

INHIBIDORES DE TRIPSINA EN ALIMENTOS A BASE DE SOYA: REVISION CRITICA DE LA CINETICA DE DESTRUCCION TERMICA, Y LOS METODOS DE ANALISIS

Roberto Cuevas¹ y Munir Cheryan²

Centro de Investigaciones del Estado para la Producción Experimental Agroindustrial (CIEPE), San Felipe, Venezuela, y Universidad de Illinois, Estados Unidos

RESUMEN

Se hace un análisis, basado en datos en la literatura y de los propios autores, de los posibles mecanismos cinéticos de destrucción térmica de los inhibidores de tripsina (IdT). Se sugiere que la cinética de primer orden rige el mecanismo de destrucción. También se demuestra que el efecto de la temperatura sobre la constante de la velocidad de reacción, para la destrucción térmica de los IdT, puede ser cuantificado en términos de la ecuación de Arrhenius. Los datos cinéticos se utilizaron para ejemplificar la optimización de un proceso térmico, maximizando la destrucción de microorganismos y de los IdT, y minimizando la destrucción de un nutriente.

Manuscrito modificado recibido: 19--5--83.

- 1 Profesional de Investigación, Fundación CIEPE (Centro de Investigaciones del Estado para la Producción Experimental Agroindustrial), Apartado 100, San Felipe, Yaracuy, Venezuela, a quien debe dirigirse cualquier correspondencia relacionada con este trabajo.
- 2 Profesor Asociado de Ingeniería de Alimentos, Universidad de Illinois, Urbana, Illinois 61801, Estados Unidos de América.

Además, se discuten los métodos de análisis de actividad de los inhibidores, haciendo especial énfasis en el método oficial de la AACC. Se demuestra que el método original para el cálculo de la actividad de los IdT no es correcto ni apropiado, como tampoco lo son varias recientes modificaciones. Con miras a resolver esta situación, los autores desarrollaron un modelo mecanístico para representar las reacciones químicas que ocurren en el análisis de los IdT. También se probó que este modelo resuelve los problemas de cálculo e incertidumbre que se han encontrado en el método original o sus modificaciones. Por último, se presentan sugerencias prácticas para la aplicación del método de cálculo propuesto.

INTRODUCCION

Aun cuando las características nutricionales de los productos de soya son de mucha importancia, esos productos contienen sustancias que podrían producir efectos adversos al ser consumidos por animales o por el hombre. En efecto, se ha demostrado que un incremento en el valor nutritivo de los productos de soya es paralelo a la destrucción de la actividad de los inhibidores de tripsina (IdT), los que tienen la característica de inhibir la actividad de ciertas enzimas proteolíticas (1, 2). Las propiedades físicas y químicas de los IdT en productos de soya, su modo de acción, sus efectos fisiológicos, y su posible significado en la nutrición animal y humana, han sido ampliamente comentados por diversos autores (1-6). Sin embargo, se ha dado menor énfasis a las razones cinéticas que ocasionan la destrucción térmica de los inhibidores. Por otro lado, la literatura revela que relativamente pocos autores se preocupan por la idoneidad de los métodos de análisis de la actividad de los IdT.

En el trabajo aquí descrito se efectúa una discusión de los posibles mecanismos cinéticos que gobiernan la destrucción térmica de los inhibidores de tripsina, en productos de soya. También se discuten los métodos de análisis y de cálculo de la actividad de los IdT, y se emiten sugerencias en cuanto a su uso en casos específicos. Sobre todo, se llama la atención hacia el método de cálculo oficial de la AACC, y se presenta una alternativa que, a juicio de los autores, es más adecuada que el método original.

CINETICA DE DESTRUCCION TERMICA DE LOS INHIBIDORES DE TRIPSINA (IdT)

La destrucción térmica de los inhibidores de tripsina (IdT) depende de la temperatura, tiempo de calentamiento, tamaño de partículas y estado físico del producto, así como de las condiciones de humedad (4), y de la presencia de ácidos y bases (1, 7). La inactivación de los IdT en granos de soya se puede lograr por cocción en autoclave durante 15-20 min a 15 psig; por inmersión en agua hirviendo (7, 8); o por cocción en vapor a presión atmosférica; el grado de inactivación depende grandemente de la humedad del grano antes del tratamiento (8-11). Además, la inactivación se acelera mediante la adición de bases durante el procesamiento, y se retarda por la adición de ácidos (7).

Los productos de soya en forma de harina han sido tratados por diversos métodos, siendo el más utilizado el calentamiento con vapor vivo (1, 12-14). La actividad de los IdT se reduce un 90% con un tratamiento de 20 min con vapor a 100°C.

Una tecnología de gran efectividad y versatilidad para el procesamiento de productos sólidos de soya, es la extrusión/cocción a altas presiones y temperaturas. En general, a más altas humedades de extrusión se requieren más cortos tiempos de residencia para lograr grados equivalentes de destrucción de los IdT, tanto en granos o harina de soya, como en mezclas de soya con cereales (15-17). La destrucción de los IdT obtenida puede ser hasta de 100% (15).

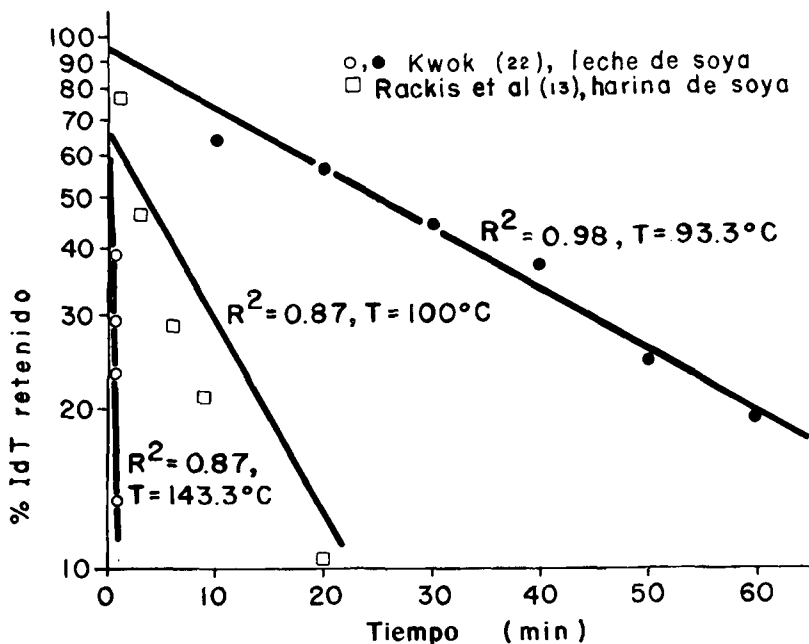
En el caso de extractos acuosos de soya, de 5 a 10 min de cocción en el autoclave son suficientes para obtener 90% de inactivación, a 121°C (18, 19). Un tratamiento consistente en remojo en agua a 4°C por un período de 10 a 12 hr, un escaldado por 3 min a 90°C, y una molienda húmeda por 5 min inmediatamente después del escaldado, reduce el contenido de los IdT en un 62% (11, 20). El procesamiento a 115°C (de 15 a 20 min) en autoclave estacionario, de extractos acuosos de soya envasados en recipientes metálicos, produce un 100% de inactivación de los IdT (21). Si se usa un autoclave giratorio, se obtiene un 95% de destrucción en sólo 3 min de tratamiento (11). La inactivación de los IdT en extractos acuosos de soya procesados a temperaturas ultra altas (UHT), ha sido estudiada por Al-Kishtaini (11) y Kwok (22), usando un intercambiador de calor tubular; por Johnson *et al.* (23), usando infusión de vapor; y por Cuevas, Cheryan y Porter (24) usando un intercambiador de superficie raspada. A

temperaturas de más de 140°C, el tiempo de retención para inactivar al menos 90% de los IdT, es del orden de 1 min.

A pesar que el tratamiento térmico se usa comúnmente para preparar productos de soya, poco se sabe acerca de las reacciones que sufren las proteínas en los casos de calentamiento de los productos (25). Sin embargo, la información disponible en la literatura científica, y los trabajos de los propios autores, permiten establecer ciertas ideas acerca de los mecanismos cinéticos que gobiernan las reacciones de destrucción térmica de los inhibidores de tripsina.

Existen dos posibles órdenes de reacción: cinética de cero orden, y cinética de primer orden. Según Wolf *et al.* (26), la cinética de cero orden (en que la velocidad de reacción es independiente de la concentración de las especies que reaccionan) puede describir la inactivación térmica de los IdT. Dichos autores sugieren que los resultados de Borchers, Ackerson y Sandstedt (27) indican una cinética de cero orden, con una constante de reacción de 0.16 (unidades/unidad de muestra/min a 80°C). Sin embargo, los datos de estos últimos para harina de soya desgrasada, corresponden a un tratamiento en autoclave, lo que podría incluir el tiempo de calentamiento y el tiempo de enfriamiento. Estos tiempos podrían contribuir de manera importante al efecto térmico global del proceso, en el caso de alimentos sólidos, los cuales son calentados por mecanismos de conducción de calor. Además, los datos de Borchers, Ackerson y Sandstedt (27) para temperaturas entre 100°C y 115.5°C, no tienen en cuenta tiempos menores de 10 min. Otros autores (12-14) han informado que con vapor se obtiene un 90% de destrucción en un máximo de 20 min. Por lo tanto, el análisis de los resultados de Borchers *et al.* (27) debe hacerse con cautela, y no de manera concluyente. Se ha encontrado, asimismo, que la cinética que gobierna la velocidad de inactivación de los IdT a 98°C cambia progresivamente de cero a primer orden, si el pH de los extractos acuosos de soya se cambia de 6.8 a 9.9.

La otra posibilidad es que la cinética de destrucción de los IdT por calor sea de primer orden, es decir, que la velocidad de reacción sea proporcional a la concentración de una de las sustancias en reacción. Si los datos de destrucción térmica de los IdT (porcentaje de retención de IdT y tiempo de calentamiento a una temperatura dada) se grafican en coordenadas semilogarítmicas, se obtienen líneas rectas, lo que también aplica a los datos de varias fuentes bibliográficas (11, 12, 19, 22). La Figura 1 muestra algu-



● % IdTret = $94.71e^{-0.026t}$; □ % IdTret = $64.58e^{-0.08t}$;
○ % IdTret = $80.22e^{-1.947t}$

FIGURA 1

Destrucción térmica de inhibidores de tripsina en productos de soya

nos casos. Lo mismo demostraron Johnson *et al.* (23), lo que indica que la cinética de primer orden sí puede describir la reacción de inactivación por calor de los inhibidores de tripsina.

Conviene recordar que hay más de un tipo de inhibidor, y que cuando una pequeña cantidad de actividad de IdT se detecta en muestras tratadas térmicamente, la actividad residual puede deberse al inhibidor del tipo Bowman-Birk. Este tipo de inhibidor es más estable ante los tratamientos térmicos que el inhibidor tipo Kunitz (6). Kwok (22) encontró que al tratar extractos de soya en agua a temperaturas ultra altas, se vislumbraba la posibilidad de la

existencia de fracciones de IdT estables al calor, siendo la fracción Kunitz la que primero se destruye. Johnson *et al.* (23) obtuvieron los mismos resultados, y lograron establecer que la inactivación de los IdT sigue una cinética de primer orden compuesta. Estos autores encontraron que al graficar el logaritmo de la actividad residual de IdT contra el tiempo de tratamiento térmico (a temperatura constante), se obtienen dos porciones rectilíneas en la gráfica. Es posible que la primera porción recta describa la destrucción (siguiendo cinética de primer orden) del inhibidor tipo Kunitz. Por ser este inhibidor termolábil, la pendiente de la línea es grande, indicando una rápida reducción de la actividad de los IdT. La segunda porción recta, con una pendiente que indica reacción lenta, es posterior a la anterior, y podría estar relacionada con la destrucción del inhibidor tipo Bowman-Birk.

El efecto de la temperatura sobre la constante de reacción (k) se puede explicar por medio de la ecuación de Arrhenius (28, 29):

$$k = A e^{-\Delta H/RT} \quad (1)$$

en donde k es la constante de reacción (min^{-1}), A es una constante (el factor de frecuencia de colisiones moleculares), ΔH es el cambio de entalpía requerido para la formación de un complejo activado de las sustancias en reacción, R es la constante de los gases ideales, y T la temperatura absoluta.

La Tabla 1 constituye un resumen de los datos cinéticos del trabajo de Kwok (22), y la Tabla 2 corresponde a los datos de Johnson *et al.* (23), ambas para el tratamiento de extractos acuosos de soya a temperaturas ultra altas. De la Tabla 1 obtenemos, por análisis de regresión:

$$k = 4.56 \times 10^{12} e^{-11797.6/T} \quad (2)$$

con $R^2 = 0.867$, y válida para $366 \leq T \leq 427.6$ °K. Por otro lado, la Tabla 2 nos permite calcular:

$$k = 3.05 \times 10^{13} e^{-12442.6/T} \quad (3)$$

con $R^2 = 0.978$, y válida para $372 \leq T \leq 426$ °K. Los valores de la energía de activación son de 23.4 Kcal/gmol (ecuación 2), y de 24.6 kcal/gmol (ecuación 3). Si se usa la misma metodología que para obtener las ecuaciones 2 y 3, y se combinan los datos de

TABLA 1

**PARAMETROS CINETICOS PARA LA DESTRUCCION DE
INHIBIDORES DE TRIPSINA EN EXTRACTOS ACUOSOS DE SOYA^{a,b}**

Temperatura °K	k min ⁻¹	D _T min
366.5	0.026	88.580
394.3	1.228	1.875
405.4	1.586	1.452
416.5	1.947	1.183
427.6	2.525	0.912

^a Datos obtenidos gráficamente de la fuente (22), y por subsecuente análisis de regresión (31).

^b pH = 6.5.

TABLA 2

**PARAMETROS CINETICOS PARA LA DESTRUCCION DE INHIBIDORES
DE TRIPSINA EN EXTRACTOS ACUOSOS DE SOYA^{a,b}**

Temperatura °K	k min ⁻¹	D _T min
372	0.073	31.667
394	0.727	3.167
405	1.727	1.333
416	3.455	0.667
427	4.935	0.467

^a Datos obtenidos gráficamente de la fuente (23), y por subsecuente análisis de regresión (31).

^b pH = 6.6.

las Tablas 1 y 2 con los datos de Hacklet *et al.* (19), Van Buren *et al.* (18), y Al-Kishtaini (11), todos para leche de soya al pH "natural", obtenemos (para 15 datos):

$$k = 5.67 \times 10^{14} e^{-13822.9/T} \quad (4)$$

con $R^2 = 0.850$, y válida para $366 \leq T \leq 428$ °K. A partir de la ecuación 4 se obtiene la energía de activación (E_a) de 27.4 Kcal/gmol, y el tiempo de reducción decimal a 121°C (D_{121}) de 6.84 min. Lund (30) notifica, para los resultados de Hackler *et al.* (19), el valor $E_a = 18.5$ Kcal/gmol y $D_{121} = 13.3$ min. Puede que la discrepancia de estos valores con respecto a los datos obtenidos a partir de la ecuación 4, se deba a diferencias en los métodos usados para el cálculo de los parámetros cinéticos; al hecho de que los experimentos en que se basan los resultados no fueron lo suficientemente controlados como para arrojar datos cinéticos confiables; o bien al método utilizado para extraer la información de las referencias originales, a fin de realizar los cálculos cinéticos. En todo caso, los datos de las ecuaciones 2 a 4 sugieren que el valor de la energía de activación para la destrucción térmica de los IdT está entre 23 y 27 Kcal/gmol. Sin embargo, es obvio que la técnica experimental para determinar los parámetros cinéticos se debe mejorar, a fin de obtener datos confiables y reproducibles.

Una prueba de significación para la pendiente b_1 (estimador de β_1) en el modelo linearizado (ecuaciones 2 a 4), permite concluir que la regresión entre k y T es significativa al 50/o.

En el caso de productos sólidos de soya, los datos de López y Castillo (32) para el calentamiento de granos de soya permiten estimar $k_{100^\circ\text{C}} = 0.0635 \text{ min}^{-1}$, para la destrucción de los IdT. Los resultados de Rackis, McGhee y Booth (12) y Rackis *et al.* (13) indican que $k_{100^\circ\text{C}} = 0.093 \text{ min}^{-1}$ para el calentamiento por vapor de harina de soya.

De lo comentado anteriormente se deduce que los inhibidores de tripsina pueden ser destruidos por diferentes mecanismos, según el producto de soya de que se trate, y el tratamiento involucrado. Cuando un estudio de inactivación se lleva a cabo, también parece conveniente determinar los parámetros cinéticos, y no asumir que los datos obtenidos para otros productos de soya, o bajo otras condiciones de procesamiento, son aplicables y extrapolables en todos los casos. Además, se concluye que no se puede asumir que la destrucción de los IdT sigue una cinética de primer orden en todos los casos. Ello se complica aún más por la falta de uniformidad en los resultados que se informan en la literatura con respecto a la presentación de datos de destrucción térmica. Algunos autores incluyen el tiempo de calentamiento como parte del tratamiento, mientras que otros consideran el "tiempo cero" como

el momento en que la temperatura de proceso deseada se alcanza. Por otro lado, la base escogida para la presentación de datos (fracción retenida o destruida de IdT) no es consistente de autor a autor; algunos utilizan la concentración a "tiempo cero", y otros la concentración antes del inicio del período de calentamiento; aun se da el caso en que la concentración de IdT en los granos de soya originales se toma como base. Esto resalta la importancia que tiene el escoger una base consistente y acertada para determinar los parámetros cinéticos en la destrucción térmica de los IdT (y de cualquier componente del alimento).

Por supuesto, el desarrollo de los experimentos requiere extremo cuidado a fin de obtener resultados de valor. Algunos de los aspectos a considerar han sido comentados por Hill (29) y por Lenz y Lund (33).

OPTIMIZACION DE PROCESOS TERMICOS EN PRODUCTOS DE SOYA

Desde el punto de vista de optimización de procesos térmicos, el objetivo que se persigue es maximizar la destrucción de los factores no deseados y, a la vez, minimizar la destrucción de los factores deseados en el producto alimenticio. Tomemos, por ejemplo, el caso de un proceso a temperatura ultra alta (UHT), con el propósito de destruir las esporas del *Bacillus stearothermophilus*, cuyos parámetros cinéticos son $D_{121^{\circ}\text{C}} = 1.63$ min y $z = 8.28^{\circ}\text{C}$ (34). Se desea obtener un proceso con un $F_0 = 6$ min; además se pretende minimizar la destrucción de tiamina, la cual tiene un $D_{121^{\circ}\text{C}} = 157$ min, y $z = 25^{\circ}\text{C}$, y según Mulley, Stumbo y Hunting (35) se desea también maximizar la destrucción de los inhibidores de tripsina. Si usamos la ecuación 4, tenemos para los IdT un $D_{121^{\circ}\text{C}} = 6.84$ min, y $z = 26^{\circ}\text{C}$. La Figura 2 presenta la relación entre el tiempo de retención y la temperatura de procesamiento. Según se aprecia, a temperaturas mayores de 114°C , destruiremos más rápidamente el microorganismo que el inhibidor, para una combinación dada de tiempo y temperatura de proceso. Por ejemplo, a 140°C , se necesitan sólo 0.5 seg para destruir las esporas de la bacteria (y obtener un proceso con $F_0 = 6$ min), mientras que para destruir el 90% del inhibidor se requieren 80 seg. Por lo tanto, el diseño del proceso térmico debe estar basado en los IdT (se puede escoger cualquier otro nivel deseado de destrucción de los IdT, con base en consideraciones nutricionales). A 140°C

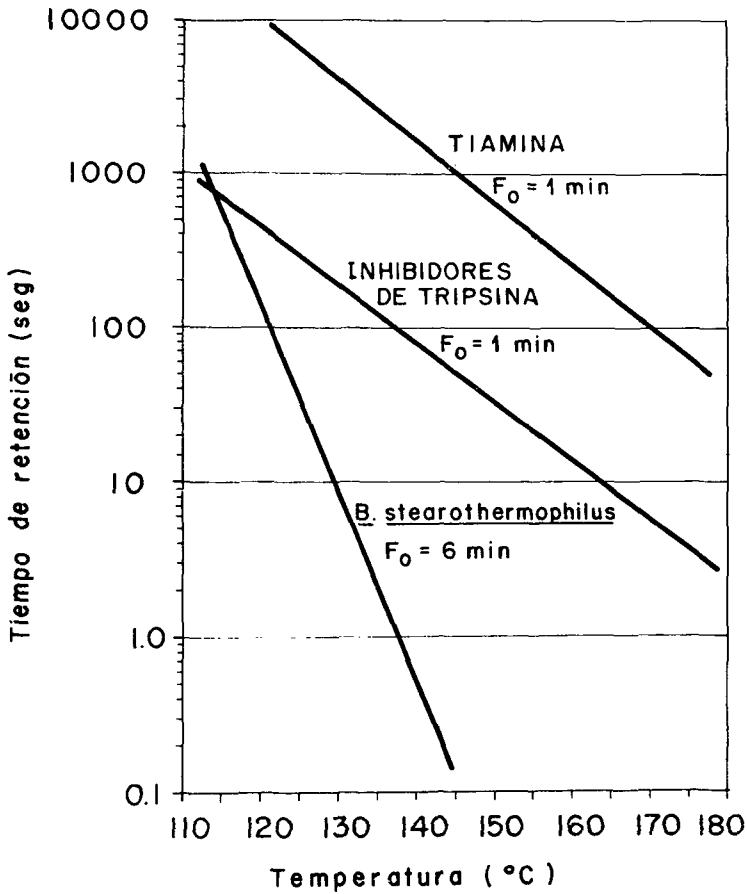


FIGURA 2

Destrucción térmica de componentes de extractos acuosos de soja, a temperaturas ultra altas (UHT)

necesitaríamos aproximadamente 1,600 seg para destruir el 90% de la tiamina presente. Dicho de otra forma, la retención de tiamina sería de aproximadamente 93%, si se procesa 80 seg a 140°C, destruyéndose el 90% de los IdT y prácticamente todas las espo-

ras presentes. Salta a la vista que en este caso se tomaron tres factores únicamente, pero en otros, de acuerdo a las propiedades funcionales deseadas y según el tipo de producto, se podrían tomar otros factores para efectuar la optimización del proceso térmico.

METODOS DE ANALISIS DE INHIBIDORES DE TRIPSINA (IdT) EN PRODUCTOS DE SOYA

Independientemente del uso y propiedades funcionales de los productos de soya, de la tecnología de procesamiento utilizada, y de la estrategia para la optimización de procesos y productos, para determinar los factores antinutricionales es indispensable contar con técnicas analíticas adecuadas. Tal el caso de los inhibidores de tripsina. En algunas circunstancias, los niveles residuales de IdT pueden ser bajos y, por lo tanto, difíciles de determinar. Además, la amplia gama de productos basados en soya que es posible obtener, exige la existencia de métodos *ad hoc*, según sea el caso.

La Tabla 3 presenta los métodos más aplicados en el análisis de la actividad de los IdT de la soya y sus productos. La base común de estos métodos radica en la determinación de la actividad de la tripsina frente a un sustrato, en presencia y en ausencia del producto que contiene los inhibidores provenientes de la soya. Los sustratos utilizados para determinar la actividad de la tripsina pueden ser (36-38): a) proteínas denaturalizadas (hemoglobina, gelatina, caseína); b) los ésteres y amidas de lisina y arginina (benzoil-DL-arginina-p-nitroanilida, (el isómero L); N-benzoil-L-arginina etil éster; N-benzoil-L-argininamida; N-benzoil-L-arginina- β -naftilamida; p-toluenosulfonil-L-arginina metil éster; L-lisina-p-nitroanilida). La tripsina hidroliza uniones en que el grupo carboxilo de la lisina o de la arginina esté presente.

La actividad de los IdT puede ser expresada como unidades de tripsina inhibidas por unidad de peso de referencia (UTI/g de muestra; UTI/g de proteína; UTI/g IdT), o bien en términos de los inhibidores (IdT/g de muestra). En cualquiera de los casos, se debe partir de la respuesta analítica del método usado (densidad óptica, por ejemplo), para calcular y obtener una expresión de la actividad de los IdT.

TABLA 3
METODOS DE ANALISIS DE LA ACTIVIDAD DE LOS INHIBIDORES DE TRIPSINA DE LA SOYA

Autor y referencia	Año	Substrato	Respuesta analítica ^a	Expresión para actividad de IdT ^a	Muestra
Kunitz (39)	1947	Caseína ^b	Densidad óptica a 280 nm	UTI= D.O. muestra sin IdT - D.O. muestra con IdT	IdT cristalizado de harina de soya
Kunitz (39) ^c	1947	Gelatina	Neutralización de COO - y titulación con HCl	UTI = mEq muestra sin IdT - mEq muestra con IdT	IdT cristalizado de harina de soya
Borchers, Ackerson & Sandstedt (27) ^d	1947	Hemoglobina	Densidad óptica a 578,691, ó 730-750 nm	UTI = D.O. muestra sin IdT - D.O. muestra con IdT	Extractos de harina de soya
Green (40) ^e	1953	BAEE ^f	Densidad óptica a 254 nm	Moles de BAEE hidrolizados en presencia de IdT	IdT cristalizado de harina de soya
Van Buren <i>et al.</i> (18) ^g	1964	Gelatina	Tiempo de incubación a 98 ^o F para que la gelatina no gelifique a 32 ^o F	Retardación del tiempo de incubación en presencia de IdT	Leche de soya
Sambeth, Nesheim & Serafin (41) y Simons & Liener (42) ^h	1967 y 1969	BAPA ⁱ	Densidad óptica a 410 nm	UTI= D.O. muestra sin IdT - D.O. muestra con IdT	Extractos de harina, leche de soya, e IdT cristalizado comercial
Collins & Sanders (43) ^j	1976	TAME ^k	Densidad óptica a 247 nm	UTI= D.O. muestra sin IdT - D.O. muestra con IdT	Soya en grano, sus fracciones y aguas de lavado

^a En base a las condiciones del análisis. ^b Kakade, Simons & Liener (42) modificaron este método. ^c Kwok (22) y Baker & Mushtakas (7) modificaron este procedimiento. ^d Basado en el método de M. L. Anson, *J. Gen. Physiol.*, 22: 79, 1939, descrito por Rick (36); usado por Wallace, Banatyne & Khaleque (21) en leche de soya. ^e El método para tripsina fue descrito por Rick (36). ^f N-benzoil-L-arginina-etil éster (hidrocloruro). ^g Basado en el método de E. M. Learmonth, *J. Sci. Food Agr.*, 3: 54, 1952, para harina de soya. ^h Basado en el método de Erlanger, Kokowsky & Cohen (44) para tripsina, con BAPA como sustrato. Modificado por Rackis *et al.* (45) y por Kakade *et al.* (46), originando el método oficial de la AACC (47). ⁱ Benzoil-DL-arginina-p-nitroanilida (hidrocloruro). ^j Basado en el procedimiento de B.C.K. Hummel. *Can. J. Biochem. Physiol.*, 37: 1393, 1959, para tripsina, con TAME como sustrato. ^k p-toluenosulfonil-L-arginina metil éster.

**DISCUSION DEL METODO DE ANALISIS DE LOS INHIBIDORES
DE TRIPSINA APROBADO POR LA AACC**

El trabajo de Erlanger, Kokowsky y Cohen (44), usando benzoil-DL-arginina-p-nitroanilida (BAPA) como sustrato, dio origen al método oficial de la AACC (47) para la determinación de la actividad de los inhibidores de tripsina provenientes de la soya. Numerosos investigadores han utilizado la técnica analítica de Kakade, Simons y Liener (42) y Kakade *et al.* (46), en la cual se basa el método de la AACC (47). Sin embargo, el modo de manejar los datos, sugerido por Kakade *et al.*, tiene dos fallas básicas: a) el primer problema fue observado por Kakade, Simons y Liener (42) y por Rackis *et al.* (45). Cuando se grafica UTI/ml contra ml, tres tipos de curvas se encuentran frecuentemente. El primer caso es la línea recta mostrada en la Figura 3. Kakade *et al.* recomendaron que la actividad de los IdT sea expresada en términos de "cero ml" de la alícuota conteniendo la muestra, lo cual se obtiene por extrapolación de la curva de UTI/ml contra ml, hasta el valor correspondiente a cero ml. La Figura 3 también muestra este método de cálculo: el punto en el cual la línea extrapolada intercepta el eje de las ordenadas se toma como el valor "verdadero" de UTI/ml. El segundo caso es una distribución casi horizontal de puntos (no necesariamente una línea recta), que según Kakade y colaboradores se resuelve dibujando arbitrariamente una línea recta horizontal. El tercer caso, que es una curva con un máximo, o aun con un mínimo, según Smith *et al.* (48), se resuelve tomando el promedio de todos los puntos. Evidentemente, no se cuenta con un método uniforme y objetivo para manejar los resultados del análisis, y es obvio que esto trae consigo incertidumbre en cuanto a los valores obtenidos de la actividad "verdadera" de los IdT.

b) El segundo problema es que el concepto de extrapolación hasta cero ml de alícuota es incorrecto desde el punto de vista matemático, ya que los datos experimentales que se exponen en la Tabla 4, muestran (y por lógica se hace necesario) que si el tamaño de la alícuota tiende a cero ($ml \rightarrow 0$), las UTI tienden a cero ($UTI \rightarrow 0$). Esto implica que, conforme $ml \rightarrow 0$, $UTI/ml \rightarrow \infty$ si $UTI \neq 0$; alternativamente, si $UTI \cong 0$, $UTI/ml \rightarrow 0$. Un análisis de los datos de la Tabla III de Kakade, Simons y Liener (42), muestra que hacer el tamaño de la alícuota más y más pequeño ($ml \rightarrow 0$), hace que UTI/ml sea cada vez mayor ($UTI/ml \rightarrow \infty$).

Sin embargo, al graficar los datos de la manera sugerida por

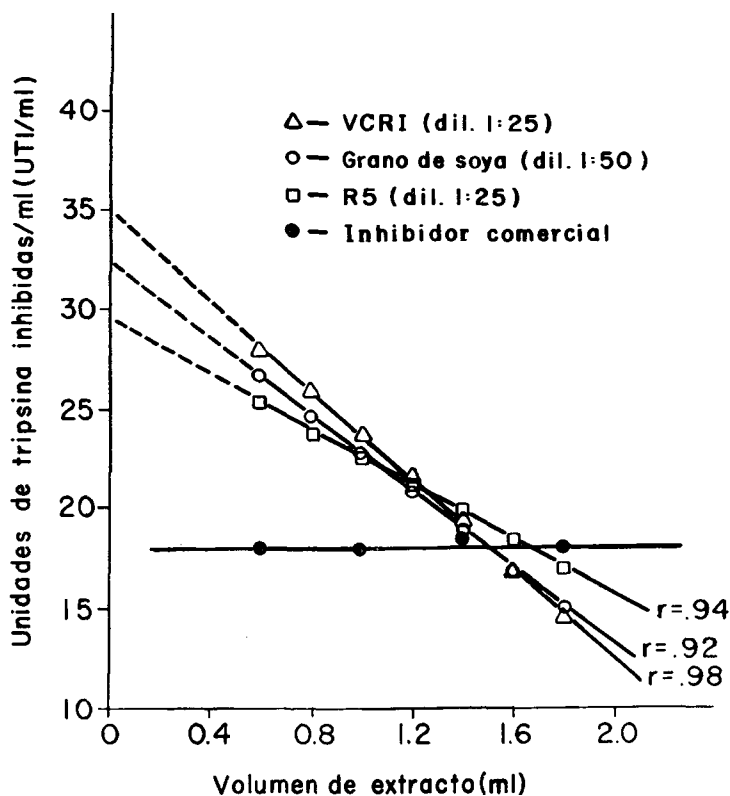


FIGURA 3

Tipos de curvas obtenidas en el análisis de IdT por el método de Kakade *et al.* (46). Tomado de Omosaiye (49). VCRI y R5 son flujos en la ultrafiltración de extractos de soya

Kakade *et al.* (42, 46) (Figura 3), fuerza los datos a que intercepten el eje de las ordenadas en un valor finito, diferente de cero, lo cual no cumple con las condiciones matemáticas arriba expresadas. De hecho, las pendientes de las líneas, y por lo tanto el intercepto (y el valor "verdadero" de la actividad de los IdT), dependerán de

TABLA 4
EFEECTO DEL TAMAÑO DE LA ALICUOTA (ml) DE LA MEZCLA DE ANALISIS,
SOBRE LA ACTIVIDAD DE LOS IdT

Muestra de soya D ^a				Soya entera ^b				Inhibidor comercial ^b			
Volumen de alícuota, ml	D.O. ^c	UTI	$\frac{UTI}{ml}$	Volumen de alícuota, ml	D.O.	UTI	$\frac{UTI}{ml}$	Volumen de alícuota, ml	D.O.	UTI	$\frac{UTI}{ml}$
0	0.480	—	—	0	0.430	—	—	0	0.435	—	—
0.2	0.384	9.6	48.0	0.6	0.268	16.2	27.0	0.6	0.325	11.0	18.33
0.4	0.283	19.7	49.2	0.8	0.232	19.8	24.75	1.0	0.255	18.0	18.00
0.6	0.197	28.3	47.2	1.0	0.202	22.8	22.80	1.4	0.176	25.0	18.50
0.8	0.129	35.1	43.9	1.2	0.176	25.4	21.20	1.8	0.097	34.0	18.80
1.0	0.078	40.2	40.2	1.4	0.165	26.5	18.90				
				1.6	0.157	27.3	17.10				
				1.8	0.156	27.4	15.20				

^a Tomado de Kakade, Simons & Liener (42).

^b Tomado de Omosaiye (49).

^c Densidad óptica.

varios factores, entre ellos el número de alícuotas, el intervalo entre las alícuotas, la cercanía de las alícuotas utilizadas al valor de cero ml, el método gráfico utilizado, etc.

El método de Kakade *et al.* (42, 46) presenta otro aspecto problemático. Cuevas (50), al tratar de calcular la "verdadera" actividad de inhibidores de tripsina usando el método de Kakade *et al.* (46), observó que los resultados presentaban cierto comportamiento, según habían también encontrado Kakade, Simons y Liener (42). Al incrementar la concentración de la substancia que contiene al inhibidor en la mezcla de ensayo, no se obtenía el incremento correspondiente en el nivel de inhibición. Este fenómeno, según se muestra en la Tabla 4, corresponde a dos grupos de datos de la literatura. Por ejemplo, Kakade, Simons y Liener (42), encontraron que el hecho de aumentar el nivel del extracto de soya en la mezcla reactiva, desde 0.2 hasta 0.8 ml, no indujo ningún incremento en las unidades de inhibidores de tripsina, sino que ocasionó que las unidades de inhibición por ml decrecieran, es decir, que no permanecieran en una tendencia constante de crecimiento. Los datos de Omosaiye (49) para soya entera (Tabla 4), también acusan tendencias similares.

La obtención de resultados decrecientes de UTI/ml al incrementar el tamaño de la alícuota puede deberse a diversas causas, características de las reacciones catalizadas por enzimas. Por ejemplo, es posible que se desarrolle alguna forma de competencia entre el substrato sintético (BAPA) y algunas proteínas (diferentes a los propios inhibidores), por la tripsina. En otros términos, aunque el extracto de soya (o cualquier otra muestra que contenga proteínas) no posea actividad de inhibidores de tripsina, el análisis podría mostrar una ligera actividad "inhibitoria" debido a esta competencia. Por lo tanto, al incrementar el tamaño de la muestra en la mezcla de ensayo, no sólo aumenta el contenido de los IdT, sino también el contenido de las proteínas competitivas. Ello resulta en una actividad neta menor que la que se atribuiría a los inhibidores por sí mismos.

Esto explicaría la diferencia entre los resultados obtenidos para soya y los resultados para el inhibidor comercial purificado (Tabla 4). El inhibidor comercial no contiene proteínas competitivas, y por consiguiente, el valor de UTI/ml permanece constante en un amplio rango del tamaño de la alícuota.

Otra posible explicación de las desviaciones del comportamiento lineal de la actividad de los IdT con respecto al tamaño de la alícuota de ensayo, es la disociación del complejo inhibidor de

tripsina-enzima, de acuerdo con lo propuesto por Green (40). También es plausible pensar en que diferentes mecanismos cinéticos podrían intervenir en la reacción, según el tamaño de la alícuota usada, lo que podría abrir la posibilidad de que la reacción dependa de la concentración de alguna de las sustancias presentes.

MODIFICACIONES AL METODO DE LA AACC (45) PARA EL ANALISIS DE LOS DATOS Y EL CALCULO DE LA ACTIVIDAD INHIBITORIA

Se han realizado varios intentos para resolver los problemas encontrados por Kakade *et al.* (42, 46), también discutidos por Rackis *et al.* (45), y analizados en la sección anterior. Las modificaciones consisten esencialmente en: a) usar solo una alícuota, por ejemplo 1 ml de extracto de la muestra (48), o 2 ml (51); el método oficial de la AACC (47) indica obtener una suspensión o extracto de la muestra por analizar, y diluir esta suspensión a fin de que 1 ml produzca una inhibición de 40^o/o a 60^o/o, para luego realizar el análisis en porciones de 0, 0.6, 1.0, 1.4, y 1.8 ml de la suspensión diluida. b) Usar un porcentaje fijo de inhibición, por ejemplo 35^o/o, como lo proponen Egberg, Potter y Honold (52), o 50^o/o (Johnson *et al.* (23)) para expresar la actividad de los inhibidores de tripsina (en lugar de usar la actividad obtenida extrapolando a cero ml de extracto, o tomando un valor promedio, como sugiere el método de la AACC).

Egberg, Potter y Honold (52) usaron un método semi-automático y una ecuación polinomial de 2^o grado para calcular, a partir de la densidad óptica, la concentración de tripsina para cada dilución; este valor sirve entonces para estimar la actividad específica de los IdT, independientemente del efecto del nivel de dilución. No obstante, dichos autores toman como referencia (arbitraria) un 35^o/o de inactivación de la tripsina, en lugar de extrapolar a 0^o/o de reducción de la actividad (como se indica en el método de Kakade *et al.*). Por lo tanto, Egberg, Potter y Honold (52) simplemente evitan el problema de la extrapolación tomando otro camino, igualmente arbitrario. Por otro lado, Smith *et al.* (48) sugieren la siguiente alternativa: estimar la actividad de los IdT equivalente al rango de 40^o/o–60^o/o de inhibición (tal como lo sugieren Kakade *et al.*), preferiblemente 50^o/o, basado en una sola alícuota de 1 ml (y no en una serie de diluciones, como se

indica en el método de la AACC). Esta alternativa, sin embargo, también ignora el hecho de que la densidad óptica obtenida depende del tamaño de la alícuota de la muestra usada en el análisis. Es obvio que varios tamaños de la alícuota implican más trabajo experimental, pero es el único camino a seguir para tomar en consideración el efecto del tamaño de la muestra. Por lo tanto, en el presente trabajo se considera que la alternativa de Smith *et al.* (48) tampoco es adecuada. Otras modificaciones (a nivel de laboratorio) al método de Kakade *et al.* (42, 46) son las siguientes: Churrella, Yeo y Thomson (53) modificaron el método (42) para usarlo en muestras liofilizadas de extractos de aislados de soya y de fórmulas infantiles, teniendo en cuenta la actividad inhibitoria de varias diluciones de los extractos liofilizados. Stewart (54) describió un método para el análisis automatizado (en un Technicon Autoanalyzer, Technicon Sampler II) de los inhibidores, basado en el trabajo de Erlanger, Kokowsky y Cohen (44). El principio del método es similar al de Sambeth, Nesheim y Serafin (41) y Kakade, Simons y Liener (42), pero el substrato usado es el isómero L-BAPA, ya que el DL-BAPA precipitaba en el equipo. El método fue utilizado sólo para IdT comercial. Egberg, Potter y Honold (52) automatizaron el método de Kakade *et al.* (46), para su uso en proteína texturizada de soya.

A pesar de todas estas modificaciones, las fallas del procedimiento para calcular la actividad de los IdT siguen vigentes. Con miras a resolver los problemas y fallas del método de cálculo de la actividad de los IdT (42, 46), y para impartir al análisis de esta actividad una base matemática y bioquímica más sólida, a continuación se recomiendan algunas modificaciones en lo concerniente a la manipulación de los datos (50). El objetivo último del análisis es obtener la concentración de los IdT en el extracto, expresada adecuadamente (UTI/gr, UTI/ml, IdT/gr, etc.). Los datos deben ser tratados como UTI directamente, es decir, en términos de densidad óptica, o de la diferencia entre la densidad óptica del estándar de tripsina (cero ml de extracto en los tubos de ensayo) y la densidad óptica de la alícuota de la muestra. En otras palabras, se debe graficar UTI contra ml de extracto en el análisis, siendo así posible obtener la pendiente de la curva para valores del volumen de la alícuota (ml) cercanos a cero. Un ejemplo de dicha gráfica se presenta en la Figura 4, para diferentes muestras de soya y para el inhibidor purificado (véase Tabla 4 y Figura 3). Hammerstrand, Black y Glover sugieren un tratamiento similar (51). Sin embargo, estos investigadores sugieren que se tome la porción recta de la

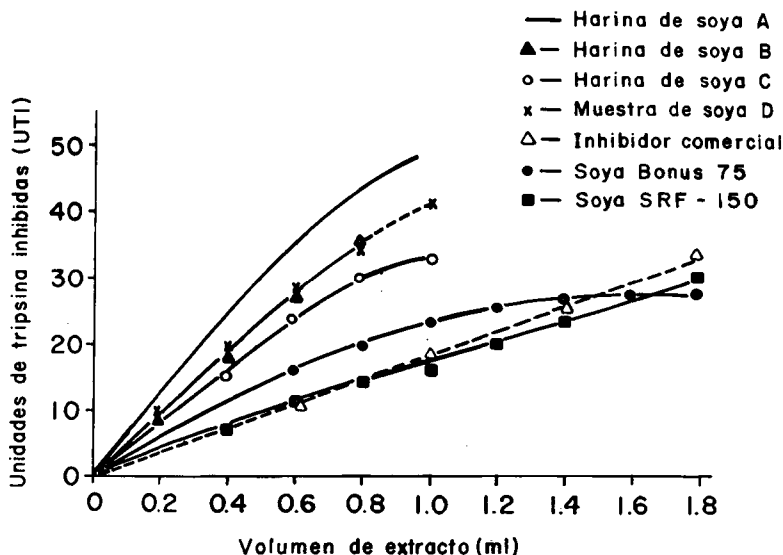


FIGURA 4

Actividad de los inhibidores de tripsina en varios productos de soja (véase Tabla 1 para consultar fuentes de datos)

gráfica (o su extensión), y de ahí se obtenga la actividad de los IdT. Además, sugieren el uso de una sola alícuota para el análisis. Los autores del presente trabajo creen que es más correcto tomar la pendiente inicial de la curva (pendiente cuando $ml \rightarrow 0$), usando varias alícuotas, desde 0 ml hasta 2 ml, en intervalos de 0.1 ó 0.2 ml. El valor de la pendiente cuando $ml \rightarrow 0$ se puede obtener gráficamente, pero es más correcto usar un modelo matemático. Este puede ser de tipo empírico (basado puramente en métodos de regresión), o de tipo mecánico (basado en consideraciones teóricas acerca de los posibles mecanismos bioquímicos que la reacción presenta, y cuyos parámetros se obtienen también por regresión).

MODELO MECANISTICO PARA EL CALCULO DE LA ACTIVIDAD DE LOS INHIBIDORES DE TRIPSINA

Un modelo mecanístico trata de explicar matemáticamente, asumiendo ciertos hechos, un fenómeno bajo estudio. Se realiza así un análisis basado en la teoría y en la experiencia disponibles, en relación al caso estudiado, y se propone una ecuación diferencial. Esta ecuación expresa la ley física que posiblemente gobierna el fenómeno, e incluye los hechos que fueron asumidos. Al resolver esta ecuación (con la cual también se deben postular las condiciones límite o de frontera), se obtiene una expresión que relaciona a las variables dependientes con las variables independientes involucradas en el fenómeno.

El caso de la determinación de la actividad de los inhibidores de tripsina, se trata de una reacción bioquímica. Basándonos en los posibles mecanismos de reacción, podemos postular el tipo de relaciones o leyes cinéticas aplicables. Según han demostrado Erlanger, Kokowsky y Cohen (44), la reacción de hidrólisis de DL-BAPA por acción de la tripsina puede ser descrita por la ecuación cinética de Michaelis-Menten. Por lo tanto, la velocidad de reacción es de primer orden para concentraciones de sustrato $[S]$ pequeñas; y es de cero orden, para concentraciones de sustrato altas (30, 55). En otras palabras, al aumentar $[S]$, el orden de la reacción disminuye de orden uno (velocidad de reacción proporcional a la concentración de sustrato $[S]$), a orden cero (velocidad de reacción proporcional a la concentración de enzima $[E]$). Kakade, Simons y Liener (42) comprobaron que la hidrólisis de DL-BAPA por tripsina sigue una cinética de orden cero. Además, al analizar muestras de productos de soya, la actividad de los inhibidores de tripsina no sigue un comportamiento lineal con respecto a la concentración de los inhibidores (o más exactamente, al tamaño de la muestra o alícuota analizada). Esto ha sido discutido anteriormente. La situación se complica aún más si se tiene en cuenta que la cinética de la inhibición corresponde a inhibición competitiva (con BAPA como sustrato), si los inhibidores presentes son del tipo Bowman-Birk, y a inhibición no competitiva, si los inhibidores son del tipo Kunitz (39).

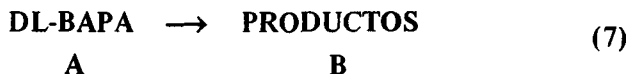
Con estos antecedentes, podemos aseverar que el postular un modelo mecanístico para la actividad de los IdT, puede que no resulte tan sencillo. Sin embargo, podemos hacer las siguientes observaciones, que resumen lo comentado antes:

- i) al aumentar el tamaño de la alícuota analizada, la cual

contiene cierta cantidad de muestra, la cantidad de los IdT aumenta, y también la de otros componentes del producto de soya que podrían competir con el substrato BAPA (de hecho, aun el isómero D del BAPA actúa como inhibidor competitivo en el sistema DL-BAPA/tripsina (33)). Alternativamente, al aumentar la cantidad de muestra también podría aumentar el grado de disociación del complejo inhibidor/enzima. Todo esto hace que una gráfica de la actividad inhibitoria contra el tamaño de la alícuota (es decir, el tamaño de la muestra), siga una relación lineal cuando la alícuota es pequeña, y una relación no lineal decreciente conforme aumenta el tamaño de la alícuota (Figura 4).

ii) por lo tanto, proponemos que el cambio de la actividad inhibitoria (es decir, la razón de disminución de la densidad óptica en el análisis según el método de la AACC (17^o) cuando cambia el tamaño de la alícuota analizada, es directamente proporcional a la cantidad o magnitud de actividad inhibitoria aún por obtener si la alícuota aumentara hasta tamaños muy grandes (ml \rightarrow ∞).

En términos matemáticos, la descomposición de DL-BAPA puede ser representada por:



Si no existe inhibición, la concentración de productos es máxima, y esto corresponde al caso en que no existe muestra de soya presente en la mezcla de análisis; en otras palabras, si ml = 0, [B] = máximo. La tasa (rate) de disminución de [B] al aumentar la alícuota puede expresarse de la siguiente manera:

$$-\frac{d[B]}{dml} \propto [B] - [B]_{\text{mínimo}} \quad (8)$$

en donde [B] es la concentración de productos B para una alícuota de tamaño "ml", y [B]_{mínimo} es la cantidad más pequeña de productos que se puede formar, si se tiene una alícuota suficientemente grande, con gran cantidad de IdT y de otros compuestos con actividad inhibitoria de tripsina. La ecuación 8 también nos dice que la actividad enzimática disminuirá más rápidamente (si se aumenta el tamaño de la alícuota) cuanto más lejos del mínimo de actividad de la tripsina se encuentran las condiciones de la reacción (este comportamiento corresponde a la porción recta de las curvas en la Figura 4). Si introducimos una constante en la ecuación 8, obtenemos:

$$-\frac{d[B]}{dml} = K ([B] - [B]_{\text{mín}}) \quad (9)$$

Puesto que la cantidad de producto B es evaluada ópticamente (47), [B] es proporcional a la densidad óptica. Además, la definición de la actividad de los inhibidores de tripsina (unidades de tripsina inhibidas, UTI) está dada por (42, 46):

$$UTI = (D.O._{ml=0} - D.O._{ml}) \times 100 \quad (10)$$

Por lo tanto, al manipular matemáticamente las ecuaciones 9 y 10 obtenemos:

$$\frac{dUTI}{dml} = K (M - UTI) \quad (11)$$

en donde K es una constante (en ml^{-1}) y M es el valor máximo posible de UTI (correspondiente a $[B]_{\text{mínimo}}$). Los parámetros K y M son característicos de cada muestra particular. Las condiciones matemáticas para la ecuación diferencial 11 son:

$$\begin{aligned} \text{condición inicial: para } ml = 0, \quad UTI = 0 \\ \text{condición de frontera: para } ml = \infty, \quad UTI = M \end{aligned} \quad (12)$$

Al integrar la ecuación 11 con las condiciones dadas en la ecuación 12, resulta:

$$UTI = M (1 - e^{-K ml}) \quad (13)$$

La expresión para UTI dada en la ecuación 13 satisface la condición real del laboratorio, de que si $ml = 0$, $UTI = 0$, por lo que puede ser considerado un modelo mecanístico satisfactorio

(31, 56, 57). La pendiente inicial, que es el valor de UTI/ml para $ml \rightarrow 0$, es:

$$\frac{dUTI}{dml} = K M \quad (14)$$

$ml \rightarrow 0$

Esto quiere decir que K y M son los parámetros necesarios para determinar la actividad "verdadera" de los IdT; así, ninguna de las arbitrariedades sugeridas en el método original (42, 46, 47) o en las más recientes modificaciones (48, 51, 52) necesitan ser introducidas. El valor de $(dUTI/dml)_{ml \rightarrow 0}$ puede ser estimado gráficamente (tomando la pendiente inicial de la gráfica de UTI contra ml), pero esto podría acarrear errores de estimación y apreciación. Es más adecuado estimar K y M, lo cual se puede hacer por regresión no lineal, ya sea por el método de las ecuaciones normales, la técnica de linearización, u otros métodos (31). En el apéndice³ se muestra la aplicación de las ecuaciones normales para la obtención de K y M en un caso específico. Algunos de los métodos de regresión no lineal se encuentran disponibles en paquetes estadísticos para ser usados en computadoras. Por ejemplo, el método de Marquardt está incluido en el paquete SPSS (58), y en la librería IBM; los paquetes BMDP y SAS también cuentan con programas para regresión no lineal (31). La Tabla 5 presenta valores de K y M, obtenidos usando el paquete SPSS, para algunos resultados de la literatura y de los autores. La Tabla 6 muestra una comparación de los valores de la actividad "verdadera" de los IdT, para las muestras de la Tabla 5, obtenidos por el método tradicional (47), y por el procedimiento basado en el modelo mecánico sugerido en este trabajo. Aunque para las muestras seleccionadas las diferencias no son muy grandes, éstas se acentúan de un investigador a otro (debido a lo arbitrario del método de cálculo original), y podrían ser significativas si se expresan como UTI/mg sólidos, tomando en cuenta las diluciones hechas en el

³ El apéndice está disponible, previa solicitud al Dr. R. Cuevas.

TABLA 5

VALORES DE LOS PARAMETROS M, K EN LA ECUACION 13
OBTENIDOS POR REGRESION NO LINEAR*

Muestra	M	K	SCM**
Harina de soya A ¹	89.0639	0.79920	1.5589
Harina de soya B ¹	1682.7550	0.02746	2.9154
Harina de soya C ¹	86.7379	0.50360	10.5530
Muestra de soya D ²	80.5936	0.70280	1.6932
Soya entera ³	32.2499	1.18154	3.3675
Soya entera ⁴	136.0450	0.13762	6.6633
Extracto de soya ⁵	60.0490	0.52760	0.0270
IdT puro ⁶	947.3110	0.01966	1.2059

* Nonlinear Program, Robinson (58).

** Suma de cuadrados = $\sum_i (UTI_i - f_i(m, M, K))^2$ minimizada.

1. Rackis *et al.* (45).
2. Kakade, Simons y Liener (42).
3. Omosaiye (49), soya variedad Bonus 75.
4. Cuevas (50), soya variedad SRF-150.
5. Omosaiye (49), inhibidor tipo 1-S de Sigma Chemical Co., St. Louis, MO., EUA.

análisis. Con el método de cálculo introducido en este trabajo, no sólo se evita la incertidumbre y arbitrariedad al extrapolar a cero ml, o al promediar los valores de UTI/ml, sino que también se logra que el cálculo esté basado en un modelo mecanístico. Este modelo trata de explicar los fenómenos cinéticos que ocurren en el análisis; por lo tanto, la solidez matemática y bioquímica del método de cálculo está garantizada.

TABLA 6

COMPARACION DE LA ACTIVIDAD "VERDADERA" DE LOS IdT
(EXPRESADA COMO UTI/ml) OBTENIDA POR EL METODO DE
CALCULO ORIGINAL, Y POR EL METODO DEL MODELO
MECANISTICO*

Muestra	UTI/ml	
	Método original	Método modelo mecanístico
Harina de soya A	69.0 ^a	71.18
Harina de soya B	46.0 ^b	46.21
Harina de soya C	36.0 ^b	43.68
Harina de soya D	54.0 ^b	56.64
Soya entera (Bonus 75)	32.5 ^a	38.10
Soya entera (SRF-150)	18.4 ^b	18.72
Extracto de soya	35.1 ^a	31.68
IdT comercial	18.4 ^b	18.63

* Véase Tabla 5 para la fuente de datos.

^a Obtenido por extrapolación lineal a 0 ml.

^b Obtenido promediando todos los datos.

SUMMARY

TRIPSIN INHIBITORS IN SOYA-BASED FOODS: CRITICAL REVIEW OF THE THERMAL DESTRUCTION KINETICS, AND ANALYTICAL METHODS

The possible kinetic mechanisms for thermal destruction of trypsin inhibitors (TI) are analyzed in this work, based on literature data and on the authors' data. The authors suggest that first order kinetics describes the destruction mechanism. On the other hand, it is demonstrated that temperature effects on the reaction rate constant for thermal destruction of TI can be quantified in terms of Arrhenius' equation. The kinetic data are used for illustrating thermal process optimization, maximizing microorganisms and TI destruction, and minimizing the destruction of a nutrient.

The analytical methods for TI activity determination are discussed, with special emphasis on the AACC Official Method. The authors show that

the original method for calculating TI activity is neither correct nor appropriate. The same can be said about several recent modifications. In order to solve this situation, the authors developed a mechanistic model, to explain the reactions occurring in the reaction mixture, when analyzing TI activity. Furthermore, it is demonstrated in this paper that the model solves the uncertainties and calculation problems found in the AACC Official Method and in its modifications. Lastly, some practical suggestions for the application of the new calculation method are proposed.

AGRADECIMIENTOS

Esta investigación fue realizada gracias al apoyo económico de la Research Corporation de New York, N. Y., y de la Agricultural Experiment Station, University of Illinois, Urbana, Illinois, EUA. También se agradece a la Fundación CIEPE (Venezuela) la ayuda que gentilmente nos proporcionara para la publicación de este trabajo.

BIBLIOGRAFIA

1. Rackis, J. J. Biological and physiological factors in soybeans. *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, **51**: 161A-174A, 1974.
2. Liener, I. E. Significance for humans of biologically active factors in soybeans and other food legumes. *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, **56**: 121-129, 1979.
3. Liener, I. E. Legume toxins in relation to protein digestibility – a review. *J. Food Sci.*, **41**: 1076-1081, 1976.
4. Liener, I. E. Effects of anti-nutritional and toxic factors on the quantity and utilization of legume proteins. En: **Protein Nutritional Quality of Foods and Feeds**. Vol. 7, Part 2. M. Friedman (Ed.). New York, N. Y., Marcel Dekker, Inc., 1975, p. 523-550.
5. Anderson, R. L., J. J. Rackis & W. H. Tallent. Biologically active substances in soy products. En: **Soy Protein and Human Nutrition**. H. L. Wilke, D. T. Hophins and D. Waggle (Eds.). New York, N. Y., Academic Press, 1979, p. 209-233.
6. Wolf, W. J. & J. C. Cowan. **Soybeans as a Food Source**. Rev. ed. Cleveland, Ohio, CRC Press, Inc., 1975.
7. Baker, E. C. & G. C. Mustakas. Heat inactivation of trypsin inhibitor, lipoxygenase and urease in soybeans: effect of acid and base additives. *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, **50**: 137-141, 1973.

8. Albrecht, W. J., G. C. Mustakas & J. E. McGhee. Rate studies on atmospheric steaming and immersion cooking of soybeans. **Cereal Chem.**, **43**: 400-407, 1966.
9. Nelson, A. I., M. P. Steinberg & L. S. Wei. Illinois process for preparation of soymilk. **J. Food Sci.**, **41**: 57-61, 1976.
10. Rackis, J. J. Soybean trypsin inhibitors: their inactivation during meal processing. **Food Technol.**, **20**: 1482-1484, 1966.
11. Al-Kishtaini, S. F. **Methods of Preparation and Properties of Water Extracts of Soybeans**. Urbana, Champaign, Illinois, University of Illinois, Ph.D. Thesis, 1971.
12. Rackis, J. J., J. E. McGhee & A. N. Booth. Biological threshold levels of soybean trypsin inhibitors by rat bioassay. **Cereal Chem.**, **52**: 85-92, 1975a.
13. Rackis, J. J., J. E. McGhee, D. H. Honig & A. N. Booth. Processing soybeans into foods: selected aspects of nutrition and flavor. **J. Am. Oil Chemists' Soc.**, **52**: 249A-253A, 1975b.
14. Ferrier, L. K. & M. J. López. Preparation of full-fat soy flour by conditioning, heating and grinding. **J. Food Sci.**, **44**: 1017-1021, 1031, 1979.
15. Harper, J. M. **Extrusion of Foods**. Volume II. Boca Raton, Florida, CRC Press, Inc., 1981.
16. Bressani, R., J. E. Braham, L. G. Elías, R. Cuevas & M. R. Molina. Protein quality of a whole corn/whole soybean mixture processed by a simple extrusion cooker. **J. Food Sci.**, **43**: 1563-1565, 1978.
17. Molina, M. R., R. Bressani, R. Cuevas, H. Gudiel & V. Chauvín. Effects of processing variables on some physico-chemical characteristics and nutritive quality of high protein foods. **AICHe Symp. Series**, **74**(172): 153-157, 1978.
18. Van Buren, J. P., K. H. Steinkraus, L. R. Hackler, I. El-Rawi & D. B. Hand. Indices of protein quality of dried soymilk. **Agr. Food Chem.**, **12**: 524, 528, 1964.
19. Hackler, L. R., J. P. Van Buren, K. H. Steinkraus, I. El-Rawi & D. B. Hand. Effect of heat treatment on nutritive value of soymilk protein fed to weanling rats. **J. Food Sci.**, **30**: 723-728, 1965.
20. Omosaiye, O. & M. Cheryan. Ultrafiltration of soybean water extracts: processing characteristics and yields. **J. Food Sci.**, **44**: 1027, 1979.
21. Wallace, G. M., W. R. Bannatyne & A. Khaleque. Studies on the processing and properties of soymilk. II. Effect of processing conditions on the trypsin inhibitor activity and the digestibility *in vitro* of proteins in various soymilk preparations. **J. Sci. Food Agr.**, **22**: 526-531, 1971.
22. Kwok, C. K. **Effect of Heat Treatment on the Trypsin Inhibitor and**

- Urease Activities of Water Extracts of Soybeans.** Urbana, Champaign, Illinois, University of Illinois, M. S. Thesis, 1972.
23. Johnson, L. A., C. W. Deyoe, W. J. Hoover & J. R. Schwenke. Inactivation of trypsin inhibitor in aqueous soybean extracts by direct steam infusion. **Cereal Chem.**, **57**: 376-379, 1980.
 24. Cuevas, R., M. Cheryan & V. L. Porter. Heat transfer and thermal process design in scraped-surface heat exchangers. **AIChE Symp. Series**, en prensa.
 25. Wolf, W. J. Purification and properties of the proteins. En: **Soybeans Chemistry and Technology**. Vol. 1. Rev. 2nd printing. A. K. Smith and S. J. Circle (Eds.). Westport, Conn., The Avi Publishing Co., 1978, p. 93
 26. Wolf, J. C., D. R. Thompson, P. C. Ahn & P. V. J. Hegarty. Kinetics of available lysine losses in a soy protein isolate: confirmation of the 'transition phase' by protein efficiency ratio tests. **J. Food Sci.**, **44**: 294-295, 297, 1979.
 27. Borchers, R., C. W. Ackerson & R. M. Sandstedt. Trypsin inhibitor. III. Determination and heat destruction of the trypsin inhibitor of soybeans. **Arch. Biochem.**, **47**: 362-374, 1947.
 28. Smith, J. M. **Chemical Engineering Kinetics**. 2nd. ed. New York, N. Y., McGraw-Hill Book Company, 1970.
 29. Hill, C. G. **An Introduction to Chemical Engineering Kinetics & Reactor Design**. New York, N. Y., John Wiley & Sons, 1977.
 30. Lund, D. B. Heat processing. En: **Principles of Food Science. Part II. Physical Principles of Food Preservation**. O. Fennema (Ed.). New York, N. Y., Marcel Dekker, Inc., 1975.
 31. Draper, N. R. & H. Smith. **Applied Regression Analysis**. 2nd. ed. New York, N. Y., John Wiley & Sons, Inc., 1981.
 32. López Castillo, M. J. **Preparation of a Full-fat Soy Flour by Conditioning Heating and Grinding**. Urbana, Champaign, Illinois, University of Illinois, M. S. Thesis, 1977.
 33. Lenz, M. K. & D. B. Lund. Experimental procedures for determining destruction kinetics of food components. **Food Technol.**, **34**(2): 51-55, 1980.
 34. Shih, S. C., R. Cuevas, V. L. Porter & M. Cheryan. Inactivation of *Bacillus stearothermophilus* spores in soybean water extracts at ultra high temperatures in a scraped-surface heat exchanger. **J. Food Protection**, **45**(2): 145-149, 1982.
 35. Mulley, E. A., C. R. Stumbo & W. M. Hunting. Kinetics of thiamine degradation by heat. A new method for studying reaction rates in model systems and food products at high temperatures. **J. Food Sci.**, **40**: 985-988, 1975.

36. Rick, W. Trypsin. En: **Methods of Enzymatic Analysis**. H. U. Bergmeyer (Ed.). 2nd. Printing, rev. New York, N. Y. Academic Press, 1965, p. 807-818.
37. Keil, B. Trypsin. En: **The Enzymes**. P. D. Boyer (Ed.). Volume III. Third ed., New York, N. Y., Academic Press, 1971, p. 249-275.
38. Barman, T. E. **Enzyme Handbook**. New York, N. Y., Springer-Verlag. New York, Inc., 1969.
39. Kunitz, M. Crystalline soybean trypsin inhibitor. II. General properties. **J. Gen. Physiol.**, **30**: 291-310, 1947.
40. Green, N. M. Competition among trypsin inhibitors. **J. Biol. Chem.**, **205**: 535-551, 1953.
41. Sambeth, W., M. C. Nesheim & J. A. Serafin. Separation of soybean whey into fractions with different biological activities for chicks and rats. **J. Nutr.**, **92**: 479-490, 1967.
42. Kakade, M. L., N. Simons & E. Liener. An evaluation of natural vs. synthetic substrates for measuring the antitryptic activity of soybean samples. **Cereal Chem.**, **46**: 518-526, 1969.
43. Collins, J. L. & G. G. Sanders. Changes in trypsin inhibitory activity in some soybean varieties during maturation and germination. **J. Food Sci.**, **41**: 168-172, 1976.
44. Erlanger, B. F., N. Kokowsky & W. Cohen. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. **Arch. Biochem. Biophys.**, **95**: 271-278, 1961.
45. Rackis, J. J., J. E. McGhee, I. E. Liener, M. L. Kakade & G. Puski. Problems encountered in measuring trypsin inhibitor activity of soy flour. Report of a collaborative analysis. **Cereal Sci. Today**, **19**: 513-516, 1974.
46. Kakade, M. L., J. J. Rackis, J. E. McGhee & G. Puski. Determination of trypsin inhibitor activity of soy products: a collaborative analysis of an improved procedure. **Cereal Chem.**, **51**: 376-382, 1974.
47. American Association of Cereal Chemists. **Approved Methods of the AACC**. St. Paul, Minn., AACC, Method 71-10 (approved 1973), 1976.
48. Smith, C., W. Van Megen, L. Twaalfhoven & C. Hitchcock. The determination of trypsin inhibitor levels in foodstuffs. **J. Sci. Food Agr.**, **31**: 341-350, 1980.
49. Omosaiye, O. B. **Hollow Fiber Ultrafiltration of Water Extracts of Soybeans**. Urbana-Champaign, Illinois, University of Illinois, Ph.D. Thesis, 1978.
50. Cuevas García, R. **Heat Transfer and Thermal Process Design in Scraped-Surface Heat Exchangers**. Urbana, Champaign, Illinois, University of Illinois, Ph.D. Thesis, 1981.
51. Hamerstrand, G. E., L. T. Black & J. D. Glover. Trypsin inhibitor in soy

- products: modification of the standard analytical procedure. **Cereal Chem.**, **58**: 42-45, 1981.
52. Egberg, D. C., R. H. Potter & G. R. Honold. The semiautomated determination of trypsin inhibitors in textured soy protein. **J. Agr. Food Chem.**, **23**: 603-605, 1975.
 53. Churella, H. R., B. C. Yao & W. A. B. Thomson. Soybean trypsin inhibitor activity of soy infant formulas and its nutritional significance for the rat. **J. Agr. Food Chem.**, **24**: 393-397, 1976.
 54. Stewart, K. K. A method for automated analysis of the activities of trypsin, chymotrypsin, and their inhibitors. **Anal. Biochem.**, **51**: 11-18, 1973.
 55. Richardson, T. Enzymes. En: **Principles of Food Science. Part I. Food Chemistry**. O. Fennema (Ed.). New York, N. Y., Marcel Dekker, Inc., 1976, p. 285-345.
 56. Box, G. E. P., W. G. Hunter & J. S. Hunter. **Statistics for Experimenters**. New York, N. Y., John Wiley & Sons, 1978.
 57. Himmelblau, D. M. **Process Analysis by Statistical Methods**. New York, N. Y., John Wiley & Sons, Inc., 1970.
 58. Robinson, B. **SPSS Subprogram Nonlinear-nonlinear Regression**. Evanston, Ill., Northwestern University, Vogelback Computing Center 1979. (Manual No. 433).