



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① Número de publicación: **2 311 358**

② Número de solicitud: 200601881

⑤ Int. Cl.:
C07K 1/20 (2006.01)
B01D 15/08 (2006.01)

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

⑫ Fecha de presentación: **14.07.2006**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **01.02.2009**

Fecha de la concesión: **08.10.2009**

⑮ Fecha de anuncio de la concesión: **23.10.2009**

⑯ Fecha de publicación del folleto de la patente:
23.10.2009

⑰ Titular/es: **Universidad de Alcalá
Plaza de San Diego, s/n
28801 Alcalá de Henares, Madrid, ES**

⑱ Inventor/es: **García López, María Concepción;
Heras Abad, José María y
Marina Alegre, María Luisa**

⑳ Agente: **No consta**

⑳ Título: **Procedimiento para la estimación del contenido en globulinas 7S y 11S en habas de soja por cromatografía líquida de alta eficacia en fase inversa de perfusión.**

㉑ Resumen:

Procedimiento para la estimación del contenido en globulinas 7S y 11S en habas de soja por cromatografía líquida de alta eficacia en fase inversa de perfusión.

El objetivo de la invención es desarrollar un procedimiento para estimar el contenido en globulinas 7S y 11S en habas de soja mediante cromatografía líquida de alta eficacia en fase inversa (RP-HPLC) de perfusión.

La invención consiste en la asignación de picos cromatográficos a la globulina 11S y a la 7S más las proteínas del suero.

La medida del área correspondiente a los picos cromatográficos obtenidos utilizando RP-HPLC de perfusión junto con la medida del área total de todos los picos y el valor del contenido total de proteínas del haba de soja permite estimar el contenido para las mencionadas globulinas. El cromatograma para el haba de soja se obtiene por RP-HPLC mediante la inyección de una disolución en agua de las proteínas de soja del haba en una columna de perfusión con un gradiente lineal y binario.

ES 2 311 358 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

ES 2 311 358 B1

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la estimación del contenido en globulinas 7S y 11S en habas de soja por cromatografía líquida de alta eficacia en fase inversa de perfusión.

5

Sector de la técnica

El procedimiento desarrollado permite la estimación del contenido de globulinas 7S y 11S en habas de soja. Supone un gran avance al permitir la posibilidad de estimar separadamente los contenidos de las globulinas mencionadas que poseen distintas características y distintas propiedades funcionales de modo que dicha estimación permitiría seleccionar adecuadamente la variedad de haba de soja más adecuada para la elaboración de un alimento determinado según la propiedad funcional que sea más necesaria para dicha elaboración. Además, el método es muy rápido ya que las condiciones cromatográficas utilizadas permiten obtener el cromatograma de un haba de soja en menos de 3 min.

10

15

Estado de la técnica

Las proteínas de soja están constituidas mayoritariamente por las globulinas 7S y 11S. Estas proteínas juegan un papel muy importante cuando la soja se utiliza para elaborar alimentos [Endres, H. G. *Soy protein products. Characteristics, nutritional aspects, and utilization*. AOAC press and the Soy Protein Council, Champaign, Illinois, 2001]. De hecho, estas proteínas son responsables de la calidad de los alimentos elaborados a base de soja, y en particular de sus propiedades físicas y nutritivas [Mori, T., Utsumi, S., Inaba, H., Kitamura, K., Harada, K., *J. Agric. Food Chem.*, 1981, 29, 20-23] [Murphy, P. A., Resurreccion, P., *J. Agric. Food Chem.*, 1984, 32, 911-915].

20

Las características de las globulinas 7S y 11S son distintas. La proteína 7S es una glicoproteína mientras que la 11S no lo es. En cuanto a la composición aminoacídica, la proteína 11S es más rica en aminoácidos sulfurados que la 7S. Además, la globulina 7S tiene un mayor carácter antioxidante que la globulina 11S. Además de estas características nutritivas diferentes, también las proteínas 7S y 11S tienen distintas propiedades funcionales [Murphy, P. A., Resurreccion, P., *J. Agric. Food Chem.*, 1984, 32, 911-915] [Bian, Y., Myers, D. J., Dias, K., Lihono, M. A., Wu, S., Murphy, P. A., *JAOCS*, 2003, 80, 545-549]. La globulina 11S presenta un mayor poder gelificante por lo que es más adecuada en la preparación de alimentos que requieren una gran capacidad de formación de geles, como por ejemplo, el tofu [5-8] mientras que la proteína 7S tiene mayor capacidad que la proteína 11S para formar emulsiones estables, siendo entonces muy adecuada para las aplicaciones que requieren un gran poder emulsionante como es la elaboración de productos cárnicos tratados con calor [9].

25

30

Por otra parte, el contenido en globulinas 7S y 11S en habas de soja varía dependiendo de la variedad de que se trate. En general, la relación 11 S/7S suele estar comprendida entre 0.5 y 3.0 [Murphy, P. A., Resurreccion, P., *J. Agric. Food Chem.*, 1984, 32, 911-915] [Hughes, S. A., Murphy, P. A., *J. Agric. Food Chem.*, 1983, 31, 376-379]. Según esta relación, unos cultivos de habas de soja serán más adecuados que otros para determinadas aplicaciones alimentarias 1 [Kim, Y., Wicker, L., *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2005, 85, 2514-2518] [Mujoo, R., Trinh, D. T., Ng, P. K. W., *Food Chem.*, 2003, 82, 265-273] [Hughes, S. A., Murphy, P. A., *J. Agric. Food Chem.*, 1983, 31, 376-379] [Tezuka, M., Taira, H., Igarashi, Y., Yagasaki, K., Ono, T., *J. Agric. Food Chem.*, 2000, 48, 1111-1117]. Por tanto, la determinación del contenido en globulinas 7S y 11S presenta un gran interés porque permitiría la selección del cultivo de soja más adecuado para una aplicación alimentaria determinada.

35

40

Solo existe en la bibliografía un artículo científico en el que se ha estimado la relación 11S/7S utilizando RP-HPLC pero la separación cromatográfica requería un tiempo de 90 min [Mujoo, R., Trinh, D. T., Ng, P. K. W., *Food Chem.*, 2003, 82, 265-273]. Además, no se han estimado los contenidos de cada una de las fracciones sino sólo su relación.

45

En esta invención se ha utilizado la RP-HPLC de perfusión para estimar los contenidos en globulinas 7S y 11S en habas de soja ya que las características propias de las fases estacionarias perfusivas permiten la reducción considerable de los tiempos de análisis [García, M. C. Marina, M. L., Torre, M., *J. Chromatogr. A*. 2000, 880, 169-187].

50

Descripción de la invención

Los cromatogramas para las habas de soja se han obtenido con en cromatógrafo de líquidos de alta presión provisto de un sistema de desgasificación, una bomba cuaternaria, un compartimento de columna termostaticado, un inyector automático y un detector de absorción ultravioleta de longitud de onda variable y que permitía realizar gradientes de composición de fase móvil. La columna utilizada es una columna con un relleno de perfusión en la modalidad de fase inversa.

55

60

La separación se lleva a cabo con una columna perfusiva de fase inversa con unas dimensiones de 50 x 4.6 mm de diámetro interno empaquetada con partículas de poliestireno entrecruzado con divinilbenceno con un tamaño de 10 μm . El método cromatográfico consiste en un gradiente binario lineal: de 5 a 25% de fase móvil (FM) B en 1.7 min y de 25 a 45% FM B en 1.3 min seguido de un gradiente inverso de 45 a 5% FM B en 1 min para equilibrar la columna con las condiciones iniciales entre análisis. Las fases móviles se preparan con agua-ácido trifluoroacético al 0.1% (v/v) (fase móvil A) y acetonitrilo-ácido trifluoroacético al 0.1% (v/v) (fase móvil B). El flujo de fase móvil es de 3 mL/min, la temperatura 60°C, y la detección UV se lleva a cabo a 254 nm. Las fases móviles se filtran en filtros PVDF (0.45 μm) y se desgasifican continuamente por vacío. El volumen de inyección es de 20 μL .

65

ES 2 311 358 B1

La preparación de las disoluciones de las habas de soja se realiza disolviendo la cantidad apropiada de muestra molida en un volumen de agua Milli-Q adecuado seguido de sonicación a 25°C durante 5 min y centrifugación (3362 g) durante 10 min.

5 Las ventajas principales del procedimiento inventado son las siguientes:

- El procedimiento objeto de la invención es accesible a la mayor parte de los laboratorios de análisis ya que se puede llevar a cabo con una instrumentación básica.
- 10 ➤ El procedimiento supone una separación cromatográfica utilizando una columna de perfusión y es capaz de separar los picos cromatográficos de las proteínas de soja correspondientes a la globulina 11S y a la fracción (globulina 7S + proteínas del suero) en muestras de habas de soja.
- 15 ➤ La medida del área de los picos cromatográficos correspondientes a la globulina 11S y la fracción (globulina 7S + suero) junto con la medida del área total de picos y el valor del contenido total en proteínas del haba de soja, permite estimar el contenido de cada una de las globulinas mayoritarias en el haba de soja.

Descripción de la figura

20 Figura 1

Cromatograma correspondiente a un haba de soja comercial. Los picos 1 a 6 se asignan a la fracción (globulina 7S + suero) y los picos 7 a 9 a la globulina 11S. Condiciones experimentales: Flujo, 3 mL/min; temperatura de la columna, 60°C; Gradiente, 5 a 25% FM B en 1.7 min y de 25 a 45% FM B en 1.3 min seguido de un gradiente inverso para equilibrar la columna con las condiciones iniciales entre análisis (de 45 a 5% FM B en 1 min); Fases móviles, agua-ácido trifluoroacético al 0.1% (v/v) (FM A) y acetonitrilo-ácido trifluoroacético al 0.1% (v/v) (FM B); volumen de inyección, 20 µL; detección, 254 nm.

Modo de realización

30

Preparación de las muestras

La disolución del haba de soja se prepara disolviendo una cantidad apropiada de la muestra molida en un volumen adecuado de agua Milli-Q. A continuación, dicha disolución se sonica a 25°C durante 5 min, se centrifuga a 3362 g durante 10 min y el sobrenadante se inyecta en el sistema cromatográfico.

Estimación del contenido de las fracciones 11S y 7S + suero en el haba de soja

La Figura 1 muestra el cromatograma correspondiente a un haba de soja. Los picos cromatográficos 1 a 6 se asignan a la globulina 7S más otras proteínas minoritarias en la soja (inhibidores de proteasas, lectivas, lipoxigenasa, etc). A estas proteínas minoritarias se les denomina proteínas del suero ya que se encuentran en el suero que se obtiene tras la precipitación isoeléctrica de las globulinas 11S y 7S. El contenido de la globulina 11S se estima mediante la ecuación siguiente:

45

$$\text{Contenido en globulina 7S (gramos / 100 gramos)} = \left(\frac{A1 + A2 + A3 + A4 + A5 + A6}{A_t} \right) \times CP(\%)$$

50

Siendo A1, A2, A3, A4, A5 y AT las áreas de los picos 1 al 5 y el área total, respectivamente, y CP el contenido en proteínas de las habas en porcentaje.

El contenido en globulina 7S se estima como fracción 7S + suero asumiendo que el contenido en las proteínas minoritarias es despreciable con respecto al de la globulina 7S. Se calcula a partir de la ecuación siguiente:

55

$$\text{Contenido en globulina 11S (gramos / 100 gramos)} = \left(\frac{A7 + A8 + A9}{A_t} \right) \times CP(\%)$$

60

Siendo A7, A8 y A9 las áreas de los picos 7, 8 y 9 respectivamente.

65 A modo de ejemplo, en la tabla I se muestran algunos resultados obtenidos para la estimación de las globulinas 11S y 7S para distintos cultivos de soja.

Tabla 1. Contenido en humedad, contenido proteico y contenidos estimados para la globulina 11S y la fracción (globulina 7S + suero) así como su relación en 10 cultivos de habas de soja comerciales.

Haba de soja	Humedad (%)	Contenido de proteína (%) ^a	Contenido estimado para la globulina 11S ^b	Contenido estimado de fracción (7S +suero) ^b	Relación estimada de contenidos 11S/(7S+suero)
Amarilla A	11.0	42.9	12.4	30.5	0.41
Amarilla B	9.4	41.7	13.6	28.0	0.48
Amarilla C	10.0	43.4	27.0	16.4	1.65
Verde A	10.3	26.6	11.4	15.2	0.75
Verde B	10.4	26.8	5.7	21.1	0.27
Roja A	10.9	25.4	13.1	12.2	1.07
Roja B	11.9	23.4	18.8	4.5	4.18
Roja C	11.7	20.6	16.4	4.1	4.00
Negra A	4.2	35.2	15.7	19.5	0.80
Negra B	13.2	22.9	16.3	6.6	2.47

^a Dado en base seca

^b g en 100 g de haba de soja

ES 2 311 358 B1

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento para la estimación del contenido en globulinas 7S y 11S en habas de soja por cromatografía líquida de alta eficacia en fase inversa de perfusión **caracterizado** porque permite la separación de las proteínas de soja y la estimación de los contenidos de las globulinas 11S y 7S en habas de soja por RP-HPLC de perfusión.
- 10 2. Procedimiento para la estimación del contenido en globulinas 7S y 11S en habas de soja por cromatografía líquida de alta eficacia en fase inversa de perfusión, según la reivindicación **caracterizado** porque se utiliza una columna de fase inversa de 50 x 4.6 mm de diámetro interno rellena con una fase estacionaria perfusiva de poliestireno entrecruzado con divinilbenceno con tamaño de partícula de 10 μm .
- 15 3. Procedimiento para la estimación del contenido en globulinas 7S y 11S en habas de soja por cromatografía líquida de alta eficacia en fase inversa de perfusión, según las reivindicaciones 1 y 2, **caracterizado** porque las fases móviles se preparan con agua-ácido trifluoroacético al 0.1% (v/v) (fase móvil A) y con acetonitrilo-ácido trifluoroacético al 0.1% (v/v) (fase móvil B).
- 20 4. Procedimiento para la estimación del contenido en globulinas 7S y 11S en habas de soja por cromatografía líquida de alta eficacia en fase inversa de perfusión, según las reivindicaciones 1, 2 y 3, **caracterizado** porque la separación cromatográfica se realiza utilizando un gradiente lineal y binario: de 5 a 25% FM B en 1.7 min y de 25 a 45% FM B en 1.3 min seguido de un gradiente inverso para equilibrar la columna con las condiciones iniciales entre análisis.
- 25 5. Procedimiento para la estimación del contenido en globulinas 7S y 11S en habas de soja por cromatografía líquida de alta eficacia en fase inversa de perfusión, según las reivindicaciones 1, 2, 3 y 4, **caracterizado** porque se lleva a cabo a una temperatura de 60°C.
- 30 6. Procedimiento para la estimación del contenido en globulinas 7S y 11S en habas de soja por cromatografía líquida de alta eficacia en fase inversa de perfusión, según las reivindicaciones 1, 2, 3, 4 y **caracterizado** porque se realiza a un flujo de fase móvil de 3 mL/min.
- 35 7. Procedimiento para la estimación del contenido en globulinas 7S y 11S en habas de soja por cromatografía líquida de alta eficacia en fase inversa de perfusión, según las reivindicaciones 1, 2, 3, 4, 5 y **caracterizado** porque la detección UV se lleva a cabo a una longitud de onda de 254 nm.
- 40 8. Procedimiento para la estimación del contenido en globulinas 7S y 11S en habas de soja por cromatografía líquida de alta eficacia en fase inversa de perfusión, según las reivindicaciones 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7, **caracterizado** porque se inyecta un volumen de la disolución de la muestra de 20 μL .
- 45 9. Procedimiento para la estimación del contenido en globulinas 7S y 11S en habas de soja por cromatografía líquida de alta eficacia en fase inversa de perfusión, según las reivindicaciones 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8, **caracterizado** porque las disoluciones de las muestras se preparan disolviéndolas en agua Milli-Q.
- 50 10. Procedimiento para la estimación del contenido en globulinas 7S y 11S en habas de soja por cromatografía líquida de alta eficacia en fase inversa de perfusión, según las reivindicaciones 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9, **caracterizado** porque se puede estimar el contenido de las globulinas 11S y 7S.
- 55
- 60
- 65

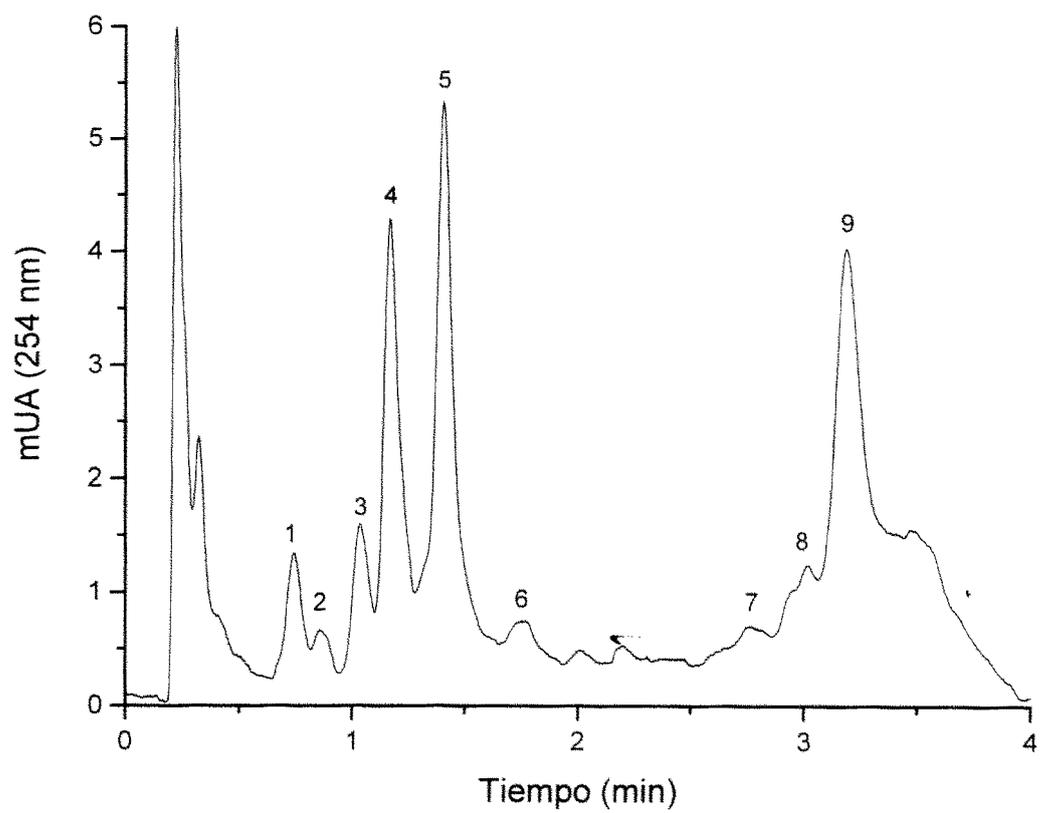


Figura 1



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 311 358

② Nº de solicitud: 200601881

③ Fecha de presentación de la solicitud: **14.07.2006**

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: **C07K 1/20** (2006.01)
B01D 15/08 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	ES 2167191 B1 (UNIVERSIDAD DE ALCALÁ DE HENARES) 01.05.2002, reivindicaciones 1-19.	1-10
X	GARCÍA, M.C. et al. A perfusion reversed-phase chromatographic method for ultrarapid determination of soybean proteins in soybean infant formulas and soybean milks: method development and validation. Journal of Chromatographic Science, 1998, Vol. 36, 527-534. Páginas 527-530.	1-10
X	MUJOO, R. et al. Characterization of storage proteins in different soybean varieties and their relationship to tofu yield and texture. Food Chemistry, 2003, Vol. 82, 265-273. Página 267.	1,3,5,7-10
X	GARCÍA, M.C. et al. Rapid separation of soybean globulins by reversed-phase high-performance liquid chromatography. Journal of Chromatography A, 1997, Vol. 758, 75-83. Resumen; página 77.	1,3,7-10

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia
Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría
A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita
P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud
E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
02.01.2009

Examinador
I.Rueda Molins

Página
1/1