination of soybean proteins in heat-processed meat products.⁶ The fraction of interest was collected, proteins were digested with trypsin, and the resulting peptide mixture was analyzed by nanoflow liquid chromatography–tandem mass spectrometry (nanoLC–MS/MS). Special attention was given to the differentiation of individual variants of the major seed storage proteins in the soybean.

Experimental Section

Standards and Samples. Soybean protein isolate (SPI) Supro 500E (Anvisa, Madrid, Spain) was employed. Heat-processed meat products from pork, chicken, and turkey with and without soybean proteins in their composition were supplied by Campofrío Alimentación, S.A. (Burgos, Spain). A beef meat product with soybean proteins in its composition was purchased in a local market in Madrid (Spain).

Extraction Procedure for Soybean Protein Isolate and Meat Products. Soybean proteins from the soybean protein isolate were directly extracted in 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) at 50 °C for 10 min, according to previously published procedures.⁶ Heat-processed meat products (beef, pork, chicken, and turkey) containing SPI were defatted with acetone as described previously⁶ prior to the extraction of soybean proteins.

Fractionation of Protein Extracts by Perfusion Liquid Chromatography. Fractionation was performed on an Agilent 1100 Series HPLC system (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany). Extracts were separated on a Poros R2/H perfusion column (100 mm × 2.1 mm, PerSeptive Biosystems, Framingham, MA) using the following conditions: Mobile phase A = 0.05% trifluoroacetic acid (TFA) in water, mobile phase B = 0.05% TFA in acetonitrile; gradient = 0–4.8 min from 5% to 25% B, 4.8–9.6 min from 25% to 42% B, 9.6–22.8 min from 42% to 50% B. The flow rate was set to 500 µL min⁻¹, and the column was kept at 50 °C. The eluent was monitored at 280 nm. Fractions were collected manually and evaporated to dryness under a stream of nitrogen.

SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE). SDS-PAGE was carried out on a Bio-Rad Mini-PROTEAN 3 system (Bio-Rad, Vienna, Austria) using self-cast linear gels (8% resolving gel). Proteins were visualized using Coomassie staining (EZBlue, Sigma) according to the manufacturer's protocol.

Tryptic Digestion and Analysis by Nanoflow Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. Dried residues obtained from the perfusion chromatography fractionation were reconstituted in 8 M urea. Disulfide bonds were reduced using dithiothreitol (10 mM DTT, 55 °C, 60 min) followed by alkylation of free thiol groups with iodoacetamide (50 mM, room temperature, 90 min) according to standard procedures. Samples were then diluted to approximately 0.8 M urea with 50 mM aqueous NH₄HCO₃, and trypsin (proteomics grade, Sigma) was added at an enzyme-to-substrate ratio of approximately 1:25. Samples were digested overnight at 37 °C and purified by solid-phase extraction (C₁₈ material) prior to evaporation under a stream of nitrogen.

For nanoLC–MS/MS analysis, an Agilent Nanoflow Proteomics Solution system was used, consisting of a nanoLC system and a SL model quadrupole ion trap equipped with an orthogonal nanoelectrospray source. Samples were reconstituted in 20–100 µL of water/acetonitrile/formic acid 95:5:0.1, v/v, and 1–4 µL was used for each run. Samples were first injected onto a trapping column (Agilent Zorbax 300 SB-C18,

5 mm × 300 µm i.d.), followed by a 5-min washing step using 0.05% formic acid in water/acetonitrile 98:2, v/v, at 30 µL min⁻¹. The trapping column was then switched in-line with the analytical column (Agilent Zorbax 300 SB-C18, 50 mm × 75 µm i.d. or 150 mm × 75 µm i.d.), and gradient elution was performed using the following conditions: Mobile phase A = 0.1% formic acid in water, mobile phase B = 0.1% formic acid in acetonitrile; gradient for 50 mm column = 0–30 min from 5% to 50% B, 30–35 min at 50% B, 35–40 min from 50% to 80% B; gradient for 150 mm column = 0–90 min from 5% to 50% B, 90–95 min from 50% to 80% B. The flow rate was 250 nL min⁻¹ for both columns. The analytical column was directly connected to a distal-coated 8 µm o.d. SilicaTip emitter (New Objective, Woburn, MA) for nanoelectrospray ionization.

The mass spectrometer was configured to acquire one full scan mass spectrum followed by MS/MS spectra of the two most abundant ions from each full scan in the range of 400–1500 Th (*m/z* units). Three MS/MS spectra were collected for each precursor ion and dynamic exclusion for two minutes was used after two fragmentation events. MS and MS/MS spectra were acquired in the range of 200–2000 Th.

Data Analysis. MS and MS/MS data were processed with the software provided with the instrument (LC/MSD Trap software 4.2, Bruker Daltonik, Bremen, Germany) and exported in a Mascot-compatible format. The peak lists obtained were then searched against the UniProtKB/SwissProt database (release 47.5, dated 19/07/05, 186882 entries) using an in-house Mascot server running version 2.0.5 (Matrix Science Ltd., London, UK). Parameters were set as follows (see also Figure 1): taxonomy = all entries or green plants, enzyme = trypsin, fixed modifications = carbamidomethylation on Cys, variable modifications = no or oxidation on Met, peptide tolerance = ±1.5 Da, MS/MS tolerance = ±0.8 Da, peptide charge = 2+/3+ or 4+, instrument = ESI trap.

All spectra corresponding to peptides from soybean proteins and potential contaminants or meat proteins were manually examined and accepted only if they fulfilled the following criteria: at least seven assigned b- or y-ions, of which at least three consecutive b- or y-ions, individual peptide score at least 18 for doubly and triply charged ions, 15 for quadruply charged ions. The validated peptide list (available as Supporting Information, Tables S-1 and S-2) was used to create a list of corresponding proteins; identification on the protein level was only considered when at least one peptide was identified in two replicate analyses. Assignment of peptides to different variants of glycinin and conglycinin was performed using the sequence alignment tool ClustalW (<http://www.ch.embnet.org/software/ClustalW.html>, accessed 30/03/2006) under consideration of the mass accuracy and resolution obtainable with the ion trap instrument (I = L, Q ~ E ~ K).

Results

Setup of the Study. Because the marker peak discriminating between meat samples with and without added soybean protein as observed by perfusion LC with UV detection is of relatively high intensity, it was expected that glycinin and β-conglycinin, the major seed storage proteins from soybean, contributed at least in part to the signal of this peak. Glycinin is normally present as a heterodimer of two subunits, A and B, that are linked via an interchain disulfide bond; these heterodimers then form hexamers in vivo. Overall, five major glycinin variants are listed in the UniProt/SwissProt database. β-Conglycinin, on the other hand, forms nonspecific trimers

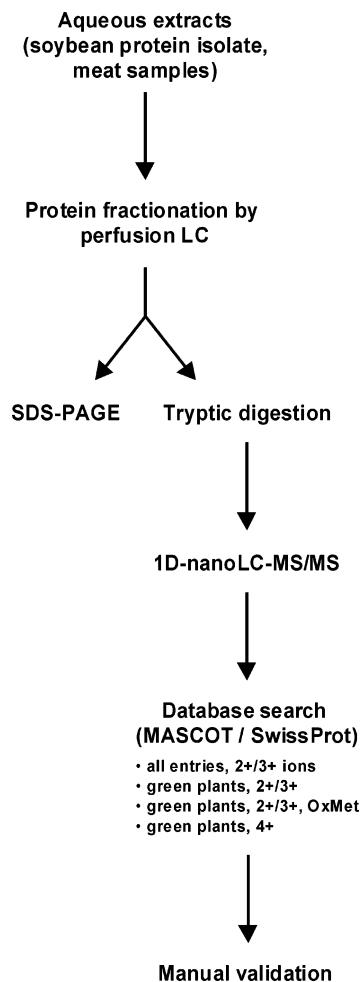


Figure 1. Strategy for the analysis and identification of soybean proteins in heat-processed meat products.

of the three major subunits (α , α' , and β) that are not covalently linked. Both the variants of glycinin and conglycinin possess a relatively large sequence homology (Table 1, Figures S-1 and S-2 in Supporting Information), and this had to be taken into account for the design of the study. It was necessary to obtain high sequence coverage to be able to differentiate between the different variants so that a marker protein (variant) could be unambiguously identified.¹⁵

To achieve this objective, we proposed a two-dimensional chromatographic separation prior to tandem mass spectrometric analysis. In the first step, proteins are relatively crudely fractionated on a perfusion LC column to obtain a less complex protein mixture. The column is packed with a polystyrene-divinylbenzene copolymer material with two classes of pores, throughpores (6000–8000 Å) and diffusive pores (800–1500 Å), and separation occurs predominantly on the basis of hydrophobic interactions. Collected fractions of interest are then digested by trypsin, and the resulting peptide mixture is analyzed by nanoflow liquid chromatography–tandem mass spectrometry. This way, sufficient peak capacity is obtainable to allow most eluting peptides to be selected for data-dependent MS/MS, something that would not be guaranteed by a “shotgun” approach involving digestion of the whole protein mixture prior to any separation step.

In addition, one-dimensional gel electrophoresis (SDS-PAGE) was used to provide estimated molecular weights of the proteins in the fractions. In this way, the presence of individual

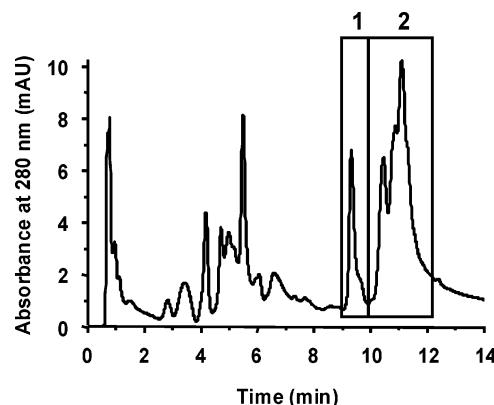


Figure 2. Separation of proteins extracted from soybean protein isolate by perfusion liquid chromatography. UV absorption was monitored at 280 nm. Peaks labeled with **1** (“marker” peak for meat samples) and **2** were collected for further analysis. For details, see text.

subunits and dimers of glycinin could be differentiated even if proteins from only one subunit were identified. In-gel digestion of protein bands proved to be less efficient, so that gel electrophoresis was not used for downstream MS analysis.

Characterization of Soybean Protein Isolate by NanoLC–MS/MS and SDS–PAGE. As a first approach, soybean protein isolate was analyzed by the procedure outlined above. Figure 2 shows a typical chromatogram of an SPI extract monitored by UV detection at 280 nm. The two main fractions, marked as **1** and **2**, were collected for further analysis. Peak **1** corresponds to the diagnostic “marker” peak for the identification of soybean protein addition in meat products. The largest peak **2** was also collected because there is no complete separation between the two and proteins might be detected in one peak that elute mainly in the other as a result of the limited selectivity of the first LC separation dimension.

Analysis of the collected fractions by SDS–PAGE resulted in three bands with approximate molecular weights of 25, 30, and 35 kDa for fraction **1** and four bands at 35, 50, and 75 (two narrowly separated bands) kDa for fraction **2**.

NanoLC–MS/MS analysis of the digested fraction **1** identified four variants of the A subunit of glycinin (A1a, A2, A3, and A4; see Table 2) and peptides from the long chain of 2S albumin. No peptides from glycinin B subunits were found, corresponding to the molecular weight information obtained by SDS–PAGE (no bands below 20 or above 35 kDa, suggesting the presence of free B chains or A+B heterodimers, respectively). Comparing the number of unique peptides for the individual glycinin A subunits, the most were identified for the A4 subunit of glycinin G4. In fraction **2**, evidence for the presence of intact glycinin heterodimers was obtained, because peptides from various A and B subunits were identified. Glycinin G1 (subunits A1a and Bx) and G2 (subunits A2 and B1a) were conclusively identified as dimers, whereas for the unnamed glycinin variant only peptides from the A subunit could be assigned. Again, agreement with molecular weight information derived from SDS–PAGE was observed. In addition to the glycinins, all three β -conglycinin chains and soybean trypsin inhibitor were observed in this fraction.

Overall, the analysis of SPI extract allowed us to conclude that sufficient data quality for unambiguous assignment to individual subunits could be obtained with our procedure so that its application to meat products should be feasible.

Table 1. Homology of the Major Seed Storage Proteins in Soybean (*Glycine max*)^a

acc no.	protein name	subunits	E-value
P04776 (GLYG1_SOYBN)	glycinin G1 prec. (52.6 kDa)	A1a (32.6 kDa), Bx (20.0 kDa)	0.0
P11828 (GLYG3_SOYBN)	glycinin G3 prec. (51.4 kDa)	A (31.5 kDa), B (19.9 kDa)	0.0
P04405 (GLYG2_SOYBN)	glycinin G2 prec. (51.4 kDa)	A2 (31.6 kDa), B1a (19.8 kDa)	0.0
P04347 (GLYG5_SOYBN)	glycinin prec. (55.4 kDa)	A3 (36.4 kDa), B4 (19.0 kDa)	2e-94
P02858 (GLYG4_SOYBN)	glycinin G4 prec. (61.2 kDa)	A5 (10.5 kDa), A4 (30.0 kDa), B3 (20.7 kDa)	3e-60
P13916 (GLCA_SOYBN)	β -conglycinin, α chain prec. (63.2 kDa)		0.0
P11827 (GLCAP_SOYBN)	β -conglycinin, α' chain prec. (67.2 kDa)		e-173
P25974 (GLCB_SOYBN)	β -conglycinin, β chain prec. (47.8 kDa)		e-152

^a acc no. = UniProt/SwissProt accession number, E-value = expectation value from blastp BLAST search against the UniProt Knowledgebase (<http://expasy.org/tools/blast/>).

Table 2. List of Proteins Identified in Soybean Protein Isolate with UniProt/SwissProt Accession Numbers in Parentheses

Fraction 1
2 S albumin precursor, long chain (P19594)
glycinin G1 precursor, A1a subunit (P04776)
glycinin G2 precursor, A2 subunit (P04405)
glycinin G4 precursor, A4 subunit (P02858)
glycinin precursor, A3 subunit (P04347)
Fraction 2
β -conglycinin, α chain precursor (P13916)
β -conglycinin, α' chain precursor (P11827)
β -conglycinin, β chain precursor (P25974)
glycinin G1 precursor, A1a + Bx subunit (P04776)
glycinin G2 precursor, A2 + B1a subunits (P04405)
glycinin precursor, A3 subunit (P04347)
trypsin inhibitors A/C precursor (P01070)

Table 3. List of Proteins Identified in the Marker Peak from Heat-Processed Meat Products Spiked with Soybean Proteins with UniProt/SwissProt Accession Numbers in Parentheses

Chicken
glycinin G2 precursor, A2 subunit (P04405)
glycinin G4 precursor, A4 subunit (P02858)
myosin heavy chain, skeletal (P13538/P02565)
Beef
glycinin G4 precursor, A4 subunit (P02858)
Pork
glycinin G2 precursor, A2 subunit (P04405)
glycinin G4 precursor, A4 subunit (P02858)
glycinin precursor, A3 subunit (P04347)
Turkey
glycinin G2 precursor, A2 subunit (P04405)
glycinin G4 precursor, A4 subunit (P02858)
glycinin precursor, A3 subunit (P04347)

Analysis of Heat-Treated Meat Samples Spiked with SPI. For meat samples, only the fraction corresponding to peak 1 from the SPI extract was collected and analyzed further. In this case, the additional presence of meat proteins in the “marker” peak had to be considered during data analysis (see Discussion below), while all other steps of the analysis were identical to those performed for the SPI. Samples from four different sources, containing soybean proteins, were analyzed: beef, pork, chicken, and turkey.

Preliminary analysis of the fraction by SDS-PAGE gave comparable results to the pure SPI. No other bands suggesting the presence of contaminating meat proteins were observed.

Results from the nanoLC-MS/MS analyses are summarized in Table 3. As could be expected, the respective marker peaks mainly contained glycinin A subunits, in accordance with the data from SPI and previous UV data for SPI-free meat extracts that showed low background in this region. In all samples, subunit A4 of glycinin (originating from variant G4) was

observed and could be confirmed with at least two unique peptides (see Figure 3 for one example). In addition, subunit A2 from variant G2 was identified in three out of four samples (not in beef), whereas the presence of the A3 subunit from the unnamed glycinin subunit was confirmed only in two samples (pork, turkey). We conclude that these results reflect the relative abundances of the different variants in the soybean protein mixture, because subunit A4 was already identified with the largest number of peptides in the total SPI extract. The absolute concentration of soybean proteins was much smaller in the meat samples so that other, less abundant subunits were sometimes not detected with sufficient certainty.

Peptides originating from meat proteins were only detected sporadically in the marker fraction. In just one sample (chicken), a meat protein was considered identified according to the same criteria used for soybean proteins; in this case, skeletal myosin heavy chain was present. Single peptides from other myosin variants were sometimes detected in chicken, beef, and turkey samples, although these were not considered reliable identifications. In the chicken sample, traces of other muscle proteins (α -actin and troponin) also appeared to be present. In analysis by SDS-PAGE using a gel with a degree of cross-linking as was used in this study, myosins would most likely not be observed because of their high molecular weight (>200 kDa), resulting in insufficient migration.

In summary of the results from the spiked meat samples, glycinin variant G4, subunit A4 was the most reliable marker for soybean protein addition.

Discussion

Protein Identification using a 2D-LC-MS/MS Approach. Despite the fact that sensitivity was not an issue in this study because it could be assumed that relatively abundant soybean proteins would contribute to the “marker” peak, we decided to implement a two-dimensional chromatographic separation system. This was necessary to be able to conclusively identify individual subunits of the main seed storage proteins. The prefractionation step on the protein level allowed the facile transfer of the existing liquid chromatographic method using UV detection to nanoLC-MS/MS-based protein identification and helped to largely overcome the problem of undersampling in the final LC-MS analysis step, i.e., the coelution of multiple peptides of which not all can be selected for data-dependent MS/MS analysis. The instrumentation we used, a three-dimensional ion trap with moderate scan speed (5500 m/z per second), allows the acquisition of roughly 20 MS/MS spectra per minute (for experimental details, see above). With the 150-mm column, the elution window for the peptides was maximum ~60 min, resulting in a theoretical capacity of 1200 MS/MS spectra per run. Obviously, multiple factors such as the

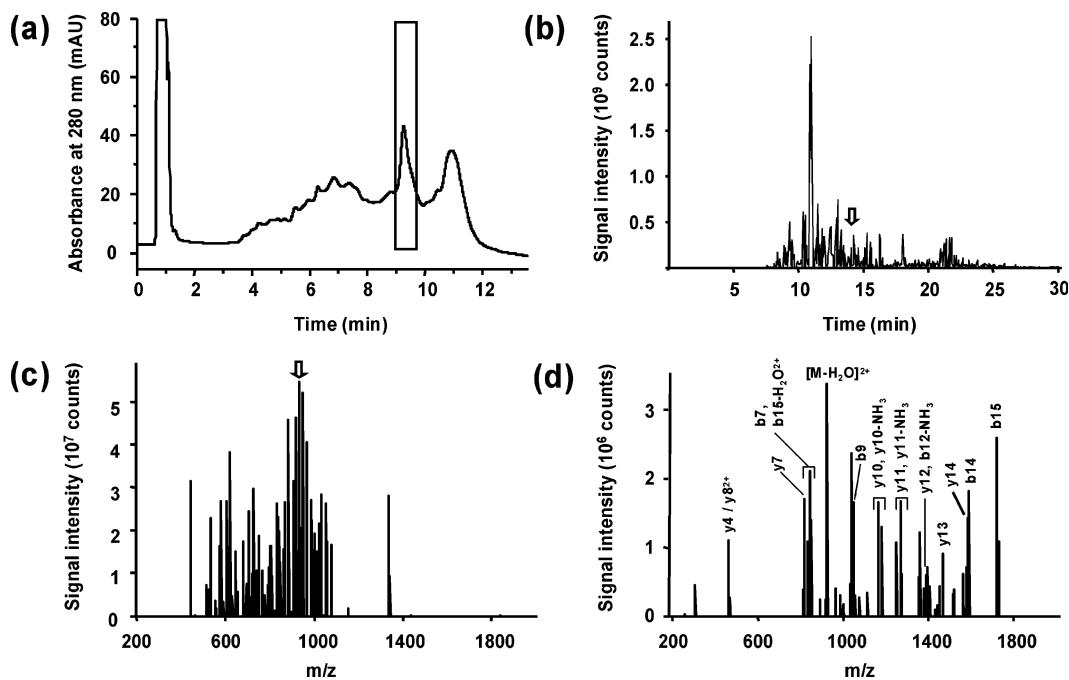


Figure 3. Identification of a peptide from glycinin G4 subunit A4 in a heat-processed turkey meat sample (containing soybean proteins) according to the multidimensional analysis concept outlined in Figure 1. (a) UV chromatogram (absorption at 280 nm). The peak eluting in the highlighted region was collected for MS analysis. (b) MS/MS total ion chromatogram of the a tryptic digest of the peak highlighted in part a. (c) MS spectrum at the elution time of 13.8 min, highlighted in part b. The peptide marked with an arrow was selected for fragmentation. (d) MS/MS spectrum of the doubly charged ion of the peptide HFLAQSFNTNEDIAEK from glycinin G4, subunit A4, with assigned fragment ions (MASCOT score = 54).

nonideal spread of peptide elution times, the presence of multiple charge states for a single peptide, and the configuration of the exclusion list (acquisition of two MS/MS spectra before exclusion) strongly reduce this number to maybe a few hundred sequencing events, thus making an additional separation dimension necessary. For meat samples, the total protein loading in the first dimension (perfusion LC) was the limiting factor, so that the protein amount in the collected fraction of interest was significantly lower and a short (50 mm) column was found to be sufficient for final nanoLC–MS/MS analysis.

Data Analysis Strategy. Data interpretation and validation is a typical bottleneck in MS-based proteomics. For large-scale studies, it is common to solely rely on automated interpretation and validation based on primary search engine scoring or additional statistical tools. For the present case, the number of identified peptides/proteins was fairly low, so that a purely statistical approach was not deemed to be useful and manual inspection of spectral data was feasible. Raw peak lists were first submitted to the MASCOT search engine, where different searches were performed in the UniProt/SwissProt database. Although the overall number of entries for soybean proteins is relatively low (<300 hits for *Glycine max*), all major proteins are covered in this database.

Spectra were first searched against the entire database without taxonomic restrictions so that contaminants such as trypsin autolysis peptides or meat proteins could be identified. Because there is some degree of sequence similarity between soybean and mammalian proteins (e.g., actins), it was important to avoid any false assignments to plant proteins. Also, in the absence of true positive sequences in a restricted database, relatively high scores can still be given to matches that are actually false positives. Further searches were only performed in a partial database restricted to green plants (*Viridiplantae*), which facilitated manual evaluation of the spectra as a result

of a strongly reduced number of high-scoring hits. In addition to a search allowing for variable methionine oxidation, a dedicated search for quadruply charged peptides was performed.

A preliminary search revealed that it was not uncommon that 4+ charged peptides were selected for fragmentation. This could be expected since tryptic cleavage sites are unevenly distributed across the glycinin variants, resulting in numerous peptides with molecular weights in the range of 2500–4500 Da. In this region, many of the identifications came from quadruply charged peptides. However, it was evident that the scoring scheme of Mascot was not well adapted to this class of highly charged peptides since scores were often very low despite the presence of extended series of b- or y-ions (see examples in Figure 4). For manual validation, a lower score cutoff was therefore selected compared to doubly or triply charged ions, although some apparently acceptable spectra were still below the threshold value.

Typically, charge states higher than 3+ are not considered in database searches but may yield important complementary information, especially for large-scale studies. For example, in a recent study by Gygi and co-workers, a significant number of peptides with more than 20 and even up to 40 amino acid residues were identified on a linear ion trap (LIT) instrument,¹⁶ although only charge states up to three were considered during data analysis of the LIT data set (see Supplementary Information to ref 16). It can be assumed that these large peptides were also present in higher charge states, which were possibly even more abundant. Peptide fragmentation tends to be more problematic for very large peptides and the increasing number of potential fragment ions makes interpretation more challenging. However, these peptides cover more sequence of the protein and this certainly warrants a closer look. Recently, Wu et al. have pointed out some advantages of using larger peptides

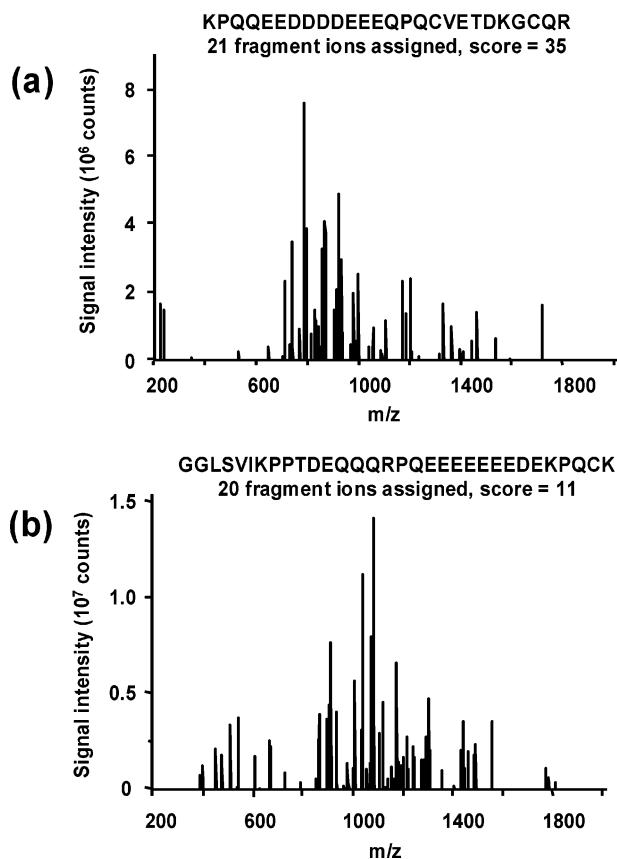


Figure 4. MS/MS spectra of quadruply charged peptides with high and low MASCOT scores. (a) KPQQEEDDDDEEEQPQCVERDKGCQR from glycinin G2, subunit A2 (score = 35), (b) GGLSVIKPPTDEQQQRPQEEEEEEDEKPQCK from glycinin G1, subunit A1a (score = 11, below acceptance threshold). Assignments of fragment ions are provided as Supporting Information (Figure S-3).

(generated by Lys-C digestion) for protein identification in a study where they took advantage of the high mass accuracy and MS³ capabilities of a LIT-FTICR hybrid instrument.¹⁷ As we have shown, the same also applies to some tryptic digests. Somewhat similar to our observations, Nesvizhskii et al. have reported that highly charged peptides do not lead to a significant increase in the number of *proteins* identified in a sample,¹⁸ although the proportion of unique *peptide* IDs from 4+ ions is considerably larger in our study.

Following the creation of a manually validated peptide list (see Supporting Information), the peptides were manually assigned to the corresponding proteins. We could not rely upon Mascot output alone because the program does not always take the limited resolution of our instrument into consideration when flagging nonunique peptides.

Proteins identified. Our off-line 2D-LC–MS/MS approach allowed the unambiguous identification of all five major variants of glycinin and of all three chains of β -conglycinin by at least two unique peptides. Using our gel-free approach, this was a more difficult task than for the 2D-GE studies reported previously, where it is expected that different variants are sufficiently separated by molecular weight and/or pI.

Therefore, this strategy could also be used for studying different soybean cultivars regarding the expression of the variants of the major proteins. Furthermore, glycinin G4 was the most abundant glycinin variant in the samples we worked

with, based on the relative number of unique (proteotypic) peptides. Peptides from this variant could be selected for more specific, mass spectrometry-based diagnostic tests. For example, multiple reaction monitoring could be employed to detect such G4 peptides from total digests of the whole, unfractionated meat samples, therefore avoiding the more time-consuming 2D-LC procedure. Alternatively, peptides common to multiple glycinin variants can be selected for a more comprehensive detection. Although these were not identified by our approach in all meat samples (compare Table S-2 in Supporting Information), dedicated detection should result in higher sensitivity. In this context, stable isotope labeled peptides could be added for absolute quantification purposes.^{19–21} A thorough evaluation of these quantitation schemes is, however, beyond the scope of this work.

Identification of meat proteins coeluting with the marker soybean proteins in the first chromatographic dimension was important, because a significant level of meat proteins would decrease the reliability of quantitation based on peak areas from UV detection as proposed earlier.⁶ Fortunately, only a small number of peptides originating from meat proteins were detected by our procedure, and only one identification was made at the protein level (myosin heavy chain in chicken). Limited database coverage may have led to the situation that proteins could not be identified, which was particularly problematic for turkey (*Meleagris gallopavo*), for which there are just slightly more than 50 entries in the current SwissProt database. To avoid overlooking contaminating proteins, homology searches in extended databases using BLAST were performed on high scoring peptide identifications that were assigned to other species than those under study. This did not lead to any further successful identifications on the protein level.

Considering the small number of meat peptides that were observed and identified, we conclude that the amount of coeluting meat proteins in the marker peak, potentially biasing its usefulness as a quantifiable UV signal, is not very significant. As a result of its size, myosin heavy chain should generate many more peptides than the main soybean proteins, but still only one or two were identified in each run compared to 10 or more for glycinin variants. Although the number of peptides per protein allows only a rough estimate of relative protein amounts,^{22–23} soybean proteins clearly dominate the perfusion LC fraction that was collected for further MS analysis.

Conclusion

The identification of marker proteins for the detection of soybean protein addition to processed meat products, as we have successfully demonstrated here, opens up new possibilities in food quality control. These marker proteins from soybean can subsequently be used for high-throughput quantitation purposes. It is expected that the presented approach comprising protein prefractionation by perfusion LC and protein identification by nanoLC–MS/MS analysis of enzymatic digests will also be applicable to other food matrices, and a similar technique may also be applied to other cases of food analysis.

Acknowledgment. A.L. and W.L. would like to acknowledge the Austrian Science Fund (FWF) for financial support for the LC–MS instrumentation used in this study. M.L.M. thanks the Comunidad Autónoma de Madrid (Spain) for financial support (project S-0505/AGR/0312). F.C.-R. thanks the

Ministerio de Educación y Ciencia (Spain) for her predoctoral grant and financial support to stay at the University of Vienna for three months. Special thanks go to M. C. García for her input in optimizing the perfusion LC method. The authors are also indebted to Jeannie Horak for her valuable support and help with SDS-PAGE experiments.

Supporting Information Available: Sequence alignments of glycinins and β -conglycinins from *Glycine max* (Figures S-1 and S-2); annotated spectra from Figure 4 (Figure S-3); detailed list of all identified peptides from the proteins reported in this study (Tables S-1 and S-2). This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

References

- (1) Belloque, J.; García, M. C.; Torre, M.; Marina, M. L. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2002**, *42*, 507–532.
- (2) *Soy Protein in Raw and Heat-Processed Meat Products*; AOAC Official Method of Analysis 988.10; <http://eoma.aoac.org/methods/info.asp?ID=16859>.
- (3) Koppelman, S. J.; Lakemond, C. M. M.; Vlooswijk, R.; Hefle, S. L. *J. AOAC Int.* **2004**, *87*, 1398–1407.
- (4) Parris, N.; Gillespie, P. J. HPLC Separation of Soy and Beef Protein Isolates. In *Methods for Protein Analysis*; Chemey, J. P., Barford, R. A., Eds.; American Oil Chemists' Society: Champaign, 1988; pp 142–155.
- (5) García, M. C.; Torre, M.; Marina, M. L. *J. Chromatogr. Sci.* **1998**, *36*, 527–534.
- (6) Castro-Rubio, F.; García, M. C.; Rodríguez, R.; Marina, M. L. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 220–226.
- (7) Criado, M.; Castro-Rubio, F.; García-Ruiz, C.; García, M. C.; Marina, M. L. *J. Sep. Sci.* **2005**, *28*, 987–995.
- (8) Castro-Rubio, A.; Castro-Rubio, F.; García, M. C.; Marina, M. L. *J. Sep. Sci.* **2005**, *28*, 996–1004.
- (9) Castro, F.; Marina, M. L.; Rodríguez, J.; García, M. C. *Food Addit. Contam.* **2005**, *22*, 1209–1218.
- (10) Castro-Rubio, A.; García, M. C.; Marina, M. L. *Anal. Chim. Acta* **2006**, *558*, 28–34.
- (11) Herman, E. M.; Helm, R. M.; Jung, R.; Kinney, A. J. *Plant Physiol.* **2003**, *132*, 36–43.
- (12) Mooney, B. P.; Thelen, J. J. *Phytochemistry* **2004**, *65*, 1733–1744.
- (13) Hajduch, M.; Ganapathy, A.; Stein, J. W.; Thelen, J. J. *Plant Physiol.* **2005**, *137*, 1397–1419.
- (14) Natarajan, S.; Xu, C.; Caperna, T. J.; Garrett, W. M. *Anal. Biochem.* **2005**, *342*, 214–220.
- (15) Nesvizhskii, A. I.; Aebersold, R. *Mol. Cell. Proteomics* **2005**, *4*, 1419–1440.
- (16) Elias, J. E.; Haas, W.; Faherty, B. K.; Gygi, S. P. *Nat. Methods* **2005**, *2*, 667–675.
- (17) Wu, S.-L.; Kim, J.; Hancock, W. S.; Karger, B. J. *Proteome Res.* **2005**, *4*, 1155–1170.
- (18) Nesvizhskii, A. I.; Roos, F. F.; Grossmann, J.; Vogelzang, M.; Eddes, J. S.; Grussem, W.; Baginsky, S.; Aebersold, R. *Mol. Cell. Proteomics* **2006**, *5*, 652–670.
- (19) Brönstrup, M. *Exp. Rev. Proteomics* **2004**, *1*, 503–512.
- (20) Gerber, S. A.; Rush, J.; Stemman, O.; Kirschner, M. W.; Gygi, S. P. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2003**, *100*, 6940–6945.
- (21) Beynon, R. J.; Doherty, M. K.; Pratt, J. M.; Gaskell, S. J. *Nat. Methods* **2005**, *2*, 587–589.
- (22) Rappsilber, J.; Ryder, U.; Lamond, A. I.; Mann, M. *Genome Res.* **2002**, *12*, 1231–1245.
- (23) Ishihama, Y.; Oda, Y.; Tabat, T.; Sato, T.; Nagasu, T.; Rappsilber, J.; Mann, M. *Mol. Cell. Proteomics* **2005**, *4*, 1265–1272.

PR060145Q

Determinación de la secuencia aminoacídica de los péptidos

Para la determinación de la secuencia de los péptidos digeridos se utilizó el método de nano-LC-MS/MS ya descrito. Los péptidos obtenidos tras la digestión con tripsina de las proteínas de soja contenidas en el pico que permitía la determinación de las proteínas de soja en los productos cárnicos eran separados en la columna de nano-LC y detectados por espectrometría de masas. Finalmente, se realizaba una búsqueda en una base datos para correlacionar los espectros de masas en tandem obtenidos con los espectros de masas calculados para todos los péptidos en la base de datos.

La búsqueda en la base de datos UniProtKB/Swiss-Prot (<http://www.expasy.org>) nos permitió encontrar la secuencia de las subunidades de las principales proteínas de soja, la glicinina y la β -conglicinina, conocer el contenido de lisina y arginina y comprobar si la enzima tripsina, que rompe específicamente detrás de lisina (K) y arginina (R) es adecuada para llevar a cabo la digestión enzimática de las proteínas de soja. Es importante que el contenido de estos aminoácidos sea grande y que estén distribuidos a lo largo de la cadena polipeptídica ni muy juntos ni muy separados para obtener péptidos ni muy grandes ni muy pequeños. El problema de los péptidos grandes es que son difíciles de ionizar y por lo tanto se pierden y no son analizados. Los péptidos pequeños con masas inferiores a 600 Da, también se pierden y no son analizados.

Las secuencias de las subunidades de la glicinina y la β -conglicinina encontradas en esta base de datos han sido incluidas en las Tablas III. 1 a III. 8. Para la glicinina aparecen cinco subunidades diferentes denominadas G1, G2, G3, G4, G5. Estas subunidades coinciden con las indicadas por Wolf y col. [206]. Las subunidades de la glicinina y β -conglicinina presentan bastantes residuos de lisina y arginina. Sin embargo, muchos de estos aminoácidos aparecían muy juntos o muy separados dando lugar a péptidos muy pequeños o muy grandes. A pesar de esta limitación, se siguió utilizando la tripsina para hacer la digestión ya que económicamente es más asequible que otras y a que a pesar de estas limitaciones se podía obtener la suficiente información como para poder identificarlas.

Además, cuando se compararon las secuencias de las cinco subunidades de la glicinina se observó que las subunidades G1, G2 y G3 poseían secuencias muy similares entre sí. De igual forma, las subunidades de la glicina G4 y G5 también presentaban secuencias muy parecidas.

Con respecto a la β -conglicinina, la tres subunidades α , α' , β presentan también secuencias muy similares.

Tabla III. 1. Secuencia de la subunidad α' de la β -conglicinina de la soja encontrada en la base de datos UniProtKB/Swiss-Prot.

Subunidad de la β -conglicinina	Secuencia*						Número de acceso
	Peso molecular: 67240,04 Da Punto isoeléctrico (teórico): 5,20						
β-conglicinina (Globulina 7S) [Precursor] subunidad α': 63-639 Glicoproteína Carbohidratos en posiciones: 277 y 551 (N-acetilglucosamina)	10	20	30	40	50	60	
	MMRARFPLL LGVVFLASVS VSFGIAYWEK QNPSHNKCLR SCNSEKD SYR NQACHAR CNL						
	70	80	90	100	110	120	
	LKV EEEECE EGQIPR PRPQ HPERER QQHG EKEEDEGEQP RPFPPR PRPQ PHQEEHEQK						
	130	140	150	160	170	180	
	EEHEWHR KEE KHGGKG SEEE QDEREHPRPH QPHQKEEEKH EWQHKQEKHQ GKEEEEEED						
	190	200	210	220	230	240	
	QDEDEEQD KE SQESEGSE SQ REPRRH KKN KN PFHFNS KRFQ TLFKNQY GHV RVLQR FN KRS						
	250	260	270	280	290	300	
	QQLQNL RDY R ILEFNS K PNT LLLPHHADAD YLIVILNGTA ILTVNNDDR DSYNLQSGDA						
	310	320	330	340	350	360	
	LRVPAGTTFY VVNP DN DENL RMIAGTTFY VVNPDN DNR MITLAIPVN K PGRFESFFLS						P11827
	370	380	390	400	410	420	
	STQAQQSYLQ GFS K NILEAS YDTK FEEINK VLFGREEGQQ QGEERLQESV IVEISKKQIR						
	430	440	450	460	470	480	
	ELSKHAK SSS RKTISSED KP FNLGS RDPIY SNK LGKL FEI TQRNPQLRDL DVFLSVVDMN						
	490	500	510	520	530	540	
	EGALFLPHFN SKAIVVLVIN EGEANIELVG I KEQQQRQQQ EEQPLEVR KY RAELSEQDIF						
	550	560	570	580	590	600	
	VIPAGYPVMV NATSDLNFFA FGINAENN QR NFLAGSKDNV ISQIPSQVQE LAFPRSA KDI						
	610	620	630				
	ENLIK SQSES YFVDAQPQQK EEGN K GRKGP LSSIL RAFY						

*Los aminoácidos lisina (K) y arginina (R) aparecen subrayados con verde y rosa, respectivamente. El aminoácido que comienza la secuencia de la subunidad aparece subrayado en amarillo.

Tabla III. 2. Secuencia de la subunidad α de la β -conglicinina de la soja encontrada en la base de datos UniProtKB/Swiss-Prot.

Secuencia de la β -conglicinina	Secuencia* Peso molecular: 63151,77 Da Punto isoeléctrico (teórico): 4,88							Número de acceso
β-conglicinina (Globulina 7S) [Precursor] subunidad α: 63-605 <i>Glicoproteína Carbohidratos en posiciones: 261 y 517 (N-acetilglucosamina)</i>	10 20 30 40 50 60 MMRARFPLL LGLVFLASVS VSFGIAYWEK ENPKHNKCLQ SCN SERDSYR NQACHARCNL 70 80 90 100 110 120 LKVEKEECEE GEIPRPRPRP QHPEREPQQP GEKEEDEDEEQ PRPIPFPRPQ PRQEEEHEQR 130 140 150 160 170 180 EEQEWP RK KEE KRGEK G SEEEE DEDEDEEQDE RQFPFPRPPH QKEERN E EED EDEEQ Q RESE 190 200 210 220 230 240 ESEDSELRRH K KN K NPFLFGS NRFETLF K NQ YGRIRVLQRF N Q RSPQLQNL R DYRILEFNS 250 260 270 280 290 300 KPNTLLLPNH ADADYLIVIL NGTAILSLVN NDD R DSYRLQ SGDALRVPSG TTYYVVNPDN 310 320 330 340 350 360 NENLR L ITLA IPVN K PGRFE SFLSSTEAQ Q SYLQGFSRN ILEASYDT K F EEIN K VLSR 370 380 390 400 410 420 EEGQQQQ G EQ R LQESVIVEIS K EQIRALS K R AKSSSRKTIS S ED K PFNLRS R RDPIYSN K L G 430 440 450 460 470 480 KFFEITPE K N PQLRDLDIFL SIVDMNEGAL LLPHFNS K AI VILVINEGDA NIELVGL K EQ 490 500 510 520 530 540 QQEQQQ Q EEQP P LEVR K YRAEL SEQDIFVIP A GYPVVVNATS N LNFFAIGIN AENNQR N FLA 550 560 570 580 590 600 GSQDNVISQI PSQVQELA F GS A QAVE K LL K N Q RESYFVD A QPKKK E GN K GR K GPLSSI LRAFY	P13916						

* Los aminoácidos lisina (K) y arginina (R) aparecen subrayados con verde y rosa, respectivamente. El aminoácido que comienza la secuencia de la subunidad aparece subrayado en amarillo.

Tabla III. 3. Secuencia de la subunidad β de la β -conglicinina de la soja encontrada en la base de datos UniProtKB/Swiss-Prot.

Subunidad de la β -conglicinina	Secuencia* Peso molecular: 47776,45 Da Punto isoeléctrico (teórico): 5,57	Número de acceso
β-conglicinina (Globulina 7S) [Precursor] subunidad β : 26-439 Glicoproteína Carbohidratos en posición: 351 (N-acetilglucosamina)	10 20 30 40 50 60 <i>MMRVRFPPLV LLGTVFLASV CVSLK</i> VREDE NNPFYFRSSN SFQTLFENQN VRIRLLQRFN 70 80 90 100 110 120 KRSPQLENLR DYRIVQFQS K PNTILLPHHA DADFLLFVLS G R AIALTLVNN D D RDSYNLHP 130 140 150 160 170 180 GDAQRIPAGT TYYLVNPHDH QNL KI KLAI PVN K PGRYDD FFLSSTQAQQ SYLQGFSHNI 190 200 210 220 230 240 LETSFHSEFE EIN R VLFGEET EEQR R QEGV I VELS K EQ I RQ LS RRAK SSSR K T ISSEDEPF 250 260 270 280 290 300 NL R SRNP I YS NNFG K FFEIT PEK N PQL R DL DIFLSSVDIN EGALLPHFN SKAIVILVIN 310 320 330 340 350 360 EGDANIELVG I K EQQQ K Q K Q EEEPLEV Q RY RAE L SEDDVF VIPAAYPFVV NATSNLNFLA 370 380 390 400 410 420 FGINAENN Q R NFLAGE K DNV VRQIER Q VQE LAFPGSAQDV ERLL K K Q RES YFVDAQPQQ K 430 EEGS K GR K GP FPSILGALY	P25974

* Los aminoácidos lisina (K) y arginina (R) aparecen subrayados con verde y rosa, respectivamente. El aminoácido que comienza la secuencia de la subunidad aparece subrayado en amarillo.

Tabla III. 4. Secuencia de una de las subunidades identificadas para la glicinina (formada por una cadena polipeptídica ácida (A) y otra básica (B) unidas por un enlace disulfuro) de la soja encontrada en la base de datos UniProtKB/Swiss-Prot.

Subunidad de la glicinina	Secuencia* Pesos moleculares: Cadena polipeptídica ácida (A1a): 32646,99 Da Punto isoeléctrico (pI) (teórico): 5,19 Cadena polipeptídica básica (Bx): 19955,53 Da Punto isoeléctrico (pI) (teórico): 6,33	Número de acceso
Subunidad G1 [Precursor] Formada: Cadena polipeptídica ácida A1a:20-306 Cadena polipeptídica básica Bx: 311-490 Ambas cadenas polipeptídicas unidas por un único enlace disulfuro en las posiciones: 107-317	10 20 30 40 50 60 <i>MAKLVFSLCF LLFGGCCFAF SSREQPQQNE CQIQKLNALK PDNRIESEGG LIETWNPNNNK</i> 70 80 90 100 110 120 <i>PFQCAGVALS RCTLNRNALR RPSYTNGPQE IYIQQGKGIF GMIYPGCPST FEEPQQPQQR</i> 130 140 150 160 170 180 <i>GQSSRPQDRH QKIYNFREGD LIAVPTGVAW WMYNNEEDTPV VAVSIIDTNS LENQLDQMMPK</i> 190 200 210 220 230 240 <i>RFYLAGNSEQ EFLKYQQEQGG GHQSQKGKHQ QEEENEGGSI LSGFTLEFLE HAFSVDKQIA</i> 250 260 270 280 290 300 <i>KNLQGENEGE DKGAIVTVKG GLSVKPPTD EQQQRQPEEE EEEEDEKPQC KGKDKHCQRPKGSQSKSRRN GIDETICTMR LRHNIGQTSS PDIYNPQAGS VTTATSLDFP ALSWLRLSAE</i> 310 320 330 340 350 360 <i>370 380 390 400 410 420 FGSLRKNAMF VPHYNLNANS IIYALNGRAL IQVVNCNGER VFDGELQEGR VLIVPQNFVV</i> 430 440 450 460 470 480 <i>AARSQSDNFE YVSFKTNNDTP MIGTLAGANS LLNALPEEVQ QHTFNLKSQQ ARQIKNNNPF</i> 490 <i>KFLVPPQESQ KRAVA</i>	P04776

* Los aminoácidos lisina (K) y arginina (R) aparecen subrayados con verde y rosa, respectivamente. El aminoácido que comienza la secuencia de la subunidad aparece subrayado en amarillo.

Tabla III. 5. Secuencia de una de las subunidades identificadas para la glicinina (formada por una cadena polipeptídica ácida (A) y otra básica (B) unidas por un enlace disulfuro) de la soja encontrada en la base de datos UniProtKB/Swiss-Prot.

Subunidad de la glicinina	Secuencia Pesos moleculares: Cadena polipeptídica ácida (A2): 31622,84 Da Punto isoeléctrico (pI) (teórico): 4,90 Cadena polipeptídica básica (Bx): 19955,53 Da Punto isoeléctrico (pI) (teórico): 6,33	Número de acceso
Subunidad G2 [Precursor] Formada: <i>Cadena polipeptídica ácida A2: 19-296</i> <i>Cadena polipeptídica básica B1a: 301-480</i> Ambas cadenas polipeptídicas unidas por un único enlace disulfuro en las posiciones: 104-307	10 20 30 40 50 60 <i>MAKLVLSCF LLFSGCFA</i> L <i>R</i> EQAQQNECQI Q <i>KLNAL</i> K <i>PDN</i> R <i>ESEGGFIE</i> TWNPNN K <i>PFQ</i> 70 80 90 100 110 120 <i>CAGVALSRCT LNRNALRRPS YTNGPQEYIY QQGNGIFGMI FPGCPSTYQE PQESQQRGRS</i> 130 140 150 160 170 180 <i>QRPQDRHHQKV HRFREGDLIA VPTGVAWWMY NNEDTPVVAV SIIDTNSLEN QLDQMPRRFY</i> 190 200 210 220 230 240 <i>LAGNQEQEFL KYQQQQQQGGS QSQKGQQEE ENEGSNILSG FAPEFLKEAF GVNMQIVRN</i> 250 260 270 280 290 300 <i>QGENEEEDSG AIVTVKGLR VTAPAMRKPQ QEEDDDDEEE QPQCVETDKG CQRQSKRSRN</i> 310 320 330 340 350 360 <i>GIDETICTMR LRQNIGQNSS PDIYNPQAGS ITTATSLDFP ALWLLKLSAQ YGSLRKNAMF</i> 370 380 390 400 410 420 <i>VPHYTLNANS IIYALNGRAL VQVVNCNGER VFDGELQEGG VLIVPQNFAV AAKSQSDNFE</i> 430 440 450 460 470 480 <i>YVSFKTNDRP SIGNLAGANS LLNALPEEVQ QHTFNLKSQQ ARQVKNNNPF SFLVPPQESQ</i> <i>RRAVA</i>	P04405

* Los aminoácidos lisina (K) y arginina (R) aparecen subrayados con verde y rosa, respectivamente. El aminoácido que comienza la secuencia de la subunidad aparece subrayado en amarillo.

Tabla III. 6. Secuencia de una de las subunidades identificadas para la glicinina (formada por una cadena polipeptídica ácida (A) y otra básica (B) unidas por un enlace disulfuro) de la soja encontrada en la base de datos UniProtKB/Swiss-Prot.

Subunidad de la glicinina	Secuencia*	Número de acceso
<p>Subunidad G3 [Precursor] Formada: <i>Cadena polipeptídica ácida A:</i> 22-296 <i>Cadena polipeptídica básica B:</i> 297-476 Ambas cadenas están unidas por un único enlace disulfuro en las posiciones: 107-303</p> <p>MAKLVLSCF LLFSGCCFAF S₁₀REQPQQNE CQIQRLNALK PDNR₂₀IESEGG FIETWNPNNK PFQCAGVALS R₇₀CTLNKRNALR R₈₀PSYTNAPQE IYIQQGSGIF GMIFPGCPST FEEPQQK₉₀GQS SRPQDRH₁₃₀HQKI YHFREGDLIA VPTGFAYWMY NNEDTPVVAV SLIDTNSFQN QLDQMP₁₄₀RRFY LAGNQE₁₉₀QEFL QYQPQK₂₀₀QQGG TQSQ₂₁₀KGKRQQ EEENEGGSIL SGFAPEFLEH AFVVDR₂₅₀RQIVR KLQGENEEE₂₆₀E KGAIVTV₂₇₀KGG LSVISPPTEE QQQR₂₈₀PEEEEK PDCDEKDKHC QSQS₂₉₀RNGIDE TICTMRLR₃₁₀HN IGQTSSPDIF NPQAGSITTA TS₃₂₀LDFPALSW L₃₃₀KLSAQFGSL R₃₄₀KNAMFVPHY NLNANSIIYA LN₃₅₀GRALVQVV NCNGE₃₆₀RVF₃₇₀DG EL₃₈₀QEGQVLIV PQNFAVAARS QSDNF₃₉₀EYVSF KTND₄₃₀RPSIGN LAGAN₄₄₀SLLNA L₄₅₀PEEVIQQTF NL₄₆₀RRQQARQV K₄₇₀NNNPFSFLV PP₄₈₀KESQRRVV A</p>	<p>Pesos moleculares: Cadena polipeptídica ácida (A): 31483,74 Da pI (teórico): 5,09 Cadena polipeptídica básica (B): 19911,42 Da pI (teórico): 8,00</p>	P11828

* Los aminoácidos lisina (K) y arginina (R) aparecen subrayados con verde y rosa, respectivamente. El aminoácido que comienza la secuencia de la subunidad aparece subrayado en amarillo.

Tabla III. 7. Secuencia de una de las subunidades identificadas para la glicinina (formada por una cadena polipeptídica ácida (A) y otra básica (B) unidas por un enlace disulfuro) de la soja encontrada en la base de datos UniProtKB/Swiss-Prot.

Subunidad de la glicinina	Secuencia* Pesos moleculares: Cadena polipeptídica ÁCIDA (A5): 10540,82 Da; pI (teórico): 5,51 Cadena polipeptídica ÁCIDA (A4): 29953,94 Da; pI (teórico): 4,70 Cadena polipeptídica BÁSICA (B3): 20743,50 Da; pI (teórico): 9,27	Número de acceso
Subunidad G4 [Precursor] Formada: <i>Cadena polipeptídica ácida A5: 24-120</i> <i>Cadena polipeptídica ácida A4: 121-377</i> <i>Cadena polipeptídica básica B3: 378-562</i> Las cadenas polipeptídicas A5 y B3 están unidas por un único enlace disulfuro en las posiciones: 108-384.	10 20 30 40 50 60 <i>MGKPFTLSLS SLCLLLLSSA CFAISSS</i> A <i>LN ECQLNNLNAL EPDHI</i> R <i>VESEG GLIQTWNSQH</i> 70 80 90 100 110 120 <i>PELK</i> CAG <i>VTV SKLTLNRNGL HSPSYSPYPR MIIIAQGKGA LGVAIPGCPE TFEEPQEMSN</i> 130 140 150 160 170 180 <i>RRGSRSQ</i> N <i>QQ LQDSHQ</i> KIRH FNEG <i>DVLVIP PSVPYWTYNT GDEPVVAISL LDTSNFNNQL</i> 190 200 210 220 230 240 <i>DQT</i> PRV <i>FYLA GNPDIEYPET MQQQQQQQ</i> KSH GGR <i>KQGQHQQQ EEEEGGSVL SGFS</i> KHFLAQ 250 260 270 280 290 300 <i>SFNTNEDIAE KLESPDDE</i> R <i>QIVTVEGGGLS VISPKWQEQQ DEDEDEDEDD EDEQIPSHPP</i> 310 320 330 340 350 360 <i>RRPSHG</i> KREQ <i>DEDEDEDED</i> K PRPSRPSQGK RNKTGQDEDEDEDEDQPRKS REWRSKKTQP 370 380 390 400 410 420 <i>RP</i>RQEEPRE RGCETRNGVE ENIC<i>TLKLHE NIARPSRADF YNP</i>KAGRIST LNSLTLPALR 430 440 450 460 470 480 <i>QFQLSAQYVV LY</i>KNGIYSPH WNLNANSVIY VTRGQGKVRV VNCQGNNAVFD GEL<i>RRGQLLV</i> 490 500 510 520 530 540 <i>VPQNFVVAEQ AGEQGFYIV FKTHHNAVTS YLKDVFRAIP SEVLAHSYNL RQSQVSEL</i>KY 550 560 <i>EGNWGPLVNP ESQQGSP</i>RVK VA 	P02858

* Los aminoácidos lisina (K) y arginina (R) aparecen subrayados con verde y rosa, respectivamente. El aminoácido que comienza la secuencia de la subunidad aparece subrayado en amarillo.

Tabla III. 8. Secuencia de una de las subunidades identificadas para la glicinina (formada por una cadena polipeptídica ácida (A) y otra básica (B) unidas por un enlace disulfuro) de la soja encontrada en la base de datos UniProtKB/Swiss-Prot.

Subunidad de la globulina	Secuencia de cada subunidad de la glicinina Pesos moleculares: Cadena polipeptídica ÁCIDA (A3): 36392,45 Da; pI (teórico): 4,97 Cadena polipeptídica BÁSICA (B4): 19049,57 Da; pI (teórico): 9,51	Número de acceso
<p>Subunidad G5 [Precursor] Formada: <i>Cadena polipeptídica ácida A3: 25-344</i> <i>Cadena polipeptídica básica B4: 345-516</i> Ambas cadenas polipeptídicas se encuentran unidas por un único enlace disulfuro: 109-351</p>	<p>10 20 30 40 50 60 <i>MGKPFFTLSL SSLCLLLLSS ACFAITSS</i>KF NECQLNNLNA LEPDHR<i>V</i>VESE GGLIETWNSQ 70 80 90 100 110 120 <i>HPELQCAGVT VSKRTILNRNG SHLPSYLPYP QMIIIVVQG</i>KG AIGFAFPGCP ETFEK<i>P</i>QQQS 130 140 150 160 170 180 <i>SRRGSRSQQQ LQDSHQ</i>KIRH FNEGDVLVIP LGVPYWTYNT GDEPVVAISP LDTSNFNNQL 190 200 210 220 230 240 <i>DQNPRVFYLA GNPDIEHPET MQQQQQQQ</i>KSH GGR<i>K</i>QGQH<i>RQ</i> QEEEGGSVLS GFS<i>K</i>HFLAQs 250 260 270 280 290 300 <i>FNTNEDTAE</i>K LRSPDDE<i>R</i>ER<i>KQ</i> IVTVEGGLSV ISP<i>K</i>WQE<i>QED</i> EDEDEDEEY<i>G</i> RTPSYPP<i>R</i>RP 310 320 330 340 350 360 <i>SHG</i>KHEDDED EDEEEDQ<i>P</i>RP DHPP<i>Q</i>RPS<i>R</i>P EQ<i>Q</i>E<i>P</i>R<i>G</i>RC QT<i>R</i>NGVEENI CTM<i>K</i>LHENIA 370 380 390 400 410 420 <i>RPSRADFYNP KAGRISTLNS LTLPAL</i>RQFG LSAQYVVLY<i>R</i> NGIYSPDWNL NANSVTMT<i>R</i>G 430 440 450 460 470 480 <i>KGRVRVVNCQ GNAVFDGELR RGQLLVVPQN PAVAEQGGEQ GLEYVVFKTH HNAVSSYIKD</i> 490 500 510 <i>VFRVIPSEVL SNSYNLGQSQ VRQL</i>KYQGNS GPLVNP </p>	P04347

* Los aminoácidos lisina (K) y arginina (R) aparecen subrayados con verde y rosa, respectivamente. El aminoácido que comienza la secuencia de la subunidad aparece subrayado en amarillo.

Los datos de espectrometría de masas (MS) y espectrometría de masas en tandem (MS/MS) obtenidos se exportaron a un formato compatible con el motor de búsqueda MASCOT. La lista de picos obtenidos se buscaron en la base de datos UniProtKB/SwissProt (release 47.5, actualizada 19/07/05, 186882 entradas) utilizando el motor de búsqueda MASCOT. Los parámetros utilizados para realizar la búsqueda fueron los que se indican a continuación: taxonomía= todas las entradas o plantas verdes, enzima = tripsina; modificaciones fijas = metilación con el grupo carbamido de la cisteína, modificaciones variables = no o oxidación de la metionina, tolerancia de péptidos = ± 1,5 Da, tolerancia MS/MS = ± 0,8 Da, carga de los péptidos = 2+/3+ o 4+, instrumento = trampa de iones con electrospray.

Todos los espectros correspondientes a los péptidos de las proteínas de soja y contaminantes potenciales o proteínas cárnicas se examinaron manualmente y se aceptaron sólo si estos cumplían los siguientes criterios: había que asignar al menos 7 iones-b o iones-y, de los cuales al menos 3 iones-b o iones-y tenían que aparecer consecutivos, la puntuación asignada a los péptidos individuales tenía que ser de al menos 18 para iones doblemente y triplemente cargados y 15 para iones cuádruplemente cargados. La lista de péptidos validados se utilizó para crear la lista de proteínas a las que corresponden. Además, para la asignación de péptidos a diferentes variantes de la glicinina y conglicinina se utilizó la herramienta de alineación de secuencias ClustalW [207] considerando las sustituciones de aminoácidos que no pueden ser diferenciadas con el instrumento de trampa de iones (glutamina con ácido glutámico y lisina con ácido glutámico). Las alineaciones encontradas por comparación de la secuencia aminoacídica de los péptidos contenidos en el pico marcador con las disponibles en la base de datos UniProtKB/Swiss-Prot se muestran en la información complementaria del artículo número 5 de esta memoria y se incluye a continuación [208].

- - - SUPPORTING INFORMATION - - -

Identification of marker proteins for the adulteration of meat products with soybean proteins by multidimensional liquid chromatography–tandem mass spectrometry

Alexander Leitner ^{1*}, Florentina Castro-Rubio ², Maria Luisa Marina ², Wolfgang Lindner ¹

¹ Department of Analytical Chemistry and Food Chemistry, University of Vienna,
1090 Vienna, Austria

² Departamento de Química Analítica, Facultad de Química, Universidad de Alcalá,
28871 Alcalá de Henares, Madrid, Spain

Figure S-1. ClustalW sequence alignment of glycinin variants in the UniProt/SwissProt Knowledgebase.

Figure S-2. ClustalW sequence alignment of β -conglycinin variants in the UniProt/SwissProt Knowledgebase.

Figure S-3. Annotated MS/MS spectra for the quadruply charged peptides (a) KPPQQEEEEEQQPQCVETDKGCQR from glycinin G2, subunit A2, and (b) GGLSVIKPPTDEQQQRPQEEEEEDEKPQCK from glycinin G1, subunit A1a.

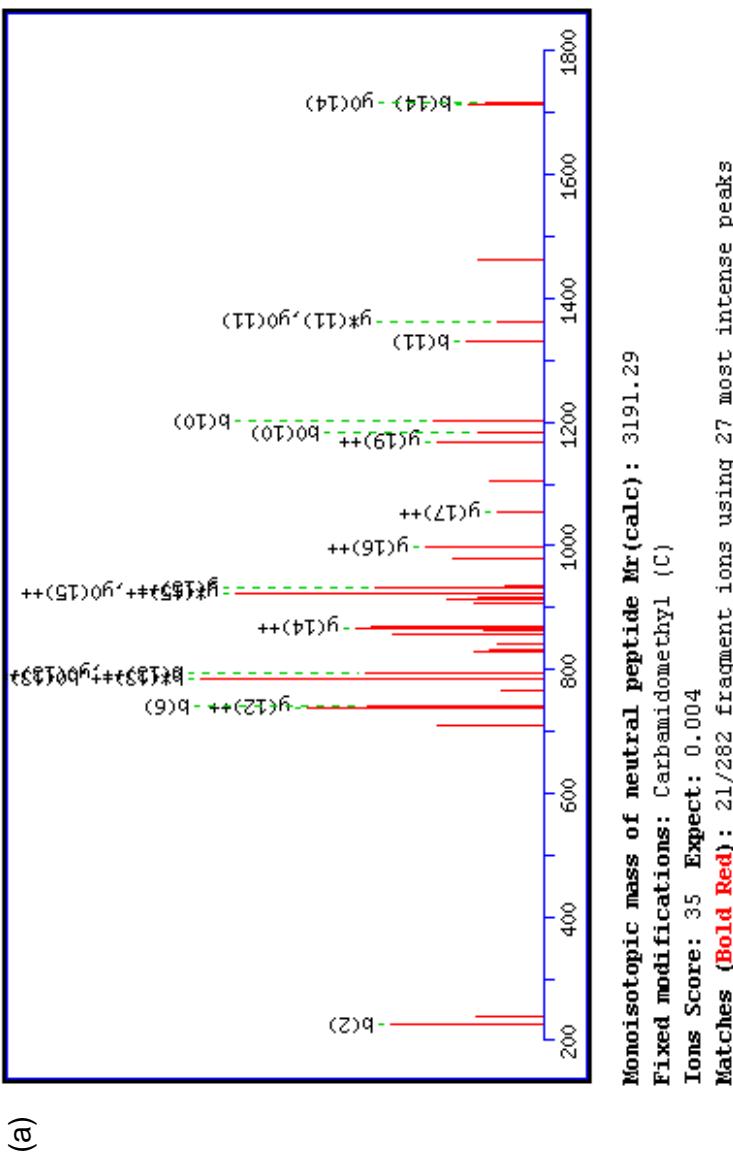


Figure S-3 (continued)

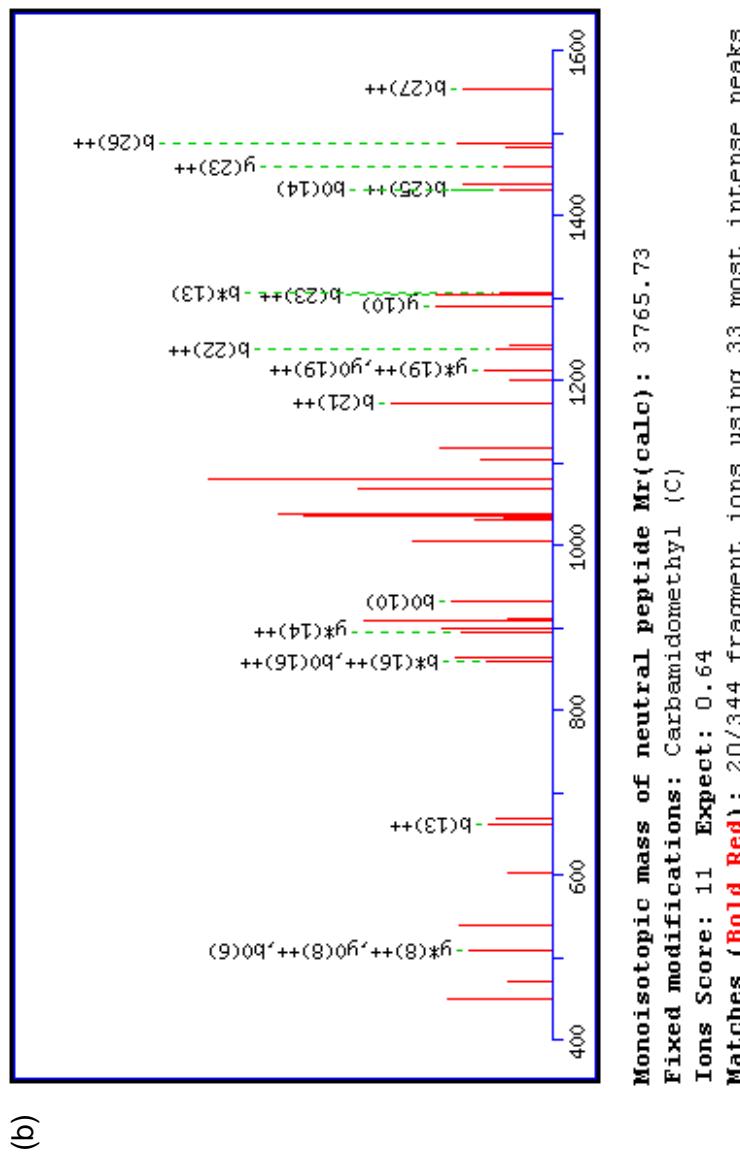


Table S-1. Overview of all validated peptide identifications from soybean protein isolate. Listed are (1) fraction number from perfusion LC separation, (2) protein accession number from UniProt/SwissProt and protein name, (3) position in the amino acid sequence (4) peptide sequence, (5) charge state, (6) highest Mascot score for this charge state, (7) additional comment, e.g specification of subunit.

Fraction#	Protein Acc# (Protein name)	Residues	Peptide sequence	Charge	Score	Comment
1	P02858 (Glycinin G4 prec.)	186-208	VFYLAGNPDIYPETTMQQQQQQK	3+	38	subunit A4
		186-208	VFYLAGNPDIYPETM*QQQQQQK	3+	37	Met oxidation
		214-235	KQGQHQQQEEEEGGSVLSGFSK	3+	22	subunit A4
		215-235	QGQHQQQEEEEGGSVLSGFSK	3+	70	subunit A4
		236-251	HFLAQSFNTNDIAEK	2+	43	subunit A4
		236-251	HFLAQSFNTNDIAEK	3+	42	
		276-301	WQEQQDDEDDEDDEQIPSHPPR	4+	22	subunit A4
		276-301	WQEQQDDEDDEDDEQIPSHPPR	3+	21	
		79-99	NGSHLPSYLPYPQMIVVQGK	3+	35	subunit A3
		186-208	VFYLAGNPDIYHPEETMQQQQQQK	3+	36	subunit A3
1	P04347 (Glycinin prec.)	186-208	VFYLAGNPDIYHPEETM*QQQQQQK	3+	34	Met oxidation
		235-250	HFLAQSFNTNEDTAEK	3+	19	subunit A3
		235-252	HFLAQSFNTNEDTAEKL	3+	26	subunit A3
1	P04776 (Glycinin G1 prec.)	242-259	NLQGENEGEDKGAIIVVK	2+	27	subunit A1

1	unassigned Glycinin peptides							
	KQIVTVEGGLSVISPK	2+	42		subunits A3 / A4			
	KQIVTVEGGLSVISPK	3+	28					
	QIVTVEGGLSVISPK	2+	62		subunits A3 / A4			
	QIVTVEGGLSVISPK	3+	26					
1	P19594 (2 S albumin prec.)	97-108	CCTEMSELR	2+	30	long chain		
		117-128	IMENQSEELEEK	2+	45	long chain		
		117-128	IM*ENQSEELEEK	2+	40	Met oxidation		
		117-130	IMENQSEELEEKQK	3+	18	long chain		
		136-145	EELNLATMCR	2+	24	long chain		
2	P04776 (Glycinin G1 prec.)	77-97	NALRRPSYNTNGPQEIYIQQGK	4+	29	subunit A1a		
		81-97	RPSYNTNGPQEIYIQQGK	3+	27	subunit A1a		
		98-120	GIFGMIVPGCPSTFEEPQQPQQR	3+	23	subunit A1a		
		98-120	GIFGM*IVPGCPSTFEEPQQPQQR	3+	18	Met oxidation		
		209-241	HQQEEENEGGSILSGFTLEFLFEHAFSVDK-QIAK	4+	29	subunit A1a		
		242-259	NLQGENEGEDKGAIVTVK	3+	38	subunit A1a		
		242-259	NLQGENEGEDKGAIVTVK	2+	28			
		401-410	VFDGELQEGR	2+	61	subunit Bx		

411-423		VIVPQNFVVAAR	2+	43	subunit Bx
2	P04405 (Glycinin G2 prec.)	205-227	GKQQEEENEGSNILSGFAPEFLK	3+	19 subunit A2
		207-227	QQEEEENEGSNILSGFAPEFLK	3+	23 subunit A2
228-238		EAFGVNM*QIVR	2+	55 Met oxidation	
228-238		EAFGVNMQIVR	2+	37 subunit A2	
268-293		KPQQQEEDDDDEEEQQPQCVENTDKGCQR	4+	49 subunit A2	
357-378		NAM*FVPHYTLNANSIIYALNGR	3+	25 B1a, Met oxid.	
426-457		TNDRPSIGNLAGANSLLNALPEEVQHTFNLK	4+	35 subunit B1a	
2	P04347 (Glycinin prec.)	186-208	VFYLAGNPDIEHPETTM*QQQQQQK	3+	A3, Met oxid.
2	unassigned Glycinin peptides		I ESEGGFIETWNPNPKPFQQCAGVALSR	3+	27 subunits A2 / A
			R FYLAGNQEQQEFLK	2+	22 su A1a / A2
			F YLAGNQEQQEFLK	2+	48 su A1a / A2
			S QSDNFEYY/SFK	2+	59 su Bx / B1a / B
			A LVQVVNCNGER	2+	26 subunit B1a / B
			I STLNSLTLPALR	2+	36 subunit B3 / B4
2	P13916 (β -CG α -chain prec.)	287-305	VPSGTTYYV/NPDNNENLR	2+	72
		287-305	VPSGTTYYV/NPDNNENLR	3+	35
		479-495	EQQQEQQEEQPLEVRK	3+	27

	537-568	NFLAGSQDNVISQIPPSQVQELAFPGSAQ-			
		AVEK	3+	20	
	575-584	ESYFVDQPK	2+	32	
2	P11827 (β-CG α'-chain prec.)	391-405	VLFGRREEGQQQGEER	3+	26
		493-517	AIVVLVINEGEANIELVGIKEQQQR	3+	23
		518-528	QQQEQQPLEVR	2+	35
2	P25974 (β-CG β-chain prec.)	103-125	ALTLVNNDDRDSYNLHPGDAQR	3+	18
		293-317	AIVLVINEGDANIELVGIKEQQQK	3+	24
		371-382	NFLAGEKDGVVR	3+	33
		371-382	NFLAGEKDGVVR	2+	22
		387-402	QVQELAFFPGSAQDVER	2+	27
2	unassigned β-CG peptides		NILEASYDTIKFEEINK	2+	43
			LQESVIVEISKEQIR	3+	45
			LQESVIVEISKEQIR	2+	32
			TISSED[K/E]PFNLR	2+	32
			TISSED[K/E]PFNLR	3+	24
			KTISSED[K/E]PFNLR	3+	38
			FFEITPEKNPQLR	2+	33
			FFEITPEKNPQLR	3+	33

2	P01070 (Trypsin inh. A/C pr.)	48-63	NELDKGIGTISSPYR	3+	19
		48-63	NELDKGIGTISSPYR	2+	18
		66-76	FIAEGHPLSLK	3+	22
		123-132	VSDDEFNNYK	2+	50

Table S-2. Overview of all validated peptide identifications from meat samples. Listed are (1) sample origin, (2) protein accession number from UniProt/SwissProt and protein name, (3) position in the amino acid sequence (4) peptide sequence, (5) charge state, (6) highest Mascot score for this charge state, (7) additional comment, e.g specification of subunit.

Sample	Protein Acc# (Protein name)	Residues	Peptide sequence	Charge	Score	Comment
Beef	P02858 (Glycinin G4 prec.)	186-208	VFYLAGNPDIYPETMQQQQQQK	3+	29	subunit A4
		186-208	VFYLAGNPDIYPETM*QQQQQQK	3+	41	Met oxidation
		214-235	KQGQHQQQEEEEGGSVLSGFSK	3+	37	subunit A4
		215-235	QGQHQQQEEEEGGSVLSGFSK	3+	47	subunit A4
Chicken	P04405 (Glycinin G2 prec.)	268-293	KPQQQEEDDDDEEEQPQCVENTDKGCQR	4+	18	subunit A2
		205-227	GKQQEEEENEGSNILSGFAPEFLK	3+	28	subunit A2
		205-227	GKQQEEEENEGSNILSGFAPEFLK	2+	22	
		239-256	NLQGENEEEDSGAIVTVK	2+	49	subunit A2
Chicken	P02858 (Glycinin G4 prec.)	186-208	VFYLAGNPDIYPETMQQQQQQK	3+	33	subunit A4
		186-208	VFYLAGNPDIYPETM*QQQQQQK	3+	35	Met oxidation
		215-235	QGQHQQQEEEEGGSVLSGFSK	3+	27	subunit A4
Chicken	Chicken myosin heavy chain, skeletal	DLEEATLQHEATAAAALR		2+	70	
		DLEEATLQHEATAAAALR		3+	29	

	HADSTAELGEQIDNLQR	2+	65
	HADSTAELGEQIDNLQR	3+	31
Pork	P04405 (Glycinin G2 prec.)	205-227	GKQQEEENEGSNILSGFAPEFLK
		205-227	GKQQEEENEGSNILSGFAPEFLK
		268-293	KPQQQEEDDDDEEEQQPQCVENTDKGCQR
Pork	P04347 (Glycinin prec.)	100-122	GAIGFAFPGCPETFEKPQQQSSR
		186-208	VFYLAGNPDIIEHPETMQQQQQQK
		186-208	VFYLAGNPDIIEHPETM*QQQQQQK
		235-250	HFLAQSFNTNEDTAEK
Pork	P02858 (Glycinin G4 prec.)	186-208	VFYLAGNPDIYEPETMQQQQQAK
		214-235	KQQGQQHQEEEEEggSVLSGFSK
		215-235	QQQQHQEEEEEggSVLSGFSK
		236-251	HFLAQSFNTNDIAEK
		276-301	WQQQQDEDDEDDEDQIPSHPPR
Pork	unassigned Glycinin peptides		FYLAGNQEQQEFLK
			KQIVTVEGGGLSVISPK
Turkey	P04405 (Glycinin G2 prec.)	228-238	EAFGVNM*QIVR
		239-256	NLQGENEEEDSGAVTVK

Turkey	P04347 (Glycinin prec.)	100-122	GAIGFAFPGCPETFEKPQQQQSSR	3+	28	subunit A2
		186-208	VFYLAGNPDIEHPETMQQQQQQK	3+	31	subunit A2
		186-208	VFYLAGNPDIEHPETM*QQQQQQK	3+	23	Met oxidation
Turkey	P02858 (Glycinin G4 prec.)	186-208	VFYLAGNPDIEYPETMQQQQQQK	3+	32	subunit A4
		186-208	VFYLAGNPDIEYPETM*QQQQQQK	3+	36	Met oxidation
		214-235	KQGQHQQQEEEEEGGSVLSGFSK	3+	29	subunit A4
		215-235	QGQHQQQEEEEEGGSVLSGFSK	3+	31	subunit A4
		236-251	HFLAQSFNTNDIAEK	2+	54	subunit A4
		276-301	WQEQQDEDEDDEDDEQIPSHPPR	3+	40	subunit A4
Turkey	unassigned Glycinin peptides		RFYLAGNQEQQEFLK	2+	38	subunit A1a / A2
			QIVTEGGGLSVISPK	2+	38	subunit A3 / A4

III.4 DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Los resultados obtenidos en este trabajo de investigación han puesto de manifiesto que la cromatografía líquida de perfusión en fase inversa ha sido una herramienta analítica muy valiosa para desarrollar metodologías analíticas rápidas y sencillas para la detección y cuantificación de proteínas de soja en productos cárnicos. En efecto, las características inherentes a las fases estacionarias perfusivas han permitido que el análisis del extracto proteico obtenido a partir de productos cárnicos se pueda llevar a cabo en tiempos inferiores a los 3 min siendo posible identificar un pico cromatográfico que se ha demostrado que corresponde únicamente a las proteínas de soja. Este pico cromatográfico se ha propuesto como “marcador” de proteínas de soja en productos cárnicos.

En el desarrollo de las metodologías analíticas propuestas ha sido fundamental la etapa de preparación de muestra. En este sentido se llevó a cabo una optimización sistemática del medio de extracción de proteínas de soja a partir de los productos cárnicos a los que se había eliminado la grasa y ello permitió seleccionar un medio que consistía en una disolución reguladora Tris-HCl a pH 8.0 como el mejor para extraer cuantitativamente las proteínas de soja con las menores interferencias posible de las proteínas cárnicas. En algunos casos, este medio de extracción difería ligeramente de unos productos cárnicos a otros, pudiendo utilizarse pequeñas cantidades de algún modificador del medio como el 2-mercaptoetanol. Hay que decir que dado el bajo contenido al que se encuentran las proteínas de soja en los productos cárnicos y las enormes interferencias a que pueden dar lugar las proteínas mayoritarias en estos productos (proteínas cárnicas) en la determinación de proteínas de soja, fue imposible extraer selectivamente las proteínas de soja sin extraer al menos en parte las proteínas cárnicas. Sin embargo, el problema de las interferencias se resolvió mediante la separación cromatográfica ya que fue posible seleccionar un pico cromatográfico que se separaba completamente de las proteínas cárnicas que eluían en otros picos cromatográficos bien solas o bien con proteínas de soja.

Los productos cárnicos constituyen una matriz analítica muy compleja por su composición y también por el procesado que se utiliza durante su elaboración en la

mayoría de los casos. La optimización de la etapa de preparación de muestra junto con la separación del extracto proteico por cromatografía de perfusión permitió eliminar las interferencias de matriz en la mayor parte de los casos lo que permitió llevar a cabo la cuantificación de proteínas de soja por el método de calibrado del patrón externo para analizar la mayoría de los productos cárnicos comerciales estudiados. Únicamente fue necesario utilizar el método de calibrado de las adiciones patrón para algunos productos cárnicos elaborados con carnes de pavo aunque se comprobó que el empleo del método de calibrado del patrón externo permitía obtener una buena estimación del contenido de proteínas de soja en estos productos con fines a realizar un *screening* rápido de los mismos.

Un problema añadido al desarrollo de metodologías analíticas para la determinación de proteínas de soja en productos cárnicos fue el no disponer de un patrón de proteínas de soja. En este sentido, nuestro trabajo de investigación se centró en la utilización de un aislado de proteína de soja comercial que en muchos casos se utilizaba en la propia elaboración de productos alimentarios comprobándose que dicho aislado de proteínas de soja permitía obtener resultados satisfactorios. Posteriormente, se comprobó que estos resultados se mantenían cuando se utilizaban otros aislados de proteína de soja como patrón.

Ha sido necesario llevar a cabo una gran cantidad de trabajo experimental para poder validar las metodologías analíticas desarrolladas. Por una parte, los productos cárnicos estudiados tenían una gran complejidad y podían haber sido elaborados con carnes de distintas especies como cerdo, pavo, pollo, ternera o mezclas de ellas pero además con adición de distintos componentes que incluían proteínas no cárnicas, en la mayor parte de los casos proteínas de soja pero en otros también proteínas lácteas. Además, estos productos cárnicos podían haber sufrido un procesado muy diferente incluyendo el tratamiento térmico a distintas temperaturas durante distintos tiempos para luego ser embutidos o enlatados. En este trabajo de investigación se hizo especial énfasis en los productos cárnicos tratados con calor y dentro de éstos los más consumidos en la actualidad incluyendo mortadela, choped, etc. Ello unido a la ausencia de materiales de referencia para estos productos nos llevó a la realización de estudios de recuperación de

proteínas de soja para distintos productos junto con la comparación de los resultados obtenidos con los proporcionados con el único método propuesto por la AOAC, el método ELISA. Además, en todos los casos, se siguió un procedimiento de validación estandarizado para métodos cuantitativos en laboratorios de alimentos que incluyó la evaluación de la linealidad, límites de detección y cuantificación, existencia de interferencias de matriz, especificidad, precisión, robustez y exactitud, como ya se ha explicado. Finalmente, como ya se ha comentado, se comprobó que los resultados obtenidos eran independientes del aislado de proteína de soja utilizado de entre varios disponibles comercialmente.

Aunque en un primer paso, la pureza del pico “marcador” de proteínas de soja se comprobó comparando su espectro UV (así como su primera y segunda derivada) con el correspondiente al pico de proteínas de soja que eluía al mismo tiempo de retención al inyectar el aislado de proteínas de soja, en una segunda etapa de este trabajo se procedió a comprobar inequívocamente que dicho pico correspondía a las proteínas de soja y a identificar qué proteínas de soja exactamente estábamos proponiendo como marcadores de la adulteración y cuantificación de proteínas de soja en productos cárnicos.

En este sentido se desarrollaron otras dos metodologías analíticas que implicaban la utilización de la espectrometría de masas como herramienta analítica.

La primera metodología analítica desarrollada consistió en el acoplamiento por primera vez de la cromatografía líquida de perfusión a la espectrometría de masas para llevar a cabo también por primera vez el análisis de proteínas de soja intactas. En este caso únicamente se estudiaron distintos cultivos de habas de soja con el fin de establecer si el pico cromatográfico del haba de soja que eluía al mismo tiempo de retención que el pico “marcador” de proteínas de soja en productos cárnicos correspondía a la globulina 7S o a la globulina 11S de la soja. La utilización de la metodología desarrollada de RP-HPLC de perfusión acoplada a la espectrometría de masas de trampa de iones permitió comprobar que este pico correspondía a la globulina 11S de la soja.

Sin embargo, nuestra intención era identificar la globulina 11S en el pico “marcador” de las proteínas de soja en productos cárnicos y también identificar exactamente la variante o variantes de dichas proteínas. Dado que las variantes de la globulina 11S poseen secuencias bastante homólogas se pensó que era necesario desarrollar una estrategia con el potencial suficiente para poder diferenciar inequívocamente las distintas variantes.

Para ello, se planteó el aislamiento del pico “marcador” de proteínas de soja en productos cárnicos con distinta composición por el método de RP-HPLC de perfusión para su posterior hidrólisis enzimática con tripsina y análisis de la mezcla peptídica resultante por nano-HPLC acoplada a espectrometría de masas en tandem. De esta forma se aseguraba una suficiente capacidad de picos como para identificar inequívocamente los péptidos obtenidos, cosa probablemente imposible realizando la digestión enzimática de todas las proteínas a la vez. La metodología analítica desarrollada permitió identificar inequívocamente las proteínas de la globulina 11S en el pico “marcador” pudiéndose identificar distintas subunidades A de la glicinina, de las cuales la subunidad A4 de la glicinina G4 fue la que se encontró en todos los productos cárnicos analizados, independientemente de su composición. Por tanto, esta subunidad “marcadora” de proteínas de soja en productos cárnicos permitiría detectar adulteraciones por adición de proteínas de soja en productos cárnicos a los cuales dicha adición está prohibida así como cuantificar proteínas de soja en productos cárnicos a los cuales está permitido adicionarlas para comprobar que no se inclumpla la legislación vigente en cuanto a los límites establecidos.

La identificación de las proteínas “marcadoras” para la detección y cuantificación de proteínas de soja en productos cárnicos abre nuevas posibilidades en el control de calidad de alimentos. Así, la estrategia desarrollada en este trabajo de investigación consistente en el aislamiento del pico “marcador” por RP-HPLC de perfusión y análisis por nano-HPLC-MS/MS de los hidrolizados peptídicos obtenidos con tripsina podría ser aplicable a otras matrices alimentarias dado que la legislación también establece

prohibición o límites máximos para la adición de proteínas de soja en otros productos alimentarios distintos de los productos cárnicos.

Finalmente, indicar que a partir del trabajo realizado en esta Tesis Doctoral se ha derivado otra aplicación muy interesante que ha sido la autentificación de habas de soja. En efecto, la metodología analítica de RP-HPLC de perfusión acoplada a la espectrometría de masas de trampa de iones para el análisis de habas de soja ha permitido la diferenciación de las habas de soja más comunes (amarillas) de otras habas de cultivos similares en apariencia pero que podrían tener distintas propiedades nutricionales o funcionales a las de las habas de soja. Este hecho posee un gran interés en el campo de la tecnología de alimentos dado la enorme utilización de las proteínas de soja en la elaboración de más de 30.000 alimentos para consumo humano.

CAPÍTULO IV

CONCLUSIONES

IV. CONCLUSIONES

A partir de los resultados recogidos en la presente memoria, se pueden extraer las siguientes conclusiones:

- Se han desarrollado metodologías analíticas utilizando HPLC de perfusión en fase inversa con detección UV para la determinación de proteínas de soja en productos cárnicos. La optimización de la etapa de preparación de muestra así como de la separación cromatográfica ha permitido la selección de un pico cromatográfico como “marcador” para la determinación de proteínas de soja en productos cárnicos siendo el límite de detección de 0.08 % (m/m) y el límite de cuantificación del 0.3 % (m/m).
- Las metodologías desarrolladas han demostrado ser válidas para el análisis de productos cárnicos crudos y tratados con calor y elaborados con carnes de cerdo, pavo, pollo, ternera o mezclas de ellas y que además pueden contener proteínas lácteas añadidas.
- Con el fin de caracterizar el pico “marcador” seleccionado para la determinación de proteínas de soja en productos cárnicos, se ha acoplado por primera vez la HPLC de perfusión a la Espectrometría de Masas. La optimización de una metodología de HPLC de perfusión-IT-MS ha permitido por primera vez el análisis de proteínas intactas de soja por MS.
- El análisis de habas de soja por HPLC de perfusión-IT-MS ha puesto de manifiesto que los picos seleccionados como “marcadores” en los productos cárnicos analizados eluyen a los mismos tiempos de retención que los picos que se corresponden en el cromatograma de las habas de soja con las proteínas 11S de la soja.

- El análisis de habas de soja amarilla y habas de distinta pigmentación (roja, verde, negra) comercializadas como habas de soja por HPLC de perfusión-IT-MS ha revelado que únicamente en las habas de soja amarillas es posible identificar las proteínas características de la soja mientras que esta asignación no fue posible para el resto de las habas analizadas. Además, los cromatogramas obtenidos para las habas y sus fracciones fueron distintos según la pigmentación del haba. De estos resultados se deriva una interesante aplicación adicional de esta Tesis Doctoral que es la autentificación de habas de soja para su diferenciación de otros cultivos similares como *azuki* o *mungbean*.
- Con el fin de identificar inequívocamente las proteínas de soja que eluyen en el pico “marcador” de estas proteínas en productos cárnicos, se ha desarrollado una metodología analítica mediante cromatografía multidimensional-espectrometría de masas en tandem. El aislamiento del pico de interés obtenido en productos cárnicos de distinta composición mediante HPLC de perfusión seguida de su hidrólisis enzimática con tripsina y posterior análisis de la mezcla peptídica obtenida por nano-HPLC-MS/MS permitió identificar diferentes subunidades A de la glicinina (11S) en el pico marcador confirmando las estimaciones realizadas por HPLC de perfusión-IT-MS. Además, se comprobó que la subunidad A4 de la glicinina G4 se encontró en todos los productos analizados por lo que se consideró la mejor candidata a ser utilizada como “marcadora” para la detección de adulteraciones de productos cárnicos con proteínas de soja.
- Las características de las metodologías analíticas propuestas junto con la ausencia de métodos adecuados les confieren un gran interés para controlar que se aplique la legislación vigente tanto por su potencial para la detección de adulteraciones (adición de proteínas de soja a productos cárnicos a los que su adición está prohibida) como para el control del contenido de proteínas de soja en productos cárnicos a los que la adición de proteínas de soja está permitida hasta un cierto límite.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] H. D. Belitz y W. Crosh, Carne, en *Química de los alimentos*, Acribia, Zaragoza, 1988.
- [2] M. L. Greaser, Proteins, in *Handbook of Muscle Foods Analysis*, CRC Press-Taylor & Francis group, Londres, cap. 4.
- [3] J. C. Cheftel y H. Cheftel, Carne y pescado, en *Introducción a la bioquímica y tecnología de los alimentos*, Acribia, Zaragoza, 1976.
- [4] O. R. Fennema, Características de los tejidos musculares comestibles, en *Química de los alimentos*, Acribia, Zaragoza, 2000.
- [5] J. L. Cuq, El sistema proteico muscular, en *Proteínas Alimentarias. Bioquímica, Propiedades funcionales. Valor nutritivo. Modificaciones químicas*, Acribia, Zaragoza, 1989.
- [6] J. C. Cheftel, J. L. Cuq y D. Lorient, Los principales sistemas proteicos alimenticios, en *Proteínas Alimentarias. Bioquímica. Propiedades funcionales. Valor nutritivo. Modificaciones químicas*, Acribia, Zaragoza, 1989, cap. 6.
- [7] A. Madrid, Los aditivos y coadyuvantes tecnológicos en los productos cárnicos, en *Los aditivos en los alimentos*, AMV: Mundi-Prensa, Madrid, 1992.
- [8] O. Venegas y C. Valladares, Clasificación de los productos cárnicos, Rev. Cubana Aliment. Nutr., 13 (1999) 63.
- [9] A. M. Pearson y T. A. Gillett, Sausages, en *Processed Meats*, Champman & Hall, Nueva York, 1996.
- [10] M. C. García y M. L. Marina, Detection of adulterations: addition of foreign proteins, en *Handbook of muscle food analysis*, CRC Press-Taylor and Francis Group, Londres, cap. 39.
- [11] M. C. García y M. L. Marina, Detection of adulterations: addition of foreign proteins, en *Handbook of processed meats*, CRC Press-Taylor and Francis Group, Londres, cap. 29.
- [12] J. G. Endres, *Soy protein products. Characteristics, nutritional aspects, and utilization*. AOAC Press, Champaign, 2001.
- [13] Y. L. Xiong, Role of myofibrillar proteins in water-binding in brine-enhanced meats, Food Res. Int., 38 (2005) 281.
- [14] J. T. Keeton, Low-fat meat products-Technological problems with processing, Meat Sci., 36 (1994) 261.
- [15] P. J. Shand, Mimetic and synthetic fat replacers for the meat industry, in *Production and processing of healthy meat, poultry, and fish products*, A. M. Pearson and T. R. Dutson Eds., Blackie Academic & Professional, Londres, 1997, cap. 9.

- [16] S. J. Eilert y R. W. Mandigo, Use of additives from plant and animal sources in production of low fat meat and poultry products, in *Production and processing of healthy meat, poultry, and fish products*, A. M. Pearson and T. R. Dutson Eds., Blackie Academic & Professional, Londres, 1997, cap. 10.
- [17] D. G. Siegel, W. B. Tuley, H. W. Norton y G. R. Schmidt, Sensory, textural and yield properties of a combination ham extended with soybean protein isolate, *J. Food Sci.*, 44 (1979) 1049.
- [18] S. A. Abdel-Aziz, S. A. Esmail, L. Hussein y F. Janssen, Chemical composition and levels of non-meat proteins in meat brands extended with soy protein concentrate, *Food Chem.*, 60 (1997) 389.
- [19] Z. Pietrasik y E. C. Y. Li-Chan, Binding and textural properties of beef gels as affected by protein, κ -carrageenan and microbial transglutaminase addition, *Food Research Int.*, 35 (2002) 91.
- [20] S. Comfort y N. K. Howell, Gelation properties of salt soluble meat protein and soluble wheat protein mixtures, *Food Hydrocoll.*, 17 (2003) 149.
- [21] W. J. Means y G. R. Schmidt, Restructuring fresh meat without the use of salt or phosphate, in *Advances in Meat Research*, AVI B, A. M. Pearson y T. R. Dutson Eds., Nueva York, 1987, cap. 14.
- [22] G. H. Lu y T. C. Chen, Application of egg white and plasma powders as muscle food binding agents, *J. Fd. Engeneering*, 42 (1999) 147.
- [23] S. J. Tsai, N. Unklesbay, K. Unklesbay y A. Clarke, Textural properties of restructured beef products with five binders at four isothermal temperatures, *J. Food Quality*, 21 (1998) 397.
- [24] S. Kumar, B. D. Sharma y A. K. Biswas, Influence of milk co-precipitates on the quality of restructured buffalo meat blocks, *Asian-Aust. J. Anim. Sci.*, 17 (2004) 564.
- [25] P. M. Kris-Etherton, T. D. Etherton, J. Carlson y C. Gardner, Recent discoveries in inclusive-based approaches and dietary patterns for reduction in risk for cardiovascular disease, *Current Opinion in Lipidology*, 13 (2002) 397.
- [26] Y. Wang, P. J. H. Jones, L. M. Ausman y A. H. Lichtenstein, Soy protein reduces triglyceride levels and triglyceride fatty acid fractional synthesis rate in hypercholesterolemic subjects, *Atherosclerosis*, 173 (2004) 269.

- [27] G. Ozimek y S. Poznanski, Influence of an addition of textured milk proteins upon physicochemical properties of meat mixtures, *J. Food Sci.*, 47 (1981) 234.
- [28] O. Zorba, S. Kart y H. Genccelep, The effects of different levels of skim powder and whey powder on apparent yield stress and density of different meat emulsions, *Food Hydrocoll.*, 19 (2005) 149.
- [29] H. S. Gujral, A. Kaur, N. Singh y N. S. Sodhi, Effect of liquid whole egg, fat and textured soy protein on the textural and cooking properties of raw and baked patties from goat meat, *J. Food Engineering*, 53 (2002) 377.
- [30] M. W. Schilling, N. G. Marriott, J. C. Acton, C. Anderson-Cook, C. Z. Alvarado y H. Wang, Utilization of response surface modeling to evaluate the effects of non-meat adjuncts and combinations of PSE and RFN pork on water holding capacity and cooked color in the production of boneless cured pork, *Meat Sci.*, 66 (2004) 371.
- [31] H. Ulu, Effect of wheat flour, whey protein concentrate and soya protein isolate on oxidative processes and textural properties of cooked meatballs, *Food Chem.*, 87 (2004) 523.
- [32] R. Gnanasambandam y J. F. Zayas, Microstructure of frankfurters extended with wheat germ proteins, *J. Food Sci.*, 59 (1994) 474.
- [33] S. C. M. Yusof y A. S. Babji, Effect of non-meat proteins, soy protein isolate and sodium caseinate, on the textural properties of chicken bologna, *Int. J. Food Sci. Nutr.*, 47 (1996) 323.
- [34] R. R. Li, J. A. Carpenter y R. Cheney, Sensory and instrumental properties of smoked sausage made with mechanically separated poultry (MSP) meat and wheat protein, *J. Food Sci.*, 63 (1998) 923.
- [35] S. Barbut, Effects of caseinate, whey and milk powders on the texture and microstructure of emulsified meat batters, *Lwt-Food Sci. & Technol.*, 39 (2006) 660.
- [36] A. J. Slesinski, J. R. Claus, C. M. Anderson-Cook, W. E. Eigel, P. P. Graham, G. E. Lenz y R. B. Noble, Response surface methodology for reduction of pinking in cooked turkey breast mince by various dairy protein combinations, *J. Food Sci.*, 65 (2000) 421.
- [37] K. S. Rhee, Oilseed food ingredients used to minimize oxidative flavour deterioration in meat products, *ACS Symposium Series*, 506 (1992) 223.

- [38] R. Gnanasambandam y J. F. Zayas, Quality characteristics of meat batters and frankfurters containing wheat germ protein flour, *J. Food Quality*, 17 (1994) 129.
- [39] P. S. Girish, M. K. Sanyal, A. S. R. Anjaneyulu, R. C. Keshari y M. Naganath, Quality of chicken patties incorporated with different milk proteins, *J. Food Sci. Technol.*, 41 (2004) 511.
- [40] R. W. Mandigo y S. J. Eilert, Strategies for reduced-fat processed meats, in *Low Fat Meats*, H. Hafs y F. K. Zimbelman Eds., Academic Press, Orlando, 1994, cap. 9.
- [41] J. Rakosky, Jr., Soy grits, flour, concentrates, and isolates in meat products, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 51 (1974) 123A.
- [42] M. K. McMIndes, Application of isolated soy protein in low-fat meat products, *Food Technol.*, 45 (1991) 61.
- [43] Anonymous, Soy protein enhances value of meat, fish and poultry products, *Food Product Development*, 15 (1981) 38.
- [44] J. Feng y Y. L. Xiong, Interaction of myofibrillar and preheated soy proteins, *J. Food Sci.*, 67 (2002) 2851.
- [45] R. Ramezani, M. Aminlari y H. Fallahi, Effect of chemically modified soy proteins and ficin-tenderized meat on the quality attributes of sausage, *J. Food Sci.*, 68 (2003) 85.
- [46] J. Feng, Y. L. Xiong y W. B. Mikel, Textural properties of pork frankfurters containing thermally/enzymatically modified soy proteins, *J. Food Sci.*, 68 (2003) 1220.
- [47] J. Rakosky, Soy products for the meat industry, *J. Agric. & Food Chem.*, 18 (1970) 1005.
- [48] M. C. García, M. Torre, M. L. Marina y F. Laborda, Composition and characterization of soybean and related products, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 37 (1997) 361.
- [49] C. G. Zarcadas, Z. Yu, H. D. Voldeng, H. J. Hope, A. Minero-Amador y J. A. Rochemont, Comparison of the protein-bound and free amino-acid contents of two northern adapted soybean cultivars, *J. Agric. Food Chem.*, 42 (1994) 21.
- [50] D. Fukushima, Recent progress of soybean protein foods: Chemistry, technology and nutrition, *Food Rev. Int.*, 7 (1991) 323.
- [51] I. Koshiyama, Purification of the 7S component of soybean proteins, *Agric. Biol. Chem.*, 29 (1965) 885.

- [52] E. L. Arrese, D. A. Sorgentii, J. R. Wagner y M. C. Añón, Electrophoretic, solubility, and functional properties of commercial soy protein isolates, *J. Agric. Food Chem.*, 39 (1991) 1029.
- [53] S. Petruccelli y M. C. Añón, Soy protein isolate components and their interactions, *J. Agric. Food Chem.*, 43 (1995) 1762.
- [54] S. Utsumi, Y. Matsumura y T. Mori, Structure-function relationships of soy proteins, en *Food proteins and their applications* (Series: *Food Sci. Technol.*), S. Damodaran y A. Paraf, Eds., Marcel Dekker, Nueva York (1997).
- [55] M. Betsiashvili, T. Sadunishvili, G. Gigolashvili, N. Nutsubidze y G. Kvesitadze, Valuable food protein preparation from soybean, *Adv. Food Sci.*, 24 (2002) 20.
- [56] M. I. Porcella, G. Sánchez, S. R. Vaudagna, M. L. Zanelli, A. M. Descalzo, L. H. Meichtri, M. M. Gallinger y J. A. Lasta, Soy protein isolate added to vacuum-packaged chorizos: effect on drip loss, quality characteristics and stability during refrigerated storage, *Meat Sci.*, 57 (2001) 437.
- [57] S. A. Hughes y P. A. Murphy, Varietal influence on the quantity of glycinin in soybeans, *J. Agric. Food Chem.*, 31 (1983) 376.
- [58] P. A. Murphy y A. P. Resurrección, Varietal and environmental differences in soybean glycinin and β -conglycinin content, *J. Agric. Food Chem.*, 32 (1984) 911.
- [59] T. Cai y K. C. Chang, Processing effect on soybean storage proteins and their relationship with tofu quality, *J. Agric. Food Chem.*, 47 (1999) 720.
- [60] K. Katsaras y P. Peetz, The functional properties of soy products, *Fleischwirtschaft*, 74 (1994) 1.
- [61] www.asa-europe.org/pdf/simplytake_s.pdf (consultada el 14 de mayo de 2008).
- [62] I. C. Peng, D. W. Quass, W. R. Dayton y C. E. Allen, The physicochemical and functional properties of soybean 11S globulin- A review, *Cereal Chem.*, 61 (1984) 480.
- [63] C. M. M. Lakemond, H. H. J. De Jongh, M. Paques, T. Van Vliet, H. Gruppen y A. G. J. Voragen, Gelation of soy glycinin: Influence of pH and ionic strength on network structure in relation to protein conformation, *Food Hydrocoll.*, 17 (2003) 365.
- [64] Y. Byan, D. J. Myers, K. Dias, M. A. Lihono, S. Wu y P. A. Murphy, Functional properties of soy protein fractions produced using a pilot plant-scale process, *JAOCs*, 80 (2003) 545.

- [65] E. Molina y D. A. Ledward, Effects of combined high-pressure and heat treatment on the textural properties of soya gels, *Food Chem.*, 80 (2003) 367.
- [66] J. Dayde, Improving soy varieties to make soy proteins more widely appreciated in the human diet, *Ocl-Oleagineux Corps Gras Lipides*, 6 (1999) 509.
- [67] A. L. Lehninger, D. L. Nelson y M. M. Cox, *Principios de Bioquímica*, 2^a Ed., Omega, Barcelona, 1993.
- [68] K. Kitabatake, M. Tahara y E. Doi, Termal denaturation of soybean protein at low water contents, *Agric. Biol. Chem.*, 54 (1990) 2205.
- [69] S. Petruccelli y M. C. Añón, Relationship between the method of obtention and the structural and functional properties of soy protein isolates. Structural and hydration properties, *J. Agric. Food Chem.*, 42 (1994) 2161.
- [70] I. Nir, Y. Feldman, A. Aserin y N. Garti, Surface properties and emulsification behavior of denatured soy proteins, *J. Food Sci.*, 59 (1994) 606.
- [71] W. J. Wolf, G. E. Babcock y A. K. Smith, Purification and stability studies of the 11S component of soybean proteins, *Arch. Biochem. Biophys.*, 99 (1962) 265.
- [72] I. Koshiyama, Purification of the 7S component of soybean proteins, *Agric. Biol. Chem.*, 29 (1965) 885.
- [73] V. H. Thanh, K. Okubo y K. Shibasaki, Isolation and characterization of the multiple 7S globulins of soybean proteins, *Plant Physiol.*, 56 (1975) 19.
- [74] V. H. Thanh y K. Shibasaki, Major proteins of soybean seeds. A straightforward fractionation and their characterization, *J. Agric. Food Chem.*, 24 (1976) 1117.
- [75] G. W. Hofland, A. De Rijke, R. Thiering, L. A. M. Van der Wielen y G. Jan Witkamp, Isoelectric precipitation of soybean protein using carbon dioxide as a volatile agent, *J. Chromatogr. B*, 743 (2000) 357.
- [76] R. Thiering, G. Hofland, N. Foster, G. Jan Witkamp y L. Van de Wielen, Carbon dioxide induced soybean protein precipitation: protein fractionation, particle aggregation, and continuous operation, *Biotechnol. Prog.*, 17 (2001) 513.
- [77] H. C. Mussman, Regulations governing the use of soy protein in meat and poultry products in the US, *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, 51 (1974) 104A.

- [78] I. Malmesen Yman, A. Eriksson, G. Everitt, L. Yman y T. Karlsson, Analysis of food proteins for verification of contamination mislabelling, *Food & Agric. Immunol.*, 6 (1994) 167.
- [79] I. Malmesen Yman, Detection of inadequate labelling and contamination as causes of allergic reactions to food, *Acta Alimentaria*, 33 (2004) 347.
- [80] H. Tsuji, M. Kimoto, Y. Natori, Allergens in major crops, *Nut. Research*, 21 (2001) 925.
- [81] H. Tsuji, N. Okada, R. Yamanishi, N. Bando, M. Kimono y T. Ogawa, Measurement of Gly m Bd 30 K, a major soybean allergen, in soybean products by a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay, *Biosci. Biotech. Biochem.*, 59 (1995) 150.
- [82] R. E. Poms, C. L. Klein y A. Anklam, Methods for allergen analysis in food: a review, *Food Additives and Contaminants*, 21 (2004) 1.
- [83] D. L. Brandon y M. Friedman, Immunoassays of soy proteins, *J. Agric. Food Chem.*, 50 (2002) 6635.
- [84] M. A. Borissova, A. B. Lissizyn, J. E. Kalinova y A. N. Danilenko, Formation of meat myosin complexes with proteins of leguminous plants, *Fleischwirtschaft*, 4 (2000) 129.
- [85] S. Baudner, Analysis of plant proteins using immunological techniques based on the antigen-antibody precipitation, *Ann. Nutr. Alim.*, 31 (1977) 165.
- [86] S. J. Koppelman, C. M. M. Lakemond, R. Vlooswijk y S. L. Hefle, Detection of soy proteins in processed foods: literature overview and new experimental work, *J. AOAC Int.*, 87 (2004) 1398.
- [87] Legislación Alimentaria de Aplicación en España (Clasificación por Alimentos). Carne, aves, caza y derivados: norma genérica de calidad para productos tratados por el calor, Eypasa, Madrid, 2002.
- [88] W. J. Olsman y C. Hitchcock, Detection and determination of vegetable proteins in meat products, in *Developments in Food Analysis Techniques-2*, R. D. King Ed., Applied Science Publishers, Londres, cap. 6.
- [89] A. C. Eldrigde, Determination of soya protein in processed foods, *JAOCs*, 58 (1981) 483.
- [90] J. Belloque, M. C. García, M. Torre y M. L. Marina, Analysis of soyabean proteins in meat products: a review, *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 42 (2002) 507.

- [91] W. J. Olsman, Methods for detection and determination of vegetable proteins in meat products, *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, 56 (1979) 285.
- [92] K. Hofmann, Identification and determination of meat and foreign proteins by means of dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis, *Ann. Nutr. Alim.*, 31 (1977) 207.
- [93] W. J. Olsman, Detection of non-meat proteins in meat products by electrophoresis, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 141 (1969) 253.
- [94] A. L. Parsons y R. A. Lawrie, Quantitative identification of soya protein in fresh and heated meat products, *J. Food Technol.*, 7 (1972) 455.
- [95] W. F. van Gils y G. G. Hidskes, Detection of casein, soy proteins and coagulated egg-white in meat products by electrophoresis on cellulose acetate-membranes, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 151 (1973) 175.
- [96] R. C. E. Guy, R. Jayaram y C. J. Willcox, Analysis of commercial soya additives in meat products, *J. Sci. Food Agric.*, 24 (1973) 1551.
- [97] R. C. E. Guy y C. J. Willcox, Analysis of soya proteins in commercial meat products by polyacrylamide gel electrophoresis of the proteins extracted in 8 M urea and 1 % 2-mercaptoethanol, *Ann. Nutr. Alim.*, 31 (1977) 193.
- [98] Y. B. Lee, D. A. Rickansrud, E. C. Hagberg, E. J. Briskey y M. L. Greaser, Quantitative determination of soybean protein in fresh and cooked meat-soy blends, *J. Food Sci.*, 40 (1975) 380.
- [99] Y. B. Lee, D. A. Rickansrud, E. C. Hagberg y R. H. Forsythe, Detection of various nonmeat extenders in meat products, *J. Food Sci.*, 41 (1976) 589.
- [100] H. Homayounfar, Identification électrophorétique des protéines étrangères et en particulier des protéines de soja dans les produits alimentaires carnés frais ou en conserve, *Ann. Nutr. Alim.*, 31 (1977) 187.
- [101] K. Hofmann, Identification and determination of meat and foreign protein by means of dodecylsulphate polyacrylamide gel electrophoresis, *Z. Anal. Chem.*, 267 (1973) 355.
- [102] K. Hofmann y I. F. Penny, A method for the identification and quantitative determination of meat and foreign proteins using sodium-dodecylsulphate-polyacrylamide gel electrophoresis, *Fleischwirtschaft*, 53 (1973) 252.

- [103] Flaherty, B., Progress in the identification of non-meat food proteins, *Chem. Ind.*, 12 (1975) 495.
- [104] A. Válas-Gellei, Detection of soya and milk proteins in minced meat, *Acta Alimentaria*, 6 (1977) 215.
- [105] E. Molander, Determination of soya protein in meat products by standard curves obtained from SDS gel electrophoresis, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 174 (1982) 278.
- [106] M. A. Abd Allah, Y. H. Foda, S. El-Dashlouty, N. Y. A. El-Sanafiry y F. M. Abu Salem, Detection of soybean in soy-based meat substitutes, *Die Nahrung*, 5 (1986) 549.
- [107] B. Thorson, K. Skaare y T. Höyem, Identification of caseinate and soy protein by means of polyacrylamide gel electrophoresis, *Nord. Vet. Med.*, 21 (1969) 436.
- [108] U. Freimuth y W. Krause, Detection of foreign protein in meat products. Part II. Detection and determination of soy protein in hot sausages with the aid of electrophoresis in polyacrylamide gel, *Mitt. Nahrung*, 14 (1970) 19.
- [109] K. H. Fischer y H. D. Belitz, Detection of soybean-protein in meat products by electrophoresis, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 145 (1971) 271.
- [110] K. Hofmann y I. F. Penny, I.F., Identifizierung von soja- und fleischeiweiß mittels dodecylsulfat-polyacrylamidgel-elektrophorese, *Fleischwirtsch.*, 4 (1971) 577.
- [111] E. Spell, Detecting milk protein and soya protein in meat products by means of vertical disc electrophoresis, *Fleischwirtsch.*, 11 (1972) 1451.
- [112] A. Frouin, C. Barraud y D. Jondeau, Detection des protéines de soja ou de lait dans les produits de viande stérilisés ou non, *Ann. Fals. Exp. Chim.*, 66 (1973) 214.
- [113] J. W. Llewellyn y B. Flaherty, The detection and estimation of soya protein in food products by isoelectric focusing, *J. Food Technol.*, 11 (1976) 555.
- [114] J. W. Llewellyn y R. Sawyer, Application and limitation of isoelectric focusing and high performance chromatography in the estimation of soya proteins in meat products, *Ann. Nutr. Alim.*, 31 (1977) 231.
- [115] F. M. Richardson, Separating meat and nonmeat proteins by using disc electrophoresis, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 61 (1978) 986.
- [116] D. J. Armstrong, S. H. Richert y S. M. Riemann, The determination of isolated soybean protein in raw and pasteurized meat products, *J. Food Technol.*, 17 (1982) 327.

- [117] C. Ring, P. Weigert y L. Hellmannsberger, Determination of non-meat and meat protein with the discontinuous acrylamide gel electrophoresis system, *Fleischwirtsch.*, 62 (1982) 648.
- [118] H. H. Heinert y H. J. Baumann, Detecting the presence of soya protein in frankfurter-type sausages PoroPAGE with added SDS and urea, *Fleischwirtsch.*, 64 (1984) 89.
- [119] E. Feigl, Electrophoretic soja determination in frankfurter-type sausage using commercially available SDS-containing gel plates and an apparatus for isoelectric focussing, *Fleischwirtsch.*, 70, 702, 1990.
- [120] A. Lacourt, M. T. Malicot y J. Dauphant, Détection des protéines étrangères à la viande par électrophorése en gel de polyacrylamide en présence de SDS, *Ann. Nutr. Alim.*, 31 (1977) 217.
- [121] J. H. Woychik, M. C. Happich, H. Trinh y R. Seilers, Quantitation of soy protein in frankfurters by gel electrophoresis, *J. Food Sci.*, 52 (1987) 1532.
- [122] López, L.B., Greco, C.B., Ronayne de Ferrer, P., and Valencia, M.E., Identification of extrinsic proteins in boneless cooked ham by SDS-PAGE: Detection level in model systems, *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 56 (2006) 282.
- [123] M. Olivera Carrión y M. E. Valencia, Detección y cuantificación de soja en productos cárnicos por electroforesis. I. Estudio en sistema modelo, *Rev. Agroquím. Tecnol. Aliment.*, 30 (1990) 509.
- [124] M. Olivera Carrión y M. E. Valencia, Detección y cuantificación de soja en productos cárnicos por electroforesis. II. Identificación e interferencias de otras proteínas diferentes de soja, *Rev. Agroquím. Tecnol. Aliment.*, 30 (1990) 518.
- [125] L. Rossebo y J. Nordal, A serological method for the detection of trypsin inhibitor in commercial soy proteins and its use in detecting soy protein addition to raw meat products, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 148 (1972) 69.
- [126] L. Kamm, Immunochemical quantitation of soybean proteins in raw and cooked meat products, *JAOAC*, 53 (1970) 1248.
- [127] T. Y. Koh, Immunochemical method for the identification and quantitation of cooked or uncooked beef and soya proteins in mixtures, *J. Inst. Can. Sci. Technol. Aliment.*, 11 (1978) 124.

- [128] N. M. Griffiths, M. J. Billington, A. A. Crimes y C. H. S. Hitchcock, An assessment of commercially available reagents for an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) of soya protein in meat products, *J. Sci. Food Agric.*, 35 (1984) 1255.
- [129] J. H. Rittenburg, A. Adams, J. Palmer y J. Allen, Improved enzyme-linked immunosorbent assay for determination of soy protein in meat products, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 70 (1987) 582.
- [130] C. C. Hall, C. H. S. Hitchcock y R. Wood, Determination of soya protein in meat products by a commercial enzyme immunoassay procedure: collaborative trial, *J. Assoc. Publ. Analysts*, 25 (1987) 1.
- [131] D. B. Berkowitz y D. W. Webert, Determination of soy in meat, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 70 (1987) 85.
- [132] J. H. Glynn, The quantitative determination of soy-bean protein in sausage or other protein mixtures, *Science*, 89 (1939) 444.
- [133] C. S. Ferguson, P. A. Racicot y L. Rane, Study of use of precipitin test for determination of soybean flour in sausages, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 25 (1942) 533.
- [134] C. M. W. Hale, Determination of soybean flour in meat products, *Food Res.*, 10 (1945) 60.
- [135] E. Degenkolb y M. Hingerle, Untersuchungen über den serologischen nachweis von fremdeiweißzusätzen in hitzedenaturierten fleischerzeugnissen, *Arch. Lebensm. Hyg.*, 18 (1967) 241.
- [136] E. Degenkolb y M. Hingerle, Eine serologische schnellmethode zum quantitativen nachweis von fremdeiweißzusätzen in hitzedenaturierten fleischerzeugnissen, *Arch. Lebensm. Hyg.*, 20 (1969) 73.
- [137] H. Krüger y D. Grossklaus, Serological detection of soya protein in heated meat products. II. Experiments using indirect haemagglutination and immune electrophoresis, *Fleischwirtsch.*, 2 (1971) 181.
- [138] M. Peter, Die vertikale immunodiffusion-ein hilfsmittel zur quantitativen beurteilung von fremdeiweißzusätzen in fleischwaren, *Arch. Lebensm. Hyg.*, 10 (1970) 220.

- [139] E. Hauser, J. Bicanova y W. Künzler, Erfassung fleischfremder eiweiße in hitzebehandelten fleischwaren durch ein standardisiertes immunodiffusionsverfahren, Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg., 65 (1974) 82.
- [140] J. Kraack, Determination of foreign protein in sausage products, Fleischwirtsch., 5 (1973) 697.
- [141] L. A. Appelqvist, B. Persson y B. Wallin, The determination of non-meat protein in meat products, Näringsforskning. Arg., 19 (1975) 217.
- [142] H. O. Günther y S. Baudner, Nachweis von zusatzeiweißstoffen in lebensmitteln, Lebensmittelchemie u. Gerichtl. Chemie, 32 (1978) 105.
- [143] Hammond, J.C., Cohen, I.C., Everard, J., and Flaherty, B., A critical assessment of Ouchterlony's immunodiffusion technique as a screening test for soya protein in meat products, J. Assoc. Pub. Anal., 14 (1976) 119.
- [144] S. Baudner, A. Schweiger y H. O. Günther, Nachweis von sojaeiweiß aus auf 120 °C erhitzten fleischkonserven, Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg., 68 (1977) 183.
- [145] L. Kotter y C. Herrmann, Die indirekte hämagglutination als nackweisreaktion für fremdeiweiße, Arch. Lebensm. Hyg., 19 (1968) 267.
- [146] L. Kotter, C. Herrmann y G. Corsico, Zum quantitativen nachweis von aufgeschlossenem milcheiweiß in hocherhitzten fleischwaren mit hilfe der indirekten hämagglutination, Z. Lebensm. Unters. Forsch., 133 (1966) 15.
- [147] H. Krüger y Grossklaus, Serological detection of soya protein in heated meat products. III. Using qualitative precipitate measurements, Fleischwirtsch., 3 (1971) 315.
- [148] C. Herrmann y G. Wagenstaller, Über den nachweis von sojaprotein in fleischerzgnissen mittels der indirekten hämagglutination, Arch. Lebensm. Hyg., 24 (1973) 131.
- [149] H. Günther, Bestimmung von Fremdeiweiß in fleischwaren, Arch. Lebensm. Hyg., 6 (1969) 128.
- [150] H. Merkl, Differenzierungsmöglichkeiten von sojaprotein und senfmehl, Fleischwirtsch., 10 (1976) 1458.
- [151] G. Poli, A. Balsari, W. Ponti, C. Cantoni y L. Massaro, Crossover electrophoresis with indirect immunofluorescence in the detection of soy protein in heated meat products, J. Food Technol., 14 (1979) 483.

- [152] J. Heitmann, Demonstration of soya protein in heated meat products with an indirect immunofluorescence test, *Fleischwirtsch.*, 67 (1987) 621.
- [153] F. W. Janssen, G. Voortman y J.A. Baaij, Detection of soya proteins in heated meat products by "blotting" and "dot-blot", *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 182 (1986) 479.
- [154] F. W. Janssen, G. Voortman y J.A. Baaij, Detection of wheat gluten, whey protein, casein, ovalbumin, and soy protein in heated meat products by eletrophoresis, blotting, and immunoperoxidase staining, *J. Agric. Food Chem.*, 35 (1987) 563.
- [155] F. W. Janssen, J. A. Baaij y G. H. Hägele, Heat-treated meat products. Detection of modified gluten by SDS-electrophoresis, western-blotting and immunochemical staining, *Fleischwirtsch.*, 74 (1994) 168.
- [156] M. Körs y H. Steinhart, CTAB electrophoresis and immunoblotting: a new method for the determination of soy protein in meat products, *Z. Lebensm. Unters. Forsch. A*, 205 (1997) 224.
- [157] C. H. S. Hitchcock, F. J. Bailey, A. A. Crimes, D. A. G. Dean y P. J. Davis, Determination of soya protein in food using an enzyme-linked immunosorbent assay procedure, *J. Sci. Fd. Agric.*, 32 (1981) 157.
- [158] W. J. Olsman, S. Dobbelaere, C. H. S. Hitchcock, The performance of an SDS-PAGE and an ELISA method for the quantitative analysis of soya protein in meat products: an international collaborative study, *J. Sci. Food Agric.*, 36 (1985) 499.
- [159] P. Ravestein y R. A. Driedonks, Quantitative immunoassay for soya protein in raw and sterilized meat products, *J. Food Technol.*, 21 (1986) 19.
- [160] J. M. Yeung y P. G. Collins, Determination of soy proteins in food products by enzyme immunoassay, *Food Technol. Biotechnol.*, 35 (1997) 209.
- [161] A. Macedo-Silva, M. Shimokomaki, A. J. Vaz, Y. Y. Yamamoto y A. Tenuta-Filho, Textured soy protein quantification in commercial hamburger, *J. Food Composition and Analysis*, 14 (2001) 469.
- [162] M. B. Medina, Extraction and quantitation of soy protein in sausages by ELISA, *J. Agric. Food Chem.*, 36 (1988) 766.
- [163] K. Yasumoto, M. Sudo y T. Suzuki, Quantitation of soya protein by enzyme linked immunosorbent assay of its characteristic peptide, *J. Sci. Food Agric.*, 50 (1990) 377.

- [164] A. F. González-Córdova, A. M. Calderón de la Barca, M. Cota y B. Vallejo-Córdoba, Immunochemical detection of fraudulent adulteration of pork chorizo (sausage) with soy protein, *Food Sci. Technol. Inter.*, 4 (1998) 257.
- [165] H. Brehmer, S. Schleiser, U. Borowski, Determination of soya protein, pea protein and gluten in frankfurter-type sausages by means of an enzyme-linked-immunosorbent assay (ELISA), *Fleischwirtsch.*, 8 (1999) 74.
- [166] AOAC Official method 998.10, Soy protein in raw and heat processed meat products, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, *Official Methods of Analysis*, 16th edition, Rev. 1996, 1997, 1998. AOAC International, Gaithersburg.
- [167] W. Lindberg, J. Ohman, S. Wold y H. Martens, Simultaneous determination of five different food proteins by high-performance liquid chromatography and partial least-squares multivariate calibration, *Anal. Chim. Acta*, 174 (1985) 41.
- [168] W. Lindberg, J. Ohman, S. Wold y H. Martens, Determination of the proteins in mixtures of meat, soymeal and rind from their chromatographic amino-acid pattern by partial least-squares method, *Anal. Chim. Acta*, 171 (1985) 1.
- [169] C. G. Zarkadas, C. N. Karatzas y S. Khanizadeh, Evaluating protein quality of model meat/soybean blends using amino acid compositional data, *J. Agric. Food Chem.*, 41 (1993) 624.
- [170] M. Zhi-Ling, W. Yan-Ping, W. Chun-Xu, y M. Fen-Zhi, HPLC determination of muscle, collagen, wheat, shrimp, and soy proteins in mixed food with the aid of chemometrics, *Am. Lab.*, 29 (1997) 27.
- [171] F. J. Bailey, F.J., A novel approach to the determination of soya proteins in meat products using peptide analysis, *J. Sci. Food Agric.*, 27 (1976) 827.
- [172] F. J. Bailey y C. Hitchcock, A novel approach to the determination of soya protein in meat products using peptide analysis, *Ann. Nutr. Aliment.*, 31 (1977) 259.
- [173] F. J. Bailey, J. W. Llewellyn, C. H. S. Hitchcock y A. C. Dean, Determination of soya protein in meat products using peptide analysis and the characterisation of the specific soya peptide used in calculations, *Chem. Ind.*, 13 (1978) 477.
- [174] J. W. Llewellyn, A. C. Dean, R. Sawyer, F. J. Bailey y C. H. S. Hitchcock, Technical note: the determination of meat and soya protein in meat products by peptide analysis, *J. Food Technol.*, 13 (1978) 249.

- [175] S. H. Ashoor y P. G. Stiles, Determination of soy protein, whey proteins, and casein in unheated meats by high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr.*, 393 (1987) 321.
- [176] N. Parris y P. J. Guillespie, HPLC separation of soy and beef protein isolates, in *Methods for Protein Analysis*, J.P. Chemy y R. A. Barford, Eds., Am. Oil Chem. Soc., Champaign, 1988, pp. 142.
- [177] I. B. Agater, K. J. Briant, J. W. Llewellyn, R. Sawyer, F. J. Bailey y C. H. S. Hitchcock, The determination of soya and meat protein in raw and processed meat products by specific peptide analysis. An evaluation, *J. Sci. Food Agric.*, 37 (1986) 317.
- [178] N. B. Afeyan, N. F. Gordon, S. P. Fulton y F. E. Regnier, Perfusion chromatography: A novel tool for protein purification and analysis, en *Techniques in Protein Chemistry III*, R. H. Angeletti, Ed., Academic Press, Nueva York, 1992, pag. 135.
- [179] N. B. Afeyan, S. P. Fulton y F. E. Regnier, Perfusion chromatography parking materials for proteins and peptides, *J. Chromatogr.*, 544 (1991) 267.
- [180] A. T. Salzman, Perfusion chromatography and beyond, *BFE*, 9 (1992) 442.
- [181] M. C. García, M. L. Marina y M. Torre, Perfusion chromatography: an emergent technique for the analysis of food proteins, *J. Chromatogr. A*, 880 (2000) 169.
- [182] POROS Columns and Media, PerSeptive Biosystems Inc., Cambridge, 1991.
- [183] F. Svec y J. M. J. Fréchet, New designs of macroporous polymers and supports: From separation to biocatalysis, *Science*, 273 (1996) 205.
- [184] F. E. Regnier, Perfusion chromatography, *Nature*, 350 (1991) 634.
- [185] Perfusion chromatography. *POROS column and media selection guide*, PerSeptive Biosystems Inc., Cambridge, 1994.
- [186] N. B. Afeyan, N. F. Gordon, I. Mazsaroff, L. Várady, S. P. Fulton, Y. B. Yang y F. E. Regnier, Flow-through particles for the high-performance liquid chromatography separation of biomolecules: Perfusion chromatography, *J. Chromatogr.*, 519 (1990) 1.
- [187] P. Augustijns, Determination of chloroquine and desethylchloroquine in biological samples using perfusion chromatography and fluorescence detection, *J. Liq. Chromatogr. & Rel. Technol.*, 20 (1997) 1103.

- [188] M. Roobol-Bóza, S. Shochat, S. E. Tjus, A. Hagman, P. Gast y B. Andersson, Perfusion chromatography - a new procedure for very rapid isolation of integral photosynthetic membrane proteins, *Photosynth. Res.*, 46 (1995) 339.
- [189] M. C. García, M. Torre y M. L. Marina, A perfusion reversed-phase chromatographic method for ultrarapid determination of soybean proteins in soybean infant formulas and soybean milks: method development and validation, *J. Chromatogr. Sci.*, 36 (1998) 527.
- [190] M. C. García, M. L. Marina y M. Torre, Determination by perfusion reversed-phase high-performance liquid chromatography of the soybean protein content of commercial soybean products prepared directly from whole soybeans, *J. Chromatogr. A*, 880 (2000) 37.
- [191] S. Delgado, M. C. García, M. L. Marina y M. Torre, Influence of the nature and concentration of the organic modifier and ion pairing agent in mobile phase on the separation of soybean proteins by perfusion liquid chromatography. Application to the quantitation of soybean proteins in commercial dairy-like soybean products using multivariate techniques, *J. Sep. Sci.*, 26 (2003) 1363.
- [192] M. C. García, M. Torre y M. L. Marina, Characterization of commercial soybean products by conventional and perfusion reversed-phase high-performance liquid chromatography and multivariate analysis, *J. Chromatogr. A*, 881 (2000) 47.
- [193] M. C. García, J. M. Heras y M. L. Marina, Simple and rapid characterization of soybean cultivars by perfusion reversed-phase HPLC: Application to the estimation of the 11S and 7S globulin contents, *J. Sep. Sci.*, 30 (2007) 475.
- [194] J. M. Heras, M. L. Marina y M. C. García, Development of a perfusion ion-exchange chromatography method for the separation of soybean proteins and its application to cultivar characterization, *J. Chromatogr. A*, 1153 (2007) 97.
- [195] AOAC Official Methods of Analysis, 16th ed. Association of Official Analytical Chemistry, Arlington, 1990.
- [196] U. K. Laemmli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of Bacteriophage T4, *Nature*, 227 (1970) 680.
- [197] M. Feinberg y N. Raguènès, Development and application of a standardized validation procedure for food chemistry laboratories, *Anal. Chim. Acta*, 391 (1999) 239.
- [198] R. Compañó y A. Ríos, Selección y validación de los métodos analíticos, en *Garantía de la calidad en los laboratorios analíticos*, Síntesis, Madrid, 2002, p. 211.

- [199] ICH Steering Comité, Text on validation of analytical procedures, (1994) 1 (www.Ich.org).
- [200] ICH Steering Comité, Validation of analytical procedure: methodology, (1996) 1 (www.Ich.org).
- [201] L. Huber, Validation of HPLC methods, en BioPharm (vol. 12), Advanstar Communication, (1999) 64.
- [202] Center for drug evaluation and research (CDER), Reviewer Guidance. Validation of chromatographic methods, (1994) 1 (www.fda.gov).
- [203] J. M. Green, A practical guide to analytical method validation, Anal. Chem., 68 (1996) 305A.
- [204] J. N. Miller y J. C. Miller, en *Estadística y Quimiometría para Química Analítica*, Pearson Education, Madrid, 2002.
- [205] L. Cuadros, A. M. García, F. Alés, C. Jiménez y M. Román, Validation of an Analytical Instrumental Method by Standard Addition Methodology, J. AOAC Int., 78 (1994) 471.
- [206] W. J. Wolf, R. E. Peterson y M. L. Schaer, Preparative reversed-phase high-performance liquid chromatography of soybean proteins and characterization of fractions by gel electrophoresis, J. Agric. Food Chem., 40 (1992) 1809.
- [207] <http://www.ch.embnet.org/software/ClustalW.html>, entrada realizada 30/03/2006
- [208] <http://pubs.acs.org>