

Determinación de Proteínas en carne y productos cárnicos mediante Geles de Poli(acrilamida con SDS)

M^a D. CALSINA , G. CASADEMONT y J.M. MONFORT.
Institut Català de la Carn, Granja Camp i Armet , Monells (Girona) , España.

Introducción:

La técnica de electroforesis con geles discontinuos de acrilamida ha sido utilizada para el estudio de las proteínas existentes en los productos cárnicos ,tanto en disco como en placa. (Persons y Lawrie, 1977) . Así mismo ha sido utilizada la electroforesis con acrilamida y dodecil sulfato de sódio (Hoffman 1973, Person y Appelgenst 1977). En el presente trabajo se combinan ambas características, lo que proporciona una buena técnica para la separación de proteínas, y por tanto para el estudio de las proteínas de los productos cárnicos. Para ello se han realizado electroforegramas de carne de cerdo, vaca y caballo; así como de las proteínas no cárnicas más comúnmente utilizadas por las empresas del sector. Las densitometrías de electroforegramas con distintas concentraciones de proteína añadida han permitido relacionar dichas concentraciones con los cocientes entre bandas características de las proteínas añadidas y la actina. Se ha observado que la relación es lineal y por tanto que la técnica puede ser cuantitativa

Material y métodos :

Preparación de las muestras:

Las muestras cárnicas utilizadas provenían de carne de cerdo, vaca y caballo (48 horas post mortem). Las proteínas no cárnicas utilizadas han sido : aislado de soja (pureza del 70%) caseína (pureza del 95 %), gluten de trigo (pureza del 65%). Las mezclas de proteína animal (cerdo) y proteína añadida se realizaron siguiendo el criterio dado por la legislación española referente a la cantidad máxima de proteína añadida permitida en cada categoría (extra 1,5% sobre peso seco, primera 3% , segunda 4%, tercera 5%), que respecto al contenido proteico total corresponde a un 5%, 10 % , 15% , 20 % respectivamente. Las muestras se prepararon mezclando la carne picada de cerdo con cantidades precisas de los aislados de proteína.

Para la homogenización de las muestras se utilizó el método de Hoffman modificado, a fin de poder utilizar el sistema de tampones de Laemmli en la carrera electroforética. La disolución empleada fue la siguiente: para cada gramo de muestra: 10 ml de tampón 0,3% Tris-HCl , 0,1% de SDS, pH 8; 2 ; 10 ml de SDS al 2% ; 2 ml de β Mercaptoetanol. En los productos cárnicos elaborados fue preciso un tratamiento previo a fin de obtener una mejora en la solubilización. Se utilizó el método de Homayounfar (1975) para el desengrasado parcial de la muestra, con anterioridad a su solubilización. El homogenizado obtenido se dejó reposar durante una noche o bien fue calentado veinte minutos a 100° C. Posteriormente se centrifugaron las muestras a 3000 rpm durante diez minutos y el sobrenadante se filtró con lana de vidrio obteniéndose el extracto proteico. Seguidamente para una solubilización total del extracto se diluyó 1 ml con la solución siguiente: Tris-HCl 50 mM, pH 6,8; sacarosa al 20 % ; SDS al 2% ; EDTA 20 mM; 0,03 % de azul de Bromtimol. Calentándose a 100°C durante quince minutos. Para conocer la concentración proteica del extracto se utilizó el microkjendal, al no poder utilizarse el método de Lowrie dado que el Tris interfiere en la determinación con el reactivo de Folin-Ciocalteu.

Técnica electroforética:

La técnica electroforética escogida es la de tampones discontinua de Laemmli (1970) combinada con la electroforesis en presencia de SDS. Las características de los geles son de 5% de acrilamida para el superior y 10% para el inferior. La fuente de voltaje utilizada ha sido ATOM 500. El voltaje escogido para el gel superior fue de 60 V , y para el inferior de 120 V. La duración del electroforegrama fue de tres horas. Los geles fueron revelados según el método de Farnbank et al. (1971) con las modificaciones dadas por Ames (1970). El colorante empleado fue el Comasie Blue . A fin de conocer el peso molecular de las bandas visualizadas, y así poder caracterizar a las proteínas, se utilizaron patrones de proteínas de pesos moleculares conocidos, para obtener una correlación entre el peso molecular de la proteína y su Rf en cada placa. Los patrones proteicos utilizados fueron : Fosforilasa b (94 K) , Albumina de suero bovino (67 K); ovoalbumina (43 K), anhidrasa carbónica (30 K), inhibidor de la tripsina en la soja (20 K), Lactoalbumina (14,5 K), de Pharmacie Fine Chemicals . Se obtuvo una relación lineal entre el

de cada banda y el logaritmo del peso molecular de la proteína en cuestión. Para conocer la cantidad de proteína presente en cada banda se realizaron densitogramas con un densitómetro ATOM 429 a una longitud de onda de 470 nm, dado que la intensidad de coloración de cada banda es proporcional a la cantidad de proteína (carácter cuantitativo del Coomassie Blue).

Resultados y discusión:

Parsons y Lawrie (1977), establecieron la determinación cuantitativa de proteínas de soja empleando técnicas electroforéticas con urea. Lacourt et al. (1977) abordaron la determinación cuantitativa de mezclas de proteínas vegetales (soja, girasol y haba). En el presente trabajo se ha estudiado el patrón electroforético de las proteínas que constituyen el tejido muscular de tres especies animales (porcino, equino y bovino) así como de los aislados de proteínas de soja, caseína y gluten de trigo, por ser éstos últimos las proteínas no cárnicas de mayor utilización en la industria cárnica española.

En la figura 1, se observa que los electroforegramas de proteínas musculares estudiados presentan pequeñas diferencias entre sí. La característica más específica del electroforegrama de carne de cerdo es la mayor intensidad de la banda de 70 K; en el caso de la carne de vacuno se constata la ausencia de la banda de 49 K, muy próxima a la de la actina, y la presencia de una banda intensa a 16 K.

En cuanto a las proteínas no cárnicas las diferencias son mayores. La soja presenta nueve bandas, cinco de ellas mayoritarias, siendo las más específicas las de 19 K, 72 K, 76 K, por no coincidir con las bandas de los otros electroforegramas. En el caso de la caseína aparecen tres bandas 34,5 K, 30 K, 26 K, siendo la de 30 K la más específica. Sin embargo el gluten presenta un electroforegrama complejo con seis bandas mayoritarias de pesos moleculares de 50 K, 45 K, 39 K, 33 K, 31 K, 29 K, que coinciden en gran medida con la zona de la actina (46 K), tropomiosina (35 K) etc...

Al objeto de poder cuantificar las diversas proteínas añadidas se ha constatado la existencia de una relación lineal entre la concentración de proteína añadida y el índice: área de la zona de bandas características con respecto a la área de la actina (A. zona caract./A. acti.) Dicho índice elimina las diferencias de orden experimental entre los diversos electroforegramas de un mismo gel, dado que la actina es la proteína mayoritaria y la más estable (Lacourt et al. 1977). La relación se estableció en aquellos intervalos de peso molecular donde se sitúan las bandas características de las proteínas estudiadas y a la vez existe una menor interferencia con las bandas proteicas musculares. Las zonas son las siguientes:

- .- A : 70 K a 82 K
- .- B : 35,5 K a 56 K (véase la figura 2)
- .- C : 29 K a 31,5 K
- .- D : 17 K a 20 K

Los resultados obtenidos para cada aislado de proteína estudiado se expresan en la figura 3. El índice (Az/Aac) solamente se ve modificado en las zonas A y D por la presencia de las proteínas de soja; en la zona B por la presencia de las proteínas de gluten; sin embargo en la zona C no es específico para la caseína ya que se ve modificado por la presencia de los tres tipos de proteína estudiados.

Así pues, un aumento del índice (Az/Aac) en las zonas A y D, con respecto a su valor en el electroforegrama de proteína muscular, nos indica la presencia de proteínas de soja. Utilizándose la correlación hallada puede determinarse el porcentaje de soja añadida. Lo mismo ocurre en la zona B con respecto al gluten. Sin embargo para determinar el porcentaje de proteína de caseína, es necesario sustraer del índice hallado en la zona C la contribución debida a los porcentajes de las proteínas de soja y gluten, en su caso, determinados anteriormente en sus respectivas zonas específicas. Por ello es preciso seguir un orden en el estudio de las zonas señaladas, empezando por las de mayor especificidad (A, B, C).

En nuestro laboratorio se han realizado pruebas con hamburguesas elaboradas con concentraciones conocidas de proteína añadida.

En un caso contenían un 5% de proteínas de soja y un 5% de proteínas de caseína, aproximadamente. Se detectó la presencia de 5,7% de proteínas de soja y de un 4,5% de proteínas de caseína. En otra prueba, las hamburguesas contenían un 8% de caseína y un 5% de gluten, aproximadamente. Se detectó la presencia de gluten al 5,8% y la de caseína al 10%.

Aunque es necesario realizar un mayor número de determinaciones cuantitativas, la precisión de la técnica debe situarse en un margen de $\pm 2\%$. Evidentemente cuanto menor sea la interferencia de las proteínas cárnicas con el aporte específico de las proteínas añadidas en las zonas de estudio mayor será la precisión de los resultados obtenidos.

El método descrito puede ser asimismo de gran utilidad en el estudio de los procesos proteolíticos que tienen lugar en la maduración y la fermentación de los productos cárnicos curados.

Bibliografia:

- .- Ames, G. F. 1974. Resolution of bacterial proteins by polyacrylamide gel electrophoresis on slabs. *J. Biol. Chem.* **249** : 634-644.
- .- Farinbanks, G., T. L., Steck y D. F. K. Wallach 1974. Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the erythrocyte membrane. *Biochemistry* **10** : 2606-2617.
- .- Hofmann, K. 1973. Method for the identification and quantitative determination of meat and foreign protein using SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. *Fleischwirtschaft* **53** : 252-257.
- .- Homayounfar H. 1975. Détection des protéines de soja dans les produits à base de viande par électrophorèse sur gel de polyacrylamide. *Cahiers Nut. Diet.* **4** : 37-39.
- .- Lacourt A. et al 1977. Détection des protéines étrangères à la viande par électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS. *Ann. Nutr. Alim.* **31** : 217-224.
- .- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T 4. *Nature* **227** : 680-685.
- .- Parsons A. L. and R. A. Lawrie. 1977. Quantitative identification of plant proteins in food products a procedure based on laser densitometry of proteins extractable in 10 M urea and resolved by thin-layer polyacrylamide gel-electrophoresis. *Ann. Nutr. Alim.* **31** : 201-206.
- .- Persson B. Apperqvist L. A. 1977. The determination of non-meat proteins in meat products using polyacrylamide gel electrophoresis in SDS. *Ann. Nutr. Alim.* **31** : 225-228.

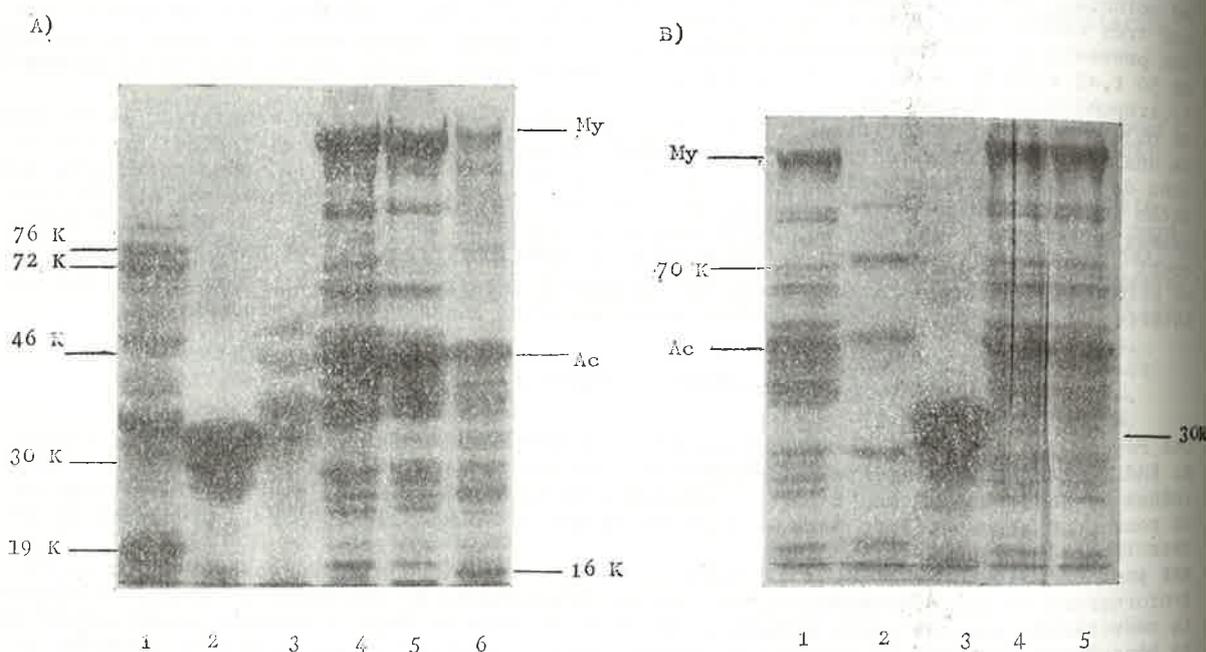


FIG 1 : Electrophoretograms of :
 A : (1) soya ; (2) casein ; (3) gluten ; (4) pig ; (5) horse ; (6) cattle
 B : (1) pig ; (2) protein patterns ; (3) casein ; (4) pig + casein 10 %
 (5) pig + casein 15% .

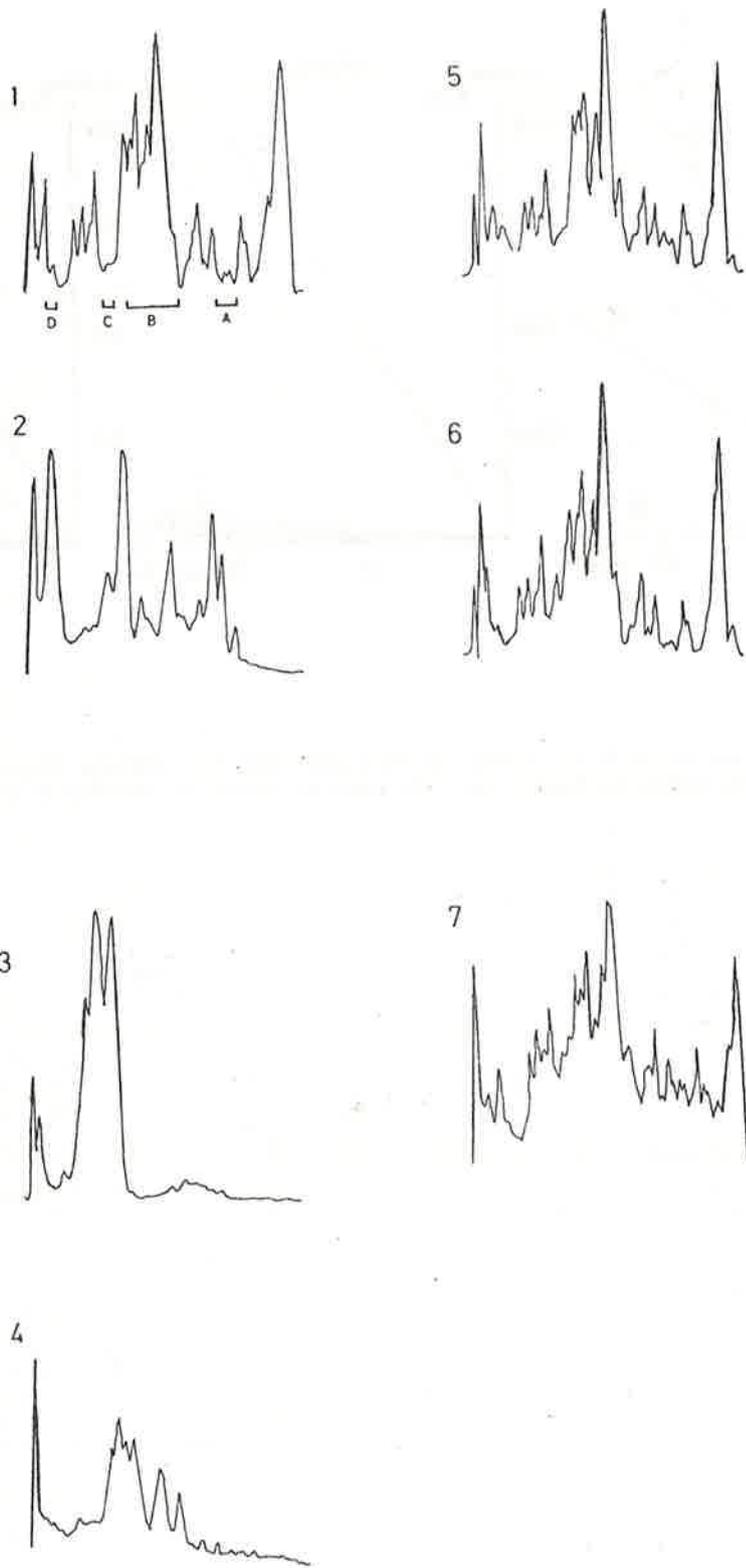


FIG 2 : Densitomer tracings of gel electrophoretics-SDS . 1) Pig muscle, 2) soya , 3) ca-
 sein, 4) gluten, 5) pig + soya 15%, 6) pig + casein 15% , 7) pig + gluten 15% .

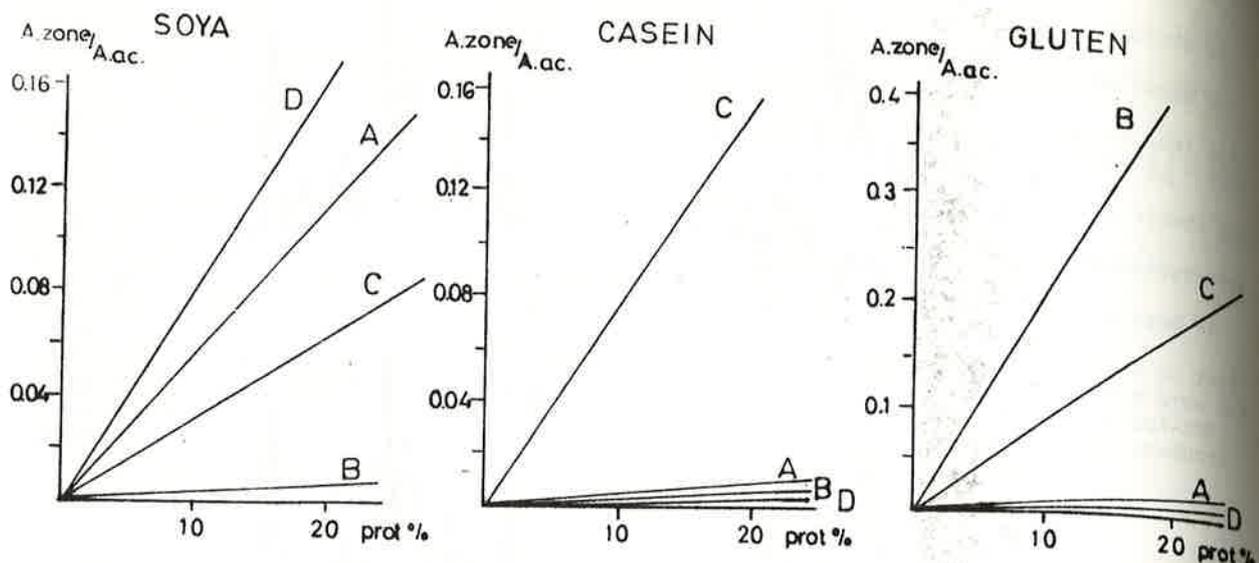


FIG 3 : Relations between the index of each zone and the foreign protein in percentage.
 Relacion entre el índice en cada zona de proteina añadida y su porcentaje.