

Inactivación de lipoxigenasas e inhibidores de tripsina en un proceso de obtención de leche de soja por molienda directa y ultra alta temperatura (MD-UAT)

Hugo Geronazzo, Alberto Macoritto, Adela Mercado, María A. Toro, Carlos M. Cuevas

Universidad Nacional de Salta, Buenos Aires, Argentina

RESUMEN. La elaboración de leche de soja mediante un nuevo proceso de Molienda Directa de sémola de soja y Ultra Alta Temperatura (MD-UAT), ha sido objeto de estudios de laboratorio en sus etapas de molienda y tratamientos térmicos, a los efectos de evaluar la extracción de sólidos y proteínas, como así también la inactivación de lipoxigenasas e inhibidores de tripsina (IT). Para la determinación de IT en extractos y leche de soja se modificó el método clásico de Kakade (17). Los mayores rendimientos de extracción en la molienda se obtienen a 70°C durante 2 minutos. La inactivación de lipoxigenasas es notablemente más eficiente durante la molienda si se utiliza solución de carbonato de sodio 0,01M en lugar de agua como medio dispersante (actividad residual de 14% en carbonato frente a 46% en agua), reduciéndose así la generación de sustancias indeseables. Se completa la destrucción de lipoxigenasas con un breve calentamiento de 30 segundos con vapor desde 70 °C hasta la temperatura de ebullición a 96 °C. Por otra parte, los inhibidores de tripsina no son adecuadamente inactivados en la molienda ni tampoco en el tratamiento con vapor a 96°C durante varios minutos. Posteriormente, en la etapa de UAT a 139 °C durante dos minutos se logra la inactivación de los IT hasta los valores considerados aceptables, posibilitando la destrucción simultánea de microorganismos. Estas condiciones se logran sin dificultad en el proceso MD-UAT, cuya flexibilidad permite adecuar temperaturas y tiempos a requerimientos específicos.

Palabras clave: Leche de soja, inhibidores, tratamiento térmico.

INTRODUCCION

En un nuevo proceso de obtención de leche de soja por Molienda Directa y Ultra Alta Temperatura (MD-UAT), la extracción de sólidos y proteínas y la rápida inactivación de lipoxigenasas para reducir la generación de sustancias indeseables, se lleva a cabo mediante la molienda directa en caliente de sémola con agua o soluciones acuosas de carbonato de sodio, seguido de un tratamiento térmico con vapor. Luego de la separación de sólidos residuales y formulación, se completa el proceso con un tratamiento de UAT a los efectos de reducir a niveles aceptables la actividad residual de IT y lograr simultáneamente una eficiente destrucción de microorganismos.

En un trabajo anterior (1) se reportaron rendimientos de extracción de sólidos y proteínas y resultados de experiencias

SUMMARY. Lipoxigenases and trypsin inhibitors inactivation in a soymilk processing by direct milling and ultra high temperature (DM-UHT). Soymilk production by a new process based on Direct Milling of soy grits and Ultra High Temperature (DM-UHT) has been studied at laboratory scale in order to evaluate solids and protein extraction, lipoxigenases (LO) and Trypsin Inhibitors (TI) inactivation during milling and heat-treatment steps. For TI measurements in soy extracts and soymilk a modification of the classical Kakade method (17) was used. Highest extraction yields were accomplished at 70 °C and 2 minutes milling of soy grits. LO was appreciably inactivated when using, as dispersing medium for milling, 0.01M sodium carbonate (Residual Activity 14%) instead of water (Residual Activity 46%), so in this way lower levels of undesired substances can be generated. LO destruction in the resulting suspension was finished by a short heating (30 seconds) from 70 °C to boiling temperature (96 °C). On the other hand, TI were not fully inactivated in milling nor even in the steaming step at 96 °C for many minutes. The TI were inactivated to the accepted levels for soymilk in the final UHT step at 135 °C and 2 minutes, being possible at the same time to carry out the simultaneous microorganisms destruction.

Key words: Soymilk, inhibitors, heat-treatment.

comparativas con otros métodos de obtención de leche de soja, la mayoría de los cuales cuenta con una etapa inicial de hidratación de los granos enteros de soja seguido de una molienda en caliente (2-6). Se ha mencionado que una rápida hidratación térmica de soja descascarada mejora la calidad del producto (7-10).

La destrucción de microorganismos mediante un equipo UAT de planta piloto en leche de soja fue estudiada exhaustivamente en diferentes situaciones operativas (11), los resultados permiten suponer que es posible ajustar la operación del equipo UAT para lograr simultáneamente la inactivación de inhibidores de tripsina y la esterilización del producto. Los sólidos residuales, con un importante contenido de proteínas, pueden utilizarse en fórmulas alimenticias mediante un simple paso de secado e inactivación final (12).

En este trabajo se informa sobre resultados de laboratorio obtenidos en la inactivación de lipoxigenasas y de inhibidores de tripsina durante la preparación de leche de soja en condiciones de molienda directa y Ultra Alta Temperatura, tendientes a perfeccionar el desarrollo del proceso.

MATERIALES Y METODOS

Materia Prima

Se utilizaron granos de soja (*Glycine max*) variedad FT 11 de uso regional (proteínas 40,9%, grasa 19,3% y humedad 9,7%).

La sémola de soja se prepara por molienda de granos enteros en dos etapas consecutivas llevadas a cabo en molino de rodillos estriados. En la primera etapa, de molienda gruesa, se elimina la cáscara por aventado. En la segunda etapa se obtiene sémola de soja de malla 20, que se utiliza de inmediato como materia prima para preparar extractos o leche de soja, según se informa mas adelante.

Preparación de extractos de soja

En un homogeneizador de laboratorio a su máxima velocidad se somete a molienda una parte de sémola de soja de reciente preparación, con nueve partes de agua corriente o solución de carbonato de sodio 0,01M, a temperatura de 70 °C y 80 °C, de unos a tres minutos, y luego se trata la suspensión con vapor para completar la inactivación de lipoxigenasas, según se indica mas adelante. Los extractos de soja se obtuvieron por filtración a través de tela.

Ensayos de inactivación a 139° C

Muestras de 1 ml de los extractos se someten a calentamiento rápido de 15 segundos en baño de parafina hasta 139±1° C en tubos de acero inoxidable de 1.5 ml de capacidad con cierre hermético y se mantienen a dicha temperatura durante diferentes períodos, a los efectos de estudiar la inactivación de inhibidores de tripsina en el producto final (leche de soja) en condiciones de UAT.

En la Figura 1 se muestra el diagrama completo del proceso MD-UAT.

Métodos

Sólido totales y proteínas. Fueron determinados según los métodos 925.23 (extracto seco por gravimetría) y 991.20 (nitrógeno total Kjeldahl por factor 6,25) para leche de vaca de AOAC (13).

Actividad de lipoxigenasas. Se tomó como referencia el método de Al-Obaidy y col (16), que fue adaptado para extractos y leche de soja. Se trabajó a pH 8,9 para favorecer la actividad de la isoenzima L-1, la más activa y estable térmicamente del sistema de lipoxigenasas de la soja (14,15). Se emplea ácido linoleico como sustrato, siguiendo la reacción enzimática mediante lecturas de absorbancia a 234 nm en

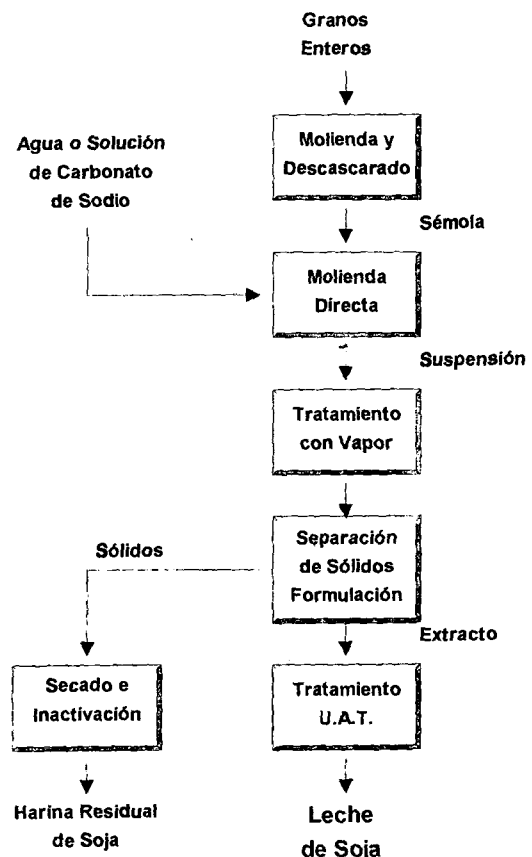
función del tiempo, en un espectrofotómetro de doble haz UV/Visible GBC Mod. 918.

1 Sustrato: Acido linoleico (Aldrich, 99% pureza). Se suspende 100 µl del ácido en 100 ml de buffer borato de pH 8,9 con 200 µl de Tween 20.

2 Técnica: En cada celda se incuban 3 ml de sustrato a 30° C durante 3 minutos y se lleva a cero de absorbancia. Se adicionan 20 µl de muestra filtrada y convenientemente diluida a la celda de medida, se mezcla rápidamente y se mide la absorbancia en función del tiempo a 234 nm. Se define 1 Unidad de Enzima (U.E.) como el incremento de 0.001 unidades de absorbancia por segundo a 234 nm bajo las condiciones del ensayo. En términos prácticos se define "Actividad de lipoxigenasas 100%" al valor de la pendiente en la zona lineal de la curva Absorbancia-Tiempo de la muestra sin tratamiento térmico.

FIGURA 1

Diagrama del proceso MD-UAT para leche de soja



Actividad de inhibidores de tripsina (IT). Para esta determinación se realizó una modificación del método de Kakade y otros (17), que empleaba BAPA (p-benzoil-DL-Arginina-p-nitro-anilida) como sustrato, en buffer Tris a pH 8,2 y 37° C y enzima tripsina. Los productos de la reacción se midieron en el espectrofotómetro GBC a 410 nm.

1 Sustrato: 50 mg de BAPA (N.B.S., U.S.A.) se disuelven en 2 ml de dimetilsulfóxido a 37° C y se llevan a 100 ml con buffer Tris de pH 8,2. El sustrato es estable durante 70 minutos a temperatura ambiente.

2 Enzima: 10 mg de tripsina de origen bovino, recristalizada y libre de sales (Sigma, U.S.A.) se disuelven en 4 ml de HCl 0,001 M.

3 Muestra sustrato-inhibidor (S-I): 50 µl de muestra (extracto o leche de soja) se adicionan a 9 ml de sustrato y se centrifugan 5 minutos a 3500 rpm. En el sobrenadante, muestra S-I, se determina la actividad antitripsina.

4 Técnica: (a) Standard: se incuban 3 ml de sustrato en cada celda a 37° C durante tres minutos y se ajusta a cero de absorbancia. Se adicionan 40 µl de solución de enzima a la celda de medida, se agita rápidamente y se mide la variación de Absorbancia vs Tiempo, a 410 nm. (b) Muestra sustrato-inhibidor: procediendo con la misma secuencia de pasos que en (a), se incuban 3 ml de muestra S-I en ambas celdas, se ajusta a cero de absorbancia, se adiciona 40 µl de la solución de enzima y se mide Absorbancia vs. Tiempo.

Se define "Actividad Residual de Inhibidores de Tripsina 100%" a la diferencia entre pendientes de Absorbancia vs. Tiempo, medidas en la zona lineal, del standard y la muestra S-I correspondiente al extracto de soja crudo, sin tratamiento térmico.

RESULTADOS Y DISCUSION

Extracción de sólidos y proteínas

En un trabajo anterior se determinó que la molienda directa de sémola de soja sin hidratación previa es más eficiente que la molienda de granos hidratados, no sólo por el alto contenido de sólidos solubles logrado, sino también porque su empleo eliminar la etapa de hidratación, simplificando el proceso y minimizando la oxidación de lípidos (1,18). Se ampliaron los estudios de molienda directa a los efectos de observar la influencia del tiempo y la temperatura de molienda en los rendimientos de extracción, empleando como medios dispersantes agua y solución de carbonato de sodio 0,01M. La solución de carbonato se ensayó teniendo en cuenta que en medio levemente alcalino aumenta notablemente la velocidad de inactivación del sistema de lipoxigenasas (3,19,20), efectos que también se han observado en inhibidores de tripsina (4,8). Los resultados de estos ensayos realizados en escala de laboratorio, se observan en la Tabla 1.

TABLA 1
Extracción de sólidos y proteínas en la molienda directa de sémola

Muestra y medio dispersante	Molienda T (°C) t (seg)	pH	Sólidos solubles ^a (g/100 ml)	Proteínas (g/100 ml)	Rendimiento de extracción ^b
1. Agua	70 60	6,65	7,40±0,05	—	62
2. Agua	70 120	6,65	8,30±0,06	3,70±0,06	70
3. Agua	70 180	6,63	8,31±0,05	—	70
4. Agua	80 120	6,60	7,31±0,09	3,30±0,09	61
5. CO ₃ ²⁻	0,01M ^c 70 120	7,80	8,10±0,09	—	68
6. CO ₃ ²⁻	0,01M ^c 80 120	7,70	7,22±0,09	3,20±0,05	60
7. CO ₃ ²⁻	0,02M ^c 70 120	8,40	8,12±0,09	—	68

a Valores promedios de determinación triplicada (± desviación estándar)

b Rendimiento de extracción = (masa sólidos extraídos / masa sémola inicial) x 100.

c Luego de la separación de sólidos residuales, el pH es ajustado a 6,8 con HCl 0,1N

Se puede apreciar la influencia notable de la temperatura de molienda en los rendimientos de extracción de sólidos. Por ejemplo, en agua a 70° C el rendimiento máximo es 70% (muestra 2 y 3), mientras que a 80° C el rendimiento disminuye hasta valores cercanos al 60% (muestra 4). En suspensiones de carbonato, a 70° C los resultados son algo menores a los del agua, para la misma intensidad de molienda. A 80° C los rendimientos de extracción caen notablemente en todas las muestras. El aumento de concentración de carbonato a 0,02M no mejora la extracción de sólidos.

De estos resultados se concluye que los mejores rendimientos de extracción en la molienda se obtienen a 70° C durante 120 segundos, ya sea en agua o en solución de carbonato de sodio 0,01M, condiciones que se emplean en adelante.

Inactivación de lipoxigenasas

En primer término, se estudió la inactivación de lipoxigenasas a 70° C durante un período de 10 minutos que incluye la etapa de molienda de la sémola en caliente. Se emplearon tres medios dispersantes, a saber: (a) agua; (b) agua con leche de vaca al 30%; (c) solución de carbonato de sodio 0,01M. El medio b se seleccionó en base a referencias sobre los efectos desestabilizantes de la caseína sobre el sistema de lipoxigenasas (21).

En la Figura 2 se observa que en agua, luego de los 2 minutos de molienda, la actividad residual de lipoxigenasas disminuye hasta 46% y alcanza valores cercanos al 10% al cabo de los 10 minutos de la experiencia.

Con el medio dispersante b no se observan diferencias significativas respecto del agua, a pesar del nivel relativamente alto de la leche de vaca en la mezcla.

En solución de carbonato se observa una mejora sustancial de la inactivación de lipoxigenasas, siendo su actividad residual 14% al término de la molienda (2 min.) y, determinada a los 4

minutos, dicha actividad es cero.

Los resultados muestran que al cabo de los 2 minutos de molienda a 70° C, aún en las condiciones más favorables ensayadas, no se destruyen totalmente las lipoxigenasas. Con los medios dispersantes a y b la inactivación completa se lograría prolongando excesivamente los tiempos de permanencia de las suspensiones a esa temperatura.

En razón de estos resultados, se estudió la etapa de tratamiento con vapor inmediata a la molienda en caliente para completar la inactivación de lipoxigenasas. Las experiencias, realizadas con agua y carbonato, muestran que es suficiente un calentamiento de las suspensiones con vapor de 1 atm., desde 70° C hasta su temperatura de ebullición (96° C), en 30 segundos para lograr la inactivación total de las lipoxigenasas, como puede observarse en la Tabla 2.

FIGURA 2

Inactivación de lipoxigenasas durante la molienda y el mantenimiento de las suspensiones a 70° C

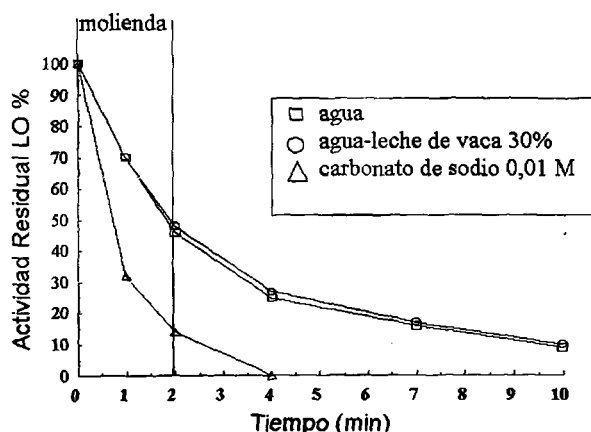


TABLA 2

Inactivación de lipoxigenasas luego de la molienda y calentamiento con vapor hasta 96°C. Medios dispersantes: agua y carbonato de sodio 0,01M

Muestra	Actividad residual de lipoxigenasas, %	
	Agua	Carbonato
Extracto crudo	100	100
Molienda directa, 70°C, 2 min.	46	14
Calentamiento de 70°C a 96°C	0	0

Los resultados se expresan como el promedio de dos determinaciones.

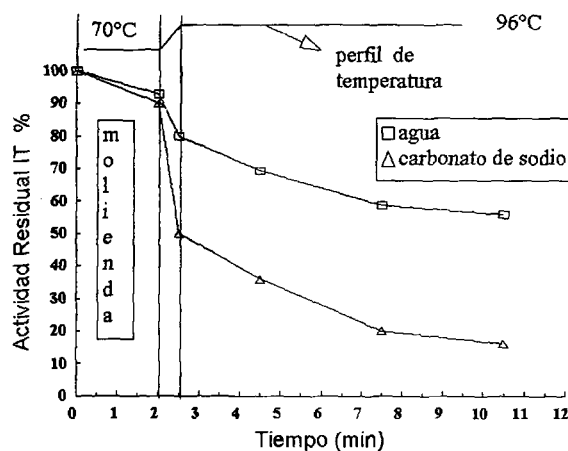
Inactivación de inhibidores de tripsina

Las experiencias se realizaron con el objeto de evaluar la actividad residual de inhibidores de tripsina luego de cada etapa térmica del proceso MD-UAT. En ellas se emplearon los medios dispersantes agua y carbonato de sodio 0,01M.

1 Etapas de molienda y de tratamiento con vapor:

FIGURA 3

Inactivación de inhibidores de tripsina en las etapas de molienda en caliente y de tratamiento con vapor



En la Figura 3 se observa que en la molienda la destrucción de inhibidores de tripsina ya sea en suspensiones de agua o de carbonato es mínima. Pero durante el breve período de calentamiento con vapor de 1 atm para llevar las suspensiones a 96°C (suficiente para completar la inactivación de lipoxigenasas), se logra reducir en forma sustancial la actividad de inhibidores de tripsina, especialmente cuando se empleó carbonato de sodio como medio dispersante durante la molienda. El mantenimiento de las suspensiones a 96°C mediante inyección de vapor durante 8 minutos disminuye la actividad residual hasta 56% y 16% en agua y carbonato, respectivamente. Significa esto que sería necesario emplear tiempos muy prolongados para alcanzar los valores finales aceptables de actividad residual en leche de soja, de alrededor del 10% (4,9).

Las mayores caídas de inhibidores de tripsina se observan en los primeros 5 minutos, tiempo mas que suficiente para la eliminación de volátiles indeseables que pudieran haberse generado por acción de las lipoxigenasas durante la molienda.

La labilidad de los IT a pH alcalinos (obsérvese los datos correspondientes a carbonato) es mayor debido a que los enlaces disulfuros intrapéptidos, que estabilizan a los IT, se tornan inestables en medio básico a temperaturas elevadas (4,22). La inactivación de inhibidores de tripsina también se ve favorecida porque la relación inicial de sémola de soja a fase acuosa está por arriba de 10 g/100 ml, nivel que, según se ha informado, mejora significativamente la inactivación térmica de los IT, probablemente como resultado de su interacción con sustancias de alto peso molecular y con grupos mercaptos libres, que reaccionan a la temperatura de inactivación con los puentes disulfuros de los inhibidores (23,24).

2 Etapa de UAT: La inactivación final de inhibidores de tripsina en el proceso MD-UAT se logra sometiendo muestras de los extractos a condiciones de temperatura y tiempo equivalentes a un tratamiento de ultra alta temperatura.

Para el análisis de esta etapa se seleccionaron muestras de extractos que han experimentado el tratamiento con vapor a 96°C durante dos minutos. Las muestras con carbonato se ajustaron previamente a pH 6,7 con HCl 0,1N, ya que luego del tratamiento por UAT se tiene el producto final, leche de soja, lista para su envasado.

En la Tabla 3 se observa que ambos extractos, con valores iniciales de actividad residual muy diferentes, alcanzan valores aceptables de inhibidores de tripsina al cabo de dos minutos a 139°C. Estas condiciones se logran sin dificultad en el proceso MD-UAT, cuya flexibilidad permite ajustar temperaturas y tiempos a requerimientos específicos de materia prima, medio dispersante o de otros parámetros de procesamiento.

TABLA 3
Inactivación de inhibidores de tripsina en condiciones de ultra alta temperatura a 139°C

Dispersante	Actividad residual de inhibidores de tripsina, %			
	Inicial	1 min.	2 min.	3 min.
Agua	70	32	11	6
Carbonato	36	26	9	5

Los resultados se expresan como el promedio de dos determinaciones.

CONCLUSIONES

1. La etapa de molienda directa de sémola de soja permite eliminar la hidratación previa de los granos, simplificando el proceso y minimizando la oxidación de lípidos. Se obtienen los mejores rendimientos de extracción de sólidos a 70°C durante dos minutos, ya sea empleando agua o solución de carbonato 0,01M como medio dispersante. Al término de esta etapa se logra una importante inactivación de lipoxigenasas, efecto que es muy notable en soluciones de carbonato.
2. En la etapa de tratamiento térmico con vapor, se completa la destrucción de lipoxigenasas en solo 30 segundos de calentamiento de 70°C a 96°C y se logra cierta reducción de inhibidores de tripsina si se mantienen las suspensiones a 96°C, especialmente cuando se emplea carbonato.
3. La etapa final de tratamiento térmico por el sistema UAT, luego de la necesaria separación de sólidos residuales, permite la inactivación de IT en la leche de soja hasta los niveles requeridos, posibilitando simultáneamente la destrucción de microorganismos.

REFERENCIAS

1. Geronazzo H, Macoritto A, Cuevas C, Mercado A, Toro M. Estudios de inactivación de inhibidores de tripsina y rendimiento de sólidos y proteínas en leche de soja obtenida por molienda en caliente y ultra alta temperatura. Anales del I Congreso Ibero-Americano de Engenharia de Alimentos, 1995 Nov 5-9; Campinas (Brasil). Valencia (España): Universidad Politécnica, 1997.
2. Bourne M. Recent advances in soybean milk processing technology. PAG Bull N° 10, 1970; 14-21.
3. Khaleque A, Bannatyne W, Wallace G. Studies on the processing and properties of soy milk. Part I. J Sci Food Agric, 1970; 21:579-83.
4. Wallace G, Bannatyne W, Khaleque A. Studies on processing and properties of soy milk. J Sci Food Agric, 1971; 22:526-31.
5. Nelson A, Steinberg M, Wei L. Illinois process for preparation of soymilk. J Food Sci, 1976; 41:57-61.
6. Johnson K, Snyder H. Soy Milk: a comparison of methods on yields and composition. J Food Sci. 1978; 43:349-53.
7. Wilkens W, Mattick L, Hand D. Effect of processing method oxidative off flavors of soybean milk. Food Technol. 1967; 21:86-9.
8. Johnson L, Deyoe C, Hoover W, Schwenke J. Inactivation of trypsin inhibitors in aqueous soybean extracts by direct steam infusion. Cereal Chem. 1980; 57(6):376-9.
9. Johnson L, Hoover W, Deyoe C, Erickson L, Johnson W, Schwenke J. Modeling the kinetics of heat inactivation of trypsin inhibitors during steam-infusion cooking of soymilk. Transactions of the ASE, 1980; 1326-9.
10. Tuitemwong P, Erikson L, Fung D, Tuitemwong K. Effect of processing temperatures on microbiological and chemical quality of soy milk produced by rapid hydration hydrothermal cooking. J Food Processing and Preservation. 1993; 17:153-75.
11. Geronazzo H, Macoritto A, Blesa O. Elaboración optimizada de bebidas analcohólicas no carbonatadas: una experiencia de transferencia tecnológica. La Alimentación Latinoamericana. 1993; N° 195, 41.
12. Robin J, Macoritto A, Geronazzo, Blesa O. Obtención de harina de soja por molienda húmeda. La Alimentación Latinoamericana. 1993; 197:58-60.
13. Association of Official Agricultural Chemists. Official Methods of Analysis AOAC. 16th ed. 1995.
14. Hildebrand D, Hymowitz T. Two soybean genotypes lipoxigenase-1. JAOCS, 1981; 5:583-6.
15. Ostergaard A, Adler-Nissen J. Thermal denaturation of lipoxigenase from soya beans in the presence of its natural substrate. Lebensm Wiss u Technol. 1988; 21:8-12.
16. Al-Obaidy H, Siddiqui A. Properties of broad beans lipoxigenases. J Food Sci. 1981; 46:622-5.
17. Kakade M, Racki J, Mc Ghee J, Pusking G. Determination of trypsin inhibitor activity of soy products. Cereal Chem. 1974; 51:376.
18. Wolf J. Lipoxigenase and flavor of soybean protein products. J Agr Food Chem. 1975; 23 (2):136-41.
19. Sessa D. Biochemicals aspects of lipid-derived flavor in legumes. J Agric Food Chem. 1979; 27 (3):234-9.

20. Kinsella J, Damodaran S. Flavor problems in soy proteins: origin, nature, control and binding phenomena. In: Charalambous G, editor. The analysis and control of less desirable flavor in foods and beverages. New York: Academic Press, Inc. 1980; 95-131.
21. Laakso S, Esa-Matti L. Milk casein inhibitor of lipoxygenase-catalyzed lipid peroxidation. *J Agric Food Chem*, 1982; 30:913-6.
22. Obara T, Watanabe Y. Heterogeneity of Soybean trypsin inhibitors. Heat inactivation. *Cereal Chem*. 1971; 48:523-6.
23. Ellenrieder G, Geronazzo H, Bondoni A. Thermal inactivation inhibitors in aqueous extracts of soybean, peanuts and kidney beans: presence of substances that accelerate inactivation. *Cereal Chem*. 1980; 57(1):25-7.
24. Ellenrieder G, Blanco S, Bondoni A. Thermal inactivation of inhibitors in aqueous extracts of soybean. Studies on substances that accelerate inactivation. *Cereal Chem*. 1981; 58(4):291-3.

Recibido: 14-11-1996

Aceptado: 17-11-1997