



Fig. 3. Comparación del Wb en una dimensión (A) y en dos dimensiones (B) en plasma de rata utilizando P66.

Bibliografía

- Vilella, E., Joven, J., Fernández, M., Vilaró, S., Brunzell, J. D., Olivecrona, T., and Bengtsson-Olivecrona, G. 1993. *J. Lipid Res.* 1993, 34: 1555-1564.
- Ricart-Jané, D., Cejudo-Martin, P., Peinado-Onsurbe, J., López-Tejero, M. D., and Llobera, M.. *J. Appl. Physiol.* 2005, 99: 1343-1351.

Fragmentos de titina generados durante el proceso de elaboración de jamón curado

Mora L¹, Sentandreu MA², Koistinen KM², Fraser PD², Bramley PM², Toldrá F.¹

¹ Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (CSIC). Apdo. 73, 46100. Burjassot (Valencia) España. ² Centre for Chemical and Bioanalytical Sciences, Royal Holloway, University of London, Egham TW20 0EX, U.K.

Introducción

Uno de los principales cambios bioquímicos que tienen lugar durante el proceso de elaboración de jamón curado es la degradación de las proteínas musculares, que es más acusada durante los últimos cuatro meses del proceso de curado (V. Larrea et al., 2006). Por otra parte, la titina es una proteína muscular que se encuentra formando parte de la estructura del sarcómero y es responsable de la elasticidad de las miofibrillas durante los ciclos de contracción y extensión muscular.

Material y métodos

Se tomaron 25 g de músculo *Biceps femoris* de una pieza de jamón curado y se realizó su extracción y posterior desproteinización. 5mL del extracto obtenido se fraccionaron por medio de cromatografía de exclusión molecular en una columna Sephadex G-25. Las fracciones correspondientes a un mayor tamaño molecular se concentraron e inyectaron en un sistema de cromatografía líquida de alta resolución con una columna Nucleosil C18 (250 x 4.6 mm) y un colector de fracciones automático. Las fracciones 41-44 se combinaron y con ellas se realizó una segunda

separación con un gradiente más lento y colección manual de picos. La determinación de las masas moleculares se realizó en un espectrómetro de masas MALDI-TOF Reflex III (Bruker Daltonics) en modo positivo y empleando el ácido 2,5-dihidroxibenzoico como matriz. La identificación de los péptidos más relevantes se realizó mediante cromatografía líquida acoplada a un sistema de espectrometría de masas tándem con detector de tiempo de vuelo API QStar Pulsar i (Applied Biosystems/MDS-SCIEX) y la interpretación de los espectros se realizó utilizando el algoritmo MASCOT.

Resultados

Los resultados obtenidos ponen de manifiesto la intensa degradación proteica que tiene lugar durante la elaboración de jamón curado. En este trabajo se han identificado por primera vez los cuatro fragmentos de titina (O97771) que se describen en la tabla 1.

Según estudios previos, la degradación de proteínas miofibrilares durante el proceso de curado podría ser debida a la actividad de las catépsinas, las cuales son bastante estables y permanecen activas durante todo el proceso de curado (Toldrá et al., 1997).

Tabla 1

<i>Observado</i> ¹	<i>PM</i> ²	<i>Secuencia</i> ³
533.57 (4+)	2130.2391	V.PEIKPAIPLPGPEPKPKPEPE
565.83 (4+)	2259.2950	V.PEIKPAIPLPGPEPKPKPEPE.V
590.40 (4+)	2259.2950	V.KVPEIKPAIPLPGPEPKPKPEPE
622.62 (4+)	2486.4494	V.KVPEIKPAIPLPGPEPKPKPEPE.V

1 Peso Molecular observado en el LC-MS-MS.

2 Peso Molecular de los iones simplemente cargados observados en el MALDI-TOF.

3 Secuencia determinada tras la interpretación de los espectros de MS-MS en MASCOT.

Conclusiones

Cuatro fragmentos de titina han sido aislados e identificados por primera vez en un extracto de jamón curado, confirmándose la extensa proteólisis de esta proteína durante el procesado del mismo. Esta investigación contribuye a conocer más sobre los cambios bioquímicos que tienen lugar en el músculo post-mortem y, particularmente, aque-

llos que afectan a la degradación de la estructura muscular.

Bibliografía

- Larrea V., Hernando I., Quiles A., Lluch M.A., Pérez-Munuera I. *Meat Science*, 2006; 74:586-593.
- Toldrá F., Flores M., Sanz Y. *Food Chemistry*, 1997; 59(4):523-530.

In solution separation of membrane proteins using free flow electrophoresis (FFE)

Obermaier C, Hartmann K, Wildgruber R, Weber G, Eckerskorn C, Nissum M.

BD Diagnostics, Innovation Center Biotechnology, Martinsried, Germany

Introduction

Free-Flow Electrophoresis (FFE) in the isoelectric focusing (IEF) mode provides a carrier-free alternative to 2D-gel electrophoresis that is not limited in pH or size range. So far, the application of IEF-FFE for the separation of membrane proteins has been limited by the tendency of the membrane proteins to precipitate at their isoelectric point (pI). Here we present Interval Zone FFE (IZ-FFE) as a novel mode of FFE. In contrast to IEF, the separation is carried out at a constant pH relying on the net protein charges. The applied pH of the separation medium is selected such that it is different from the pI of the proteins to be separated thereby maintaining proteins in solution that would otherwise precipitate.

Material and methods

A total cell extract from HeLa cells was prepared by sonication in lysis buffer followed by centrifugation. Membrane proteins were extracted by including washing steps in HBS buffer and sodium carbonate buffer and dissolving the final pellet in lysis buffer. IZ-FFE was performed at pH 7.8 on a BD™ FFE System. The separation media contained a proprietary cleavable detergent to increase solubility of the membrane proteins. Collected protein fractions were digested and analyzed using LC-MS/MS. The LC-MS/MS setup consisted of Agilent 1100 binary HPLC system coupled to a Bruker HCTultra ion trap mass spectrometer.