

2.5.10.90



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**CUANTIFICACION DE LA FRACCION TERMOESTABLE DE  
LAS PROTEINAS DE SOYA EN PRODUCTOS CARNICOS,  
POR METODOS INMUNOLOGICOS.**

**T E S I S**

**MARIA DEL PILAR GRANADA MACIAS**

**QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO**

**1 9 8 4**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## I N D I C E

Indice	1
1.0 INTRODUCCION Y OBJETIVOS	4
2.0 GENERALIDADES	5
2.1 Historia de la soya	5
2.2 Características de la soya	5
2.3 Las proteínas de soya	7
2.3.1 Propiedades fisico-químicas de las proteínas de soya	8
a. Solubilidad en función del pH	8
b. Dispersibilidad y desnaturalización	9
2.3.2 Glicinina	9
2.3.3 Fracción 7 S	11
2.3.4 Fracción 2 S	11
2.3.5 Fracción 15 S	12
2.3.6 Fracción Termoestable	12
2.4 Derivados de soya usados en la elaboración de productos cárnicos	14
2.4.1 Harina y sémola de soya	15
2.4.2 Concentrado de proteínas de soya	16
2.4.3 Aislado de proteínas de soya	17
2.4.4 Fibras texturizadas	18
a. Extrusión termoplástica	18
2.5 Usos de las proteínas de soya en productos cárnicos	19
2.5.1 Productos molidos	20
2.5.2 Embutidos	20
2.5.3 Otros	20
2.6 Otros usos de la soya	23
2.7 Aspectos nutricionales de la soya	24
2.8 Métodos de detección de proteínas de soya en pro - ductos cárnicos	27
3.0 MATERIALES Y METODOS	31
3.1 Obtención del suero inmune contra la fracción ter- moestable de las proteínas de soya	31
3.1.1 Obtención de harina desengrasada de soya	30
3.1.2 Extracción de las globulinas de soya	31
3.1.3 Tratamiento térmico	33

3.1.4	Cuantificación de proteínas por el método de Biuret	32
3.1.5	Esquema de inmunización	33
3.1.6	Sangría de prueba	34
3.1.7	Titulación del suero	34
a.	Preparación de las placas de agar	35
b.	Doble difusión en gel de Duchterlony	35
3.1.8	Sangría de cosecha	36
3.1.9	Esterilización del suero inmune	36
3.1.10	Titulación del suero estéril	36
3.2	Pruebas cruzadas	
3.3	Técnica de inmunodifusión radial	37
3.3.1	Preparación del agar	37
3.3.2	Preparación de la mezcla agar:suero inmune	38
3.3.3	Extracción de la fracción termoestable de los productos cárnicos	38
3.3.4	Pruebas de calibración	39
3.4	Cuantificación de la fracción termpestable en productos cárnicos por inmunodifusión radial	40
3.5	Determinación de fécula en embutidos por hidrólisis ácida de almidón	41
3.5.1	Preparación de reactivos	41
3.5.2	Técnica experimental	42
a.	PRUEBA CUALITATIVA	42
b.	Prueba cuantitativa	42
4.0	RESULTADOS Y DISCUSION	44
4.1	Titulación de los sueros	44
4.2	pruebas cruzadas	45
4.3	Inmunodifusión radial	45
4.3.1	Pruebas de calibración	45
4.3.2	Cuantificación de la fracción termoestable en productos cárnicos comerciales	47
4.4	Determinación de fécula en embutidos por hidrólisis ácida de almidón	54
4.4.1	Prueba cualitativa	54

4.4.2	Prueba cuantitativa	55
5.0	RESUMEN	56
6.0	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	57
7.0	ANEXOS	58
Anexo I	Preparación del control de productos cárnicos	58
Anexo II	Elección de las muestras comerciales evaluadas	60
Anexo III	Determinación de proteínas por la técnica de Biuret	61
Anexo IV	Resultados de la cuantificación de almidón por hidrólisis ácida	64
Anexo V	Determinación de reductores totales en alimentos	68
Anexo VI	Pruebas de solubilidad de la fracción termoestable	69
		70

El aumento en el uso de las proteínas de soya en alimentos procesados en la última década, hace necesario el contar con técnicas analíticas que permitan cuantificar el contenido de los diferentes aditivos de soya en los productos terminados. Las proteínas de soya tienen especial importancia en la industria de la carne, pues debido a su valor nutritivo y propiedades funcionales, se han empleado con gran éxito como análogos y sustitutos de carnes en alimentos industrializados. Sin embargo, el uso de los diferentes derivados de soya en productos cárnicos, no cuenta en nuestro país con una reglamentación adecuada, debido a que no existe un método que pueda detectar este tipo específico de adulteraciones. Es por esto que el objetivo fundamental del presente trabajo es el desarrollo de una técnica analítica, cuantitativa, reproducible, confiable y sencilla que permita la detección y cuantificación de soya en productos cárnicos con un alto grado de especificidad; estas características las reúnen los métodos inmunológicos. De ellos se eligió la técnica de Inmunodifusión radial, pues además de reunir los requisitos mencionados, es un método que no requiere de equipo especial y por tanto su costo es bajo. Como segundo objetivo, se aplicará esta técnica a productos comerciales, para evaluar su contenido de soya y detectar un posible fraude a la legislación vigente, la cual indica el uso de un máximo de aglutinantes del 10% (26). Finalmente se probará la hidrólisis ácida de almidón en los productos evaluados por inmunodifusión radial; la hidrólisis de almidón es la técnica indicada en la única Norma analítica que existe para este tipo de aditivos.

## 2.0 GENERALIDADES

### 2.1 HISTORIA DE LA SOYA

Originaria de China, la soya se ha utilizado como alimento en Asia desde hace aproximadamente 5,000 años. Ya en el año 2838 A.C., el rey chino Chang-Nonag menciona a la soya en un tratado médico; en este país fue considerada uno de los cinco cultivos sagrados, ya que su grano era esencial para la existencia de su población. Fue introducida en Europa por el botánico germano Engelbert Kaempfer, de donde se propagó a principios del siglo actual a Rusia, Italia y Hungría. En Estados Unidos, su cultivo se inició en 1904, pero no fue industrializada comercialmente sino hasta mediados de los años 30's. (43). George Washington Carver, en 1924 descubre una de las características más importantes de este grano; su alto contenido protéico: 38%, mientras que la carne vacuna posee aproximadamente el 18% (39).

Actualmente la soya se cultiva en una gran extensión de E.U.A. (más de 16 millones de Ha.) ocupando uno de los primeros lugares entre los cultivos de ese país. En E.U.A se produce el 67% de la producción mundial de soya, siguiéndole en importancia: China con 14 millones de Ha. de cultivo y el 25% de la producción mundial; Rusia con 850,000 Ha., Indonesia 650,000 Ha. y otros productores menores como Japón, Corea del Sur, Canadá y Paraguay (24). En México, aunque la soya se considera uno de los cultivos básicos; su participación en la agricultura nacional en 1981 representó solamente el 4.4% (34).

### 2.2 CARACTERISTICAS DE LA SOYA

La soya (Glicine max) es una planta anual de primavera-verano, cuyo ciclo vegetativo oscila entre 3 y 7 meses. Su desarrollo puede variar desde 40 cm. hasta 1.50m. según la variedad y condiciones de cultivo.

La soya pertenece a la familia de las leguminosas, tiene consistencia herbácea y tallos rígidos, fuertes y erectos. Las hojas son triflo

liadas de forma ovalada ó lanceolada y según la variedad su matiz cambia. Sus flores son pequeñas y amariposadas, hermafroditas, no muy visibles, forman racimos de 3 a 15 flores en las axilas de las hojas, su color puede ser blanco ó púrpura. El fruto es una legumbre ó vaina que contiene de 1 a 5 semillas. La semilla es generalmente esférica y su color cambia de acuerdo a la variedad desde verde, amarillo-blanquecino ó negro. Su tamaño es semejante al de un guisante, de 4 a 7 semillas pesan 1gr. aunque existen variedades de grano más pequeño. El embrión llena por completo la semilla, ésta se forma de dos cotiledones y una pequeña radícula. Las reservas alimenticias de las semillas están almacenadas en los cotiledones, cuyas células elongadas forman una empalizada que contiene aceite y proteínas. Los cotiledones contienen alrededor de 38% de proteínas, 18% de grasa, 25% de sustancias extractibles no nitrogenadas, agua, vitaminas, minerales y enzimas (39). La mayor parte de las proteínas se almacena en estructuras llamadas cuerpos protéicos, entre los cuales se hallan esparcidos los esferosomas que contienen aceite.

Tanto las hojas, como tallos y vainas son pubescentes, siendo el color de los pelos rubio ó pardo agrisado. Cuando la soya llega a su madurez, las hojas se ponen amarillentas y caen, quedando todas las vainas maduras en el tallo. Este hecho constituye una ventaja, pues facilita su recolección (23).

La soya es una planta sensible a la exposición solar, de las llamas de día corto. Sin embargo existen en el mundo, una gran gama de variedades comerciales de ciclos vegetativos muy diversos (desde 90 hasta cerca de 200 días), adaptables a cualquier zona de acuerdo a sus exigencias en cuanto a la duración del día (fotoperiodismo) y por tanto a la latitud geográfica. En E.U.A se han clasificado las variedades en 10 grupos de madurez numerados desde el 00 hasta VIII. En el cuadro No.1, se mencionan algunos, especificando sus ciclos comprobados en aquel país.

CUADRO NO.1 VARIETADES Y CICLOS DE LA SOYA (23)

GRUPO	VARIEDAD	CICLO (Días)
00	Portage	90-95
0	Merit, Traverse	105-110
I	Chipewa 64, Hark, Wirth	112-118
II	Harosoy 63, Lindarin 63, Ameay, Corsoy, Beeson	122-128
III	Shelby, Wayne	132-135
IV	Clark 63, Kent, Cuther, Calland	137-147
V	Hill, Dare	152-163
VI	Lee	168-175
VII	Bragg	178-188
VIII	Hampton, Hardee	190-195

### 2.3 LAS PROTEINAS DE SOYA

Las proteínas de soya constituyen una compleja mezcla de componentes, generalmente dividida en dos categorías: las de reserva y las proteínas biológicamente activas. Las proteínas de reserva están localizadas en partículas intracelulares de los cotiledones, llamadas cuerpos protéicos. Estudios de microscopía electrónica, han mostrado que los cuerpos protéicos aislados en un simple gradiente de sacarosa, tienen forma esférica y poseen un diámetro entre 1 y 3 micras (44) su contenido protéico es de aproximadamente 70%, el resto incluye humedad, carbohidratos, cenizas y pequeñas cantidades de RNA (2).

Las proteínas biológicamente activas, incluyen numerosas enzimas así como otras proteínas con actividad biológica específica como inhibidores de proteasas y hemaglutininas.

Las proteínas de reserva, también llamadas globulinas, por ser insolubles en agua, pero solubles en soluciones de sales neutras (14) - representan la mayor parte de los componentes usados en sistemas alimenticios. Se precipitan isoelectricamente a pH entre 4.5 y 5.0; en el

suero remanente se encuentran las proteínas biológicamente activas.

El análisis de las proteínas de soya por electroforesis, filtración en gel, puntos isoeléctricos y patrón típico de ultracentrifugación, muestran cuatro fracciones designadas: 2, 7, 11 y 15 S, en base a sus coeficientes de sedimentación (Cuadro No. 2). Por técnicas inmunológicas, se han purificado y caracterizado las globulinas que forman parte de éstas fracciones a las que se les bautizó como:  $\alpha$  Conglicinina,  $\gamma$  Conglicinina, Glicinina, y  $\beta$  Conglicinina (2), respectivamente.

CUADRO NO. 2 CANTIDADES APROXIMADAS Y COMPONENTES DE LAS FRACCIONES SOLUBLES EN AGUA DE LAS PROTEINAS DE SOYA (2) (5).

FRACCION	% DEL TOTAL	COMPONENTES	PESO MOLECULAR
2 S	22	Inhibidor de Tripsina, Citocromo C	8,000 21,500
7 S	37	Hemaglutininas, Lipoxigenasa, Amilasa y Globulina 7 S	- - 61,700
11 S	31	Globulina 11 S	180 - 210,000
15 S	11	-	-

### 2.3.1 PROPIEDADES FISICO-QUIMICAS DE LAS PROTEINAS DE SOYA

#### a. SOLUBILIDAD EN FUNCION DEL pH

Un extracto de globulinas de soya, preparado a partir de hojuelas extraídas a pH 9, precipitadas isoeléctricamente, lavadas y neutralizadas; presenta el perfil de solubilidad mostrado en la Figura No. 1. La mayor parte de las globulinas de soya son solubles a pH mayor de 9, mientras que el mínimo de solubilidad se encuentra entre pH 4 y 5. (33). Sin embargo, utilizando altas concentraciones de sales (0.7M de NaCl y 0.2M de CaCl<sub>2</sub>), pueden obtenerse soluciones altamente concentradas de globulinas de soya, aún bajo pH igual ó menor que el del punto isoeléctrico, es decir entre 4.5 y 7.0 (22).

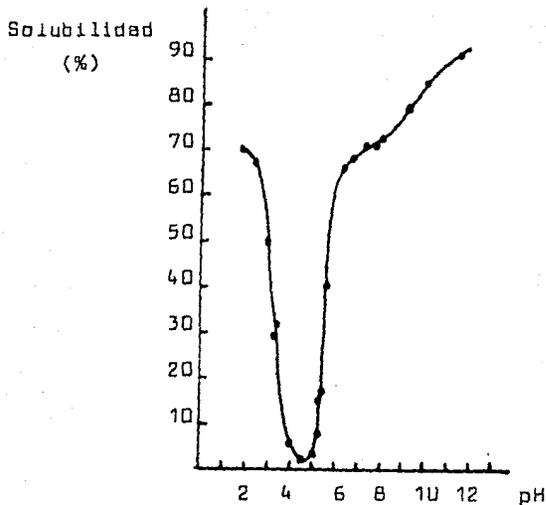


Figura No.1 Solubilidad de las proteínas de soja en función del pH (33).

b. DISPERSIBILIDAD Y DESNATURALIZACION DE LAS PROTEINAS DE SOYA

Casi el 90% de la materia nitrogenada de la harina desengrasada de soja es dispersible en agua a pH de 6.6; el 65% de éstas sustancias pueden ser precipitadas por ácidos a pH de 4.1 y recobradas como proteínas.

Beckel realizó estudios sobre la desnaturalización por calor a diferentes temperaturas y porcentajes de humedad de las proteínas de soja. Sus resultados se muestran en el Cuadro No.3 e indican que existe una temperatura crítica para cada humedad abajo de la cual la desnaturalización es baja, pero sobre ésta temperatura la insolubilización es rápida (5)(31).

2.3.2 G L I C I N I N A (FRACCION 11 S)

Es la proteína de reserva más importante de la soja, constituye 1/3 del total de proteínas del grano. Es una globulina con peso molecular entre 333,000 y 363,000 (19). Fue descrita por primera vez por Osborne y Campbell en 1898, quienes le dieron su actual nombre (5). Contiene grandes cantidades de ácido glutámico y aspártico, y una baja-

CUADRO No.3 DESNATURALIZACION POR CALOR DE LAS PROTEINAS DE SOYA (5).

HUMEDAD RELATIVA (%)	TEMPERATURA °C	% DESNATURALIZACION				
		0.5hr	1.0 hr	1.5 hr	2.0hr	2.5 hr
100	60	0.6	-	-	64	-
	80	2.2	4.4	11.5	11.5	26.3
	90	10.8	27	33.2	-	85
	100	-	71.1	86.4	92.8	95.9
	116	55.4	87.8	92.9	95.1	97.3
	127	-	87.8	93.4	97.1	98.1
50	100	3.8	11.9	12.8	13.7	26.1
18	80	0.9	0.9	3.9	3.9	3.9
	100	2.5	2.5	8.6	11.0	14.1
	120	11.1	11.1	62.5	84.7	90.8
0	100	4.8	4.8	6.7	-	10.1
	120	-	-	-	19.8	50.8

proporción de histidina, cisteína, metionina, tirosina y triptofano. Los residuos N terminales de la glicinina, corresponden a los aminoácidos glicina, leucina y fenilalanina en proporción 4:1:1 respectivamente - (2); su coeficiente de sedimentación se ha descrito como 12.25 S (42) y 11.85 S (13), el punto isoeléctrico de ésta proteína se encuentra - entre pH 4.64 (17) y pH 5 (42); su coeficiente de difusión obtenido - por métodos inmunológicos es  $D_{20w} = 1.47 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{seg}$  (4). La forma - más estable de la glicinina es un dímero que está compuesto por dos - estructuras anular-hexagonales que contienen a su vez seis subunidades diferentes tres ácidas y tres básicas (4). La fracción 11 S puede precipitarse selectivamente de un extracto acuoso de proteínas de soya diluido 1:10, usando Magnesio (II) 0.05M, la preparación que se obtiene tiene entre un 90-95% de pureza, después de dializarla contra - solución reguladora de fosfatos de pH 7.8 en cloruro de sodio 0.5 M- (1).

#### a. PROPIEDADES INMUNOQUIMICAS DE LA GLICININA

Al poner en contacto glicinina con su suero anti-específico, por la técnica de doble difusión en gel, se obtiene una sola banda de inmunoprecipitado. El suero anti-glicinina produce una débil reacción con

la Araquina, que es la proteína más importante del cacahuete, es posible que otras proteínas de reserva de semillas diferentes puedan compartir determinantes antigénicos con la Glicinina.

A pH 7.6, la Glicinina se polimeriza rápidamente y el polímero insoluble en agua retiene sus propiedades inmunológicas.

La inmunodifusión radial, ha sido usada para estudiar la desnaturación térmica de la Glicinina, cuantificando la cantidad de ésta que permanece antigénicamente activa después de calentar a diferentes temperaturas durante un tiempo constante ó a temperatura constante y tiempos variables (4). Se demostró que la proteína retiene su actividad inmunológica calentando por 30 min. a 65°C y que ésta se pierde rápida pero no totalmente entre 70 y 90°C. ( $F_{100^{\circ}\text{C}}^{15.3} = 1.5$ ) (Valor obtenido a partir de los datos de Catsimpoles y Meyer (4)).

### 2.3.3 F R A C C I O N 7 S

La fracción 7 S consiste en al menos 4 proteínas diferentes: Hema-glutinina, Lipoxigenasa, α Amilasa y un componente llamado Globulina 7S- (γ Conglicinina). Esta fracción constituye 1/3 del total de las proteínas de soya y la mitad la forma la Globulina 7S.

La Globulina 7 S posee 9 residuos de aminoácidos terminales y tal vez, 9 subunidades de cadenas polipeptídicas simples. A pH 7.5 y Fuerza iónica de 0.5 se presenta como monómero de Peso molecular entre 180 y-210,000, pero se dimeriza a Fuerza iónica de 0.1. La estructura cuaternaria de la Globulina 7 S es destruida por urea 8M ó Clorhidrato de guanidina 4M (2). En el proceso de preparación de aislados de proteínas de soya para uso en alimentos, debido a la alcalinidad usada, la estructura cuaternaria de ésta proteína se destruye también.

Inmunológicamente, la Globulina 7 S produce una sola banda de inmunoprecipitado por la técnica de Contraelectroforesis (2).

### 2.3.4 F R A C C I O N 2 S

En la fracción 2 S, además del citocromo C, se encuentra una Globulina llamada Conglicinina, exhibe un peso molecular parecido al del inhibidor de Tripsina de Kunitz (2) (que es una proteína biológicamente-activa remanente en el suero de la precipitación isoeléctrica de las proteínas de soya) 8,000, pero tienen diferentes puntos isoeléctricos - por lo que éstas dos proteínas no son iguales y pueden ser separadas -

por cromatografía de intercambio iónico. La conglucina también posee actividad de inhibidor de Tripsina, y a ella se deben los problemas nutricionales que presentan los alimentos a base de proteínas de soya (2).

### 2.3.5 FRACCION 15 S

Por métodos físico-químicos ha sido imposible aislar esta fracción como una especie aislada, sin embargo, por métodos inmunológicos se ha visto que la conglucina, como se le ha llamado a esta fracción, forma 3 bandas de precipitación por la técnica de Ouchterlony. Estos y otros resultados sugieren que la fracción 15 S resulta de una polimerización de la fracción 7 S, pues esta última se compone de una fracción que rápidamente se polimeriza a componentes con coeficientes de sedimentación 15 S (2).

### 2.3.6 LA FRACCION TERMOESTABLE DE LAS PROTEINAS DE SOYA

El primer trabajo publicado sobre el aislamiento de las proteínas de soya, parece ser el de Meissl y Böcker en 1883 (5). Estos autores distinguieron 3 proteínas en el grano de soya, una de las cuales llamaron caseína (esta no está relacionada con la caseína de la leche), la cual extraída con una solución suavemente alcalina de pH 9, comprendía más del 30% del peso del grano y el 90% del total de proteínas. Esta fracción corresponde a la que se obtiene actualmente por precipitación isoeléctrica. El segundo componente permanecía insoluble aún con extracciones repetidas de hidróxido de potasio; comprendía el 7% del grano de soya y la llamaron caseína insoluble. La tercera fracción que obtuvieron, la llamaron albúmina (independiente de la albúmina del huevo) por que se coagulaba al calentar el suero obtenido de la primera extracción. En 1937, Watts (29) describe una proteína extraída de la harina de soya a pH 5 que, aparentemente no era idéntica a la albúmina puesto que permanecía en solución después de la coagulación de esta última. Esta es la primera evidencia reportada de la existencia de una fracción de las proteínas de soya que conserva su estructura, aún después de un tratamiento con calor, es decir una fracción termoestable (FTE).

Kamm, en 1970 (15) realizó estudios inmunolectrofóreticos en los que aplicó la técnica de Laurell para cuantificar proteínas de soya - en productos cárnicos. Encontró que en el suero anti-proteínas de soya - existe una  $\gamma$  Globulina (anticuerpo) específica contra la FTE, ésta - conclusión se deriva de sus observaciones de que aún usando como antí - geno un extracto de proteínas de soya tratado durante 30 min. a  $125^{\circ}\text{C}$ , se presenta un pico de precipitación indicativo de la reacción Antíge - no-Anticuerpo. Un resultado semejante reportan Pastelín y Ruiz (28) en - la que obtienen una banda de precipitación por la técnica de Contra - inmunolectroforesis, al poner en contacto suero anti-proteínas de so - ya y un extracto de proteínas calentado a  $80^{\circ}\text{C}$  durante 5 hrs. Estas - reacciones de precipitación, indican la existencia de una proteína - conserva sus propiedades antigénicas; es decir su estructura aún des - pués de un tratamiento térmico parecido al que sufren los productos - cárnicos en su elaboración.

2.4 DERIVADOS DE SOYA USADOS EN LA ELABORACION DE PRODUCTOS CARNICOS.

Los derivados de soya que se utilizan comercialmente en la industria de la carne son: harina, sémola, concentrados y aislados de proteínas. En el Cuadro No. 4 se cita su composición.

CUADRO NO. 4 COMPOSICION DE LAS PREPARACIONES BASICAS DE SOYA (12).

NUTRIENTE	CONCENTRADO DE PROTEINAS	AISLADO PROTEINAS	HARINA SIN DESENGRASAR	HARINA DESENGRASADA
CALORIAS	---	369-392	350-400	273-295
PROTEINAS (gr)	66.2	90-97.7	38.5-43	51-55
GRASA (gr)	0.3	0.2-1.2	19.1-23	1 - 3.5
COLESTEROL (gr)	---	0	0	0
SACAROSA (gr)	---	---	4.8-6.4	6 - 8
DEXTROSA (gr)	---	---	Trazas	Trazas a 0.1
FIBRA (gr)	---	0.25-0.4	2 - 2.3	2.5 -3
SODIO (gr)	---	0.15-1.5	0.2	0.2-0.25
AC.GRASOS POLIINSATURADOS/MONOSATURADOS/SATURADOS	---	---	3/1/1	3/1/1

Las preparaciones básicas de soya se obtienen de hojuelas que tienen un contenido mínimo de proteínas del 50% (19). Estas hojuelas se obtienen de granos de soya descascarillados, laminados, desengrasados y finalmente tostados. Dependiendo del método usado para eliminar el disolvente y de la cantidad de calor aplicado, las hojuelas, se obtienen con un color que va desde el blanco hasta el moreno oscuro. Las hojuelas blancas exhiben actividad de lipoxidasa, ureasa e inhibidor de Tripsina, adicionalmente tienen sabor amargo. El producto tostado es obscuro y la actividad del inhibidor de Tripsina se destruye modificándose su sabor a uno parecido al de la nuez.

### 2.4.1 HARINA Y SEMOLA DE SOYA

El harina de soya se prepara moliendo hojuelas desengrasadas hasta 100 mallas ó aún más finas (30), mientras que la sémola es más gruesa. El contenido mínimo de proteínas de éstas preparaciones es de 40 - 50%, dependiendo del contenido de grasa. El tostado previo de las hojuelas está condicionado al uso que se le dé posteriormente a las harinas y sémola. En la Figura No.2, se muestra el diagrama de flujo de la obtención industrial de harina, sémola y aceite de soya.

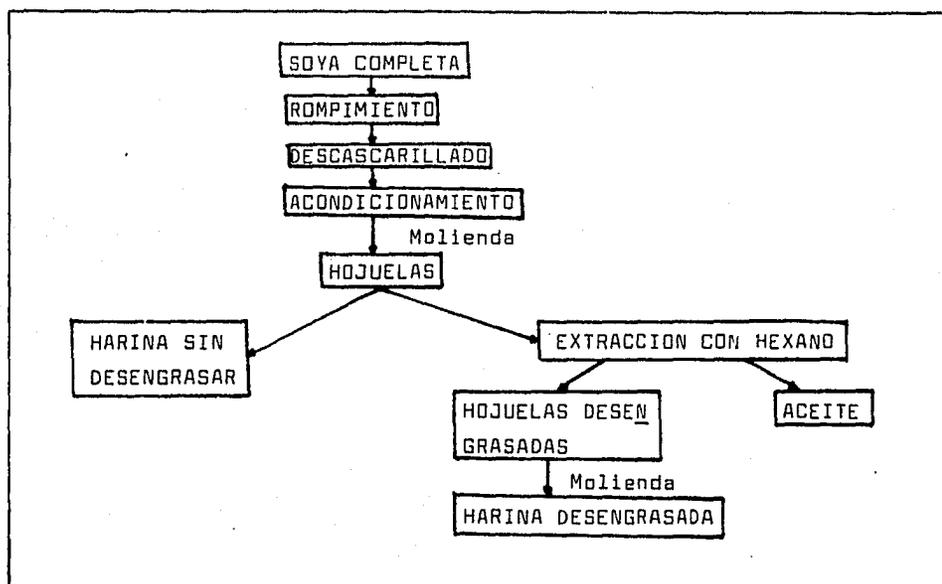


Figura No. 2 Diagrama de flujo de la transformación industrial del grano de soya en aceite, hojuelas y harina (29) (43).

## 2.4.2 CONCENTRADO DE PROTEINAS DE SOYA

El concentrado de proteínas de soya se produce comercialmente a partir de hojuelas desengrasadas ó harina, por cualquiera de los métodos que se citan a continuación:

- a. Lavado con solución acuosa de etanol al 60-80%.
- b. Insolubilización con ácido diluido a pH 4.5.
- c. Tratamiento con calor húmedo seguido de un lavado acuoso.

Con ellos se eliminan los oligosacáridos, parte de la ceniza y algunos otros componentes menores, obteniéndose un producto con 70% ó más de proteínas en base seca. En la Figura No. 3 se muestra el diagrama de flujo de la obtención del concentrado de proteínas de soya.

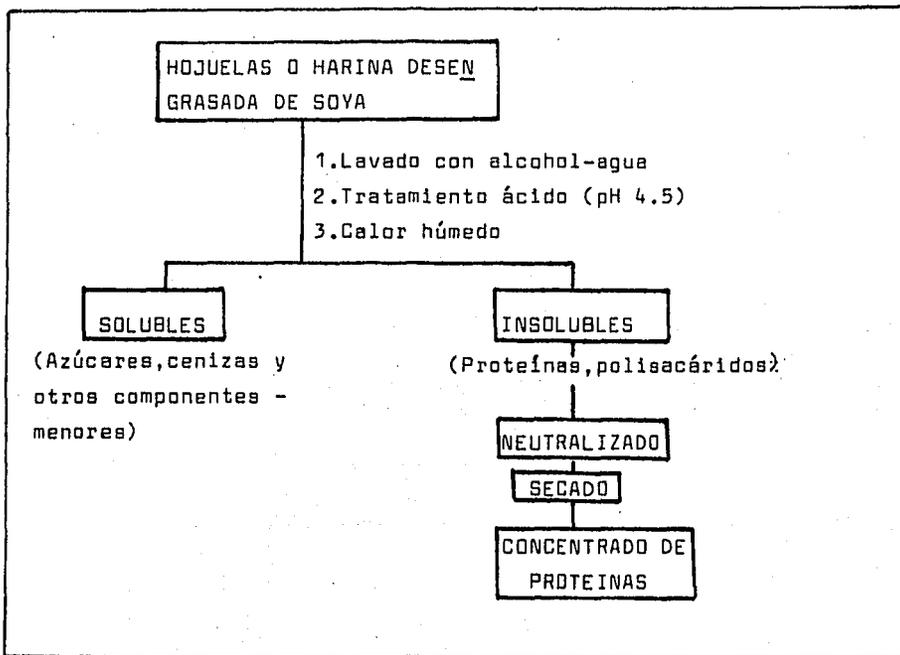


Figura No.3 Diagrama de flujo de la obtención del concentrado de proteínas de soya. (29) (43)

### 2.4.3 AISLADO DE PROTEINAS DE SOYA ( PROTEINATO)

La forma más refinada de las proteínas de soya, son los aislados. Se preparan eliminando los azúcares insolubles, oligosacáridos y componentes de peso molecular bajo que no se separan al producir los concentrados. Las hojuelas desengrasadas ó harina sin tostar, se lavan con agua, seguida de álcali diluido con pH entre 7 y 8.5. El residuo insoluble que contiene los polisacáridos insolubles en agua se separa. Posteriormente al extracto se le ajusta el pH a 4.5. Este tratamiento precipita las proteínas que pueden separarse por centrifugación ó filtración; se lavan, neutralizan y secan para obtener el proteinato ó aislado. Si las proteínas no son neutralizadas, se obtiene un aislado llamado de "proteínas isoeléctricas" (43) que no es soluble en agua, mientras que el proteinato sí lo es.

El aislado de proteínas de soya contiene 95% de proteínas, de 2 a 4% de cenizas y entre 3 y 4% de constituyentes menores; estos últimos pueden eliminarse con soluciones acuosas de alcohol y consisten en una mezcla de saponinas, fosfolípidos, glicósidos, isoflavonas y compuestos no identificados. La figura No. 4 muestra el diagrama de flujo de la obtención comercial del aislado de proteínas de soya.

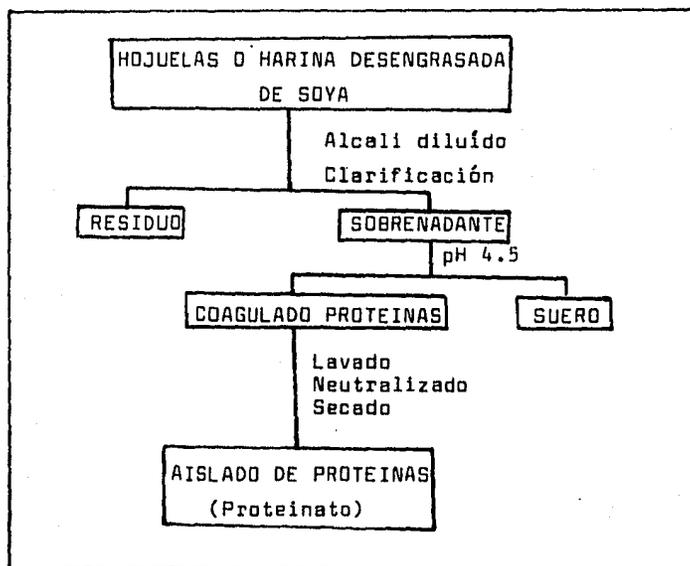


Figura No. 4 Obtención comercial del aislado de proteínas de soya (29) (43).

#### 2.4.4 FIBRAS TEXTURIZADAS

El proceso básico de producción de fibras de soya fue descrito en una patente por Boyer en 1954, en otras de Boyer y Saewert en 1956 y Gidd en 1960(30). Este es uno de los más promisorios usos de las proteínas de soya, pues con ellas se producen análogos de carne ó alimentos texturizados. En éste proceso el aislado de proteínas se suspende en álcali (pH 7.5-8.5) y se estiran a presión haciéndolo pasar la solución por un baño ácido coagulante, de manera que se forman fibras, que posteriormente se alargan para endurecerlas. Estas pueden ser manipuladas para obtener productos que simulen la textura y sabor de una gran variedad de alimentos que usualmente se fabrican a base de carne, como el tocino.

El tocino de soya se produce con fibras texturizadas coloreadas para simular carne ó sin color para simular grasa, las fibras se unen con cohesivos comestibles y se les da sabor. La pieza formada, se trata térmicamente y se corta (30).

##### a. EXTRUSION TERMOPLASTICA

Por éste proceso pueden obtenerse fibras texturizadas a un costo menor, pues además del aislado de proteínas puede utilizarse harina completa.

En la extrusión termoplástica, una mezcla de harina de soya, agua, saborizantes y colorantes se somete a un tratamiento térmico a presión reducida. Esta masa se extruye a presión para expandirla. La forma y tamaño de las fibras se determina por la forma y tamaño de los troqueles de salida, así como por la frecuencia con que se corta la fibra por las cuchillas, con éste proceso pueden obtenerse hojuelas, granulados ó trozos grandes a los que se les puede dar sabor de hamburguesa, carne ahumada y/o con chile, es posible obtener también fibras para análogos de carne de res, cerdo, jamón, tocino y aves; carne tipo Salisbury (molido), hogazas de carne pastelillos y croquetas de res. Estos contienen entre el 25-50% de proteína en base seca, de 6-8% de humedad 3% de fibra, 1% de grasa y 5-6% de cenizas, puede añadirsele grasa hasta igualar su peso, pero generalmente contienen entre un 6-30% de ella(43) Estudios en perros, ratas y niños demostraron que los análogos de carne texturizados poseen el equivalente nutricional de la carne y en un

80% el de la caseína (19).

## 2.5 USOS DE LAS PROTEINAS DE SOYA EN PRODUCTOS CARNICOS

Las proteínas de soya en sus variadas formas tienen propiedades funcionales que las hacen útiles en los sistemas alimenticios. Cuando se usan como emulsificantes, aglutinantes y estabilizadores; las proteínas de soya alteran y mejoran la apariencia, sabor y textura de los productos. Previenen la excesiva absorción de grasa durante la fritura conservan los jugos y grasa de los productos de carne durante su cocinado de manera que no disminuyen su tamaño, como lo hacen los productos sin soya, que pierden hasta el 70% de su peso en gotas de grasa (12). Por ser hidrofílicas, permiten adicionar más agua a los productos de panadería que las contienen, mejorando las características de manejo de la pasta; esta retención de humedad ayuda a los productos de soya a mantener su frescura. En los análogos de carne preparados únicamente con soya, se reduce el tiempo de cocinado, pues las proteínas se gelifican durante el proceso de fabricación del alimento y el cocinado por el consumidor sirve únicamente para darle el sabor y textura deseados. En fin, los productos de soya usados en la industria contribuyen a la estabilidad, nutrición, sabor y costo de los productos terminados; estas propiedades funcionales les dan ventaja sobre otros aditivos de alimentos.

Sin embargo, el uso de derivados de soya en alimentos se restringió por mucho tiempo, debido a su sabor dominante y a la sensación que deja en la boca. La harina de soya tiene estas propiedades más marcadas, mientras que el concentrado, aunque es más caro posee un sabor más suave. El problema del sabor en soya puede atribuirse al calor usado durante la extracción del aceite con Hexano y a la actividad de Lipoxigenasa y Lipasa durante la molienda de la soya, lo que resulta en una degradación de lípidos y formación de productos de oxidación de sabor desagradable. Una extracción con azeótropo de Hexano-Etanol se usa actualmente para obtener harina y concentrados de soya con sabor parecidos al de la harina de trigo. El tueste después de la extracción azeotrópica, realza el sabor de las harinas y concentrados de soya a 7.9e., valor que se compara favorablemente con el 8.1 para la harina de trigo. (19)

### 2.5.1 PRODUCTOS MOLIDOS

En productos tales como hamburguesas, la sémola de soya se utiliza en nivel de 6%, en carne con chile enlatada se utilizan también harinas y aislados hasta en un 8% por libra de carne. En pasteles de carne se utilizan los concentrados de proteínas y sémola por niveles sobre el 6% por libra de carne; en éstos mismos productos se han usado proteínas texturizadas con concentraciones entre el 12.5 y 20%; estos productos son mejor aceptados por los consumidores que aquellos preparados con carne al 100%. En albóndigas, hogazas, croquetas y biftec tipo Salisbury, se permite usar harinas y aislados en nivel del 12% por libra de carne. Las proteínas texturizadas se usan en albóndigas y croquetas de pollo en un 12% (43).

### 2.5.2 EMBUTIDOS

Las regulaciones de E.U.A permiten el uso de harina de soya, sémola y concentrado de proteínas en un nivel del 3.5% basado en peso seco del producto, el aislado se permite en nivel del 2%. (30). En México como aglutinante de salchicha tipo Viena, puede usarse al 10% sobre el peso seco del producto (26).

### 2.5.3 OTROS

En salsas, pan, pasteles, sopas enlatadas y jugos de carne se usan harinas, concentrados y aislados de proteína. Para la fabricación de donas, waffles y macarrón se utilizan harinas y aislados.

El Cuadro 6 resume los usos mencionados anteriormente.

Una de las grandes ventajas de utilizar derivados de soya en la producción de alimentos es su bajo costo. Es por esto que en los países sobrepoblados y con pocas perspectivas de cubrir la necesidad de proteínas de su población, la soya se cultiva con idílico entusiasmo.

CUADRO NO. 6 USOS DE LAS PREPARACIONES DE SOYA EN PRODUCTOS ALIMENTICIOS (43)

FORMA USADA DE LAS PROTEINAS DE SOYA	ALIMENTO
HARINA DE SOYA	Salchichas Frankfurter, bologna, salsas, rollos de pollo, sopas, pan, pasteles aderezos, pastelillos de carne, carne con chile, macarrón, tocino, postres congelados y harina para Hot-cakes.
AISLADO DE PROTEINAS	Salchichas Frankfurter, Bologna, análogos de carne molida, aderezos, salsas, paste de carne, jamones con hueso, carne deshidratada, macarrón y donas.
CONCENTRADO DE PROTEINAS	Salchichas Frankfurter, Bologna, rollos de pollo, salsas, pasteles de carne, jamones con hueso, tocino, pan, pasteles, sopas y postres congelados.

La comparación en México del costo por tonelada de carne y grano de soya se muestra en el Cuadro No.7

CUADRO NO. 7 COMPARACION DEL COSTO DE SOYA Y CARNE. 1980 (8) (11)

PRODUCTO	PRECIO POR TONELADA
SOYA (Proteína 40-43%)	\$35,000.00
CARNES: (Proteína 18%)	
BOVINA	\$56,306.00
PORCINA	\$47,195.47
OVINA	\$63,366.00
CAPRINA	\$65,862.20
AVES	\$47,607.65

Comparándose con otros granos y carne, de la soya se obtiene una mayor cantidad de proteínas por acre de tierra, como se observa en el Cuadro No.8.

CUADRO NO. 8 PRODUCCION DE CARNE Y OTROS CEREALES POR ACRE DE TIERRA, EUA 1977 (30).

PRODUCTO	Lb. AL AÑO POR ACRE DE TIERRA
CARNE	58
TRIGO	180
MAIZ	323
SOYA	500

En cuanto a otras leguminosas y legumbres, la soya posee un mayor volumen de producción (en E.U.A) y mayor cantidad de proteínas - de acuerdo al Cuadro No.9.

CUADRO NO. 9 VOLUMEN DE PRODUCCION DE OLEAGINOSAS Y LEGUMBRES EN E.U.A. 1977 (29).

SEMILLA	Ton. Cúbicas (millones)	CONTENIDO DE PROTEINA (% en peso)
SOYA	46.52	40-43
SEMILLA DE ALGODON	27.06	17-21
CACAHUATE	18.4	25-30
GIRASOL	9.65	20
AJONJOLI	1.86	25
NABO SILVESTRE	6.5	17-24
LINAZA	4.14	24
LEGUMBRES	40.39	23-27

Por todas estas características y ventajas, la soya es ampliamente utilizada en los sistemas alimenticios.

## 2.6 OTROS USOS DE LA SOYA.

El aceite de soya, es el aceite líquido con mayor producción mundial; en E.U.A., cerca del 85% de la grasa de consumo humano se obtiene de la soya (23). Este aceite que representa entre el 17 y 19% del peso de la semilla, se emplea en la elaboración de margarinas y manteca vegetal, de él se extrae lecitina, aprovechada en la producción de mantequilla, chocolates y confitería. Por su alto contenido de ácidos grasos no saturados, el aceite de soya se usa en la elaboración de alimentos y bebidas dietéticas. En la industria, se utiliza en la producción de esmaltes, aceites, barnices, pinturas, telas de imprenta, lacas, linóleos, glicerina, lubricantes, explosivos, sustitutos del caucho, hule, celuloideos, jabones, velas impermeabilizantes e insecticidas. (39).

En los países de Oriente, desde hace siglos, la soya ha constituido un prominente factor alimenticio para el hombre, en forma de diversos platos, como el Tempeh, Miso, Natto y salsas de soya ó Shoyu, ó en forma de queso y leche. La leche de soya no es más que un extracto acuoso del grano completo (19), de ésta leche se obtienen los quesos y mantequilla de soya; éstos productos han resultado de buena calidad para el sustento infantil cuando se han tratado térmicamente a 121°C entre 5 y 10 minutos, ó a 93°C por 60 min. (19). El grano de soya en sí constituye un excelente remedio contra el raquitismo. Cultivada para forraje produce alrededor de 5 toneladas de producto verde rico en proteínas; El rastrojo de soya picado e incorporado al suelo proporciona a éste un material muy valioso para mantener su fertilidad y condiciones físicas.

Las harinas de soya, constituyen un elemento básico de los denominados alimentos balanceados, que son imprescindibles en la producción avícola y cuyo empleo en la ganadería intensiva ya ha alcanzado metas sumamente importantes en diferentes países del mundo y en especial en Europa (39).

En México se han realizado estudios (7) (10), para producir tortillas suplementadas con un 20% de harina de soya; el producto obtenido posee un sabor agradable y mayor valor nutritivo que el normal, esto mismo se ha hecho con amaranto.

## 2.7 ASPECTOS NUTRICIONALES DE LA SOYA

La soya posee el mejor equilibrio de aminoácidos esenciales que cualquier otra fuente vegetal de alto contenido protéico. Sin embargo las proteínas de soya muestran un déficit del 18% en valor biológico (VB) respecto a la carne (12), éste puede corregirse con la suplementación con proteínas de mejor calidad como la del huevo, lactalbúmina ó proteínas de pescado. Una mejor solución es la incorporación de los aminoácidos limitantes en la proteína de soya: metionina y valina para aumentar su valor biológico y aproximarlos al de la carne ó leche. En el Cuadro No. 10, se muestra el contenido de aminoácidos esenciales del concentrado y aislado de proteínas de soya.

CUADRO NO. 10 CONTENIDO DE AMINOACIDOS ESENCIALES DE LAS FORMAS COMERCIALES DE LAS PROTEINAS DE SOYA. (43)

AMINOACIDO	CONCENTRADO PROT. DE SOYA (gr de amino ácido por 16 gr de N)	AISLADO DE PROT. DE SOYA (gr de amino ácido por 16 gr de N)
Lisina	6.6	5.7
Metionina	1.3	1.3
Cisteína	1.6	1.0
Triptofano	1.4	1.0
Treonina	4.3	3.8
Isoleucina	4.9	5.0
Leucina	8.0	7.9
Fenilalanina	5.3	5.9
Valina	5.0	5.2

Como se observa, las proteínas de soya tienen un alto contenido de lisina y son un útil suplemento para cereales que tienden a tener una baja cantidad de éste aminoácido.

El grano de soya contiene vitaminas tales como: Beta-Caroteno - (precursor de la Vitamina A), Tiamina, Riboflavina, Niacina, Ac. Pantoténico, Piridoxina, Biotina, Ac. Fólico, Inositol, Colina y Ac. Ascórbico, aunque sólo la concentración de Tiamina y Ac. Fólico es significativa. Entre los minerales, la soya contiene: Calcio, Hierro, Manganeso, Magnesio, Fósforo, Cobre y Zinc, constituyendo una buena fuente de los cuatro últimos (19).

Los concentrados de proteínas de soya tienen PER'S equivalentes a los de la caseína. El aislado de proteínas tiene entre un 65 y 80% del valor nutritivo de la caseína medido por PER ó VB, pues ésta preparación es más deficiente en aminoácidos azufrados que las harinas y concentrados. El uso de proteínas de soya texturizadas como reemplazo de carne en croquetas de pollo, res y albóndigas en un 30% aumenta el valor del PER de éstos alimentos hasta exceder el de la caseína - (18).

A continuación se muestra una comparación del valor nutritivo de las proteínas de soya texturizadas y la carne molida de res.

CUADRO NO. 11 COMPARACION DEL VALOR NUTRITIVO DE LA CARNE DE RES Y LAS PROTEINAS DE SOYA TEXTURIZADAS (36)

COMPONENTE	POR 100gr DE PRODUCTO	
	CARNE MOLIDA	PROTEINA DE SOYA TEXTURIZADA
PROTEINA	17.9 gr	16.3 gr
GRASA	21.2 gr	0.5 gr
CARBOHIDRATOS	-	13.0 gr
CENIZAS	0.7 gr	2.0 gr
HUMEDAD	60.2 %	67.0 %
CALORIAS	268.0	103.0
TIAMINA	0.08 mg	0.32 mg
RIBOFLAVINA	0.16 mg	0.16 mg
NIACINA	4.33 mg	5.44 mg
FIERRO	2.79 mg	4.0 mg
VITAMINA A	40.0 U.I	13.0 U.I
PER(Rango de eficiencia de proteína)	2.76	2.5



CUADRO NO.12 EVALUACION BIOLOGICA DE ALIMENTOS DE SOYA EN HUMANOS. ( 19 )

FUENTE DE PROTEINAS	VALOR BIOLOGICO	DIGESTIBILIDAD
Soya en vaina	65	--
Harina de soya desengrasada	81	92
Leche de soya	91	89
Aislado de proteínas	71	85
Análogo de carne texturizado a base de soya	81	92
Grano de soya maduro	96	-
Huevo	97	97
Leche de vaca	90	91
Harina de trigo	41	97
Maíz	30	--

## 2.8 METODOS DE DETECCION DE PROTEINAS DE SOYA EN PRODUCTOS CARNICOS.

Quando el costo de la carne aumentó, la suplementación de productos cárnicos con proteínas vegetales, llegó a ser una realidad económica; con ello aumento el interés en cuantificar la contribución de las proteínas usadas como sustitutos de carne, como las harinas, proteínas-texturizadas, concentrados y aislados de proteínas de soya. Algunos de ellos se basan en rangos establecidos de materiales no proteícos de la soya. Dentro de ésta categoría están los métodos para determinar Fósforo lipido, azúcares no fermentables, cenizas de azúcares, Manganeso, extractos libres de nitrógeno insolubles en etanol, obtenidos del álcali de los residuos vegetales etc. Estos métodos pueden aplicarse a harina de soya, pero tienen poco ó ningún valor si la soya ha sido purificada en otras fracciones.

En 1948, Bennett (30) desarrolló una técnica basada en el contenido de celulosa del producto cárnico. En ella, la muestra problema se digiere en una solución de potasa alcohólica, para obtener celulosa; se

solubiliza con ácido clorhídrico, se separa y reprecipita con la adición de etanol, se centrifuga y cuantifica volumétricamente. Esta técnica es aplicable a harinas de soya, sémola y concentrados que contienen altos niveles de celulosa, pero no a aislados que carecen de ella. En 1974 se propuso un análisis de Magnesio (15) para medir el contenido de soya de productos cárnicos, pero tiene un valor limitado para aislados y concentrados. Las regulaciones de E.U.A. marcan que los aislados destinados a la incorporación en productos cárnicos deben estar etiquetados con Titanio al 0.1%, que se cuantifica posteriormente, reduciendo la muestra a cenizas, disolviendo en ácido sulfúrico y finalmente leyendo la absorbancia debida al contenido de Titanio (30).

Las técnicas electroforéticas, usando geles de Dodecil sulfato de acrilamida (SDS) aplicadas a extractos de productos cárnicos acuosos que se comparan con patrones de las proteínas de soya solubles en agua, permiten cuantificar proteínas en productos crudos y cocinados. Este método es cuantitativo, detecta entre el 5 y 35% de proteína de soya sobre el peso total del producto y se aplica en harinas, aislados y concentrados (16) (18).

Dentro de los métodos inmunológicos, Catsimpoolas y Meyer (2)(4) encontraron que con la técnica de Oudín, se obtiene una relación lineal entre la distancia de la migración del complejo antígeno-anticuerpo y el logaritmo de la concentración de las proteínas de soya, pero no aplican su técnica en productos cárnicos, sólo en extractos de proteínas. Kamm (15) utiliza la técnica de Laurell para la cuantificación de proteínas de soya en extractos de productos cárnicos, sin embargo, en aquellos tratados térmicamente no se aplica satisfactoriamente el método.

## 2.9 INMUNODIFUSION RADIAL

No obstante de vivir en un medio ambiente altamente contaminado por agentes agresores reales ó potenciales, el hombre y los animales no sufren de sus impactos. Ello se debe a que poseen una serie de mecanismos defensivos y protectores que les aseguran cierta integridad y sólo ante fallas de los mismos se producen infecciones -

ó agresiones.

El término inmunidad proviene del vocablo latino "imun", privado de carga ó privilegiado. Desde el punto de vista médico, la inmunidad es considerada sinónimo de resistencia y sirve para expresar la resultante de dos sistemas opuestos; el agente invasor ó antígeno (Ag) y las reacciones del huésped invadido (21). La inmunidad se caracteriza por que, como respuesta al estímulo antigénico no se desencadenan manifestaciones colaterales perjudiciales al huésped. En un sentido más amplio, los fenómenos inmunológicos deben considerarse como la respuesta de un huésped a un agresor real ó potencial y a las consecuencias de ella derivadas.

Un vertebrado inmune forma ciertos elementos específicos que actúan sobre el antígeno ó agente agresor, neutralizándolo ó impidiendo un daño en su organismo. Estos elementos pueden ser anticuerpos (proteínas) ó bien linfocitos sensibilizados, que reaccionan específicamente con él antígeno contra el cual fueron sintetizados. Actualmente se utiliza más el término "inmunógeno" para designar a aquellos agentes capaces de despertar una respuesta inmune en un ser vivo, mientras que antígeno se usa para especificar la sustancia que reacciona con su anticuerpo específico.

Sí la reacción Antígeno-Anticuerpo (Ag-Ac) ocurre in vitro, generalmente la sigue un fenómeno visible que puede ser, una precipitación, aglutinación, bacteriolisis, citólisis etc. dependiendo de las características del antígeno y de la presencia ó no de sustancias complementarias. Sí el antígeno se encuentra en solución al reaccionar con su anticuerpo específico (Ac), el complejo antígeno-anticuerpo se agrupa como precipitado.

Empleando soportes adecuados como poliacrilamida, pectina, alginato de calcio, membranas de acetato de celulosa gelatinizada y en especial agar disuelto en electrolitos, es posible hacer migrar antígenos (Ag) y anticuerpos (Ac), por simple difusión, de modo que al encontrarse interaccionen formando un precipitado. La distancia que éstas macromoléculas migran obedece a las leyes generales de la difusión, que establecen que una sustancia difunde en relación directamente proporcional a su concentración e inversamente proporcional a la concentración de agar y a su peso molecular.

Aunque las reacciones Antígeno-Anticuerpo en gel fueron descritas en 1905 y usadas por varios investigadores en la identificación de microorganismos. Su utilidad inmunoquímica moderna comenzó con el trabajo de Oudin, quien en 1946 introdujo la técnica de difusión simple y sugirió la posibilidad de la doble difusión en dos dimensiones. A partir de éstas técnicas, se desarrollaron la doble difusión en gel de Ouchterlony, la inmunolectroforesis, la técnica de Laurell, la contra-inmunolectroforesis y la inmunodifusión radial (14).

De entre los varios métodos citados, la técnica de inmunodifusión radial es una de las más simples, sensibles y menos costosas. Por definición la reacción de precipitación por inmunodifusión radial (RID) se lleva a cabo incorporando una de las partes del sistema de reacción en un gel de agar con una concentración uniforme, mientras que el otro reactante, generalmente el antígeno, se introduce en un "pozo" a partir del cual se deja difundir en el gel donde reacciona con el "reactivo interno". Se ha demostrado que existe una relación lineal entre el área de precipitación del complejo Ag-Ac y la concentración de Ag, si la difusión se continúa hasta que todo el antígeno se ha - lle combinado (20). Por lo que si se traza una gráfica de concentración de antígeno contra diámetro del halo de precipitación, se obtiene una línea recta, en la que es posible interpolar las concentraciones de Ag en problemas con concentración desconocida. Las posibles - fuentes de error de ésta técnica son: irregularidades en los pozos, - que impiden una difusión homogénea, falla en la mezcla agar-anticuerpo que ocasiona una mala distribución de éstos últimos en el gel y - por tanto la reacción Ag-Ac no es uniforme.

Aunque las reacciones Antígeno-Anticuerpo en gel fueron descritas en 1905 y usadas por varios investigadores en la identificación de microorganismos. Su utilidad inmunoquímica moderna comenzó con el trabajo de Oudin, quien en 1946 introdujo la técnica de difusión simple y sugirió la posibilidad de la doble difusión en dos dimensiones. A partir de éstas técnicas, se desarrollaron la doble difusión en gel de Ouchterlony, la inmunolectroforesis, la técnica de Laurell, la contrainmunolectroforesis y la inmunodifusión radial (14).

De entre los varios métodos citados, la técnica de inmunodifusión radial es una de las más simples, sensibles y menos costosas. Por definición la reacción de precipitación por inmunodifusión radial (RID) se lleva a cabo incorporando una de las partes del sistema de reacción en un gel de agar con una concentración uniforme, mientras que el otro reactante, generalmente el antígeno, se introduce en un "pozo" a partir del cual se deja difundir en el gel donde reacciona con el "reactivo interno". Se ha demostrado que existe una relación lineal entre el área de precipitación del complejo Ag-Ac y la concentración de Ag, si la difusión se continua hasta que todo el antígeno se halla combinado (20). Por lo que si se traza una gráfica de concentración de antígeno contra diámetro del halo de precipitación, se obtiene una línea recta, en la que es posible interpolar las concentraciones de Ag en problemas con concentración desconocida. Las posibles fuentes de error de ésta técnica son: irregularidades en los pozos, que impiden una difusión homogénea, falla en la mezcla agar-anticuerpo que ocasiona una mala distribución de éstos últimos en el gel y por tanto la reacción Ag-Ac no es uniforme.

### 3.0 MATERIALES Y METODOS

Para la evaluación de proteínas de soya en productos cárnicos por la técnica de Inmunodifusión radial, se prepara un suero inmune (con anticuerpos específicos) usando como inmunógeno una fracción de las proteínas de soya, llamada "Fracción termoestable" (15); capaz de retener sus propiedades antigénicas a una temperatura de  $121^{\circ}\text{C}$  durante 20 minutos, condiciones que son parecidas al tratamiento térmico más drástico que se le da a un producto cárnico. El suero (Anticuerpos), se mezcla con una solución de agar, para después ser vertida en placas, en las que se evaluará la cantidad de proteínas de soya en productos cárnicos comerciales y controles; estos últimos con una cantidad conocida de harina de soya. (Fig.5).

#### 3.1 OBTENCION DEL SUERO INMUNE CONTRA LA FRACCION TERMOESTABLE DE LAS PROTEINAS DE SOYA.

##### 3.1.1 OBTENCION DE HARINA DESENGRASADA DE SOYA

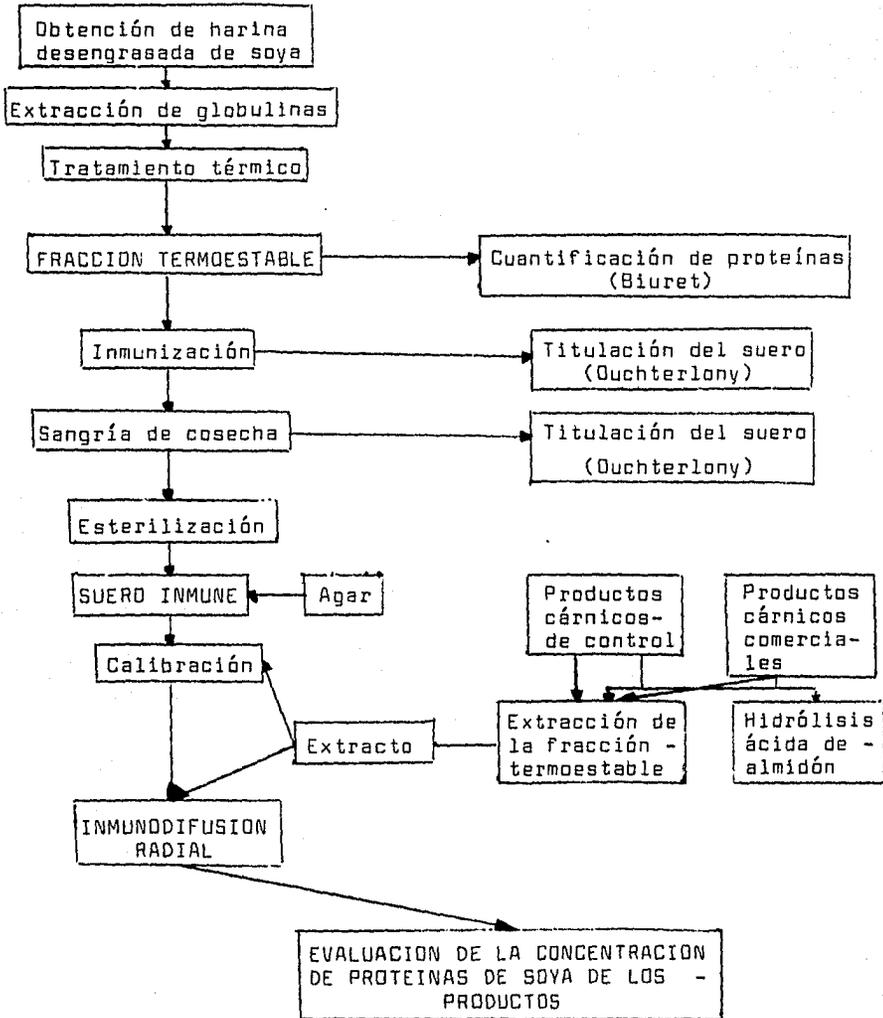
A partir de granos de soya comerciales (Casa Alinadi, 3 Kg) se obtuvo el harina de soya. Los granos se secaron al sol durante aproximadamente 96 hrs., posteriormente se partieron en un molino de cereales (CeCoCo Flour grinding mill) separándose la cáscara de los cotiledones.

Los cotiledones descascarillados se molieron hasta un tamaño de partícula capaz de atravesar el tamiz de malla No. 20. Con el harina obtenida se forma una suspensión en Hexano, la cual se filtra a través de papel Whatman No.2 (Büchner). Se lava repetidamente con Hexano hasta obtener que una gota del filtrado dé una prueba libre de grasa en papel filtro. El producto se esparce en papel aluminio hasta la total evaporación del Hexano (aproximadamente 48 hrs. a temperatura ambiente). El desengrasado de la harina evita problemas con el método de extracción de las proteínas, pues parte de éstas podrían quedar atrapadas en la grasa (15).

##### 3.1.2 EXTRACCION DE LAS GLOBULINAS DE SOYA

Para la extracción de las proteínas del harina desengrasada, se aprovechó la solubilidad de éstas en agua y soluciones salinas diluídas. Se mezclaron 500 ml de solución de cloruro de sodio al 0.85% -

Figura No. 5 DIAGRAMA PARA LA EVALUACION DE LA FRACCION TERMOESTABLE DE LAS PROTEINAS DE SOYA EN PRODUCTOS CARNICOS.



solución salina isotónica ( S.S.I. ) con 130 gr de harina desen -  
 grasada lentamente en un vaso de precipitados, agitando durante 2 ho -  
 ras, sin formar espuma. Se dejó reposar el extracto durante 18 horas a  
 4°C. El sedimento se separó por centrifugación a 8,000 rpm durante 30  
 min; 90 ml. del sobrenadante se trasvasaron a 4 frascos de centrifu -  
 ga de 250 ml. respectivamente. Los frascos son sellados con tapones -  
 de algodón-gasa y sujetos firmemente con hilo resistente..

### 3.1.3 TRATAMIENTO TERMICO

Los frascos de centrífuga con el extracto se sometieron a una -  
 temperatura de 121°C por 20 min. en autoclave. Se dejan enfriar a -  
 temperatura ambiente para una posterior centrifugación a 5,000 rpm -  
 durante 45 min. El sobrenadante contiene la "Fracción Termoestable" -  
 de las globulinas de soya. Se transvasaron 3 ml. del sobrenadante en -  
 condiciones de esterilidad a frascos ampula de 10 ml estériles.

### 3.1.4 CUANTIFICACION DE PROTEINAS POR EL METODO DE BIURET

Se cuantificó la concentración de proteínas del sobrenadante -  
 por la técnica de Biuret (37) (Anexo III) Esta técnica se eligió por -  
 ser la más reproducible en el extracto de globulinas de soya. Una -  
 vez conocida la concentración de proteínas, se calcula el volúmen ne -  
 cesario para administrar una concentración del 2% de proteína (14) -  
 (27) (28) en cada dosis que se inocula a los conejos. El cálculo se -  
 realizó según la siguiente ecuación:

$$\begin{array}{l}
 \text{Volúmen del extracto} \\
 \text{DOSIS} = \text{con concentración de} = \frac{2}{\text{Concentración de pro} \times 1 \text{ ml.}} \\
 \text{proteína del 2\%} \quad \text{teína del extracto -} \\
 \quad \quad \quad \quad \quad \quad \quad \text{en gr/100 ml.}
 \end{array}$$

### 3.1.5 ESQUEMA DE INMUNIZACION

Para la obtención del suero inmune, se utilizaron 5 conejos de -  
 raza Nueva Zelanda ( 2 hembras y 3 machos) con 2.5 Kg. de peso aproxi -  
 madamente; a los que se les aplicaron 9 dosis de la Fracción Termoesta -  
 ble de la globulinas de soya (FTE), cada una con una concentración del

2% de proteínas durante 20 días, según se muestra en el Cuadro No. 13. Un retraso involuntario en la continuidad del proyecto, hizo necesario ampliar el período de inmunización con 4 dosis extras, que se aplicaron vía intraperitoneal en cada conejo, 34 días después de haber concluido el esquema descrito. Entre cada dosis extra se dejó descansar a los animales durante una semana.

El adyuvante completo de Freund, es un potenciador de la respuesta inmune, por lo que fue utilizado en las primeras inmunizaciones para exacerbar la reacción de los animales. Consta de una mezcla de vaselina líquida, Arlacel A y Bacilos tuberculosos muertos por calentamiento (Bacto-DIFCO, Completes Freund's adjuvant)

CUADRO No. 13 ESQUEMA DE INMUNIZACION

DIA	EXTRACTO ESTERIL DOSIS	ADYUVANTE COMPLETO DE FREUND (ml)	VIA DE INOCULACION
1	1	0.5	Intramuscular
3	1	1.0	Intramuscular
8	1	1.0	Intramuscular
14	1	-	Endovenosa
16	1	-	Endovenosa
17	1	-	Endovenosa
18	1	-	Endovenosa
19	1	-	Endovenosa
20	1	-	Endovenosa

### 3.1.6 SANGRIA DE PRUEBA

Al término del período de inmunización, se deja descansar a los animales durante una semana, procediendo a obtener aproximadamente 3-ml de sangre por punción de una de las venas marginales de la oreja. La sangre así obtenida, se deja coagular, separando el suero por centrifugación a 3,000 rpm durante 10 min. en una centrífuga clínica.

### 3.1.7 TITULACION DEL SUERO

Se probó la respuesta de cada conejo al inmunógeno (FTE) con el suero obtenido, mediante la técnica de doble difusión en gel de Ouchterlony. Basándose en la precipitación del complejo antígeno-anticuerpo en gel de agar, ambos son depositados por separado en

pequeños "pozos", practicados en el agar. Se dejan difundir y en caso de existir reacción Antígeno-Anticuerpo (Fracción Termoestable-Anticuerpo específico), se forman bandas de precipitación entre los pozos (27).

a. PREPARACION DE LAS PLACAS DE AGAR

1.5 gr. de agar Purum (Behring), se calientan a  $100^{\circ}\text{C}$ , en 150 ml de Cloruro de sodio al 0.85%, adicionado de 150 mg de Azida de sodio como conservador, hasta formar una solución clara. 5 ml de la solución se reparten en 30 tubos de ensaye de 13x100. Se tapan con Parafilm y se almacenan a  $4^{\circ}\text{C}$ . Para preparar las placas, se funde el contenido de uno de los tubos, en un baño de agua hirviente y se vierte en una caja Petri desechable de 4.2 cm de diámetro, teniendo cuidado de mantenerla en un plano horizontal. Se dejan solidificar a temperatura ambiente. En la placa sólida se practican "pozos" de 4mm de diámetro interno y 2 mm de profundidad, con ayuda de un horadador manual.

b. DOBLE DIFUSION EN GEL DE DUCHTERLONY

Se preparan diluciones 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:10, 1:20, 1:40 y -- 1:60 de los sueros obtenidos de cada conejo con S.S.I. Se toman 20 microlitros de Fracción termoestable y 20 microlitros de cada dilución colocándose en los "pozos" practicados en el agar, como se muestra en la Figura 6.

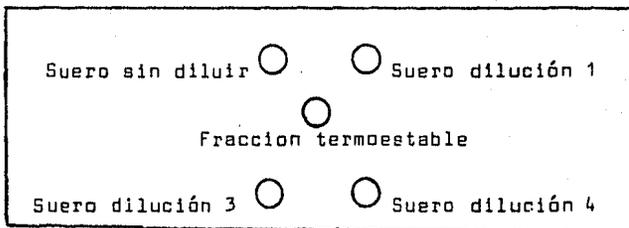


Figura No. 6 DISTRIBUCION DE LAS MUESTRAS EN LA PRUEBA DE DOBLE DIFUSION EN GEL.

La prueba se realiza con todas las diluciones de los sueros, por duplicado, incubándose durante 48 hrs. a temperatura ambiente las cajas cerradas ó en cámara húmeda, después de lo cual se estima la ban-

da respectiva de inmunoprecipitado. El título del suero se considera como la máxima dilución en la que se observe precipitación.

### 3.1.8 SANGRIA DE COSECHA

Cuando el título del suero se encuentra en una dilución aceptable, se procede a realizar la sangría por punción cardíaca en cada animal. Se extraen aproximadamente 50 ml de sangre por conejo. La sangre obtenida se deja coagular separando el suero por centrifugación a 3,000 rpm. durante 30 min.

### 3.1.9 ESTERILIZACION DEL SUERO INMUNE

El suero de cada conejo se esteriliza separadamente por medio de un equipo Zeitz estéril, en el que se utiliza un filtro de asbesto con poro aproximado de 2 micras. (Figura No. 7)

El vacío que se use en el sistema debe ser cuidadosamente aplicado para evitar que se forme espuma.

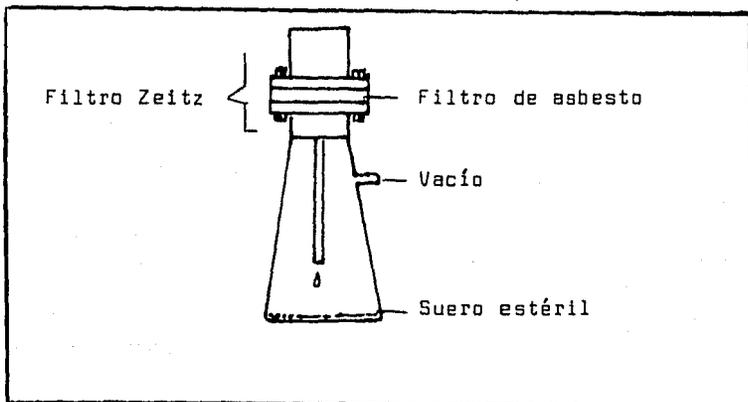


Figura No. 7 Esterilización del suero obtenido

### 3.1.10 TITULACION DEL SUERO INMUNE ESTERIL

La titulación del suero estéril de cada conejo, se lleva a cabo por la técnica de Doble Difusión en gel de Ouchterlony, ya descrita.

### 3.2 PRUEBAS CRUZADAS

Es posible que las especies animales utilizadas en la elaboración de productos cárnicos, compartan determinantes antigénicos con la fracción termoestable de las globulinas de soya. Para analizar esta posibilidad y evitar resultados positivos falsos, se efectuaron pruebas cruzadas; en las que se puso en contacto a la fracción termoestable con antisueros de caballo, porcino, bovino y de burro y al suero anti-FTE frente a los sueros de las especies mencionadas. La prueba se efectuará mediante la técnica de Ouchterlony. Figura No.8

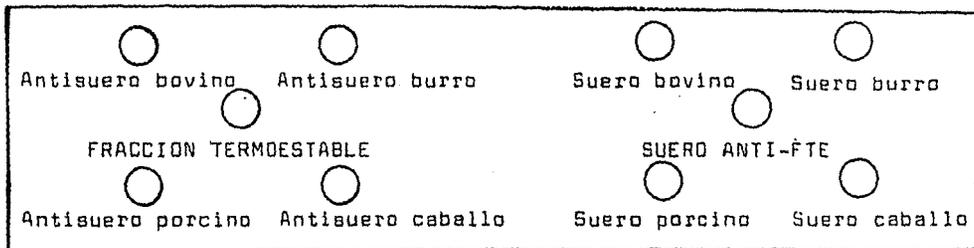


Figura No.8 Pruebas cruzadas por la técnica de Ouchterlony

### 3.3 TECNICA DE INMUNODIFUSION RADIAL

Esta técnica permitirá evaluar la cantidad de fracción termoestable de globulinas de soya que contengan los productos cárnicos que se utilizarán.

#### 3.3.1 PREPARACION DEL AGAR

Se preparan soluciones de agar al 1.4, 1.5, 2 y 3% de la siguiente forma: a 25 ml de SSI con merthiolate 1:10,000 como conservador, se les añaden 0.35, 0.375, 0.5 y 0.75 de agar Purum (Behring) respectivamente; se calientan a 100°C en baño de agua hirviente hasta la total solubilización del agar. Cada solución se distribuye en tubos de ensayo de 13 x 100 previamente etiquetados con la concentración de agar correspondiente y se almacenan a 4°C.

El propósito de tener soluciones de agar con diferentes concentraciones, es poder ensayar varias proporciones de suero:agar conservando siempre una concentración final de agar de 1% (20)(21)(26). La proporción suero:agar que muestre mejores resultados se elegirá para probar las muestras comerciales.

### 3.3.2 PREPARACION DE LA MEZCLA AGAR:SUERO INMUNE

El suero y el agar se mezclan en las proporciones que muestra el Cuadro No. 14.

CUADRO NO. 14 PROPORCIONES DE PRUEBA AGAR:SUERO

SUERO (ml)	A G A R		PROPORCION SUERO:AGAR
	VOLUMEN (ml)	CONCENTRACION ( % )	
3	3	2	1:2
2	4	1.5	1:3
1.6	4.8	1.4	1:4
4	2	3	2:3

El agar solidificado, se funde en un baño de agua hirviente y se enfría hasta 40°C. El suero, se calienta en baño de agua hasta esta temperatura, después de lo cual se mezclan los volúmenes requeridos de ambos tan rápido como sea posible con la ayuda de una pipeta precalentada a 40°C - evitando la formación de espuma y burbújas. Se vierte la mezcla en dos cajas de plástico ( Hyland, Co. ), 3 ml en cada una y se colocan en una superficie nivelada hasta que solidifiquen sin cerrarlas. Una vez sólidas se les practican horadaciones de 4mm de diámetro con ayuda de un horador manual. Se cierran y se conservan almacenadas a 4°C. (Cuadro No.15).

### 3.3.3 EXTRACCION DE LA FRACCION TERMOESTABLE DE LOS PRODUCTOS CARNICOS

Con el fin de contar con un control de productos, que contuviese una concentración conocida de harina de soya, se prepararon salchichas y hamburguesas con 5, 10, 15 y 20% en peso de harina desengrasada de soya preparada en el laboratorio (9) (32).

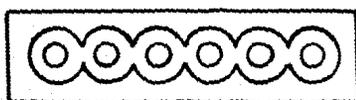
20 gr del control de productos cárnicos y comerciales se colocan -

en una probeta graduada, aforando a 100 ml con solución reguladora de pH 5.4. El contenido de la probeta se transfiere a una licuadora, donde se muele a baja velocidad durante 1 min. La mezcla se vierte en frascos Gerber etiquetados, limpios y secos; se tapan con Parafilm y se dejan reposar a 4°C entre 18 y 24 hrs., finalizado el tiempo, se centrifugan a 8,000 rpm durante 20 min. La capa de grasa se elimina con un agitador y el sobrenadante se decanta en tubos limpios, secos y etiquetados.

### 3.3.4 PRUEBAS DE CALIBRACION

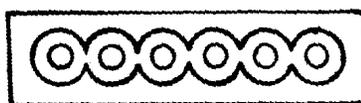
Con un Dosificador (LC Partigen, Behring) ó una micropipeta de - Hamilton, se colocan 20 microlitros de cada extracto en los pozos de las placas preparadas para inmunodifusión radial (con diferentes proporciones de suero: agar, Cuadro 15). Se cierran las cajas e incuban a temperatura ambiente hasta que el diámetro de los anillos de inmunoprecipitado no varíe en 24 hrs. (Punto límite de difusión) esto generalmente ocurre después de 72 hrs. de incubación. Cada prueba se corre por duplicado, teniendo cuidado de que no se forme agua de condensación en las placas, si es así, es conveniente incubarlas con la superficie superior hacia abajo, una vez que las muestras hallan difundido (21).

CUADRO No. 15 APLICACION DE LAS MUESTRAS EN LAS PLACAS DE INMUNODIFUSION RADIAL



1 2 3 4 5 6  
SALCHICHAS

POZO	% HARINA SOYA
1	0
2	5
3	10
4	15
5	20
6	0



1 2 3 4 5 6  
HAMBURGUESAS

POZO	% HARINA DE SOYA
1	0
2	5
3	10
4	15
5	20
6	0

Ya en el punto de difusión, se mide el diámetro de los anillos-- de inmunoprecipitado; por facilidad de manejo, es preferible utilizar una regla graduada Partigen (Behring) para efectuar las medidas. Con éstos resultados, se traza una curva de referencia en papel milimétrico, graficando los diámetros de los precipitados, elevados al cuadrado en función del porcentaje de harina de soya de los controles (21). La proporción suero:agar de las placas cuyos límites de difusión sean más definidos y su curva de referencia más reproducible - se elige para probar las muestras comerciales.

#### 3.4 CUANTIFICACION DE LA FTE EN PRODUCTOS CARNICOS COMERCIALES POR LA TECNICA DE RID

Con la proporción suero:agar elegida se preparan 10 placas de - inmunodifusión radial (tal como se indica en la mezcla de suero:agar Punto 3.3.2).

Las muestras comerciales fueron obtenidas de un Supermercado local, eligiéndose las siguientes modalidades de productos cárnicos: - salchichas tipo Viena, pastel de pollo, jamón, mortadela y hamburguesas (Anexo II). Se utilizaron éstas formas de productos cárnicos debido a que en el proceso de elaboración de todas ellas se incluye - un tratamiento térmico. Fueron evaluadas un total de 10 muestras de marcas comúnmente conocidas, a las que se les extrajo la FTE, utilizando la misma técnica que para los controles (extracción de la FTE de las globulinas de soya, 3.3.3).

Tres pozos de cada placa se llenan con 29 microlitros de extracto de los controles y en los tres restantes se deposita el mismo volumen de extracto de las muestras comerciales. Las cajas se cierran herméticamente y se dejan difundir a temperatura ambiente hasta que el diámetro de los inmunoprecipitados no varíe en 24 hrs. Cada caja se corre por duplicado. Finalizado el tiempo de incubación, se mide - el diámetro de los anillos y se elabora una curva de referencia para cada caja, graficando el diámetro al cuadrado de los halos de precipitación de los controles en función de su contenido de harina de soya. En ésta gráfica se interpolan los diámetros de las muestras - desconocidas, para conocer su contenido de FTE (20) (21). Es necesario trazar una curva de referencia para cada caja, pues las condiciones de su preparación varían considerablemente debido al error humano (20). La técnica de RID se evaluó de acuerdo a su sensibilidad, -

reproducibilidad, costo, tiempo de ejecución y exactitud.

### 3.5 DETERMINACION DE FECULA EN EMBUTIDOS POR HIDROLISIS ACIDA DE ALMIDON

La unica norma analítica para la detección de aglutinantes- en embutidos cocidos es la cuantificación de almidón por hidrólisis - ácida, no existe una específica para soya. Se aplicó ésta técnica para- confirmar su falta de utilidad en la detección de harina de soya.

La Norma Oficial Mexicana para la determinación de almidón- en embutidos (24) establece que ésta cuantificación debe realizarse a- través de la hidrólisis ácida del almidón presente en la muestra, los- azúcares reductores liberados se titulan por la técnica de Fehling. - Sin embargo, no fue posible titular los extractos de los productos a - través de ella, por lo que se utilizó la técnica del Acido 3,5 dinitro salicílico (DNS). En ella se hacen reaccionar los azúcares reductores- del hidrolizado con el ácido 3,5 dinitrosalicílico el cual se reduce- a un aminoderivado cuya absorbancia se mide espectrofotométricamente, para conocer su concentración. Mediante la elaboración de una curva de referencia; utilizando patrones de concentración conocida de glucosa, - se interpolan los valores de las muestras desconocidas (40).

#### 3.5.1 PREPARACION DE REACTIVOS

##### a. REACTIVO DE LUGOL

Disolver 10 gr de yoduro de potasio (KI) en 70 ml de agua; cuando esté completamente disuelto, se le añaden 5 gr de yodo metálico Disolver y completar el volumen a 100 ml con agua destilada.

##### b. HIDROXIDO DE SODIO 2 N.

Disolver 4 gr de hidróxido de sodio en 50 ml de agua.

##### c. HIDROXIDO DE SODIO 1:1 P/V

Pesar 20 gr de hidróxido de sodio (NaOH) en lentejas y adi- cionar 20 ml de agua destilada, agitar hasta total disolución.

##### d. REACTIVO DE ACIDO 3,5 DINITROSALICILICO

Disolver a temperatura ambiente 1 gr de ácido 3,5 dinitro salicílico en 50 ml de agua, a la cual se le agregan 20 ml de hidróxido de sodio 2 N, después de dispersar el DNS en el agua. Una vez lograda - la disolución del DNS, se añaden 30 gr de tartrato doble de sodio y p<sub>g</sub> 41

tasio y se afora a un volúmen de 100 ml con agua desionizada. El reactivo se guarda en un frasco ámbar protegido del  $\text{CO}_2$ .

#### e. SOLUCION ESTANDARD DE GLUCOSA

Pesar: 0.05, 0.1, 0.15, 0.2 y 0.25 gr de glucosa, colocarlos en matraces aforados de 100 ml y completar el aforo con agua destilada.

### 3.5.2 TECNICA EXPERIMENTAL

#### a. PRUEBA CUALITATIVA EN PRODUCTOS CARNICOS

Tomar entre 2.5 y 5.0 gr de los controles de productos cárnicos y productos comerciales. Añadir 10 ml de agua y disgregar la muestra en una cápsula de porcelana. Calentar en una parrilla eléctrica durante 2 ó 3 minutos a una temperatura entre 90 y 95°C. Agregar unas gotas de solución de lugol. La aparición de un color azul característico del complejo yodo-almidón, indica la presencia de fécula en la muestra. Esta prueba funcionó para conocer si el producto contenía harinas de otro tipo diferente a soya (24).

#### b. PRUEBA CUANTITATIVA EN PRODUCTOS CARNICOS

Pesar entre 5 y 10 gr de muestra molida, colocarla en un matraz Erlenmeyer de 500 ml, añadir 150 ml de agua y 25 ml de ácido clorhídrico concentrado. Ajustar el matraz a un equipo de reflujo entre 1 y 1.5 hrs. Enfriar el hidrolizado y neutralizar con hidróxido de sodio. Trasferir el contenido del matraz a otro aforado de 250 ml y completar el volúmen con agua. En tubos de ensaye de 16 x 150, colocar 1-ml de los hidrolizados ó 1 ml de las soluciones estándar de glucosa. Añadir 1 ml de reactivo de DNS a cada tubo, taparlos y colocarlos inmediatamente en un baño de agua hirviente durante 5 min. (tomar tiempo con cronómetro). Una vez transcurrido el tiempo de calentamiento, sacar los tubos y enfriarlos en hielo. Añadir 5 ml de agua destilada a cada tubo y leer su absorbancia a  $\lambda = 540 \text{ nm}$ .

Se grafican las absorbancias obtenidas para los estándares en función de su concentración y en ésta curva patrón se interpolan-

las concentraciones de los hidrolizados. El almidón contenido en las muestras de calcula de la siguiente expresión (24) :

$$\frac{\text{gr. de reductores como glucosa en 100 gr.de muestra}}{\text{Conc.de azúcares reductores del hidrolizado}} \times 250 \times \frac{100}{\text{Peso de la muestra}}$$

Al valor obtenido, se le debe restar la cantidad correspondiente a los reductores directos de cada muestra (25), Anexo V, y multiplicar el resultado por 0.9, que es el factor de conversión de glucosa a almidón.

#### 4.0 RESULTADOS Y DISCUSION

##### 4.1 TITULO DE LOS SUEROS INMUNES OBTENIDOS

El bajo título obtenido en las sangrías de prueba (1:1 para todos los sueros), al finalizar el esquema de inmunización, hizo necesaria la aplicación de 4 refuerzos de 1 ml de inmunógeno (FTE) al 2% en proteínas por vía intraperitoneal. Estas inoculaciones tuvieron como objetivo aumentar la cantidad de anticuerpos y por tanto el título de los sueros. Sin embargo, aún después de aplicarlos, no se obtuvo una alza significativa en los títulos, como se observa en el Cuadro No. 16. Esto se debió posiblemente al retraso sufrido en la sangría de cosecha (34 días); de manera que al inocular nuevamente a los conejos, su sistema inmune toleró al inmunógeno, observándose una disminución considerable en la respuesta inmune.

CUADRO NO. 16 TITULO DE LOS SUEROS INMUNES CONTRA LA FTE DE LAS GLOBULINAS DE SOYA.

DILUCION DEL SUERO	FRACCION TERMOESTABLE DE LAS GLOBULINAS DE SOYA				
	Conejo 1	Conejo 2	Conejo 3	Conejo 4	Conejo 5
1:1	+	+	+	+	+
1:2	+	+	-	+	+
1:3	-	-	-	-	+
1:4	-	-	-	-	-
1:5	-	-	-	-	-
1:10	-	-	-	-	-
1:20	-	-	-	-	-
1:40	-	-	-	-	-
1:60	-	-	-	-	-

#### 4.2 PRUEBAS CRUZADAS

Los resultados obtenidos, al poner en contacto sueros anti-especie contra la FTE, se muestran en el Cuadro No. 17.

CUADRO NO. 17 RESULTADOS DE LAS PRUEBAS CRUZADAS

ANTICUERPO	A N T I G E N O				
	Suero cerdo	Suero burro	Suero equino	Suero bovino	FTE
Antisuero cerdo	+	-	-	-	-
Antisuero burro	-	+	-	-	-
Antisuero equino	-	-	+	-	-
Antisuero bovino	-	-	-	+	-
Suero anti-FTE	-	-	-	-	+

Como se observa, la FTE de las globulinas de soya no comparte-determinantes antigénicas con otros componentes de los productos -cárnicos. Por lo que la reacción del suero Anti-FTE con la FTE es es pecífica, lo que imparte un alto grado de confiabilidad al tipo de -análisis que se llevó a cabo, en productos cárnicos.

#### 4.3 INMUNODIFUSION RADIAL (RID)

##### 4.3.1 PRUEBAS DE CALIBRACION

En el Cuadro No. 18 se muestran los resultados obtenidos-para las pruebas de calibración. Para la preparación de las placas -utilizadas en éste ensayo se utilizó el suero del conejo No. 1, pues-aunque no es el más potente, se contaba con un mayor volúmen de sue-ro con título 1:2.

CUADRO No. 18 RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DE CALIBRACION

PRODUCTO	CONTENIDO DE HARINA DE - SOYA (% peso)	1:1		1:2		1:3		2:1	
		A	B	A	B	A	B	A	B
SALCHICHA	5	49	56.25	0	0	0	0	53.3	53.3
SALCHICHA	10	65.6	75.7	0	0	0	0	68.2	65.6
SALCHICHA	15	92.15	94.1	0	0	0	0	84.65	79.2
SALCHICHA	20	98	98	100	100	100	100	100	100
HAMBURGUESA	5	0	0	0	0	0	0	53.3	54.7
HAMBURGUESA	10	0	0	0	0	0	0	57.7	59.3
HAMBURGUESA	15	0	0	0	0	0	0	65.6	69.2
HAMBURGUESA	20	0	0	0	0	0	0	70.5	86.5

A y B son repeticiones.

La proporción suero:agar fué 1:1,1:2,1:3 y 2:1.

Se eligió la proporción suero:agar 2:1 para la preparación de las placas de inmunodifusión radial en las que se efectuaron las pruebas para productos cárnicos comerciales, pues aunque el diámetro de los halos no varía considerablemente entre la proporción 1:1 y 2:1; el límite de difusión se observó mejor en la proporción elegida. El volumen de llenado de las placas fué de 3 ml y se mantuvo constante en todos los experimentos.

Como se observa la técnica no funcionó al probar hamburguesas esto puede deberse, posiblemente a que a la temperatura de fritura la fracción termoestable pierde parte de sus determinantes antigénicas y por tanto la reacción con el suero inmune es débil.

Fué necesario lavar las placas después de alcanzar el punto de difusión, pues los sueros obtenidos presentaban inicios de hemólisis, lo que podría dar lugar a la aparición de precipitados no específicos ó falsos. El lavado se efectuó colocando cada placa en un vaso de precipitados de 250 ml con SSI, la solución de lavado se cambió cada 8 hrs. aproximadamente, hasta completar un tiempo total de 72 hrs.

#### 4.3.2 CUANTIFICACION DE LA FRACCION TERMOESTABLE EN PRODUCTOS CARNICOS COMERCIALES

Para la técnica de inmunodifusión radial, no fue posible utilizar como estándar de concentración conocida a la FTE obtenida en este trabajo, debido a que presenta una precipitación en los pozos de gel de agar de pH 7. Hubiese sido posible usarla sin tener este problema si el gel de agar se preparase con pH de 5.4, pues en estas condiciones la FTE es soluble (Anexo V), sin embargo en estas condiciones los anticuerpos contenidos en el suero se desnaturalizarían dando lugar a precipitados no específicos.

Se concentró en rotavapor la FTE para obtener un extracto de doble concentración pero aún así ocurría la precipitación del Antígeno en los pozos. Por otra parte, los resultados obtenidos usando como estándares los controles de productos cárnicos, fueron reproducibles y sus curvas de referencia aceptables ( $r^2=0.99$ ), por lo que se trabajó con éstos últimos como estándares.

De las 10 muestras comerciales, sólo dos resultaron positivas; los resultados se muestran en los cuadros 19 al 23 y figuras 9 a 13.

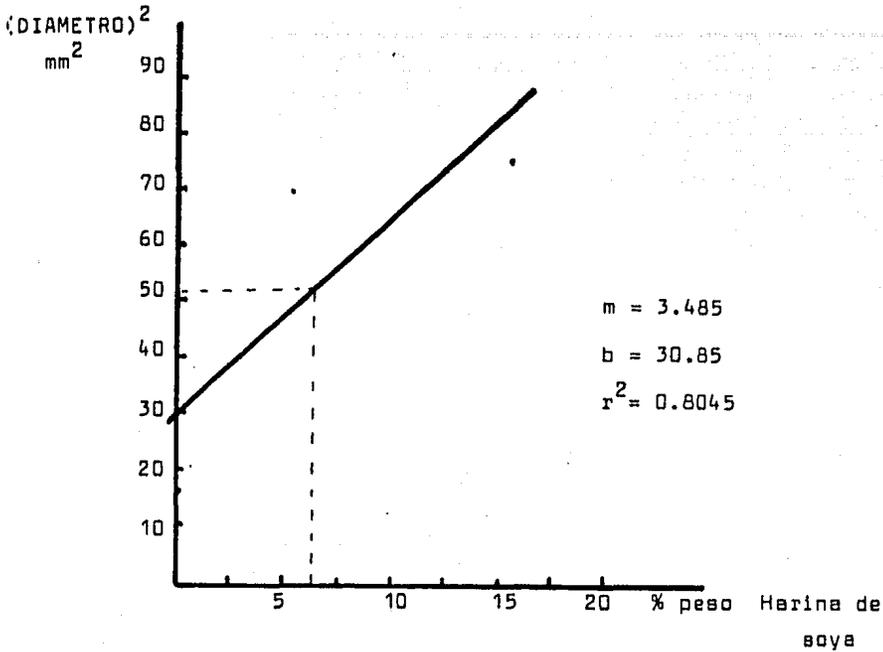


Figura No. 9 CURVA DE REFERENCIA DE LA PLACA DE RID  
No.1

CUADRO No. 19 RESULTADOS DE LA TECNICA DE RID PARA LA CUANTIFICACION  
DE LA FTE EN PRODUCTOS CARNICOS.PLACA No.1

PRODUCTO	CONCENTRACION DE HARINA DE SOYA (% en peso)	DIAMETRO AL CUADRADO DEL HALO DE PRECIPITACION (mm <sup>2</sup> )
CONTROLES: Salchicha	0	16
Salchicha	5	70.55
Salchicha	15	75.7
COMERCIAL: S <sub>1</sub>	<u>7.5</u>	57.7
S <sub>2</sub>	0	16
S <sub>3</sub>	0	16

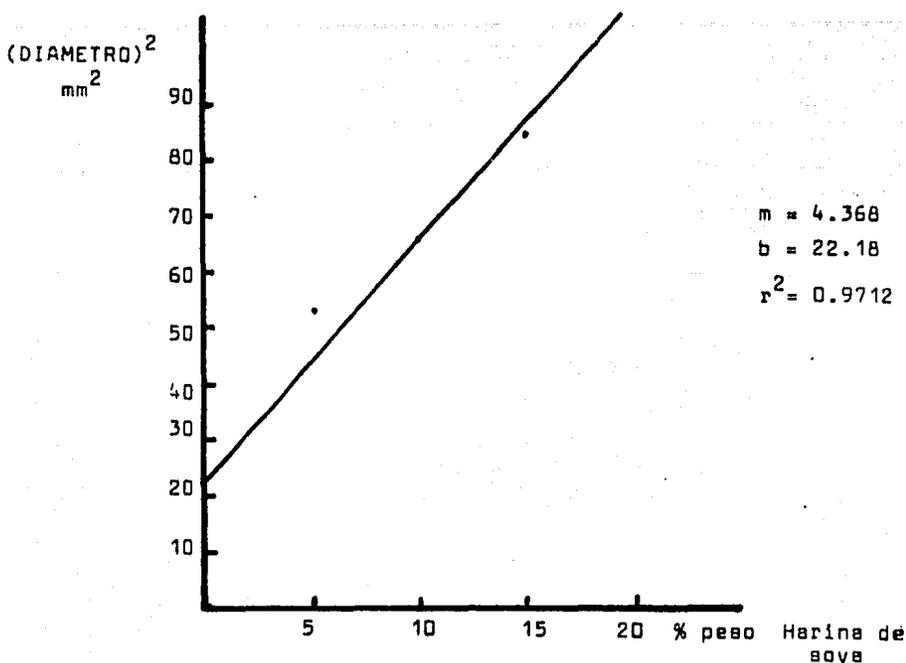


Figura No. 10 CURVA DE REFERENCIA DE LA PLACA DE RID No.2

CUADRO No. 20 RESULTADOS DE LA TECNICA DE RID PARA LA CUANTIFICACION DE LA FTE EN PRODUCTOS CARNICOS - PLACA No.2

PRODUCTO	CONCENTRACION DE HARINA DE SOYA (% en peso)	DIAMETRO AL CUADRADO DEL HALO DE PRECIPITACION (mm <sup>2</sup> )
CONTROLES: Salchicha	0	16
Salchicha	5	53.3
Salchicha	15	84.6
COMERCIALES: S <sub>4</sub>	0	16
S <sub>5</sub>	0	16
S <sub>6</sub>	0	16

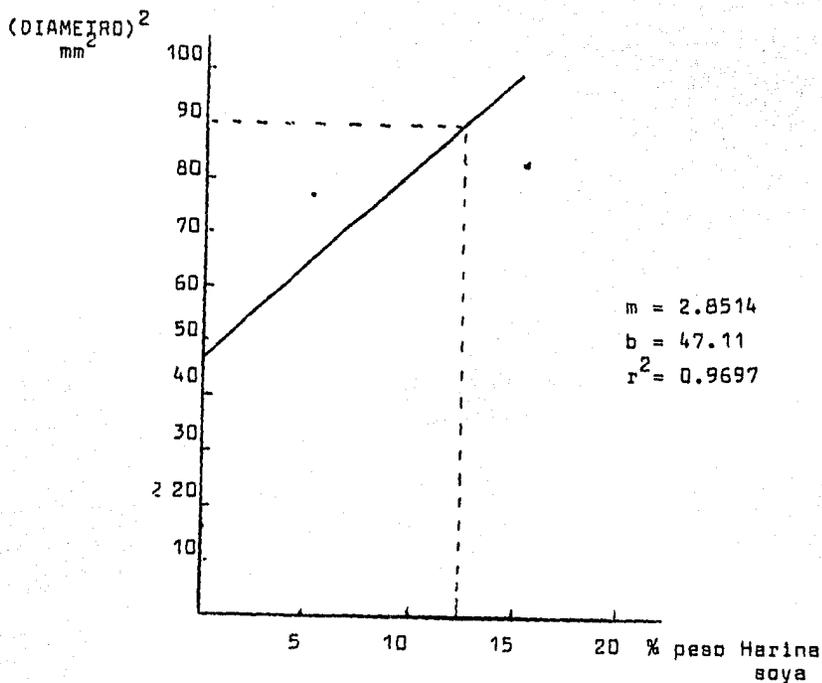


Figura No.11 CURVA DE REFERENCIA DE LA PLACA DE RID No.3

CUADRO No.21 RESULTADOS DE LA TECNICA DE RID PARA LA CUANTIFICACION DE LA FTE EN PRODUCTOS CARNICOS. PLACA DE RID. No. 3

PRODUCTO	CONCENTRACION DE HARINA DE SOYA (% en peso)	DIAMETRO AL CUADRADO DEL HALO DE PRECIPITACION ( $mm^2$ )
CONTROLES: Salchicha	0	16
Salchicha	5	77.4
Salchicha	15	82.8
COMERCIALES: J	<u>12.5</u>	90.2
P.P	0	16
M	0	16

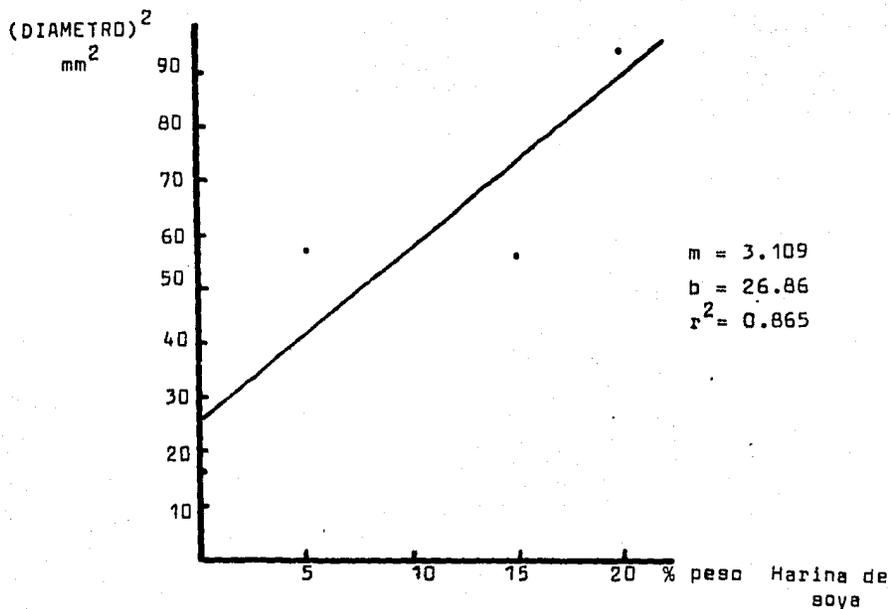


Figura No. 12 CURVA DE REFERENCIA DE LA PLACA DE RID No.4

CUADRO No.22 RESULTADOS DE LA TECNICA DE RID PARA LA CUANTIFICACION DE LA FTE EN PRODUCTOS - CARNELOS.PLACA No.4

PRODUCTO	CONCENTRACION DE HARINA DE SOYA (%en peso)	DIAMETRO AL CUADRADO DEL HALO DE PRECIPITACION (mm <sup>2</sup> )
CONTROLES: Hamburguesa	0	16.0
Hamburguesa	5	57.75
Hamburguesa	15	56.25
Hamburguesa	20	94.1
COMERCIAL: H <sub>1</sub>	0	16.0

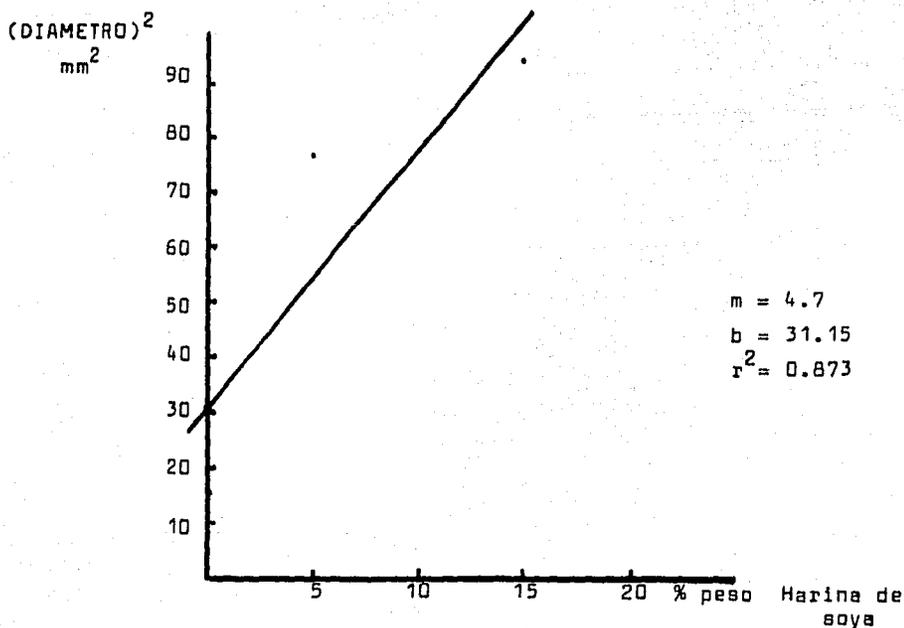


Figura No.13 CURVA DE REFERENCIA DE LA PLACA DE RID  
No.5

CUADRO No.23 RESULTADOS DE LA TECNICA DE RID PARA LA CUAN  
TIFICACION DE LA FTE EN PRODUCTOS CARNICOS.  
PLACA DE RID No.5

PRODUCTO	CONCENTRACION DE HARINA DE SOYA (% en peso)	DIAMETRO AL CUADRADO DEL HALO DE PRECIPITACION (mm <sup>2</sup> )
CONTROLES: Salchicha	0	16
Salchicha	5	77.4
Salchicha	15	94.1
COMERCIAL: H <sub>1</sub>	0	16

Todas las curvas de referencia fueron corregidas, obteniendo la recta de regresión de cada una, misma que se graficó.

La técnica de RID, mostró ser cuantitativa y reproducible, es capaz de detectar variaciones en el contenido de harina de soya entre un 5- y 20% en peso del producto. Un gran inconveniente de la técnica, fué el no haber podido contar con un estándar soluble de fácil manejo, en vez de utilizar un producto cárnico determinado, pues se limita la aplicación de la técnica con confiabilidad a éste solo producto. Sin embargo, la facilidad de su ejecución, ya teniendo los sueros listos- la hacen una técnica rápida (Cuadro No. 24 ). En cuanto a su costo, en el Cuadro No. 25 se observa que el precio por prueba es bajo. La única desventaja que ofrece ésta técnica es que para obtener los resultados se tiene que aguardar a llegar al punto límite de difusión, que se alcanza en aproximadamente 72 hrs.

CUADRO No. 24 TIEMPO DE EJECUCION DE LA TECNICA DE RID PARA 40 PRUEBAS

ACTIVIDAD	TIEMPO DE EJECUCION (hrs.)
Inoculaciones	10
Tratamiento térmico	1
Biuret	1
Esterilizaciones	4
Prep. de material y reactivos	2
TOTAL	44 min/prueba

CUADRO No. 25 COSTO DE LA TECNICA DE RID PARA 40 PRUEBAS

REACTIVOS	CANTIDAD	COSTO (M.N)
Conejo	1	750.00
Harina de soya	500 gr	50.00
NaCl	500 gr	20.00
Agar Purum	0.3 gr	54.00
Merthiolate	30 ml	60.00
NaOH	3.5 gr	14.00
KI	18 gr	370.00
CuSO <sub>4</sub>	5.5 gr	42.00
Tartrato doble de sodio y potasio	15 gr	57.30
Albúmina bovina	0.115 gr	488.20
TOTAL	62.40/Prueba	

4.4 DETERMINACION DE FECULA EN EMBUTIDOS POR HIDROLISIS  
ACIDA DE ALMIDON.

4.4.1 PRUEBA CUALITATIVA

Los resultados obtenidos para los productos examinados se muestran en el Cuadro No.24.

CUADRU No.26 RESULTADOS DE LA PRUEBA CUALITATIVA DE DETERMINACION DE ALMIDON.

PRODUCTO	CONCENTRACION DE HARI NA DE SOYA (%en peso)	PRUEBA CUALITATIVA
CONTROLES: Salchicha	0	-
Salchicha	5	+
Salchicha	10	+
Salchicha	15	+
Salchicha	20	+
Hamburguesa	0	+
Hamburguesa	5	+
Hamburguesa	10	+
Hamburguesa	15	+
Hamburguesa	20	+
	(Por interpolación en las figuras 9-13)	
COMERCIALES: S <sub>1</sub>	7.5	+
S <sub>2</sub>	0	+
S <sub>3</sub>	0	+
S <sub>4</sub>	0	+
S <sub>5</sub>	0	+
S <sub>6</sub>	0	+
J	12.5	+
P.P	0	+
M	0	+
H <sub>1</sub>	0	+

Como se observa, los diez productos comerciales examinados contienen harinas, pero sólo en los casos de las muestras S<sub>1</sub> y J, el harina es de soya y únicamente 5 de ellos (S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub>, S<sub>4</sub>, S<sub>5</sub> y M) declaran fécula en sus marbetes.

#### 4.4.2 PRUEBA CUANTITATIVA

La única Norma analítica para la detección de aglutinantes en embutidos cocidos, es la determinación de fécula por la hidrólisis ácida de almidón, no existe otra para harina de soya. Se aplicó esta técnica en los productos comerciales que resultaron positivos por la técnica de RID, en los controles de salchichas con 5 y 20% de harina de soya y en el harina de soya completa elaborada en el laboratorio. Como era de esperarse la técnica de la Norma (24), no resultó aplicable para este tipo de aditivo de alimentos, debido a que el contenido de almidón de la harina de soya es muy bajo. Los resultados se muestran en el Anexo-IV.

## 5.0 RESUMEN

A partir de la necesidad de contar con una reglamentación adecuada respecto al uso de derivados de soya en productos cárnicos, en éste trabajo se desarrolló la técnica de Inmunodifusión radial para la cuantificación de la fracción termoestable de las globulinas de soya, que permanece intacta aún después de sufrir el tratamiento térmico, que generalmente reciben los productos cárnicos industrializados. Esta técnica ofrece una alta especificidad, bajo costo y simplicidad de ejecución. Para su realización se obtuvo un suero inmune específico contra ésta fracción termoestable, inmunizando conejos con ella durante 20 días. El suero inmune se mezcló con una solución de agar de concentración adecuada y se vertió en placas a las que se les practicaron horadaciones ó pozos. En ellos se deposita un cierto volumen de extracto de productos cárnicos control y comerciales. Si los productos contienen harina de soya, la fracción termoestable reacciona con los anticuerpos específicos del suero y forma un halo de precipitación alrededor de los pozos. El diámetro del halo es directamente proporcional a la concentración de fracción termoestable que contiene el producto, por lo que al comparar los halos de precipitación de los controles de productos cárnicos con concentración conocida de harina de soya, se obtiene la cantidad de FTE que poseen las muestras desconocidas. Se evaluó el contenido de almidón de éstos productos a través de la hidrólisis ácida de éste. La técnica de hidrólisis ácida de almidón, no pudo ser aplicada tal como la indica la Norma de la Sria. de Industria y Comercio, en la que se hidroliza el almidón de la muestra y se cuantifican los azúcares reductores del hidrolizado por la técnica de Fehling; la titulación fué efectuada a través de la técnica del ácido-3.5 dinitrosalicílico, sin embargo aún con ésta modificación la técnica no fué aplicable. La inmunodifusión radial desarrollada, demostró ser específica y sensible en la detección de proteínas de soya en productos cárnicos.

## 6.0 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

1. Existe una fracción termoestable en las proteínas de soya capaz de conservar sus propiedades antigénicas aún después de un tratamiento térmico a 121°C durante 20 minutos.

2. Esta fracción no comparte determinantes antigénicas con las proteínas de bovinos, caballo, porcinos y burros.

3. La fracción termoestable de las proteínas de soya puede cuantificarse por la técnica de inmunodifusión radial en embutidos y jamón que contengan entre 5 y 20% de harina de soya.

4. Debido a la concentración con la que se obtiene la fracción termoestable y a sus propiedades fisicoquímicas, tiene un uso relativo, como estándar soluble a la concentración de 2% de proteína en la técnica de inmunodifusión radial, por lo que es recomendable hallar las condiciones adecuadas para utilizarla como tal.

5. Por la baja potencia del suero obtenido, no fue posible realizar el estudio en un número de muestras estadísticamente confiable. Sin embargo, debido a la gran especificidad de la técnica, sí es posible afirmar que de las diez muestras analizadas, dos contenían harina de soya, una de ellas con concentración de 12.5% es decir sobre el límite permitido. Es recomendable obtener un suero con un mayor título de anticuerpos para efectuar la determinación en un número mayor de muestras y aumentar la sensibilidad de la técnica.

6. La determinación de almidón por hidrólisis ácida, no aplicable en los productos evaluados.

7. Todos los productos cárnicos probados contienen harina, pero sólo en dos casos se demostró la presencia de proteínas de soya.

8. La técnica de inmunodifusión radial puede ser una valiosa herramienta, si se establece como método de detección de adulteraciones con derivados de soya.

## 7.0 ANEXOS

### ANEXO I

#### PREPARACION DEL CONTROL DE PRODUCTOS CARNICOS

##### a. SALCHICHAS TIPO VIENA

Las salsichas se prepararon de acuerdo a la composición señalada en el Cuadro No. 27.

CUADRO NO. 27 ELABORACION DE SALCHICHAS TIPO VIENA (9)

INGREDIENTE	SALCHICHAS DE SOYA				
	0 % (gr)	5% (gr)	10% (gr)	15% (gr)	20% (gr)
Carne de res	100	100	100	100	100
Retazo de papada	100	90	80	70	60
Hielo	106.6	106.6	106.6	106.6	106.6
Condimento para-salschicha	1.93	1.93	1.93	1.93	1.93
Sal (NaCl)	2.66	2.66	2.66	2.66	2.66
Acuerdo	1.53	1.53	1.53	1.53	1.53
Harina desengrasada de soya	0	10	20	30	40

La carne de res y el retazo de papada (sin hueso), se muelen en un picador de carne doméstico (Moulinex) incorporándole poco a poco los demás ingredientes. La mezcla se embute en una embutidora en tripa artificial y se divide en tramos de 6 cm aproximadamente.

Las salsichas así preparadas, se someten a una temperatura entre 75-78°C durante 10 minutos. Se almacenan a 0°C hasta el momento de usarlas.

##### b. HAMBURGUESAS

La fórmula base de las hamburguesas elaboradas, se muestra en el Cuadro No. 28.

CUADRO No. 28 ELABORACION DE HAMBURGUESAS CON SOYA

INGREDIENTE	HAMBURGUESAS DE SOYA				
	0% (gr)	5% (gr)	10% (gr)	15% (gr)	20% (gr)
Carne de res	99	94	89	84	79
Sal (NaCl)	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9
Sazonador	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
Harina desengra- sada de soya	0	5	10	15	20

La carne se muele en un picador de carne doméstico (Moulinex) incorporándole lentamente los demás ingredientes. Se forman hamburguesas con 50 gr de peso y se cocinan a fuego lento.

A N E X O II

ELECCION DE LAS MUESTRAS COMERCIALES EVALUADAS

Se seleccionaron diferentes modalidades de productos cárnicos comerciales en las que se incluyera un tratamiento térmico en su elaboración. Así, se escogieron las formas comerciales mencionadas en el Cuadro No. 29.

CUADRO NO. 29 MODALIDADES Y MARCAS COMERCIALES EVALUADAS POR LA TECNICA DE RID E HIDROLISIS DE ALMIDON EN CUANTO A SU CONTENIDO DE SOYA.

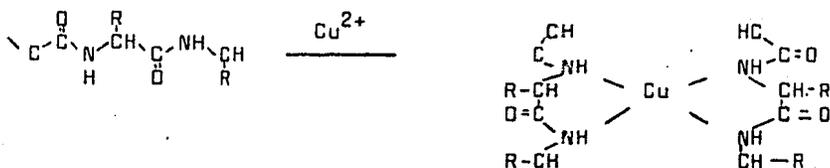
MODALIDAD	MARCA COMERCIAL	ABREVIATURA
Salchicha	Fud	S <sub>1</sub>
Salchicha	Zwan	S <sub>2</sub>
Salchicha	Riojano	S <sub>3</sub>
Salchicha	San Rafael	S <sub>4</sub>
Salchicha	Iberomex	S <sub>5</sub>
Salchicha	Valdy	S <sub>6</sub>
Jamón	San Rafael	J
Pastel de pollo	Fud	P.P
Mortadela	Zwan	M
Hamburguesa	Tom-Boy	H <sub>1</sub>

### A N E X O III

#### DETERMINACION DE PROTEINAS POR LA TECNICA DE BIURET (37)

Esta técnica está basada en la reacción de iones cúpricos - ( $\text{Cu}^{2+}$ ) en solución alcalina, con los enlaces peptídicos de las - proteínas para formar un complejo de color rosa a violeta rojizo con una absorptividad máxima a 550 nm.

La reacción que se efectúa es la siguiente:



#### a. PREPARACION DE REACTIVOS

##### DILUYENTE DE BIURET

(Yoduro de potasio al 5% en Hidróxido de sodio 0.25 N). - Se pesan 6 gr de Hidróxido de sodio, se disuelven en 600 ml de - agua destilada, se agregan 30 gr de Yoduro de potasio y se agita - hasta la disolución total de los reactivos.

##### REACTIVO DE BIURET

Se disuelven 9 gr de Sulfato de cobre pentahidratado ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ ), en 42-48 ml de agua destilada. Por separado se prepara una solución de 27 gr de Tartrato doble de sodio y potasio en - 360-420 ml de diluyente de Biuret, a la que se agrega lentamente - y con agitación el Sulfato de cobre solubilizado en agua. Ambas - soluciones deben estar a temperatura ambiente para prevenir la - reducción del  $\text{Cu}^{2+}$  por el Tartrato. Se afora con diluyente de Biuret hasta completar un volumen total de 600 ml. Antes de usarse, - se filtra para separar el óxido cuproso precipitado. El reactivo - se guarda en un frasco de polietileno lejos de la luz solar di - recta.

##### SOLUCION ESTANDARD DE PROTEINAS

Se pesan 4 gr de albúmina sérica bovina, se adicionan a - un matraz aforado de 100 ml. Se agrega agua lentamente y sin agi-

tar hasta completar el aforo. El matraz se deja reposar en refrigeración de 2 a 4 hrs. Con esto se evita la desnaturación de la proteína y se permite su total disolución. A partir de esta solución se preparan estándares con 0.5, 1, 2 y 3 gr/100ml diluyendo de la siguiente manera:

CUADRO No. 30 PREPARACION DE LAS SOLUCIONES ESTANDAR DE ALBUMINA

CONCENTRACION	ml de Sol.Std. 4gr/100 ml	Agua destilada
3 gr/100 ml	8.75	1.25
2 gr/100 ml	5.0	5.0
1 gr/100 ml	2.0	6.0
0.5 gr/100 ml	1.0	7.0

b. TECNICA EXPERIMENTAL

Se preparan diluciones 1:2, 1:3 y 1:4 de la Fracción termoes- table de las globulinas de soya con Cloruro de sodio al 0.85%. Se colocan en tubos de 16 x 150, 2 ml de la FTE sin diluir, de las dilu- ciones y de cada solución estándar. Se les agregan 8 ml de reacti- vo de Biuret, se mezclan e incuban a temperatura ambiente durante - 30 min. Se lee la absorbancia de los tubos contra un blanco que con- tenga el reactivo de Biuret y 2 ml de agua destilada. La longitud de onda de la absorbancia máxima del complejo es 550 nm.

Los resultados de los estándares se grafican en función de su concentración, las absorbancias de los problemas se interpolan en - la curva obtenida (Figura No. 14) y se multiplican por la dilución - que se halla utilizado.

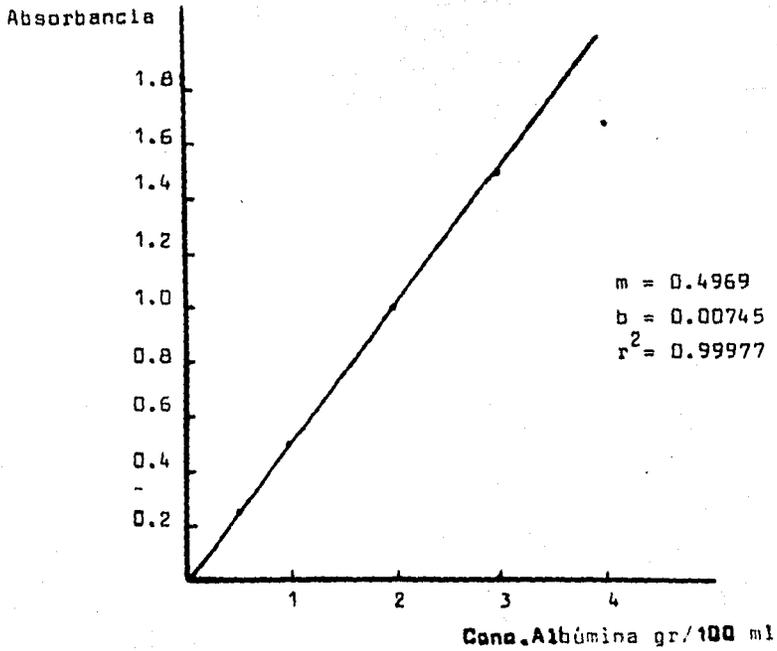


Figura No. 14 CURVA PATRON DE ALBUMINA (Tec.Biuret)  
 Leída en colorímetro Bausch and Lomb Spectronic 20  
 $\lambda = 558 \text{ nm}$

CONCENTRACION (gr/100 ml)	ABSORBANCIA
0.5	0.26
1.0	0.505
2.0	1.0
3.0	1.5
4.0	1.69

## A N E X O IV

### RESULTADOS DE LA DETERMINACION DE FECULA POR HIDROLISIS ACIDA DE ALMIDON.

#### a. PRUEBA CUANTITATIVA

Esta se aplicó solamente en los controles de salchichas con 5- y 20% de harina de soya, en la harina de soya preparada en el laboratorio y en las dos muestras comerciales que resultaron positivas.

A parti de la curva patrón de glucosa obtenida con la técnica de DNS (Fig.No. ) se interpolaron las concentraciones de azúcares- de los hidrolizados de almidón y de reductores totales de cada muestra.

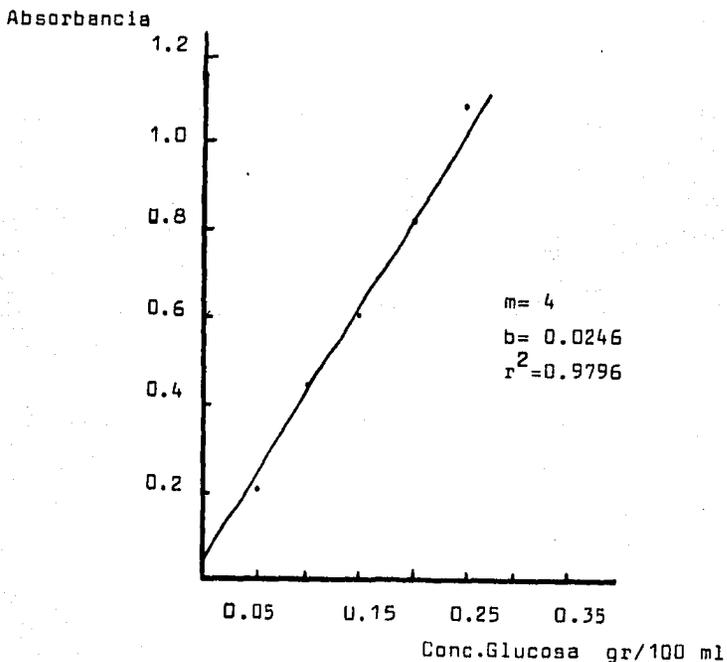


Figura No. 15 CURVA PATRON DE GLUCOSA OBTENIDA  
POR LA TECNICA DE DNS. (Leída en colorímetro -  
Bausch and Lomb Spectronic 20,  $\lambda = 550$  nm)

CURVA PATRON DE GLUCOSA

CONCENTRACION DE GLUCOSA gr/100 ml	ABSORBANCIA
0.05	0.201
0.10	0.472
0.15	0.601
0.20	0.810
0.25	1.1

En el Cuadro No 31 se muestran los resultados obtenidos para reductores directos y almidón de cada una de las muestras analizadas.

CUADRO No. 31 RESULTADOS DE LA HIDROLISIS DE ALMIDON Y REDUCTORES DIRECTOS EN LOS PRODUCTOS CARNICOS ANALIZADOS.

a. HIDROLISIS ACIDA DE ALMIDON

PRODUCTO	% HARINA SOYA	PESO DE MUESTRA	ABSORBANCIA	CONC. DE REDUCTORES - TOTALES COMO GLUCOSA DEL HIDROLIZADO. (gr/100 ml)	gr DE REDUCTORES POR 100 gr DE MUESTRA
Salchicha	5	7.6	0.27	0.066	2.56
Salchicha	20	8.5	0.745	0.1718	5.052
S <sub>1</sub>	7.5	2.2	0.215	0.0425	4.82
J	12.5	3.5	0.173	0.04	2.85
Harina de	100	10	3.1	0.7045	17.61

b. REDUCTORES DIRECTOS

PRODUCTO	% HARINA DE SOYA	PESO DE LA MUESTRA (gr)	ABSORBANCIA	CONC.DE REDUCTORES DIRECTOS COMO GLUCOSA gr/100 ml	gr de REDUCTORES DIRECTOS POR 100 gr DE MUESTRA (COMO GLUCOSA)
Salchicha	5	6.5	0.306	0.075	2.59
Salchicha	20	7.6	0.745	0.0845	2.77
S <sub>1</sub>	7.5	2.5	0.195	0.0362	3.62
J	12.5	3.2	0.004	0.0	0.0
Harina de soya	100	10	0.006	0.0	0.0

c. CONTENIDO DE ALMIDON DE LAS MUESTRAS

PRODUCTO	REDUCTORES DIRECTOS - COMO GLUCOSA DEL HIDROLIZADO - POR 100 gr DE MUESTRA	REDUCTORES DIRECTOS COMO GLUCOSA POR 100 gr DE MUESTRA	CONTENIDO DE ALMIDON POR 100 gr DE MUESTRA
Salchicha con 5% soya	2.56	2.59	0.0
Salchicha con 20% soya	5.052	2.77	2.0538
S <sub>1</sub> (7.5% soya)	4.82	3.62	1.08
J (12.5% soya)	2.85	0	2.57
Harina de soya	17.61	0	15.849

En el Cuadro No.32 se muestran los resultados resumidos de la determinación de almidón y se comparan con el valor teórico esperado en cada caso.

CUADRO No. 32 RESULTADOS RESUMIDOS DE LA CUANTIFICACION DE ALMIDON EN LOS PRODUCTOS EVALUADOS.

PRODUCTO	CONTENIDO DE HARINA DE SOYA OBTENIDO POR <u>RID</u> ( % en peso)	CONTENIDO DE ALMIDON HIDR.ACIDA (% en peso)	CONTENIDO TEORICO DE ALMIDON QUE DEBERIA TENER LA MUESTRA.(% en peso)
Control Salchicha	5	0	0.95
Control Salchicha	20	2.045	3.46
S <sub>1</sub>	7.5	0.726	-
J	12.5	2.57	-

Como se observa, el contenido experimental de almidón que se obtiene para los controles de productos cárnicos es bajo. En el caso del control de salchichas con un contenido de harina de soya de 20%, que es un caso interesante desde el punto de vista legal, pues el que una salchicha contenga más del 10% de harina constituiría un fraude (26), se obtiene un 60% de error en la determinación que se efectuó en este trabajo, lo que significaría la aceptación de un producto adulterado como normal. Por otro lado, el obtener 0% de concentración de almidón en el control de salchicha con 5% de harina de soya, equivaldría a afirmar que dicho producto no contiene harina, lo cual es falso, pues ya de antemano se tenía la certeza de habérsela agregado. Por todo lo anterior se observa que la técnica de la hidrólisis ácida para la cuantificación de almidón no es aplicable a productos que contienen harinas de soya como aditivos.

A N E X O V

DETERMINACION DE REDUCTORES TOTALES EN ALIMENTOS(25)

a. PREPARACION DE REACTIVOS

SOLUCION SATURADA DE ACETATO NEUTRO DE PLOMO

En 50 ml de agua destilada añadir poco a poco y con agitación Acetato neutro de plomo hasta que no se disuelva más, quedando algunos cristales en el fondo.

b. TECNICA EXPERIMENTAL

De 5 a 10 gr de muestra de productos cárnicos, se colocan en un matraz Erlenmeyer de 250 ml, se añade 100 ml de agua y se agita. Se agregan de 2 a 10 ml de solución saturada de acetato de plomo, se agita y se deja sedimentar. Añadir poco a poco Oxalato de sodio ó potasio hasta la total precipitación del acetato de plomo. Filtrar, recibir el filtrado en un matraz volumétrico de 250 ml. Lavar 3 veces el matraz con 20 ml de agua. Se añaden 10 ml de Acido Clorhídrico concentrado al matraz, calentar a 65°C, durante 15 min. y enfriar. Neutralizar con Hidróxido de sodio 1N y aforar con agua hasta completar un volumen de 250 ml. La cantidad de reductores de la muestra se cuantifica por la técnica de DNS( 40).

La cantidad de reductores totales por 100 gr de muestra se obtiene de la siguiente expresión:

$$\begin{array}{l} \text{gr DE REDUCTORES TOTALES} \\ \text{POR 100 gr de MUESTRA} \end{array} = \begin{array}{l} \text{Conc. interpo} \\ \text{lada} \\ \text{gr/l} \end{array} \times 250 \times \frac{100}{\text{Peso de la muestra}} \text{tra}$$

## A N E X O VI

### PRUEBAS DE SOLUBILIDAD DE LA FRACCIÓN TERMOESTABLE DE LAS GLOBULINAS DE SOYA

Debido a la insolubilidad de la Fracción termoestable a pH 7 se efectuaron pruebas de solubilidad con el objeto de hallar un pH al cual la FTE fuera totalmente soluble y preparar las placas bajo estas condiciones. Se mezclaron soluciones reguladoras preparadas con diferentes sales desde pH 2.68 hasta 12.6. En tubos de ensayo de 13x100, se depositó 1 ml de la solución reguladora y 1 ml de la FTE obtenida en el laboratorio, se mezclaron y dejaron en reposo a temperatura ambiente durante 24 hrs. después de las cuales se centrifugaron y se observó que, únicamente a pH 5.4 la FTE permanecía en solución, mientras que en todo el rango restante se precipitó. Sin embargo este resultado no pudo ser aplicado en la elaboración de las placas de RID, pues a ese pH los anticuerpos se desnaturan y por tanto se pierde la especificidad de la reacción Ag-Ac.

El conocimiento de las propiedades de solubilidad de la FTE permitió elegir el pH de 5.4 para extraerla de los productos cárnicos control.

## 8.0 REFERENCIAS

1. APPU, R. 1975. Binding of Mg (II) by the 11 S fraction of soybean - proteins. *J. Agr. Food. Chem.* 23(4): 657-661
2. CATSIMPODLAS, N. Immunological aspects of foods. The Avi Publishing Co. Westport, Con. 1978, p. 37-59
3. CATSIMPODLAS, N. y LEUTHNER, E. 1964. Immunochemical methods of detection and quantitation of Kunitz soybean trypsin inhibitor. *Anal Biochem.* 31:437-447
4. CATSIMPODLAS, N. y MEYER, E. W. 1968. Immunochemical properties of the 11 S component of soybean proteins. *Arch. Biochem. Biophys.* 125:742 - 750.
5. CIRCLE, S. y SMITH, A. Soybeans, chemistry and technology. Vol II Soybeans and soybean products. Ed. por Smith-Circle. Westport Avi. 1972- Cap. VII Proteins and other nitrogenous constituents. p. 275-348.
6. CROSS, H. y STANFIELD, M. 1975. Effect of fat and textured soy protein content on consumer acceptance of ground beef. *J. Food Sci.* 40 1331-1332.
7. DEL VALLE, F. 1974 . Enrichment of tortillas with soy proteins by time-cooking of whole raw corn-soybean mixtures. *J. Food Sci.* 39: 244-248.
8. DIRECCION GENERAL DE ECONOMIA AGRICOLA. Estadística del subsector pecuario. SARH, 1980.
9. DRICE, J. F. Ciencia de la carne. Ed. Acribia, España, 1976. p.
10. FRANZ, K. 1975. Tortillas fortified with whole soybeans prepared by different methods. *J. Food Sci.* 40: 1275-1277.
11. GARCIA, R. 1983. La estadística agrícola en México. Colegio de Pos - graduados. Centro de economía agrícola. SARH. Chapingo, México.
12. HAMDY, M. M. 1977. Soybean proteins in prudent diet foods. *J. Am. Oil - Chem. Soc.* 54(2): 87-89A.
13. HILL, J. E. y BREIDENBACH, R. W. 1974. Proteins of soybean seeds. I. Isolation and characterization of the major components. *Plant. Phys.* - 53:742-746.
14. KABAT, E. Inmunología experimental. 2ª Ed. Prensa Médica Mexicana. - 1964. P. 18, 79.

15. KAMM, L. 1970. Immunochemical quantitation of soybean protein in - raw and cooked meat products. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 53(6):1248-1254.
16. KOTDLA, A.W. y ROUGH, D.K. 1977. Influence of added soy protein on - electrophoretic patterns of the water soluble proteins of cooked beef patties. *J. Food Sci.* 42(3):731-734.
17. KOSHIYAMA, I. 1972. Purification and physicochemical properties of 11 S globulin in soybean seeds. *Intern. J. Peptide. Prot. Res.* 4:167-176.
18. LEE, Y.B. , RICKANSRUDE, E.C. y BRISKEY, E. 1975. Quantitative deter - mination of soybeans proteins in fresh and cooked meat soy blends *J. food Sci.* 40:380-383.
19. LEINER, I. 1977. Nutritional aspects of soy protein products. *J. Am - Oil Chem. Soc.* 54(6):454-472A.
20. MANCINI, G. CARBONARA, A. y HEREMANS, J.F. 1965. Immunochemical quanti - tation of antigens by single radial immunodiffusion. *Immunochemis - try.* 2: 235-254.
21. MARGNI, R. *Inmunología e Inmunoquímica. Fundamentos.* 2º Ed. Ed. Médi - ca Panamericana Argentina. Buenos Aires, 1977.
22. MEGEN, W. 1974. Solubility behavior of soybean globulins as a func - tion of pH and ionic strength. *J. Agr. Food Chem.* 22(1):126-129.
23. MINISTERIO DE AGRICULTURA. 1973. *La soja.* Dir. Gral. Prod. Agraria. 2º - ed. Madrid, España.
24. NORMA OFICIAL MEXICANA. NOM. F. 323, 1978. Determinación de fécula por hidrólisis ácida de almidón en embutidos. Dirección Gral de Normas Sría. de Industria y Comercio. Tecamachalco, México.
25. NORMA OFICIAL MEXICANA. NOM. F. 312, 1978. Determinación de reductores directos y totales en alimentos. Dir. Gral. de Normas. Sría de Ind. y - Com. Tecamachalco, México.
26. NORMA OFICIAL MEXICANA para salchicha estilo Viena enlatada, NOM. F. 65-1964. Dir. Gral. de Normas. Sría. de Ind. y Com. Tecamachalco, México.
27. DUCHTERLONY, O. 1968. *Handbook of immunodiffusion and immunoelectro - phoresis.* Arbor Sci. Publ. U.S.A.
28. PASTELIN, R. y RUIZ, R.E. 1978. Determinación por métodos inmunológi - cos de derivados de soya en productos cárnicos. Tesis Fac. de Quí - mica, UNAM. p.40
29. RACKIS, J.J. 1977. Soyproteins, uses, problems and potential. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 54(2):292-294A.

30. RAKOSKY, J. 1970. Soy products for the meat industry. *J. Agr. Food Chem.* 18(6): 1005-1008.
31. SAID, K. TERASHIMA, M. y WATANABE, T. 1975. Food use of soybean 7 S- and 11 S proteins. Changes in basic groups of soybean proteins by high temperature heating. *J. Food Sci.* 40: 541-544.
32. SANZ, C. 1967. Enciclopedia de la carne. Espasa-Calve, España. p.627-628.
33. SHEN, J. 1976. Solubility profile, intrinsic viscosity and optical rotation studies of acid precipitated soy proteins and commercial soy isolate. *J. Agr. Food Chem.* 24(4): 784-787.
34. SISTEMA ALIMENTARIO MEXICANO. 1981. Informe de resultados de la producción agrícola, ganadera y forestal. SARH.
35. SOFOS, J. y ALLEN, E. Effects of lean meat source and levels of fat and soy proteins on the properties of wiener type products. *J. Food Sci.* 42(4): 875-878.
36. STOUGHTON, T.C. 1979. The soybean answer to food costs. *Dimensions in Health Service.* 53(1): 29-31.
37. TIETZ, A. 1972. Química Clínica Moderna. 10 ed. Ed. Interamericana - México.
38. THANH, U. y SHIBASAKY, K. 1976. Major proteins of soybean seeds. A straightforward fractionation and characterization. *J. Agr. Food Chem.* 24(6): 1117-1121.
39. TOCAGNI, H. 1980. La soja. Ed. Albátros, Buenos Aires, Argentina. p.8-17.
40. WHITAKER, J. y BERNAHARD, D.R. 1972. Experiments for an introduction to enzymology. The ehiber Press, Davis. p.41-43.
41. WILLIAMS, C. 1975. Quality characteristics of soy substituted ground beef, pork and turkey meat loaves. *J. Food Sci.* 40: 502-505.
42. WOLF, W. y BRIGGS, D.R. 1959. Purification and characterization of the 11 S component of soybean proteins. *Arch. Biochem. Biophys.* 85: 186-189.
43. WOLF, W.J. 1970. Soybean proteins: Their functional, chemical and physical properties. *J. Agr. Food Chem.* 18(6): 999-1004.
44. WOLF, W.J. 1970. Scanning electron microscopy of soybean protein bodies. *J. Am Oil Chem Soc.* 47: 107-109.