

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE QUIMICA



DETERMINACION POR METODOS INMUNOLOGICOS DE
DERIVADOS DE SOYA EN PRODUCTOS CARNICOS

RODOLFO PASTELIN PALACIOS

ROSA ELIZA RUIZ CARDENAS

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

1 9 7 8



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.

CLAS. TESIS
ADQ. H.T. - ~~308~~ 327
FECHA _____
PROC. ~~1774~~



JURADO ASIGNADO ORIGINALMENTE:

PRESIDENTE:

Q.F.B. NINFA GUERRERO DE C.

VOCAL:

Q.F.B. MAGDALENA ACOSTA A.

SECRETARIO:

Q.F.B. MA. LUISA GARCIA P.

1er. SUPLENTE:

Q.F.B. IRMA VILLA N.

2do. SUPLENTE:

M.V.Z. RICARDO BERNAL C.

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA: FACULTAD DE QUIMICA

NOMBRE Y FIRMA DE LOS SUSTENTANTES: _____

RODOLFO PASTELIN PALACIOS

ROSA ELISA RUIZ CARDENAS

NOMBRE DEL ASESOR DEL TEMA: _____

Q.F.B. MAGDALENA ACOSTA S.

Y sucedió que a la tarde subieron codornices que cubrieron el campamento y a la mañana había en torno al campamento una capa de rocío. Cuando el rocío se evaporó, vieron - sobre la superficie del desierto una cosa menuda, como -- granos, parecía a la escarcha. Los hijos de Israel al ver la, se preguntaron unos a otros ¿Manhu? (¿Que es?), pues no sabían lo que era. Moisés les dijo: Ese es el pan que os da Yavé para alimento.

A nuestros padres

Demetrio Ruiz Ramírez
Teresa Cárdenas de Ruiz

Rodolfo Pastelin Cid
Isabel Palacios de Pastelin

Con todo nuestro amor y respeto por el cariño,
apoyo y comprensión inapreciables brindados
durante nuestra existencia.

A nuestros hermanos

Patricia Ivonne
Claudia Teresita
Octavio
Jorge .

Francisco Javier
Lucia Alma
Martha Eugenia
Julio Cesar .

Por el cariño y apoyo que nos ha unido a través
de los años de convivencia y con nuestro pro-
fundo deseo de superación.

A nuestros adorables sobrinos

Ivan Rodrigo
Claudia Vanessa

Con cariño y respeto a nuestros abuelos

Elisa Martínez de Vargas
Pedro Vargas Salas

Lucia Lomé Vda. de Palacios
Carmen Cid Vda. de Pastelin

Al Sr. Pablo I. Palacios Lome

Por su invaluable apoyo

A todos nuestros familiares.

Con infinito cariño y agradecimiento por su apoyo desinteresado
en todo momento a la maestra

Q.F.B. Magdalena Acosta Segura

A los Sres. profesores

Dra. Ma. del Consuelo Hidalgo y Mondragon

Q.F.B. Ma. Luisa García Padilla

Q.F.B. Mercedes Iruete Alejandre

Q.F.B. Olga Velázquez Madrazo

Q.F.B. Elva Peniche Quintana

Q.F.B. Leonor Martínez

Q.F.B. Jorge Vázquez Ramos

Q.F.B. Javier Lumbreras Guerrero.

Por su ayuda y apoyo en nuestra preparación.

A todos nuestros maestros.

A todos nuestros amigos y compañeros

Al Servicio Social de las áreas de Microbiología y Farmacia

A nuestra Facultad.

Indice.

	Pag.
I Introducción	1
II Generalidades	3
A.- Constitución Botánica	3
B.- Composición Botánica	3
C.- Aspectos Nutricionales	4
D.- Clasificación de las Proteínas	6
E.- Solubilidad de las Proteínas	7
F.- Composición Química de las Proteínas	8
G.- Distribución del tamaño Molecular	9
H.- Comportamiento Electroforético en Gel	12
I.- Reacciones de Disociación-Asociación	12
J.- Efectos del Calor	15
K.- Estudios de Desnaturalización	16
III Derivados de Soya en Productos Cárnicos	19
A.- Hojuelas Desengrasadas de Soya	19
B.- Harina y Sémola de Soya	20
C.- Concentrados de Proteína de Soya	22
D.- Aislados de Proteína de Soya	24
E.- Fibras Texturizadas	26
F.- Hidrolizados de Proteína Vegetal	29

	Pag.
IV Métodos Utilizados en la Identificación y Cuantificación de Proteínas de Soya	30
V Materiales y Métodos	33
VI Resultados y Discusión	39
VII Resumen	45
VIII Conclusiones	46

Anexos

I Preparación del Extracto de Proteínas de Soya	47
II Determinación de Proteínas por el Método de Biuret	50
III Obtención del Suero Antiproteínas de Soya	53
IV Doble Difusión en Agar. Técnica de Ouchterlony	56
V Contrainmunolectroforesis	58
VI Preparación del Extracto de Proteínas de Soya a Partir de Embutidos Comerciales	63
VII Inmuno-difusión Radial en Gel de Agar	64
IX Bibliografía	67

I INTRODUCCION

En el este de Asia la soya, por centurias, ha sido una parte muy importante de la dieta humana, en el mundo occidental los usos alimenticios de la soya han seguido un patrón diferente a los de oriente y se han incrementado a partir de los años '20s, en los que se empezó a utilizar para la producción de aceite, empleándolo en la manufactura de productos tales como margari-nas, mantecas, mayonesas, etc. El material desengrasado (subproducto),- se utilizó en un principio, como pienso para aves de corral y ganado, con lo que se redujo el costo de la producción del aceite.

Solamente en los últimos años, en países como EE. UU. se ha incrementa-do la cosecha de soya y desde hace aproximadamente quince años se han - empezado a elaborar productos alimenticios, que han tenido que sobreponer-se a problemas tales como: prejuicios en contra de productos no tradiciona-les, el sabor remanente a frijol, estabilidad de los productos y trastornos- fisiológicos causados por el consumo de éstos, Sin embargo, la mayoría - de estos obstáculos han sido librados por el avance en los procesos moder-nos de tecnología. Actualmente, existe en la mayoría de los mercados de-occidente un gran número de productos de soya.

Cuando se inició el uso de los derivados de soya en la industria de carnes procesadas, el abuso de muchos industriales causó una reacción indebida-en el consumidor, por lo que se establecieron en EE. UU. leyes de regula-ción, restricción o prohibición para el uso de proteínas de soya en carnes

procesadas.(5)

Esto mismo ha sucedido en México, y actualmente no se ha logrado tener -- una reglamentación adecuada para evitar el abuso en el empleo de los derivados de soya en productos cárnicos.

Esta investigación tiene como objeto principal llamar la atención de las -- autoridades para que promuevan el desarrollo de una legislación adecuada, que regule el uso de los derivados de soya en la industria de alimentos. -- Actualmente es difícil establecer dicha legislación, ya que no se han encontrado métodos analíticos que reúnan las características de: ser cuantitativo, reproducible, confiable y sencillo. Pensamos que este trabajo puede ser el inicio de una serie de investigaciones tendientes a crear dichos métodos analíticos.

Para un futuro próximo, creemos, que se continuará con el uso de la soya -- en los productos ya establecidos, debido a sus propiedades fisicoquímicas, las cuales, son de gran utilidad en los productos de carne procesada y para un futuro lejano parece ser que la soya representará uno de los pocos recursos disponibles, consistente y abundante de proteínas vegetales de alto valor nutritivo para propósitos de alimentación humana, debido a la creciente demanda de la proteína animal cada día mas escasa cuyo precio será también cada vez mayor.

II GENERALIDADES

A.- Clasificación botánica .- La soya (Glycine max) pertenece a la familia de las leguminosas, es una hierba anual que se cultiva en Manchuria China, Japón, India y en algunas partes de América y Europa.

Sus semillas son ovoideas, redondeadas y miden de 6 a 11 mm de largo, 5 a 8 mm de ancho y de 4 a 7 mm de grueso, 100 semillas pesan de 14.5 a 33.0 gf; son de color amarillo pálido o color ante, aunque hay variedades pardas y negras. La testa es tenaz y algo translúcida y en el centro de uno de los bordes más largos de la semilla está el hilio, de 3 a 4 mm de largo, con el micrópilo en un extremo y un pequeño estrófilo en el otro. El embrión llena por completo la semilla y está constituido por dos grandes cotiledones plano-convexos con una pequeña radícula hipocótila y la plúmula. Las reservas alimenticias de la semilla están almacenadas en los cotiledones, cuyo interior está formado con células elongadas que forman una empalizada, que contiene aceite y proteínas. La mayor parte de las proteínas está almacenada en cuerpos proteicos cuyos diámetros varían entre 2 a 20 μm . El aceite está localizado en pequeñas estructuras denominadas esferosomas y sus diámetros oscilan entre 0.2 a 0.5 μm . Estas estructuras se encuentran esparcidas entre los cuerpos proteicos.

B.- Composición bromatológica .- El frijol de soya posee el mayor contenido proteico entre los vegetales, alrededor del 40 %, en base seca. Contiene un alto porcentaje de lípidos (20 %), encontrándose preponderantemente

te ácido linolénico, linoléico y oléico.

Posee poco almidón (carbohidratos) y entre los azúcares encontrados están la sacarosa, galactosa, pentosas, rafinosa y otros; la rafinosa no es digerible en el conducto intestinal y ocasiona problemas de digestión al ingerir soya.

Posee buena cantidad de fósforo, fierro, magnesio y calcio, entre los minerales más importantes.

Entre las vitaminas encontradas se tienen las del complejo B, E y K.

Se ha demostrado que la soya tratada térmicamente es mejor por que así se destruyen factores antinutricionales presentes en ella, aunque un sobrecalentamiento ocasiona pérdida de aminoácidos, disminuyendo su valor proteico. Los aminoácidos azufrados son limitantes en la soya, incrementándose aún más esta limitación con la temperatura necesaria para la destrucción de los factores antinutricionales.

Una de las mayores objeciones a la aceptación de la soya es su acendrado sabor a frijol, producido por una gran cantidad de compuestos volátiles y no volátiles, como compuestos carbonílicos, ésteres, ácidos carboxílicos, ácidos fenólicos, algunas aminas y alcoholes, siendo responsable de la producción de estos compuestos químicos la enzima lipoxigenasa.

C.- Aspectos nutricionales.- La gran importancia de la proteína de soya en nutrición depende de su alto contenido de aminoácidos esenciales, par

ticularmente lisina, leucina e isoleucina. La tabla 1 compara los niveles de aminoácidos esenciales en las proteínas de harina desengrasada de soya, harina de trigo, proteína de huevo y proteína de Aspergillus niger. Se observa una superioridad en la proteína de soya en los aminoácidos esenciales antes citados y una inferioridad en el contenido de aminoácidos -- sulfurados (cisteína y metionina), siendo más escaso el aminoácido metionina.

Tabla 1. mg de aminoácido por gramo de material

AMINOACIDO	Harina de soya desengrasada	Harina de trigo	A. niger	Proteína de huevo
Isoleucina	119	116	106	129
Leucina	181	195	172	172
Lisina	161	82	118	125
Fenilalanina	117	140	154	114
Tirosina	91	97	88	81
Total de aa. aromáticos	208	237	242	195
Cistina	37	64	16	86
Metionina	37	49	64	61
Total de aa. azufrados	74	113	80	107
Treonina	101	88	96	99
Triptofano	30	40	--	31
Valina	126	131	184	41

La harina de soya sin desengrasar también ofrece una contribución al val-

lor nutritivo por su alta proporción de ácidos grasos esenciales, pues posee un 51 % de ácido linoléico y un 9 % de ácido linolénico.

La soya contiene inhibidores de tripsina, hemaglutininas, saponinas e isoflavonas. El 90 % de las proteínas de soya son globulinas comprendidas en cuatro fracciones: 2S, 7S, 11S y 15S. Los inhibidores de la tripsina se encuentran en la fracción 2S, con peso molecular de 8000 a 21000. Uno de ellos tiene 194 aminoácidos con ácido aspártico en el grupo amino terminal y leucina en el carboxilo terminal. La ingestión del inhibidor desactiva el sistema enzimático al que pertenece la tripsina, y por tanto, su prime el crecimiento a la vez que estimula al páncreas y crea una hipertrofia pancreática, equivalente a una pérdida excesiva de aminoácidos por excreción de enzimas en heces, explicándose así la supresión del crecimiento, este inhibidor se inactiva por calor.

Las hemaglutininas se encuentran en la fracción 7S con un peso molecular de 111 000, son de tipo albuminoideo. Producen aglutinación en los glóbulos rojos, aunque no se ha comprobado en los hombres este efecto. También se inactivan por calor y por la pepsina presente en el estómago.

Las saponinas pasan a través del estómago a intestino delgado y en realidad no causan ningún problema al hombre.

De las isoflavonas no se tienen muchos conocimientos.

D.- Clasificación de las proteínas.- La soya no contiene ninguna proteí

na soluble al alcohol similar a la gliadina, que junto con la glutenina son las únicas protefnas en el gluten del trigo. Consecuentemente, las protefnas de soya carecen de propiedades para formar amasijo como el que produce el gluten. Los productos adicionados con harina de soya, tienen el gluten y el almidón diluido por lo que los derivados de soya no pueden ser usados simplemente para reemplazar la harina de trigo en productos para hornear.

La mayoría de las protefnas de soya son clasificadas como globulinas, insolubles en agua en sus puntos isoeléctricos; pero solubles en soluciones salinas diluidas o en agua a pH por encima y debajo de sus puntos isoeléctricos. La alta extractibilidad por el agua de las protefnas de la harina desengrasada, indica que la membrana fosfolípida que engloba o envuelve a los cuerpos proteicos es fácil de modificar.

E.- Solubilidad de las protefnas.- La dependencia de la solubilidad de las protefnas al pH, se observa claramente en la fig. 1 en donde el alimento desengrasado es suspendido en agua destilada a pH de 6.5, en el que se obtiene el máximo de solubilidad proteica. Al aumentar el pH con álcalis, aumenta ligeramente la solubilidad y disminuye abruptamente cuando se acidifica el medio a un pH de 4.5, que corresponde a la región isoeléctrica, A valores inferiores del rango anterior, las protefnas se cargan positivamente y se rehidratan.

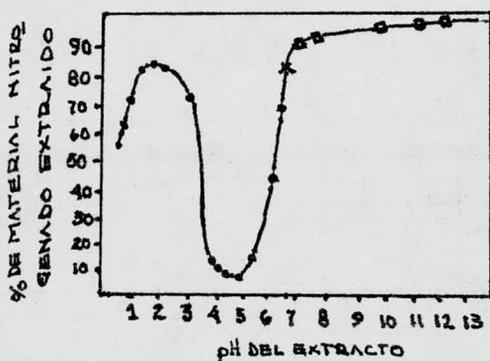


Figura 1 Extractibilidad de las proteínas como una función del pH (Smith y Circle, 1938)

La curva de solubilidad en la fig. 1, es típica de una harina que ha recibido un mínimo de tratamiento térmico durante la extracción del aceite. Las proteínas de soja son sensibles al calor húmedo y son rápidamente insolubilizadas por tratamiento con vapor. Estas propiedades de solubilidad -- son factores importantes que gobiernan las aplicaciones alimenticias de las proteínas y son frecuentemente usadas como una prueba de control de calidad.

F.- Composición química de las proteínas de soja.- Esta composición es muy importante debido a su relación con la nutrición y a las reacciones de las proteínas durante su procesamiento. Es conocido que la solubilidad de los aislados de proteína de soja se altera cuando se forman las uniones intermoleculares disulfuro por los residuos de cistina entre las -- proteínas principales. La composición de los aminoácidos esenciales en

los tres derivados principales de soya están enlistados en la tabla 2. Las diferencias son causadas por el fraccionamiento durante el procesamiento.

Tabla 2. Contenido de aminoácidos esenciales de varios derivados de soya.

Aminoácido esencial	Contenido de aminoácidos (g/16 g de nitrógeno)		
	Harina ^a	concentrado ^b	Aislado ^a
Lisina	6.9	6.6	5.7
Metionina	1.6	1.3	1.3
Cistina	1.6	1.6	1.0
Triptofano	1.3	1.4	1.0
Treonina	4.3	4.3	3.8
Ísolucina	5.1	4.9	5.0
Leucina	7.7	8.0	7.9
Fenilalanina	5.0	5.3	5.9
Valina	5.4	5.0	5.2

(a) Rackis (1961)

(b) Meyer (1967)

Las proteínas de soya son una buena fuente de todos los aminoácidos esenciales, a excepción de la metionina. El alto contenido de lisina hace de las proteínas de soya un complemento muy usado en las proteínas de cereales, que son deficientes en este aminoácido. Una mezcla de concentrado de proteína de soya y harina de trigo es nutricionalmente superior que de cada una de las fuentes de proteínas por separado; una proporción de proteínas de 3:1 soya- trigo, da una relación de eficiencia proteica óptima.

G.- Distribución del tamaño molecular.- Las proteínas de soya representan una mezcla, que difieren en tamaño, carga y estructura. Las diferencias en tamaño son apreciadas mejor en la ultracentrifugación (fig. 2) o -

en la filtración en gel. De la separación por ultracentrifugación de las proteínas extraídas con agua, de una muestra de harina desengrasada, se obtienen cuatro fracciones con coeficientes de sedimentación aproximados de 2, 7, 11, 15S. Las cantidades relativas y los pesos moleculares de estas cuatro fracciones están dadas en la tabla 3. Se observa que cerca de un 80 % de las proteínas tienen pesos moleculares de 100 000 ó más altos.

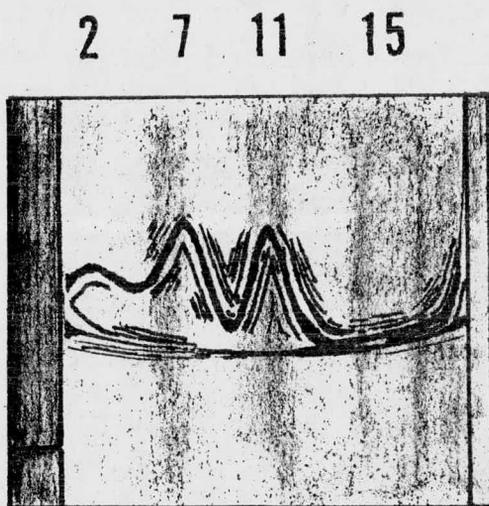


Figura 2. Patrón de ultracentrifugación de las proteínas de soya extraídas con agua; los números son los coeficientes de sedimentación en unidades -- Sverberg. (Wolf, 1970)

Tabla 3. Fracciones de proteínas de soya ultracentrifugadas.

Fracción proteica	% del total	Componentes	Peso molecular	Referencias
2S	22	Inhibidores de tripsina	8 000	Millar, 1969
		Citocromo C	21 000	W.B. y Scharaga 1962
		Globulina-2,35 S	12 000	Friedman, 1968
		Globulina-2,85 S	18 200	1969
		Alantoinasa	32 000	Vaintraub y Shutov, Vaintraub y Shutoy 1969
7S	37	α -amilasa	50 000	Yuan, 1967
		Hemaglutininas	61 700	Gertler y Birk, 1965
		Lipoxigenasas	110 000	Lis, 1966
		Globulina 7S	108 000	Stevens, 1970
11S	31	Globulina 11S	186-210 x 10 ³	Koshiyama, 1968
15S	11	----- + de	350 000	Wolf y Briggs, 1969
			500 000	-----

Las fracciones 2S contienen varios inhibidores de tripsina, citocromo C, alantoinasa y dos globulinas con actividad biológica desconocida.

La fracción 7S es más de la tercera parte de la proteína total pero solo contiene cuatro diferentes proteínas: α -amilasa, hemaglutininas, lipoxigenasas y globulina 7S. Existen formas múltiples de hemaglutininas y lipoxigenasas. La actividad de la globulina 7S es desconocida.

Otra tercera parte del total de las proteínas la forma la globulina 11S, también llamada Glicinina.

La fracción 15S no ha sido aislada ni caracterizada, pero basándose en su

coeficiente de sedimentación es una molécula con peso molecular de medio millón o más.

H.- Comportamiento electroforético en gel.- Bajo ciertas condiciones, la electroferesis en gel confirma la complejidad de la mezcla que forman las proteínas de soya. Por ejemplo, la electroferesis en gel de almidón de las proteínas precipitadas por ácido, en urea 5 mol/l con amortiguador alcalino, revela catorce bandas de proteínas, siendo así que en condiciones de precipitación alcalina revela quince bandas, la globulina 11S muestra dieciocho bandas en geles alcalinos y diez en geles ácidos. Estos estudios también indican que algunos de los componentes de las globulinas emigran fácilmente al cátodo a pH de 8.7. La electroforesis en gel de agar de las proteínas extraídas con agua sin urea, dan una mancha continua de componentes, pero cuando estas proteínas son difundidas nuevamente en combinación con sus anticuerpos, un mínimo de dos precipitan formando arcos. El gran número de bandas de proteínas encontradas con geles que contienen urea pueden ser descritas como fracciones de las grandes unidades denominadas subunidades.

I.- Reacciones de Disociación-Asociación.- Una propiedad característica de las globulinas 7S y 11S es su habilidad para sufrir reacciones de disociación y asociación rápidas y reversibles bajo cambios moderados en el medio iónico. Por ejemplo, la globulina 7S a pH de 7.6 y con una fuerza iónica de 0.5, se presenta como un monómero con peso molecular de 180 000 a 210 000, pero en una fuerza iónica de 0.1, tienen un peso molecular de - -

370 000 que es el resultado de una dimerización. Igualmente, la globulina-11S desarrolla una forma rápida de sedimentación cuando la fuerza iónica -- baja de 0.5 a 0.1, pero el grado de asociación es bajo.

- 1) Estructura de las subunidades.- Las globulinas 7S y 11S poseen una forma adicional que aumenta su complejidad y corresponden a las interacciones entre las subunidades, las cuales -- aparecen como subunidades no comunes a las proteínas.

La globulina 11S tiene una estructura cuaternaria formada por doce subunidades, que presentan los siguientes residuos terminales: glicinas, 2 fenilalaninas y cada una con dos leucinas o dos isoleucinas.

Por arriba de su punto isoeléctrico, en urea-mercaptoetanol, se separan sus subunidades. Estos resultados sugieren que la molécula 11S es un dímero -- formado por dos monómeros idénticos, cada uno consistente de seis subunidades (Catsimpoolas, 1969. Un resultado sorprendente es que, tres de estas subunidades son ácidas con puntos isoeléctricos a pH de 4.75, 5.15 y -- 5.40, y tres son básicas con puntos isoeléctricos a pH de 8.0, 8.25 y 8.50. Las subunidades básicas y ácidas tienen pesos moleculares de 22 300 y -- 37 200 respectivamente. Las interacciones entre ambos tipos de subunidades ayudan a la estabilidad de la molécula 11S.

La estructura cuaternaria de la molécula 11S se destruye por una variedad de condiciones que incluyen la fuerza iónica, pH altos o bajos, alta concentración de urea, los detergentes y las temperaturas cercanas a 80°C.

La globulina 7S contiene nueve residuos de aminoácidos terminales y presumiblemente, nueve subunidades de cadenas polipeptídicas simples. Ha sido aislada una glicoproteína simple, que contiene los mismos azúcares que se encontraron en la molécula intacta 7S (38 residuos de manosa y 12 de glucosamina). Consecuentemente, los carbohidratos parecen ser una unidad de polisacárido simple, unido a una de las subunidades proteicas.

La estructura 7S es destruida por los reactivos usuales capaces de disociar las proteínas en subunidades. En urea 8 mol/l o en clorhidrato de guanidina 4 mol/l, el peso molecular decae de 188 000 de la forma nativa a 22 500 a 24 000 ó a cerca de una novena parte del tamaño original. En solución de dodecil sulfato de sodio, el peso molecular de la globulina 7S es de 34 000. La adición de cerca de 40 moléculas de detergente por subunidad, puede influir en la discrepancia de pesos moleculares bajo las diferentes condiciones de la disociación proteica.

En solución de hidróxido de sodio 0.01 mol/l, la globulina 7S se disocia en una unidad de coeficiente de sedimentación de 0.45S. En soluciones ácidas y en concentraciones bajas de sal, se forman dos especies sedimentables con coeficientes de 2S y 5S. Las sales inhiben la conversión de la globulina 7S en las formas 2S y 5S, pero se puede restablecer nuevamente por diálisis de las proteínas a pH de 7.6 y una fuerza iónica de 0.5. La globulina 7S es menos sensible a cambios irreversibles en estructura que la globulina 11S pero la razón de esta diferencia es desconocida.

El hilado de los aislados de proteínas en fibras para el uso en los análogos de carne, es un ejemplo de un sistema alimenticio en el que las estructuras cuaternarias de las globulinas 7S y 11S se destruyen. La formación de subunidades se presenta, cuando el aislado de proteínas se disuelve en alcalis para preparar el hilado semifluido.

J.- Efectos del calor.- Los alimentos son siempre y universalmente calentados durante el proceso o en la preparación de la comida. Consecuentemente, las proteínas de soya usadas como ingredientes alimenticios están expuestas a varias degradaciones por el tratamiento térmico. Se conoce muy poco acerca de los cambios físicos y químicos que toman lugar a nivel molecular cuando las proteínas son calentadas, pero el cambio más apreciable es la pérdida de solubilidad. Por ejemplo, como se muestra en la fig. 3, si las hojuelas desengrasadas y sin desengrasar son sometidas a un tratamiento con vapor a presión atmosférica, la extracción de proteínas decrece de un valor inicial de 80% a cerca de un 20% en 10 min., ni la presencia ni la ausencia de la grasa afecta la insolubilización de las proteínas. La mayoría de las harinas de soya comerciales son sometidas a tratamientos con vapor, colocándolas en la parte baja de la curva de solubilidad (fig.3). -- Las hojuelas o harinas usadas para aislados o como fuente de enzimas para el blanqueo de los pigmentos de la harina de trigo reciben un mínimo de tratamiento térmico y, por tanto tienen solubilidades correspondientes a la parte alta de la curva.

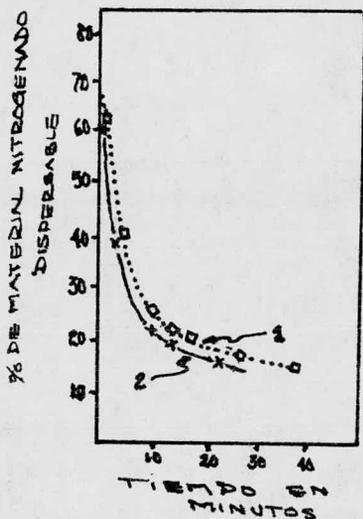


Figura 3. Efecto del tiempo de exposición al vapor a presión atmosférica sobre dispersiones acuosas de los constituyentes nitrogenados de (1) hojuelas desengrasadas y (2) hojuelas sin desengrasar.

K.- Estudios de desnaturalización.- Las proteínas de soya son rápidamente insolubilizadas cuando la harina es tratada con vapor, las soluciones concentradas de proteínas forman geles cuando se calientan. El calentamiento de los aislados comerciales en concentraciones del 7 % incrementa la viscosidad y causa gelificación. Los geles se forman de 10 a 30 min. a temperaturas de 70 a 100°C.

La cisteína y el sulfato de sodio, agentes bloqueadores de la unión disulfuro, ayudan a que se solubilizan los aislados, abatiendo las viscosidades de dispersiones de aislados calentados y sin calentar e inhiben la gelificación. Las uniones disulfuro, aparentemente, contribuyen a la estructura --

del gel.

Los estudios de gelificación de las proteínas de soya proponen el siguiente esquema:



La dispersión de proteínas (sol) es convertida irreversiblemente en una progel, altamente viscosa, la cual por enfriamiento se vuelve más viscosa y gelifica. La transición progel-gel, sin embargo, parece reversible. Cuando el sistema proteico es calentado excesivamente (125°C), se forma un metasol que es incapaz de gelificar por enfriamiento. La ruptura de las uniones disulfuro, asimismo, produce un metasol.

La gelificación de las proteínas de soya en sistemas que contienen lípidos, muestra un procedimiento complejo. Aparentemente, las viscosidades de la progel y la gel son incrementadas cada una por la disminución de cadenas largas de ácidos grasos en la glicerina o por la disminución de la esterificación de los grupos hidroxilos en el glicerol.

Las viscosidades de las gels son más elevadas, cuando existen ácidos grasos saturados que cuando existen ácidos grasos insaturados.

La gelificación de las proteínas de soya es realizada con la adición de otros fosfatos o con colesterol.

Shibasaki empleo una serie de disolventes para solubilizar selectivamente -

las proteínas de soya desnaturalizadas por el calor. Los resultados para una harina desengrasada tratada con vapor por 3h se pueden observar en la tabla 4. El agua y el amortiguador disuelven proteínas pequeñas, como es típico para muchas proteínas desnaturalizadas. La adición de mercaptoetanol al amortiguador incrementa la solubilidad ligeramente, pero la combinación de amortiguador+mercaptoetanol+urea solubilizan tres cuartas partes de la proteína.

Sin embargo, a altas concentraciones de urea se rompen las uniones -- hidrógeno o hidrofóbicas, que parecen ser las responsables de la insolubilidad de las proteínas de soya en harinas calentadas.

III DERIVADOS DE SOYA EN PRODUCTOS CARNICOS.

A.- Hojuelas desengrasadas de soya.- La soya se trata con vapor para remover la cáscara, que contiene más del 85 % de carbohidratos (celulosa y otros polisacáridos) y se procede a una molienda de la cual se obtiene las "hojuelas" de soya, que son sometidas a la extracción del aceite con hexano, la torta de extracción contiene un 50 % ó más de proteínas y de ésta se preparan los principales derivados de soya.

Dependiendo del método usado para remover el disolvente y de la cantidad de humedad, se aplica un tratamiento térmico a las hojuelas desengrasadas, éste influye en la dispersabilidad de las proteínas en agua. Las hojuelas se pueden clasificar en tres amplias categorías en base a este tratamiento son: blancas, cocidas y tostadas.

Las blancas contienen lipoxigenasa, ureasa y factores antitripsicos activos, además, tiene un sabor a frijol amargo. El producto tostado es de color oscuro, la actividad enzimática y los factores antitripsicos se encuentran inactivados o destruidos, su sabor es parecido al de la nuez dulce. Las hojuelas cocidas tienen propiedades intermedias. La tabla 4 compara estas características.

Tabla 4. Características de hojuelas desengrasadas de soya.

Característica	Blanca	Cocida	Tostada
Tratamiento térmico	mínimo	intermedio	intenso
Dispersabilidad de las proteínas de agua	50-80 %	25-50 %	menos 25 %
Actividad enzimática	alta	moderada	nula
Actividad de inhibidores de tripsina	alta	moderada	nula
Sabor	amargo	intermedio	dulce

B.- Harina y sémola de soya.- La harina y la sémola de soya se obtienen de la trituración de las hojuelas desengrasadas y secas. El contenido de proteína y las demás propiedades de las hojuelas son las mismas que poseen la harina y la sémola. Se habla de harina o de sémola en base al tamaño de partícula; la harina se considera así cuando puede pasar a través de una malla de 100, la sémola es de un tamaño de partícula mayor y no puede pasar a través de esta malla.

La harina de soya ha sido usada como aditivo en productos embutidos y panes para hornear desde hace mucho tiempo, su uso se debe a las siguientes ventajas:

- a) el costo por kilograma es de \$ 3.14
- b) la harina de soya retiene el jugo de la carne y la grasa.

Las desventajas son:

- a) el sabor remanente de frijol
- b) la sensación física que deja en la boca.

Estas desventajas limitan su aplicación en productos cárnicos.

De los tres tipos de harina se prefiere la tostada o cocida, pues como se mencionó anteriormente, las blancas contienen enzimas y factores antinutricionales activos que causan problemas en el sistema cárnico a emulsionar. Esto se ha observado en embutidos con proceso de ahumado, donde la temperatura es insuficiente para destruir la actividad de estos factores.

En E. U., las harinas están permitidas solas o combinadas con otros aditivos autorizados en cantidades que no excedan del 3.5 %. En productos de chile, el límite es del 8.0 %. En albóndigas para spaghetti y biftec tipo Salisbury es del 12 %.

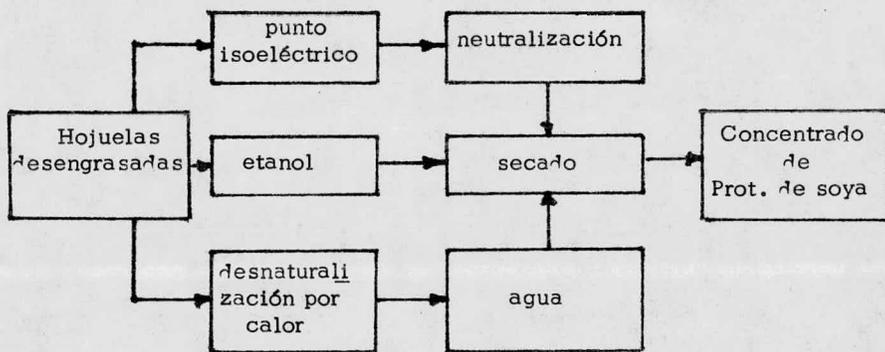
La sémola de soya es también usada en embutidos, pero está menos extendida que la anterior. Se prefiere el producto tostado a los otros dos tipos, por las mismas razones explicadas en el caso de la harina.

La sémola tiene una gran utilidad en productos con carne de un molido tosco, como hamburguesas, en los que se permite un 6 % de ésta. En plantas de inspección federal, el uso de la sémola se ha restringido a un 3.5 % en embutidos, a un 8 % en productos con chile y a un 12 % en albóndigas para espagueti y en biftec tipo Salisbury.

Las ventajas de la sémola son las mismas de la harina. Es de hacer notar que la sensación en la boca que producen los productos que contienen harina no es apreciada en productos similares que contienen sémola. La razón

de esta diferencia es desconocida.

C.- Concentrados de proteínas de soya. Existen tres métodos por los cuales se obtienen los concentrados de proteína de soya, los tres se basan en la inmovilización de las proteínas y es aquí donde se diferencian. Los métodos de inmovilización son: por calentamiento, punto isoelectrico y lavado con alcohol (fig. 4). Todos son ampliamente utilizados en la industria.



Las características impartidas por estos tres métodos se muestran en la tabla 5.

Tabla 5. Características comparativas de los concentrados de proteínas de soya obtenidos por los diferentes métodos industriales.

Características.	Extracto etílico	Punto isoelectrico	Desnaturalización por calor
Humedad	70 % mín.	70 % mín.	70 % mín.
Solubilidad de las proteínas de agua	5-10 %	25-35 %	menos del 5 %
Contenido de sodio	bajo	moderado	bajo
Factor flatulento	bajo	bajo	bajo
Color	moreno brillante	moreno	moreno obscuro
Sabor	muy suave	suave	parecido a nuez

Los concentrados de proteínas de soya tienen un contenido proteico, en base seca, del 70 % y se usa en productos de carne con un molido tosco.

Las ventajas de este producto son:

- a) tiene un sabor más suave que la sémola
- b) tiene un alto contenido de proteína
- c) puede ser hidratado en un alto grado. Si se usa poca agua para hidratar el producto, éste tendrá una apariencia seca. Normalmente los niveles de hidratación son de 1.0-2.5%. Una buena regla para la hidratación de productos de soya, es dejar el contenido de proteína a un 18 %.

La suplementación de la carne molida, en productos tipo croquetas se hace en un 20 % sin el ajuste de sabor pero es necesario añadir sasonadores para contrarrestar el efecto de dilución del sabor a carne. Obviamente, en aplicaciones de este tipo, el molido tosco del concentrado de proteínas de soya es más usado que el producto tipo harina. Para propósitos de clasificación, este tipo de productos es referido como Concentrado de Proteínas de Soya Granular (CPSG).

La ventaja de usar CPSG en productos tales como croquetas, es que el encogimiento, debido a pérdidas de humedad y de grasa durante la cocción, se reduce en un 10 % si se incorpora un 25 % de CPSG a los alimentos cárnicos. Además de esta estabilidad dimensional, se tiene un producto con mejor sabor y más jugoso.

Para obtener resultados óptimos en el uso del CPSG se recomienda un prerre

mojo del producto por un corto tiempo antes de ser incorporado a la carne. - Posteriormente, la mezcla puede ser remolida para obtener un tamaño de partícula más uniforme.

Los concentrados de proteínas molidos tipo harina son usados, principalmente, en sistemas cárnicos emulsionados de la misma manera que la harina de soya. Debido a su sabor suave y a su alto contenido de proteínas, es preferido sobre la harina en productos tipo salchicha.

En plantas de inspección federal de EE. UU., el concentrado de proteínas es autorizado sólo o combinado, al igual que para harina de soya, hasta un 3.5 % en embutidos un 8 % en productos conchile y un 12 % en albóndigas y en biftec Salisbury.

D.- Aislados de proteínas de soya (APS).- El aislado comestible de proteínas se prepara a partir de las extracciones acuosas o alcalinas de las hojuelas blancas. El líquido que contiene la proteína es separado del residuo de las hojuelas y la proteína es precipitada con un ácido de grado alimenticio. La cuajada resultante se lava, se seca por aspersion en su forma isoelectrica o bien, se puede neutralizar antes del secado para producir un proteínato de sodio dispersable en agua. En ambos casos el contenido de proteínas es de 90 % en base seca. El proteínato de sodio es la forma más empleada en la industria cárnica.

El APS tiene las propiedades de ser emulsificante, cementante, estabilizante de emulsiones, de incrementar la viscosidad y de formar geles por el calor, por lo que se usa en procesos de gelificación, en donde de un 12-17 %

se dispersa en agua y se calienta para formar la gel. También puede usarse ventajosamente en artículos de carne enlatada, debido a que no es afectado por las altas temperaturas del proceso. En esta aplicación, parece ejercer una acción protectora sobre las proteínas de carne en contra de los efectos del calentamiento, por lo que juega un importante papel en los artículos de carne procesada a altas temperaturas por corto tiempo.

Es posible hacer una dispersión de APS en agua para efectuar una retención de grasa por un englobamiento de ésta durante el calentamiento. Esto mismo sucede en embutidos fabricados con carne magra, en los cuales retiene la grasa cuando la emulsión es sometida a un tratamiento térmico.

Una emulsión perfecta se puede hacer con un 15 % de APS, 50 % de agua y 35 % de lardo, observándose que esta emulsión es extremadamente estable. Después del calentamiento, la emulsión, puede soportar las temperaturas de hervor, frito o enlatado comercial sin romperse. Esto no puede lograrse con ningún otro cementante, con la posible excepción del caseinato de alta viscosidad.

Sin embargo, esta propiedad cementante del APS no puede reemplazar a la miosina del músculo esquelético magro pues ésta tiene la función de impartir sabor a la carne.

El APS tiene gran utilidad en aquellos productos, tales como hogazas de carne, en los que no hay restricción en la adición de agua, para ser más específicos, el APS requiere una cantidad adicional de agua de 3 a 4 veces su

peso, aparte del agua del sistema en que esta funcionando. También puede ser empleado en carnes con pobre poder cementante, debido a situaciones de "stress"

En EE. UU. las reglamentaciones en el presente, restringen el uso de grasa a un 30 % y la adición de agua a un 10 %, por lo que ha cambiado el panorama en la utilización de proteínas de soya, pues solo se permite un 2 % en productos tales como salchichas tipo Frankford, bologna y productos similares.

En la tabla 6 se muestra un resumen de los productos básicos de soya usados en sistemas cárnicos. La adición de proteínas de soya ha sido clasificada en dos categorías: mayor (A) y menor (B). La categoría A significa que el producto es usado en niveles relativamente altos y la categoría B indica que el producto se usa en niveles bajos.

E.- Fibras texturizadas

a) Fibras hiladas.- Las proteínas hiladas se fabrican por un proceso similar al empleado, en un principio, para obtener aislado de proteína. El método varía únicamente en que después de producir la cuajada, ésta es "hilada", obteniéndose así fibras alargadas que tienen una resistencia semejante a la que presentan las fibras de la carne, con las cuales se pueden elaborar productos, tradicionalmente de carne, a un precio menor.

Su aplicación más importante es la imitación de productos de carne como tocino, y de otro artículo como tiras de coco y frutas secas.

Tabla 6. Productos de Proteínas de Soya básicos
usados en varios sistemas cárnicos.

Sistema	50 % de proteínas		70 % de proteínas en base seca		90 % de proteínas en base seca
	Harina	Sémola	Concentrado de prot. de soya		Aislado de proteínas.
			Tosco	Fino	
<u>Molido tosco</u>					
croquetas	B	A	A	B	B
albóndigas	B	A	A	B	B
hogazas de carne	B	A	A	B	B
carne con chile	B	A	A	B	B
tacos	A	A	A	B	B
biftec tipo Salibury	A	A	A	B	B
emulsiones	AB	A	A	A	A
<u>Emulsiones</u>					
salchichas	A			A	A
bologna	A			A	A
pasteles	A			A	A
enlatados	A			A	A
<u>Otros</u>					
Alimentos infantiles	A	A	A	A	A
sopas enlatadas	A	A	A	A	A
sopas secas					A
salsas y jugos de carne	A	A	A	A	A
alimentos adicionales	A	A	A	A	A

Dentro del campo cárnico, la imitación de tocino se hace por la disposición al azar de capas delgadas de fibras coloreadas, algunas para simular carne y otras para representar grasa y unidas por un cementante comestible, adicionadas de saborizante y grasa.

Estas imitaciones de productos cárnicos pueden soportar, sin alteraciones, los procesos de congelación, enlatado y secado.

b) Productos obtenidos por extrusión termoplástica.- A este grupo corresponden las proteínas de soya sometidas a un proceso de extrusión, que consiste en mezclar harina de soya, agua, saborizante y colorante, la mezcla homogeneizada se somete a un calentamiento a presión atmosférica o reducida para producir un producto compacto o expandido respectivamente (la forma expandida es la de mayor interés industrial). La forma y tamaño es determinado por el tamaño y forma de los troqueles, también, de la frecuencia con que el material extruido es cortado de los troqueles por la cortadora. Estos productos contienen una alta humedad, por lo que es necesario un secado para llegar a una humedad final de 6-8 %, con contenido de 50 a 53 % de proteínas, un 1 % de grasa un 3 % de fibra y de 5-6 % de cenizas.

El equipo usado en la manufactura de estos productos es similar al usado en los productos tipo resina termoplástica, o sea, cocido con extrusión continua.

Estos productos son usados como ingredientes en artículos de carne picada, carne con chile, salsa para spaghetti, hogazas de carne, biftec Salisbury y croquetas.

Las principales ventajas obtenidas del uso de este tipo de productos en artículos de carne son:

- a) su bajo costo (de \$5.40 a \$17.95/Kg de material extruído)
- b) buena estabilidad al almacenamiento.
- c) buena apariencia.

La desventaja observada es la dificultad en la imitación del color y del sabor de los productos naturales.

Con estos productos de fibras texturizadas se pueden manufacturar alimentos para dietas originadas por problemas religiosos o de salud, pudiéndose simular carne de res, puerco, jamón, tocino y de aves de corral.

F.- Hidrolizados de proteína vegetal.- Son usados en productos de carne procesada para intensificar el sabor a carne, cuando éste se pierde por los procesos de industrialización. Normalmente, son usados en concentraciones de 0.2-2 % en base al peso del producto terminado.

El hidrolizado de proteínas de soya (HPS) es de particular importancia en aquellos productos imitadores de carne, en los que contribuye con un sabor a carne.

En EE. UU. el HPS es usado en plantas de inspección federal y en las de -- más plantas, su reglamentación se efectúa en base a la siguiente norma: -- "en cantidad suficiente para el propósito".

IV Métodos Utilizados en la Identificación y Cuantificación de las Proteínas de Soya en Productos Cárnicos.

El creciente interés de los industriales de alimentos en el uso de los aditivos de soya en productos cárnicos ha producido un interés similar en los procedimientos analíticos para la determinación y cuantificación de estos materiales.

Uno de los principales problemas al que se enfrentan los analistas es la gran variedad de derivados de soya que se aplican a una gran gama de productos cárnicos.

A continuación presentamos los principales métodos desarrollados a nivel de investigación, a vistas de convertirse en métodos de rutina.

El Methods of Analysis (A.O.A.C.) en su 12a. edición enuncia un método tentativo para la determinación de harina de soya en carne, que consiste en la digestión de la muestra con potasa alcohólica, la centrifugación de la mezcla para obtener un residuo, que después de ser tratado con HCl es observado al microscopio con fuente de luz polarizada buscando células características en forma de I.

Como puede observarse, este método no resulta práctico debido a que sólo es aplicable a la harina de soya, no es cuantitativo y hay la necesidad de emplear un microscopio con fuente de luz polarizada.

Guy y colaboradores hicieron investigaciones empleando la técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida para determinar cuantitativamente los a-

Aditivos comerciales de soya en productos cárnicos.

La extracción de las proteínas de soya de los productos cárnicos la realizaron por dos métodos, en uno de ellos, la extracción de las proteínas se llevó a cabo con una solución de 8 mol/litro de urea, adicionada de un 1% de 2-mercaptoetanol que se dejó actuar durante 16 h a 18-20°C (método I). En el método II, la solución para la extracción consistió de 10 moles/litro de urea y adicionada de un 4% de 2-mercaptoetanol que se dejó actuar durante 30 min a 100°C.

Las proteínas de los extractos fueron separadas por electroforesis en gel de poliacrilamida al 6% y adicionada de una solución de 6 moles/litro de urea (método I) u 8 moles/litro de urea (método II), usando la solución amortiguadora de tris-glicina 0.06 moles/litro a pH 8.6. Después de realizada la electroforesis, procedieron al tinte de las bandas proteicas con Amidoschawartz 10B y las leyeron en un densitómetro. Los densitogramas se emplearon para la estimación cuantitativa. Ambos métodos dan resultados cuantitativos en hamburguesas y en embutidos, además el método I da magníficos resultados en pies de carne y en productos cárnicos enlatados, habiendo sido estos últimos sometidos a 115°C por 40 minutos.

Los productos cárnicos empleados en ese trabajo fueron preparados por los mismos investigadores (hamburguesas, embutidos, pies de carne y hogasas de carne) usando los aditivos comerciales: Promina D (aislado), Soyolk (harina) y TVP (proteína vegetal texturizada).

Otros intentos han sido realizados por Lee y colaboradores utilizando la técnica de electroforesis en gel de acrilamida-dodecilsulfato de sodio en columna, evaluado la posibilidad de cuantificar las proteínas de soya en varios productos cárnicos preparados por ellos mismos. Realizaron simultáneamente un estudio de la posible influencia de otros aditivos (leche en polvo, clara de huevo, caseína, proteínas de suero, harina de semilla de algodón y -- concentrados proteicos de semillas de algodón y cacahuete) por el procedimiento electroforético, dando como resultado un patrón propio para cada uno de los aditivos fácilmente identificables en los patrones de las combinaciones desarrolladas. Estas combinaciones consistían en mezclas de carne deshidratada en polvo y las proteínas vegetales cuyas relaciones eran en peso.

La técnica de electroforesis empleada es una ligera modificación de la descrita por Laemmli (1970). La solución de extracción en este método fue una solución amortiguadora a una concentración de 0.06 moles/litro de tris-HCl (pH 6.8) adicionada de un 3 % de SDS y un 1 % de 2-mercaptoetanol. La -- gel consistió en una solución de acrilamida al 10 %, 10 ml de la solución -- amortiguadora de tris HCl (1.5 moles/litro, pH 8.8) con un 4 % de SDS, 1-ml de persulfato de amonio (0.1mol/l), 11 ml de agua y 0.03 ml de TEMED - (N-N'-N'-N'-tetrametiletildiamina).

V Materiales y Métodos

Del capítulo anterior se desprende que en la actualidad no existe un método analítico confiable para determinar proteína de soya en alimentos y específicamente en productos de carne.

La soya posee un elevado porcentaje de proteínas capaces de provocar una respuesta inmune cuando son administradas a animales de laboratorio por vía parenteral. Basándose en esto, se preparó un suero anti proteínas de soya partiendo de un extracto elaborado con harina desengrasada de soya y solución salina isotónica, cuya concentración de proteínas fue determinada por el método de Biuret (0.13 g/100 ml, anexo II). Este extracto fue esterilizado por filtración y concentrado por liofilización (anexo I), cuya concentración de proteínas fue de 0.099 g/100 ml determinada por el método de Biuret.

Con el extracto de proteínas de soya, ajustado a una concentración de 2 g de proteínas por 100 ml, se inmunizaron tres conejos siguiendo el esquema de inmunización descrito en el anexo III. Al término de éste, se procedió a determinar la presencia de anticuerpos en el suero de los conejos por la técnica de doble difusión en agar (técnica de Ouchterlony, anexo IV). Una vez comprobada la existencia de anticuerpos contra las proteínas de soya en los sueros de los tres conejos, se aplicó un refuerzo con el objeto de evitar el descenso del título de anticuerpos, después de una semana de descanso se procedió a la sangría de cosecha mediante punción cardíaca, obteniendo 60 ml de sangre de cada conejo a los cuales se les denominó como A, B y C.

Con estos sueros se realizaron pruebas cruzadas con sueros de burro, equino, bovino y porcino y también se probaron los sueros antiespecie respectivos contra el extracto de proteínas de soya, en ambos casos las pruebas se hicieron por el método de doble difusión en agar, con el objeto de comprobar que no existen fracciones antigénicas comunes, evitando así posteriores resultados falsos positivos al probar extractos de proteínas de productos cárnicos.

Empleando también la técnica de Ouchterlony, pero utilizando pozos de 0.8 cm de diámetro, una distancia de separación entre los pozos de 1.5 cm y un tiempo de difusión de 80 h se investigó que alteraciones causa el calentamiento en el extracto de proteínas de soya a las condiciones térmicas en el proceso de cocimiento de los embutidos reportadas en la literatura ($85^{\circ}\text{C}/\text{h}$ /Kg), para lo cual el extracto de proteínas se calentó durante 5 h a 85°C tomando muestras cada hora. Los pozos de los antígenos fueron llenados con estas muestras, extracto fresco (recién preparado) y extracto liofilizado. Los resultados de esta investigación son los siguientes: en el extracto de proteínas de soya fresco (recién preparado) se observaron cinco bandas de inmunoprecipitación, en el extracto de soya liofilizado, seis bandas posiblemente la sexta banda se deba a un polímero proteico formado durante la liofilización y los extractos calentados 60, 120 180 min. tres bandas y en los extractos calentados 240 y 300 min. sólo una banda. Esta pérdida de inmunoprecipitados se debe a la insolubilización de las proteínas de soya por el tratamiento térmico.

A continuación, empleando la técnica de contrainmunolectroforesis (anexo-IV) se determinó el título de anticuerpos presentes en los sueros A, B y C, haciéndolos reaccionar con el extracto de proteínas de soya fresco, liofilizado y calentado a 85°C. durante 5 h. Paralelamente se probaron los mismos extractos proteicos con un suero antiproteínas de soya del Instituto Be-hring. Los extractos se diluyeron en incrementos de dos con solución amortiguadora de veronal-acetato (pH de 8.6, fuerza iónica de 0.01); con cada una de estas diluciones se llenaron los pozos de los antígenos y con cada uno de los sueros, los pozos de anticuerpos. Las placas se introducen en las cámaras de electroforesis y se aplica una corriente de 4.5 V/cm durante 45 min. En seguida se procedió a lavar las placas con SSI durante 48 h, -- con cambios frecuentes de ésta y después las bandas de inmunoprecipitado se tñieron con Rojo de Ponceau.

Una vez que se obtuvo el título de los sueros, se escogió el suero más potente y con él se realizaron las pruebas en las muestras de productos cárnicos (salchichas, jamones, pasteles de carne, pasteles mosaico de carne, mortadelas y patés) a los cuales se dividieron en tres categorías en base al tipo de empaquetadora de la que provenían.

1a. Categoría: Productos procedentes de empaquetadoras de prestigio reconocido.

2a. Categoría: Productos procedentes de empaquetadoras de prestigio medio.

3a. Categoría: Productos procedentes de empaquetadoras desconocidas.

Las muestras de estos productos se obtuvieron en mercados, supermercados y en las propias empaquetadoras, las cuales se clasificaron según la tabla 7.

Tabla 7. Clasificación de las Muestras

Clase	Tipo	Clave	Núm. total de muestras analizadas	Núm. muestras 1a.	Núm. muestras 2a.	Núm. muestras 3a.
Entero	jamón	J	13	5	4	4
Picado	pastel mosaico	PM	3	-	2	1
Molidos	Salchicha	S	12	3	5	4
	mortadela	M	6	3	3	-
	Pastel de carne	P	7	3	3	1
	paté	Pe	4	1	2	1

La preparación de los extractos se realizó pesando 20 g de la muestra, colocándolos en una probeta de 100 ml., agregando solución salina isotónica -- hasta el aforo y moliéndose en licuadora por 2 min, esta suspensión se refrigeró por toda la noche y antes de realizar la prueba se centrifugó a temperatura ambiente, desechándose el residuo y la evaluación de la cantidad de proteína de soya en estos extractos se efectuó por contranmuno-electroforesis, haciendo diluciones similares a las empleadas en la determinación del título de los sueros, es decir, en incrementos de dos.

Otra técnica empleada en la determinación del porcentaje de proteína de soya

en los embudidos fué la de Inmunodifusión Radial en gel de agar. Esta técnica tiene las ventajas de ser mucho más sensible que las dos anteriores (Ouchterlony y CIEF) y de no requerir de aparatos costosos como el de electroforesis, por lo que la determinación de proteínas de soya por esta técnica se hace accesible a cualquier laboratorio.

Para determinar las concentraciones óptimas tanto del anticuerpo en el gel de agar como del antígeno, se realizaron una serie de pruebas preliminares en las que se probaron diluciones de anticuerpo (1.6 %; 1.2 %; 0.8 %, 0.4%; 0.3 %, 0.2 %; 0.15 %; 0.1 %) y del antígeno (1:16; 1:32; 1:64), partiendo del extracto fresco de proteínas de soya.

La concentración óptima del anticuerpo que permitía observar los anillos de precipitación claramente, se empleó para preparar las placas de inmunodifusión radial según la técnica descrita en el anexo VII. Los primeros cuatro pozos se llenaron con las diluciones del antígeno (1:1; 1:2; 1:4; 1:8) y los ocho pozos restantes con los extractos proteicos de las muestras que dieron bandas de precipitación en las determinaciones por contrainmunolectroforesis (seis positivas y dos negativas)

Con los datos obtenidos de las diluciones del extracto de proteínas de soya se construyó una curva de referencia, colocando en las abscisas los valores en g de soya/100 ml que corresponden al extracto y en las ordenadas los valores del diámetro de los anillos de precipitación elevados al cuadrado. Los

datos de los diámetros de los anillos de precipitación de las muestras de --
productos cárnicos fueron también lavados al cuadrado para posteriormente
ser interpolados en la curva, obteniéndose así, la cantidad de proteínas de
soya presente.

VI Resultados y Discusión

Al término del esquema de inmunización se realizó la sangría de prueba y — mediante la técnica de Ouchterlony se demostró la presencia de anticuerpos en el suero de los conejos, ya que se obtuvieron dos bandas de inmunoprecipitado con cada suero.

Las pruebas cruzadas que se realizaron con los sueros antiespecie, sueros heterólogos y extracto de proteínas de soya dieron los siguientes resultados:

ANTIGENOS

Anticuerpo	Suero de burro	Suero bovino	Suero equino	Suero porcino	Ext. de soya
Antisuero de burro	+	-	+ —	-	-
Antisuero bovino	-	+	-	-	-
Antisuero equino	+ —	-	+	-	-
Antisuero porcino	-	-	-	+	-
Suero anti-proteínas de soya	-	-	-	-	+

En estos casos hubo identificación parcial.

Como se puede observar en la tabla unicamente hay reacción entre los sueros (Ag) y los antisueros correspondientes, a excepción de los sueros equino y burro que presentan identificación parcial. Con estos resultados se puede

asegurar que los datos obtenidos con las muestras de embutidos al hacerlos reaccionar con el suero antiproteínas de soja se debieron en todos los casos a estas proteínas y no a las carnes de que pudieran estar constituidos los productos.

Por la técnica de contrainmunolectroforesis se determinó el título de anticuerpos en los tres sueros (A, B y C) y en el suero antiproteínas de soja del Instituto Behring (Be), empleando como antígenos el extracto de soja liofilizado (hidratado con 3 ml el contenido de un frasco ampula), extracto de soja fresco y extracto calentado a 85°C/5h, dando los siguientes resultados:

Dilución	S U E R O S											
	Extracto de Soja liofilizado				Extracto de soja fresco				Extracto de soja calentado			
	A	B	C	Be	A	B	C	Be	A	B	C	Be
1:1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1:2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1:4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1:8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1:16	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1:32	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1:64	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1:128	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
1:256	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-
1:512	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-
1:1024	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
1:2048	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Se consideró como positivo la dilución del Ag que mostró una banda de inmunoprecipitación claramente definida.

Como se puede observar en la tabla, el suero con mayor potencia fue el B, - por lo que se decidió emplearlo en la determinación de proteínas de soya en productos cárnicos. Para esto, se utilizó la técnica de contraimmunoelectroforesis con un sistema de diluciones similar al empleado en la titulación de anticuerpos, es decir, en incrementos de dos del extracto de proteínas de los productos cárnicos; los resultados obtenidos se expresan en la siguiente tabla:

Producto	Clave	Total de muestras	Núm. de muestra positivas		
			1a. cat.	2a. cat.	3a. cat.
Jamón	J	13	0	0	0
Pastel mosaico	PM	3	0	0	0
Salchichas	S	12	1	3	2
Mortadela	M	6	0	0	0
Pastel de carne	P	7	0	0	0
Paté	Pe	4	0	0	0

De las 45 muestras analizadas, sólo seis dieron resultados positivos, correspondiendo todas a salchichas y sólo la muestra S-7 (1a. categoría) declaraba soya en su formulación.

La existencia de un alto porcentaje de resultados negativos puede deberse a la ausencia de harina de soya, o bien a que el suero inmune se preparó utilizando como antígeno el extracto de proteínas de soya sin tratamiento térmico, lo que hace necesario continuar este estudio empleando sueros obtenidos con el extracto sometido a diferentes temperaturas para asegurar así la presencia de anticuerpos frente a las fracciones termoestables del extrac

to de proteínas de soya (coctoprecipitinas).

Los resultados positivos obtenidos con las seis muestras de salchichas están enlistados en la tabla siguiente:

Dilución	g de soya por 100 ml	1a. Cat.				2a. Cat.		3a. Cat.	
		S-7	S-1	S-2	S-3	S-4	S-6		
1:1	0.07	+	+	+	+	+	+		
1:2	0.15	+	+	+	+	+	+		
1:4	0.31	+	+	+	+	+	+		
1:8	0.62	+	+	+	+	+	+		
1:16	1.25	-	+	+	+	+	+		
1:32	2.50	-	+	+	+	+	+		
1:64	5.00	-	+	-	+	+	+		
1:128	10.00	-	-	-	+	+	+		
1:256	20.00	-	-	-	-	+	-		
1:512	más de 20	-	-	-	-	+	-		
1:1024	más de 20	-	-	-	-	-	-		

Como se puede observar en la tabla los resultados semicuantitativos están basados en el título del suero B con el extracto de soya calentado a 85°C/5h, considerando a la última dilución en la que se obtuvo inmunoprecipitado (1:256) como la mayor concentración de soya (20 g/100 ml). La muestra S-4 sobrepasó el título del suero con el extracto calentado, debido a que -- contenía más de 20 % de soya en su formulación y sólo declaraba "fécula".

Una técnica más sensible que no requiere equipo de electroforesis pero que tarda más tiempo es la inmunodifusión radial. Los resultados de la serie -

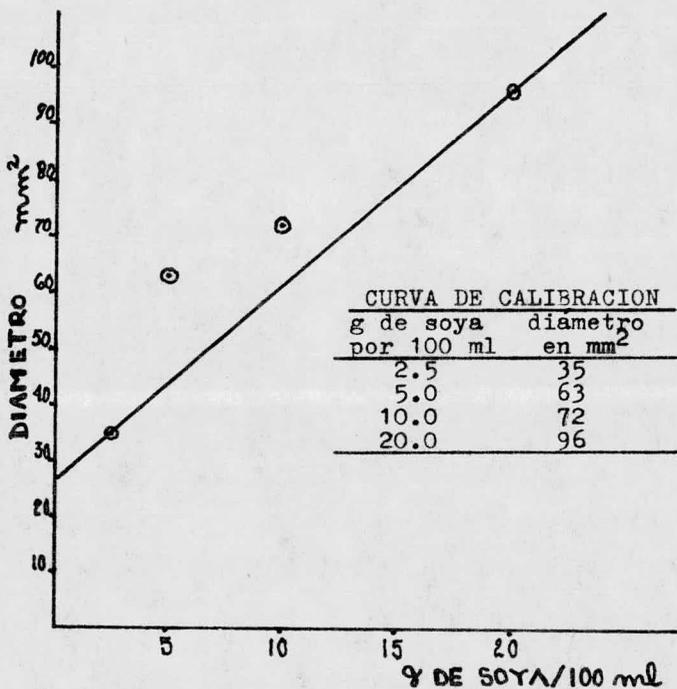
de pruebas preliminares que fueron realizadas para encontrar la dilución óptima del anticuerpo en la aplicación de esta técnica, se expresa en la siguiente tabla:

Conc. final del Ac. en el gel en PORCIENTO	Diluciones del antígeno		
	1:16 (diámetro en mm ²)	1:32 (diámetro en mm ²)	1:64 (diámetro en mm ²)
1.60	0.0	0.0	0.0
1.2	0.0	0.0	0.0
0.8	11.55	8.0	0.0
0.4	23.05	12.25	0.0
0.3	19.35	10.25	0.0
0.2	24.00	14.45	0.0
0.15	16.80	11.55	0.0
0.10	22.10	13.70	0.0

Con el objeto de probar si esta técnica es aplicable a la determinación cuantitativa de las proteínas de soya se prosiguió la investigación empleando la concentración final de anticuerpo en la gel de 0.2 %, en la cual se observó que los anillos de inmunoprecipitado eran definidos después de intensificarlos con ácido tánico al 4 %. Con propósito de establecer una curva patrón se probaron las diluciones de antígeno (extracto de soya fresco) 1:1, 1:2, 1:4 y 1:8, y las seis muestras positivas de salchichas y dos más negativas. Los resultados obtenidos y la gráfica de la curva se expresan en la figura 5.

Como se mencionó antes, la prueba de difusión radial simple se hizo con el único propósito de ver si se podía aplicar este método a la cuantificación

de proteínas de soya, pero como no se contaba con el equipo necesario, la preparación de las placas se realizó en forma sumamente rudimentaria lo - - que necesariamente le restó exactitud al método, pero se demostró plena - - mente que sí es aplicable. Todo lo anterior es la causa de que se observen discrepancias cuando se comparan los resultados obtenidos por las técnicas de inmunodifusión radial y de contraelectroforesis.



Gráfica de la curva de calibración
para la prueba de inmunodifusión -
radial

Los resultados de los extractos proteicos de embutidos son los siguientes:

Muestra	Diámetro en mm ²	Concentración de proteínas.
S-1	64.0	10.75
S-2	----	-----
S-3	75.7	14.8
S-4	70.55	12.6
S-5	74.0	14.6
S-7	35.0	2.5

VII Resumen

El uso de la soya en el continente occidental como alimento humano ha ido incrementándose conforme la tecnología ha superado los aspectos indeseables de la soya.

Uno de los derivados de soya más empleado como aditivo y en algunos casos como adulterante en productos cárnicos es la harina de soya desengrasada.

En la actualidad se han desarrollado varios métodos principalmente electroforéticos para la determinación tanto de harina desengrasada como de aislados y proteína vegetal texturizada, pero hasta el momento no hay uno oficial. En la presente investigación se emplearon técnicas de inmunoprecipitación como lo son la de doble difusión radial (Ouchterlony), contra inmuno-electroforesis y la de inmunodifusión radial, donde la primera es básicamente cualitativa, la segunda es semicuantitativa y la tercera es cuantitativa, demostrándose en el presente estudio que las dos últimas técnicas son aplicables en la estimación cuantitativa de las proteínas de soya en productos cárnicos.

VII Conclusiones

- 1) Las proteínas de soya son compuestos capaces de desencadenar una respuesta inmune al ser administradas por vía parenteral a animales de laboratorio.
- 2) Las proteínas de soya no comparten determinantes antigénicos con proteínas de origen animal.
- 3) El tratamiento térmico de las proteínas de soya provoca la insolubilización de éstas, lo cual ocasiona la pérdida de su capacidad para reaccionar con su anticuerpo correspondiente. Por lo anterior, es necesario elaborar un suero antiproteínas de soya tratadas térmicamente.
- 4) La técnica de contrainmunolectroforesis es aplicable en la determinación semicuantitativa de las proteínas de soya y la facilita cuando se dispone de poco tiempo y de los medios adecuados.
- 5) La técnica de inmunodifusión radial es la técnica más sensible de las empleadas en este estudio en la determinación cuantitativa de las proteínas de soya en productos cárnicos.
- 6) Los resultados de esta investigación no son válidos estadísticamente debido a que el número de muestras analizadas fué muy reducido.
- 7) Se hace necesario continuar con esta serie de estudios para establecer un método oficial con el fin de poder elaborar la norma que regule la adición de derivados de soya en la industria alimentaria.

Anexo I

Preparación del extracto de proteínas de soya:

a) Equipo

balanza granataria

agitadores magnéticos

centrífuga para tubos de 50 ml

portafiltros Millipore de 293 mm de diámetro

bomba peristáltica Randolph

liofilizadora

b) Material

1 matraz Erlenmeyer de 2 000 ml

4 vasos de precipitados de 1 000 ml

1 probeta de 500 ml

8 tubos para centrifuga de 50 ml

1 prefiltro de 0.5 mm de diámetro de poro

1 membrana Millipore de 0.45 micras de diámetro de poro

1 membrana Millipore de 0.22 micras de diámetro de poro

100 frascos ampula de 10 ml de capacidad

c) Reactivos

2 000 ml de solución salina isotónica (SSI)

500 g de harina de soya comercial

Técnica.- Se pesan cuatro porciones de 125 g de harina de soya comercial y se agregan lentamente a cada uno de los vasos de precipitados que contie

nen 500 ml de SSI (relación 1:4, p:v) con agitación constante y vigorosa para dispersar la harina de soya y así facilitar la solubilización de las proteínas de ésta. Se refrigera a 4°C durante 18 h agitando ocasionalmente la mezcla. Transcurrido este período se procede a centrifugar a 5 000 r.p.m. durante 15 min a temperatura ambiente. Los sobrenadantes se recolectan en un matraz de 500 ml y los sedimentos se descartan. Estos sobrenadantes se recentrifugan a 12 000 r.p.m. durante 30 min a temperatura ambiente. Después de la centrifugación se descartan los sedimentos conservando los sobrenadantes, los cuales se depositan en un matraz Erlenmeyer de 500 ml y se determina contenido proteico por el método de Biuret (anexo II).

La esterilización del extracto de proteínas de soya (EPS) se realiza en dos pasos:

1er. paso.- El EPS se filtra a través de un prefiltro con poro de 5 micras de diámetro, sobre un portafiltros Millipore de 293 mm de diámetro, aplicando presión positiva (1.5 Kg/cm^2) con una bomba peristáltica Randolph. A continuación el EPS se filtra sobre una membrana Millipore con poro de 0.45 micras de diámetro, posteriormente se emplea otra membrana Millipore con poro de 0.22 micras de diámetro. Estas filtraciones tienen por objeto clarificar el EPS, eliminando así las partículas en suspensión por lo que no es necesario trabajar en condiciones estériles.

2do. paso.- El EPS clarificado se filtra para su esterilización a través de una membrana Millipore estéril con poro de 0.22 micras de diámetro. Posteriormente el EPS estéril se distribuye en 100 frascos ampula estériles (3 ml

en cada uno), se procede a la liofilización y se engargolan los frascos. El contenido proteico se determina por el método de Biuret (anexo II), después de rehidratar el liofilizado con 3 ml de agua destilada.

Anexo II

Determinación de proteínas por el método de Biuret:

a) Equipo

Fotocolorímetro

filtro verde

3 celdas para fotocolorímetro

b) Material

4 tubos de ensayo de 15 x 150 mm.

2 pipetas graduadas de 10 ml., divididas en ml y 1/10

2 pipetas graduadas de 5 ml divididas en ml y 1/10

1 pipeta graduada de 1 ml dividida en 1/10

c) Reactivos

Reactivo de Biuret (16 ml)

solución de NaCl al 0.85 % (15 ml)

Técnica.- En un tubo de ensayo de 15 x 150 mm, medir 9.5 ml de solución de NaCl al 0.85 % y adicionar 0.5 ml de la solución de proteínas.

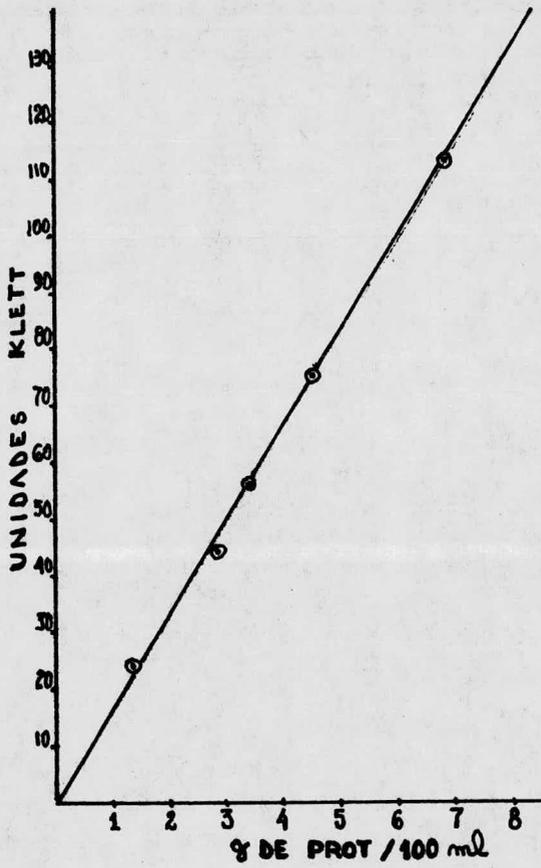
En dos tubos de 15 x 150 mm depositar 2 ml de la dilución anterior marcando uno como problema y otro como blanco de color y en otro depositar 2 ml de la solución de NaCl al 0.85 % y marcarlo como blanco.

Adicionar a los tubos blanco y problema 8 ml del reactivo de Biuret y mezclar, al tubo marcado como blanco de color adicionarle 8 ml de NaCl al --

0.85 %, dejando 30 min a temperatura ambiente para el desarrollo de color. Utilizando el tubo del blanco ajustar al 100 % de transmisión con el filtro verde. Sustituyendo el tubo del blanco por el de blanco de color obtener la lectura que se restará a la lectura obtenida del tubo problema. De la diferencia se obtendrá el valor que se interpolará en la curva de calibración. Esta curva se obtuvo al hacer las diluciones 1:1, 1:1.5, 1:2.0, 1:2.5 y 1:4.0 de una solución de albúmina bovina a una concentración de 6.8 g/ 100 ml y siguiendo la misma técnica de Biuret.

Curva de Calibración de Proteínas
por la técnica de Biuret

g de prot./100ml	Dilución	Lectura (UK)
1.35	1:4.0	24
2.70	1:2.5	44
3.40	1:2.0	56
4.53	1:1.5	75
6.80	1:1.0	112



Anexo III

Obtención del suero antiproteínas de soya:

a) Equipo

Centrífuga para tubos de 50 ml

b) Material

6 jeringas hipodérmicas estériles

6 agujas hipodérmicas estériles del núm. 24

6 agujas hipodérmicas estériles del núm. 20

3 tubos de centrífuga de 50 ml

1 tabla para sujetar conejos

algodón

c) Material biológico

3 conejos de la raza Nueva Zelanda con peso de 2 a 2.5 Kg.

Adyuvante de Freund completo

Extracto de soya liofilizado

Agua destilada estéril

Técnica.- Para obtener el suero antiproteínas de soya se siguió el siguiente esquema de inmunización:

1er. día El contenido de un frasco ampula (hidratado con 1 ml de agua destilada estéril) más 0.5 ml de adyuvante de Freund completo por vía intramuscular.

3er. día El contenido de un frasco ampula (hidratado con 1 ml de agua destilada estéril) más 0.5 ml de adyuvante de Freund completo por vía intramuscular.

lada estéril) más 1.0 ml de adyuvante de Freund completo por vía intramuscular.

8vo. día El contenido de un frasco ampula hidratado con 1 ml de agua destilado estéril) más 1.0 ml de adyuvante de Freund completo por vía intramuscular.

Las siguientes inyecciones fueron endovenosas:

14 día 1 ml de extracto de proteínas de soya estéril.

16 día 1 ml de extracto de proteínas de soya estéril

17 día 1 ml de extracto de proteínas de soya estéril

18 día 1 ml de extracto de proteínas de soya estéril

19 día 1 ml de extracto de proteínas de soya esteril

20 día 1 ml de extracto de proteínas de soya esteril

Al término del esquema de inmunización se deja descansar al animal durante una semana y se procede a hacer la sangría de prueba. Para ello se toman unos 2 ml de sangre por punción en la vena marginal de la oreja, la sangre se coloca en un tubo de ensayo de 12 x 75 mm y se deja coagular, se separa el suero y se determina la presencia de anticuerpos por el método de doble difusión en agar (método de Ouchterlony, anexo IV).

Si al cabo de las 48 h se observan bandas de precipitación, se procede a la sangría de cosecha mediante la punción cardíaca. La sangre extraída se deja coagular en los tubos de ensayo y posteriormente se somete a una centrifugación a 3 500 r.p.m. durante 15 min a temperatura ambiente. El sue-

ro es separado del coágulo por decantación y se reparte en tubos de 12 x 75 mm en porciones de 3 ml, manteniéndose en congelación hasta el momento de emplearse, además de añadirse 1 mg de azida de sodio por mililitro de suero como conservador.

Anexo IV

Doble Difusión en agar.- Técnica de Ouchterlony

a) Material

Cajas Petri desechables

1 matraz Erlenmeyer de 100 ml

1 pipeta graduada de 10 ml

1 cortador (sacabocados) de 2 mm de diámetro

1 tubo de 12 x 75 mm.

tubos capilares

b) Reactivos

100 ml de solución amortiguadores de veronal-acetato (pH de 8.6, fuerza iónica de 0.01)

1.5 g de Agar Purum (Instituto Behring)

100 ml del colorante Rojo de Ponceau

100 ml de ácido acético glacial

1 000 ml de SSI

100 mg de azida de sodio

c) Material biológico

1 ml del suero antiproteínas de soya

1 ml del EPS liofilizado (hidratado con 3 ml de agua destilada)

1 ml del EPS sin liofilizar

Fundamento.- Todas las macro moléculas tienden a difundir a través de ge

les, siguiendo las leyes generales de la difusión, que establecen que la -- distancia a la que una sustancia difunde está en relación directa con su -- concentración y en relación inversa con su peso molecular.

Técnica.- 1.5 g de agar purum se calientan a ebullición con 100 ml del amor -- tiguador de veronal-acetato adicionado de 100 mg de azida de sodio como -- agente conservador hasta que el agar se disuelve completamente.

Cada una de las cajas Petri se colocan en un plano exactamente nivelado y -- se llenan con pipeta con 22 ml del gel fundido. Después de la solidifica -- ción del agar y estando éste firme se cortan los pozos sobre su superficie -- con ayuda de un sacabocados de 0.2 cm de diámetro a una distancia de 0.5 cm siguiendo la disposición de la fig. 6. Se retiran los cilindros de gel de los cortes quedando así los pozos para la colocación del antígeno o del anticuerpo.

Cada pozo en las placas de gel de agar se llena con 20 microlitros de solu -- ción de antígeno o anticuerpo, de forma que la solución alcance el borde su -- perior. Las cajas de gel de agar se dejan de dos a tres días a temperatura ambiente, para que se formen los inmunoprecipitados.

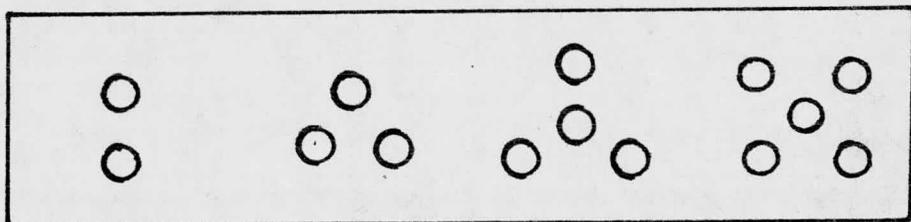


Figura 6 Diferentes disposiciones de los pozos en las placas de gel.

Anexo V

Contrainmunolectroforesis:

a) Equipo

Aparato de electroforesis (fuente de poder y cámara)

Balanza analítica.

b) Material

1 matraz Erlenmeyer de 100 ml.

1 pipeta graduada de 10 ml

1 mechero Bunsen

1 tela de alambre con asbesto

1 tripie

tubos capilares

placas de acrílico de 9 x 11 cm

placas de acrílico de 20 x 30 cm

1 nivel de gota

1 cortador (sacabocados) de 4 mm de diámetro

tiras de papel filtro Whatman núm. 1 de 9 x 6 cm

1 par de guantes quirúrgicos de látex

1 tijeras

1 plantilla para realizar los cortes de los pozos

8 cajas de plástico con cierre hermético de 20 x 20 x 6 cm

1 caja de plástico con cierre hermético de 22 x 34 x 10 cm

c) Reactivos

Solución amortiguadora de veronal-acetato pH= 8.6 y fuerza iónica de 0.05 para la cámara de electroforesis y de 0.01 para la preparación de las placas de agar.

1.5 g de agar purum por cada 100 ml de solución amortiguadora de veronal-acetato (pH de 8.6, fuerza iónica 0.01)

250 ml de colorante Rojo de Ponceau

200 ml de ácido acético glacial

100 ml de glicerol

10 000 ml de SSI

agua desionizada

d) Material biológico

Sueros antiproteína de soya

suero antiproteína de soya del Instituto Behring

extracto de proteína de soya

Fundamento.-Esta técnica se basa en los mismos principios de la técnica de Ouchterlony. El antígeno y el anticuerpo se colocan en pozos diferentes; - en los puntos donde se juntan al difundirse se forman inmunoprecipitados.

Los antígenos proteicos debido al fenómeno electroosmótico se mueven hacia el ánodo en el campo eléctrico y los anticuerpos específicos se mueven hacia el cátodo, concentrándose en un sólo lugar, cuando los dos se encuentran se forma una o varias líneas visibles de precipitación en el medio-

de soporte.

Técnica.- Para preparar las placas de gel de agar se mezclan 1.5 g de agar purum con 100 ml de la solución amortiguadora de veronal acetato (pH 8.6, - fuerza iónica de 0.01 y con 100 mg de azida de sodio) calentando hasta ebullición. Una vez que la solución está completamente clara se deja enfriar a 80°C y se vierte sobre las placas de acrílico (23 ml), las que deberán estar desengrasadas con alcohol y éter sulfúrico y colocadas sobre una superficie perfectamente nivelada. Cuando el agar ha solidificado, las placas - se refrigeran por 30 min con el objeto de que adquieran mayor consistencia. Posteriormente se efectúan los cortes de los pozos sobre la superficie de - la placa de agar en 3 series de dos hileras con ocho pozos cada hilera (fig. 7), ayudándose para ello con la plantilla. Los pozos de las filas (A) ánodo, se llenan hasta su borde con los sueros antiproteínas de soya (anticuerpo). En los pozos de las filas (B) cátodo, se coloca el antígeno.

A continuación las placas se colocan dentro de la cámara de electroforesis, estableciendo contacto entre el amortiguador y la placa de agar con las tiras de papel filtro Whatman núm. 1. El potencial de corriente es de 8 a - 10 V/cm (90 V/placa), a temperatura ambiente durante 45 min. Transcurrido este período, las placas son sometidas a un lavado con SSI por inmersión - durante 48 h cambiando la solución frecuentemente con el objeto de eliminar las proteínas que no reaccionaron. El secado de las placas se realiza me- - diante hojas de papel filtro de 9 x 11 cm a temperatura ambiente durante 12h.

El teñido de las placas se realiza dentro de recipientes de plástico que contienen la solución de Rojo de Ponceau, por 3 min de inmersión. La decoloración de éstas se realiza con cambios frecuentes de ácido acético al 5% durante 48 h.

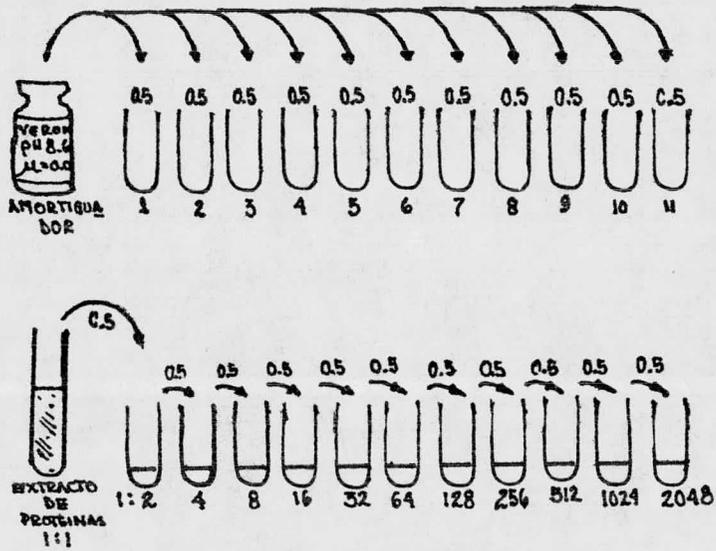
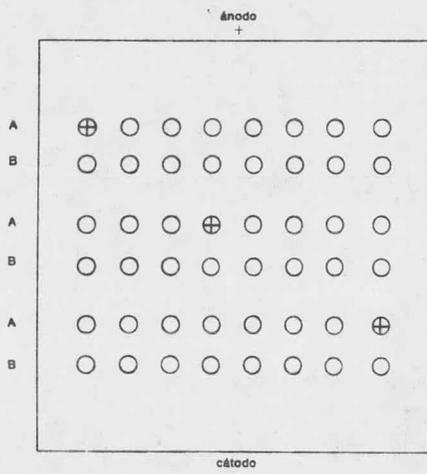


Diagrama de las diluciones en Incrementos de Dos



Plantilla para efectuar los cortes en las
placas de contraelectroforesis

Anexo VI

Preparación del Extracto de Proteínas de soya a partir de embutidos comerciales:

a) Equipo

Balanza granataria

licuadora

centrífuga con cabezal para tubos de 50 ml

frascos ampula

b) Material

1 probeta de 100 ml

frascos de reactivo de 250 ml con tapón de rosca

tubos de centrifuga de 50 ml

c) Reactivos

Solución salina isotónica adicionada de 1 mg/ml de azida de sodio.

Técnica.- Se pesan 20 g de la muestra de embutido y se aforan con solución salina isotónica a 100 ml en una probeta. A continuación el contenido de la probeta se vierte a un vaso de licuadora y se muele durante 2 min, posteriormente esta suspensión se refrigera en los frascos de reactivo durante 12 h. Transcurrido este período, 50 ml de este macerado se centrifugan a 12 000 r.p.m. durante 30 min a temperatura ambiente, después de lo cual se separa el sobrenadante y se mantiene en refrigeración.

Anexo VII

Inmunodifusión Radial en gel de agar:

a) Equipo

2 baños de agua a temperaturas constantes de 45° y de 55 °C.

b) Material

1 Matraz Erlenmeyer de 125 ml

3 pipetas de 10 ml

1 agitador de vidrio

6 cajas de Partigen vacías

2 cubas de plástico

2 aplicadores para 5 microlitros

tubos capilares para el aplicador

1 regla Partigen

1 mechero Bunsen

1 tela de alambre con asbesto

1 tripie

c) Reactivos

Solución salina isotónica

ácido tánico al 4 %

agar purum

solución amortiguadora de veronal-acetato (pH 8.6, fuerza iónica de 0.01)

d) Material Biológico

Suero antiproteínas de soya

extracto de proteínas de soya

extractos proteicos de productos cárnicos

Fundamento.- Esta técnica se basa en la difusión del antígeno a través de un medio de soporte que contiene el anticuerpo correspondiente. El aumento del área del anillo de precipitación es en primer lugar función del tiempo. Desde el comienzo de la difusión del antígeno se forma un complejo antígeno-anticuerpo. Después de suficiente tiempo de difusión, por llegarse a -- la zona de equivalencia, se alcanza el punto final de difusión, en el cual, el área del anillo de precipitación es directamente proporcional a la concentración del antígeno en el pozo e inversamente proporcional a la concentración del anticuerpo en el gel.

Técnica.- Para preparar las placas de inmunodifusión radial, se mezclan -- 1.5 g. de agar purum con 100 ml de la solución amortiguadora de veronal-acetato calentando hasta ebullición. Una vez que la solución está perfectamente clara, se enfría a 55°C dentro del baño a dicha temperatura. En el -- baño a 45°C, se calienta el suero antiproteínas de soya. Ambos se mezclan agitando constantemente dentro del baño a 55°C. Depositar 10 ml de esta mezcla con una pipeta precalentada a 60°C en cada una de las cajas -- de plástico, las cuales deben estar ya sobre una superficie perfectamente -- nivelada.

Una vez que el agar ha solidificado perfectamente, se procede a efectuar --

los cortes de los pozos de 2 mm de diámetro siguiendo la numeración de las cajas, se retira el gel de los cortes y se llenan con 10 microlitros de las diluciones del extracto de proteínas de soya. La difusión se realiza durante 72 h. Al término de este período, las placas se lavan con SSI durante 48 h con cambios frecuentes de ésta. Después del lavado, las placas se sumergen en la solución de ácido tánico al 4 % durante una hora, posteriormente, se lavan nuevamente con agua destilada durante 2 h para eliminar los restos de ácido tánico. A continuación, las cajas se dejan al aire libre para que se elimine el exceso de humedad. Posteriormente se miden los diámetros de los anillos de precipitación con la regla partigen.

IX Bibliografía

- 1.- Acosta, M., S. Fraga, F. Fraga y F. Fraga 1973. La investigación de anticuerpos frente al semen humano por contrainmunolectroforesis. Medicina (Mex) ____:33
- 2.- Anderson, R.L. 1973. Extration of soybean meal proteins with salt solution at pH 4.5. Agric. and Food Chem. J. 21:251
- 3.- Boyle, J.R. 1969. New soybeans products use textured protein. Crops & Soils. 21:12
- 4.- Brandly, J.P. 1975. Higiene de la carne. Compañía Editorial Continental, S.A. D.F., México.
- 5.- Burket, R.E. 1977. Introducción a la proteína de soja comestible. Alimentaria. Núm. 78:29
- 6.- Catsimpoolas, N. and Meyer, E.W. 1968. Immunochemical study of soybean proteins. Ag. & Food Chem. J. 16:128-131.
- 7.- Curtin, V. 1966. Purified soy protein potencial standard. Feedstuffs. 30:20

- 8.- Enjers, B. y Hungerer, K.D. 1975. Hojas de laboratorio para el diagnóstico médico. Behringwerke. Ag. Medizinische Information. Frankfurt, Alemania Occidental.
- 9.- Provin, A. 1974. Detection of soy proteins. Am. Oil Chem. Soc. J. 51: 188A
- 10.- Guy R.L. 1973. Analysis of comercial soya aditives in meat products. J. Scie. Food & Agric. 24:1551
- 11.- Heer, E.E. y Margni, R.A. 1971. Electro e Inmunolectroforesis, Manual de laboratorio e interpretaciones fundamentales. Gumer-sindo F. Fernández Editor. Buenos Aires, Argentina.
- 12.- Hoechst Aktiengesellschaft. 1976. Partigen, Discos de inmunodifusión. Gráficas Roman, S.A. Barcelona, España.
- 13.- Horwitz, W., Editor. 1975. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. Published by the Association of Official Analytical Chemists. Washington, D.C.
- 14.- Judge, M.D. 1974. Soya Aditives in beef patties. Food Scie. J. 39: 137.

- 15.- Larsen, A.L. 1968. Electrophoretic differences in seed protein protein among varieties of soybean. *Crop Sci.* 8:47
- 16.- Lee, Y.B. 1975. Quantitative determination of soybean protein in -- fresh and cooked meat soy blends. *J. Food Sci.* 40:380
- 17.- Lee, Y.B. 1976. Detection of various nonmeat extenders in meat products. *J. Food Sci.* 41:589
- 18.- Mancini, G., Carbonara, A.O. and Heremans, J.F. 1965.- Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion. *Immunochem.* 2:235.
- 19.- Margni, R.E. 1977. *Inmunología e Inmunquímica*. Editorial Panamericana. Buenos Aires, Argentina.
- 20.- Mussman, H.C. 1974. Regulations governing the use of soy protein in meal and poultry products in the U.S. *Am. Oil Chem. Soc. J.* 51:104A
- 21.- Nash, A.M. and Wolf, W.J. 1967. Solubility and ultracentrifugal studies on soybean globulins. *Cereal Chem.* 44:193.

- 22.- Parson, A.L. 1972. Quantitative identification of soya protein in -- X
fresh and heated meat products.
J. Food Tech. 7:455
- 23.- Puski, G. and Melnychyn, P. 1968. Starch-gel electrophoresis of soybean
globulins. Cereal Chem. 16:128
- 24.- Rakosky, J. 1970. Soy products for the meat industry. Agric. & Food - X
Chem. J. 18:1005.
- 25.- Rakosky J, Jr. 1974. Soy grits, flour, concentrates and isolates in - X
meat products. Am. Oil Chem. Soc. J. 51:123A
- 26.- Roberts, L.A. 1974. Utilization of high levels of soy protein in com- X
minuted processed meat products. Am. Oil Chem. Soc. J. 51:
195A
- 27.- Roitt, I.M. 1975. Essential Immunology. Blackwell Scientific Publi-
cations Ltd. Oxford, England.
- 28.- Schweiger, R.S. 1974. Soy protein concentrates and isolates in com X
minute meat systems. Am. Oil Chem. Soc. J. 51:192A
- 29.- Schwich, G. y Storiko, K. 1964. Hojas de laboratorio para el diag--

nóstico médico. Determinación cualitativa y cuantitativa de las proteínas del plasma por inmunoprecipitación. Behrinerker AG. Medizinische Information. Frankfurt, Alemania Occidental.

30.- van Megen, W.H. 1974. Solubility behavior of soybean globulins as a function of pH and ionic strength. J. Agric. & Food Chem. -- 22:126

31.- Vergani, C., Stabilini, R. and Agostini, A. 1967. Quantitative determination of serum immunoglobulins by single radial immunodiffusion on cellulose acetate. Immunochem 4:4

32.- Wang, H.L. 1967. Products from soybeans. Food Tech. 21:799

33.- Wan Gils, H. 1977. Regulaciones y leyes europeas que rigen el uso de la proteína de soja en los productos cárnicos. Alimentaria. núm. 82:41.

34.- Williams, C. W. and Zabik, M.E. 1975. Quality characteristics of -- soy-substituted ground beef, pork, and turkey meat loaves. J. Food Scie. 40:502.

- 35.- Wodicka, V.D. 1974. Authorizations and restrictions on soy protein -
in food in the U.S. Am. Oil Chem. Soc. J. 51:101 A
- 36.- Wolf, W.S. 1972. What is soy protein. Food Tech. 26:44 X
- 37.- Yasuda, K. 1974, Soy protein in meat-like products in Japan. Am. -
Oil Chem. Soc. J. 51:195A