

to remove high abundance proteins, like others used for human biomarker identification, the ProteoMiner treatment will decrease the amount of these high-abundance proteins. This kind of strategies should widen the number of applications in serum animal proteomics.

This work was funded by grant AGL2006-02364/GAN from the Spanish "Ministerio de Educación y Ciencia". Part of the funding was financed by the FEDER program from the European Union. We thank Ms. Anna Vilalta for her excellent technical assistance.

## References

- [1] Adkins JN, Varnum SM, Auberry KJ, Moore RJ, Angell NH, Smith RD et al. Toward a human blood serum proteome: analysis by multidimensional separation coupled with mass spectrometry. *Mol. Cell. Proteomics* 2002; 1, 947-955.
- [2] Anderson NL and Anderson NG. The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects. *Mol. Cell. Proteomics* 2002; 1, 845-867.
- [3] Echan LA, Tang HY, Ali-Khan N, Lee K and Speicher DW. Depletion of multiple high-abundance proteins improves protein profiling capacities of human serum and plasma. *Proteomics* 2005; 5, 3292-3303.
- [4] Boschetti E and Righetti PG. The ProteoMiner in the proteomic arena: A non-depleting tool for discovering low-abundance species. *J. Proteomics* 2008; 71, 255-264.
- [5] Berkelman T and Stenstedt T. 2-D Electrophoresis. Principles and methods. Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden. 1998.

## La Proteómica como vía para determinar el origen animal de los productos cárnicos

*Miguel Ángel Sentandreu<sup>1</sup>, Paul D. Fraser<sup>2</sup>, Enrique Sentandreu<sup>1</sup>, Leticia Mora<sup>1</sup>, Peter M. Bramley<sup>2</sup>*

<sup>1</sup> Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (CSIC), P.O. Box 73, 46100 Burjassot, Valencia, España. <sup>2</sup> Center for Systems and Synthetic Biology, School of Biological Sciences, Royal Holloway, University of London, Egham TW20 0EX. Reino Unido

## Resumen

En el presente trabajo se describe el desarrollo de un método para detectar la presencia de carne de pollo en mezclas de carne haciendo uso de la tecnología proteómica. Es un método simple y robusto que incluye una etapa de extracción de proteínas musculares, enriquecimiento de la proteína diana mediante isoelectroenfoque, digestión con tripsina de la misma y análisis de un péptido biomarcador específicos de la especie aviar mediante LC-ESI-MS/MS. Esta metodología ha permitido detectar la presencia de un 0,5 % de carne de pollo contaminando carne de cerdo. Además de su sencillez, el método presenta la ventaja de poder aplicarse indistintamente al análisis de carne fresca y cocinada, representando una alternativa

interesante a los métodos que se están empleando actualmente para el control del origen animal de los productos cárnicos.

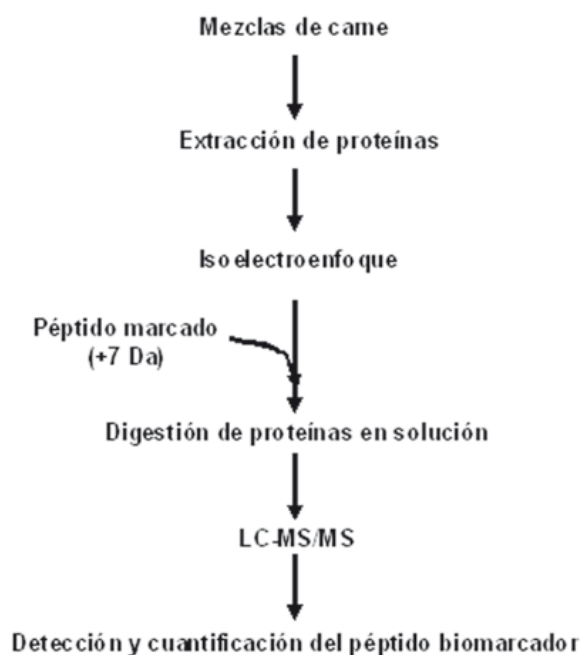
## Texto principal

Los principales casos de adulteración en productos cárnicos se relacionan con la sustitución de carne de elevada calidad por carne de un menor coste con objeto de poder obtener un beneficio económico adicional. Para poder controlar el fraude que supone esta forma de proceder es necesario disponer de métodos de análisis robustos, sensibles y precisos. De entre las tecnologías más empleadas hasta el momento para este propósito hay que destacar los inmunoensayos y los análisis de ADN. A pesar del

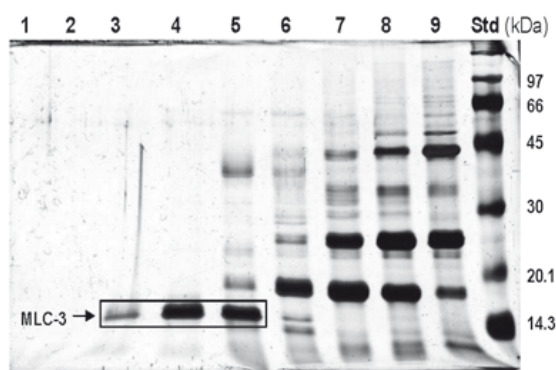
gran avance que ha supuesto la introducción y el desarrollo de estas técnicas, existen importantes limitaciones cuando éstas se aplican al análisis de productos cárnicos procesados ya que las agresivas condiciones empleadas durante el procesado de la carne pueden influir negativamente en el reconocimiento de las proteínas diana o del ADN [1]. Los recientes avances en las técnicas de espectrometría de masas aplicadas al campo de la proteómica constituyen una alternativa interesante a través de la identificación de péptidos biomarcadores específicos de cada especie animal. En el presente trabajo se ha seleccionado un péptido biomarcador específico de la especie aviar para poder detectar esta carne en cualquier tipo de mezcla de carne tanto fresca como cocinada. Para ello, un gramo de distintas mezclas de carne de pollo se homogeneizaron con 10 mL de tampón Tris, pH 8,0, centrifugándose a continuación durante 20 min a 10000 rpm. Se recogió el precipitado obtenido y se solubilizó en el tampón Tris pH 8.0 conteniendo 6M de urea y 1 M de thiourea. Se tomo el volumen necesario de este extracto para fraccionar 2,5 mg de proteínas totales por isoelectroenfoque en el intervalo de pH 4-7 empleando un fraccionador OFFGEL 3100 (Agilent). De la fracción donde se localizó la cadena ligera de miosina 3 se tomaron 20 µL para realizar una digestión con tripsina. Después de la digestión se ajustó el volumen final de cada muestra a 30 µL, analizando los péptidos contenidos

en este extracto mediante LC-ESI-MS/MS (Thermo Electrón Corp.). La identificación de péptidos se realizó a partir de los espectros MS/MS empleando MASCOT como algoritmo y la base de datos de proteínas NCBIInr. La cuantificación del péptido seleccionado como biomarcador de la especie aviar en distintas mezclas de carne conteniendo diferentes porcentajes de carne de pollo se realizó mediante la adición de 5 picomoles del péptido seleccionado marcado con isótopos estables <sup>13</sup>C6/<sup>15</sup>N (Técnica AQUA). La integración de los picos cromatográficos correspondientes tanto al péptido nativo como al péptido pesado se realizó manualmente. La cantidad de péptido nativo en cada muestra se determinó por comparación de las áreas de cada pico.

El método que se ha desarrollado en el presente trabajo se esquematiza en la Figura 1. Las proteínas de los distintos extractos de carne se fraccionaron mediante isoelectroenfoque en medio líquido. En la Figura 2 se puede observar el perfil de proteínas obtenido en SDS-PAGE para las fracciones OFFGEL correspondientes a los valores de pH más ácidos. Como se puede apreciar, las fracciones 3 y 4 contienen una sola banda de proteína, correspondiente a la cadena ligera de miosina 3 (MLC3). Esto confirma el uso del isoelectroenfoque en medio líquido como vía adecuada para el enriquecimiento de MLC3 como proteína diana para la posterior hidrólisis con tripsina y generación de péptidos po-



**Figura 1.** Resumen esquemático del método desarrollado para detectar cuantitativamente la presencia de la carne de pollo en las distintas mezclas de carne.



**Figura 2.** SDS-PAGE al 12 % correspondiente a las nueve primeras fracciones obtenidas después de separar las proteínas de una mezcla de carne (1 % de pollo en carne de cerdo) con el fraccionador de proteínas en solución OFFGEL 3100 de Agilent. El isoelectroenfoque se realizó en el intervalo de pH 4-7. Se indica la posición en el gel de la cadena ligera de miosina 3 (MLC3).

tenciales biomarcadores de cada especie animal. El presente trabajo se ha centrado en la selección de un péptido biomarcador para detectar la presencia de pollo en mezclas de carne. Como criterios de selección se tuvo en cuenta que el péptido elegido fuera específico de la especie aviar, así como que su detección fuera posible aun en aquellos casos en los que la carne de pollo esté presente en bajas cantidades en el producto. De este modo, se llevó a cabo el protocolo de trabajo de la Figura 1 empleando una mezcla de carne conteniendo un 1% de pollo en carne de cerdo. Después de realizar la hidrólisis con tripsina de las fracciones OFFGEL 3 y 4 (Figura 2), el análisis mediante LC-ESI-MS/MS de los péptidos generados permitió la identificación del péptido biomarcador e específico de la especie aviar  $^{37}\text{ALGQNPTNAEINK}^{49}$  procedente de MLC3. La cuantificación de este péptido en mezclas de carne conteniendo distintos porcentajes de carne de pollo (0, 0,5, 1, 2, 5 y 10 %) se realizó mediante la adición de su homólogo marcado con isótopos

estables (+7 Da) al extracto enriquecido en MLC3 después del fraccionamiento en OFFGEL (Figura 1). De este modo se obtuvo una buena correlación lineal ( $R^2 = 0,9921$ ) entre el porcentaje de carne de pollo añadido a la mezcla y la cantidad del péptido biomarcador seleccionado, determinada por LC-ESI-MS/MS. El método desarrollado en el presente trabajo es preciso y sensible, además de ser fiable en el análisis de alimentos sometidos a un tratamiento térmico elevado. Los resultados obtenidos permiten afirmar que la aproximación proteómica puede ser una alternativa de interés a los métodos empleados actualmente para resolver el problema de la determinación de las especies cárnicas.

## Referencias

- [1] Woolfe M, Primrose S. Food forensics: using DNA technology to combat misdescription and fraud. *Trends in Biotechnology* 2004; 22 (5): 222-6.

## Péptidos inhibidores de la Enzima Convertidora de Angiotensina I generados en la digestión *in vitro* de la carne de cerdo

Elizabeth Escudero<sup>1</sup>, Miguel Angel Sentandreu<sup>1</sup>, Keizo Arihara<sup>2</sup>, Fidel Toldrá<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto de agroquímica y Tecnología de Alimentos (CSIC). <sup>2</sup>Faculty of Animal Science, School of Veterinary Medicine and Animal Sciences, Kitasato University

## Resumen

El objetivo principal de este trabajo se ha centrado en la generación de péptidos inhibidores de la Enzima Convertidora de Angiotensina I (ECA) después de la digestión de carne de cerdo mediante la acción secuencial de pepsina y pancreatina, simulando las condiciones del sistema digestivo. El hidrolizado fue analizado directamente mediante nanoLC-ESI-MS/MS, estudiando seguidamente las secuencias obtenidas a partir de los espectros MS/MS. Los resultados obtenidos ponen de manifiesto el potencial de las proteínas de la carne de cerdo como fuente de péptidos antihipertensivos después de la digestión gastrointestinal.

Estudios recientes han demostrado el potencial de la carne de cerdo al generar péptidos biológicamente activos con capacidad para regular numerosos procesos en el organismo [1], lo que otorga a la carne un valor añadido. En trabajos anteriores se han descrito péptidos con acción antioxidante, antimicrobiana o antihipertensiva por ejemplo [2]. La acción antihipertensiva ejercida por algunos péptidos es debida a su capacidad para inhibir la actividad ECA. En el presente estudio, se ha investigado la posible actividad inhibidora de la ECA de los péptidos generados en la digestión de las proteínas del músculo esquelético del cerdo por acción de las enzimas gastrointestinales. El proceso de digestión fue simulado *in vitro* usando pepsina y pancreatina