

Modificación enzimática de las propiedades funcionales, nutricias y sensoriales de la soya para alimentación especial

Ana María Calderón de la Barca, Abraham Wall Medrano, Martín Jara Marini,
Aarón F. González Córdova y Adolfo Ruíz Salazar

Dirección de Nutrición, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C., Hermosillo, Sonora, México

RESUMEN. En la producción de fórmulas hipoalérgicas, bebidas fortificadas y nutracéuticos para alimentación especial, se requieren ingredientes ideales. En este estudio, se obtuvieron ingredientes proteicos por medio de hidrólisis y síntesis enzimática con metionina a la proteína de soya. La hidrólisis se realizó al 4% (p/v) con enzimas pancreáticas porcinas al 4% (p/p), 50 °C, 6 h y pH 8. El hidrolizado seco se resuspendió al 20% (p/v) e incubó con 7.6% de metiléster de metionina (p/p), quimotripsina al 1% (p/p) y glicerol 3 M, 37 °C, 3 h y pH 7.0. Antes y después del enriquecimiento (E), el hidrolizado se fraccionó en 3 partes por ultrafiltración (UF): FI>10, 10>FII>3 y 3>FIII>1 kDa. A la proteína nativa y todas las fracciones se les evaluaron propiedades funcionales, aminoácidos, factores antifisiológicos y antigenicidad; así como calidad proteica y características sensoriales a 2 de ellas. La hidrólisis y síntesis modificaron las propiedades proteicas y el enriquecimiento se dio en un mínimo de tiempo y metionina añadida. Después de la UF, las fracciones menores de 10 kDa presentaron solubilidad completa (pH 4 y 7), buena claridad y regular capacidad espumante. La FIII-E por su calidad nutricia, nulas antigenicidad y actividad antifisiológica, puede utilizarse en fórmulas infantiles hipoalérgicas. La FII-E por su composición de aminoácidos es adecuada para fórmulas fortificadas solubles y como única proteína en nutracéuticos. La FI, semejante al aislado comercial, es utilizable amortizando costos. La FI-E por su contenido de metionina, la estabilidad de su espuma, su actividad emulsificante y buen sabor, puede utilizarse en papillas infantiles.
Palabras clave: Proteína de soya, modificación enzimática.

SUMMARY. Enzymatic modification of the functional, nutritional and sensorial properties of soy protein for special nutrition. Production of new protein-based products for special nutrition such as hypoallergenic infant formulas, fortified beverages and nutraceuticals, require ideal ingredients. Protein ingredients were developed by enzymatic hydrolysis and methionine synthesis of soy protein. Hydrolysis was done at 4% (w/v) using porcine pancreatic enzymes (4% w/w), 50 °C, 6 h and pH 8. After drying powder was resuspended (20% w/v) and incubated with 7.6% (w/w) methionine methyl-ester, 1% (w/w) chymotrypsin and 3 M glycerol, 37 °C, 3h and pH 7. Hydrolysates were fractionated by ultrafiltration (UF) before and after enrichment (E): FI>10, 10>FII>3 and 3>FIII>1 kDa. Functional properties, amino acid content, anti-physiological factor activities and antigenicity were assayed for all the UF fractions and the soybean meal. Protein quality bioassay and sensorial test of a non-enriched fraction and an enriched fraction were performed. Functional properties were positively modified by hydrolysis and synthesis by using a minimum time and methionine added for the last reaction. After UF all the fractions under 10 kDa showed 100% solubility (pH 4 and 7), good clarity, acceptable foam capacity and negligible antigenicity and antiphysiological activities. Additionally, methionine enrichment enhanced their nutritional value, upgrading sulfur amino acid requirements for infants and adults. Because functionality and nutritional value FIII-E could be used for hypoallergenic infant formulas, FII-E for fortified soluble formulas and nutraceuticals and FI-E for a semi-solid baby food.
Key words: Soyprotein, enzymatic modification.

INTRODUCCION

En los últimos años han cambiado las tendencias de producción de alimentos. Estos cambios van desde la sustitución de ingredientes para el mejoramiento y eficiencia de procesos tecnológicos hasta el diseño de productos realmente novedosos. Las características de algunos alimentos nuevos los hacen más accesibles a los consumidores; otros, se han desarrollado para nutrir a personas con necesidades especiales. Son ejemplos de la nueva tecnología de producción de alimentos basada en «ingredientes ideales», las fórmulas infantiles hipoalérgicas, las bebidas fortificadas para adultos y los nutracéuticos.

En esta nueva era, las proteínas siguen siendo primordiales. El desarrollo de nuevos productos proteínicos «ideales» ha motivado al especialista en alimentos a buscar alternativas para obtener proteínas con buenas propiedades. La reacción plasteínica es un ejemplo de esta nueva tendencia, la cual permite el “moldeo” de proteínas de calidad intermedia y bajo costo, hidrolizándolas y uniéndoles aminoácidos covalentemente (1,2). Esta tecnología enzimática, se basa en la capacidad que tienen las proteasas de actuar no sólo como hidrolasas sino también como transferasas (3). Esta modificación proteica ya se había intentado en alimentos en la década de los 70's, en el afán de cubrir la supuesta necesidad de proteína de alta calidad nutritiva (4). Ahora, se ha recuperado

la idea por la accesibilidad de los procesos tecnológicos modernos que la abaratan. De este modo, se está utilizando para la obtención de péptidos terapéuticos y edulcorantes, tales como el Aspartame[®] (3).

Parte de la tecnología de modificación enzimática, se usa ya en las fórmulas infantiles hipoalergénicas que son hidrolizados de proteínas de leche de vaca. Uno de los problemas de este tipo de productos es la falta de control del tamaño de los péptidos (5); lo cual ocasiona respuestas alérgicas en lactantes con hipersensibilidad (6). Además, las fórmulas infantiles hipoalergénicas son demasiado caras.

Por otra parte, las bebidas fortificadas como Ensure[®] o Sustacal[®], para personas con problemas de mala absorción como los de la tercera edad, aunque contienen proteínas de buena calidad, no tienen nada especial que permita que se digieran o absorban mejor. También este tipo de productos resulta caro, especialmente en los países emergentes en donde no se fabrican.

Así, se están importando a los países de América Latina dos clases de productos: las fórmulas infantiles hipoalergénicas y las bebidas para personas con problemas de malabsorción, a un costo demasiado elevado. Es por ello que los sistemas de seguridad social y los particulares tienen problemas para mantener este tipo de alimentación. El reto para la industria es producir proteínas con las características más adecuadas y a menor costo, para formular estos productos, no sólo para consumo local, sino para sustituir algunos de los existentes en el mercado internacional. Para ello, se propone la modificación enzimática de proteína de soya de bajo costo, enriqueciéndola con metionina y fraccionándola por ultrafiltración. De esta forma, se lograrán péptidos de tamaño definido, con concentraciones adecuadas de aminoácidos y con propiedades fisicoquímicas ideales para la formulación de productos nutritivos y agradables a los sentidos de las personas con necesidades nutricias específicas.

MATERIALES Y METODOS

Materiales

Se usó pasta de soya (Gamesa, S.A.) con un tamaño de partícula semejante al de una harina comercial, con una concentración de proteína 46.3% y 9.5% de humedad. Para la hidrólisis se utilizó un concentrado enzimático de páncreas de cerdo obtenido en el laboratorio (7), con actividades de tripsina y quimotripsina de 12.2×10^{-3} y 6.9×10^{-3} µg de p-nitroanilida/min/mg de concentrado, respectivamente. Para la síntesis enzimática se utilizó α-quimotripsina tipo II de páncreas bovino (Sigma Chemical Co. St. Louis, MI.).

Hidrólisis y síntesis enzimáticas

La hidrólisis y síntesis se realizaron de acuerdo a las condiciones obtenidas en un trabajo previo, utilizando un concentrado enzimático de páncreas porcino para la primera y

quimotripsina comercial para la síntesis (7). Brevemente, la concentración de pasta de soya para la hidrólisis fue de 4% p/v y la relación enzima/sustrato de 4% p/p, a 50 °C durante 6 h, manteniendo el pH a 8 e inactivando al final a 85 °C por 15 min. Finalmente, se deshidrató el producto por aspersión (LAB S1/WO 21086 de APV Anhydro Inc., Attleboro Falls, Mass.), con temperaturas de entrada y salida de 200 y 90 °C, respectivamente.

Para enriquecer el hidrolizado con metionina, se utilizó una concentración de 0.07585 g de metil éster de metionina (ME-Met)/g de hidrolizado (0.05666 g de Met/g), una concentración del hidrolizado de soya de 20% (p/v), una relación de quimotripsina/sustrato de 1/100 p/p y glicerol 3 M. La mezcla se incubó a 37°C a pH 7.0, durante 3 h para posteriormente inactivarse a 85° por 15 min. La remoción total de aminoácidos libres se realizó por ultrafiltración.

Ultrafiltración (UF) de los hidrolizados antes y después de la síntesis

En un ensayo preliminar, se fraccionó en 3 partes el hidrolizado de soya por UF en una celda (Amicon, mod. 8 200): FI>10 kDa, 10>FII>3 kDa y 3>FIIIa>0.5 kDa. Luego se escaló a un equipo de cartucho (Amicon, mod. CH2) y se obtuvieron las 3 fracciones, excepto que la FIII fue entre 1 y 3 kDa (FIII), así se ultrafiltraron tanto el hidrolizado sin enriquecer, como el enriquecido (síntesis), asegurando por ultrafiltración la remoción total de Met libre.

Evaluación de las propiedades funcionales

A las fracciones de hidrólisis y síntesis se les evaluaron solubilidad (8), claridad y espumado (9), en muestras acuosas al 1% p/v a pH 4 y 7. También se analizó actividad emulsificante (10) a pH de 7. Los resultados obtenidos se analizaron utilizando un diseño de bloques (2 x 3) completamente al azar, comparando los 2 tipos de hidrolizados (enriquecido y no enriquecido) en 3 niveles (fracciones: FI>10 kDa, 10>FII>3 kDa y 3>FIII>1 kDa).

Análisis de aminoácidos

La composición de aminoácidos de los productos y la estimación de metionina unida en las fracciones enriquecidas, se determinó por cromatografía líquida de alta resolución después de digerir con HCl 6 N (11).

Evaluación biológica de calidad de proteína

En dos experimentos secuenciales se evaluaron una fracción peptídica sin enriquecer de bajo peso molecular (FIIIa), una combinación de fracciones enriquecidas de polipéptidos de peso molecular alto (FI-E + FII-E), un producto comercial a base de aislado de soya y caseinato (Ensure[®]), y una proteína de referencia (Caseina ANRC). La evaluación se hizo en ratas Sprague Dawley recién destetadas, de 53.9 g promedio, en jaulas metabólicas (NALGENE), a 25 °C, ciclos luz-oscuri-

dad de 12 h, humedad relativa de 50-65% y libre acceso a dieta y agua. Los bioensayos fueron aprobados por un comité de ética interno. Las dietas formuladas fueron isoenergéticas con un nivel de proteína al 10% (12). Empleando un diseño en bloques completamente al azar, se asignaron 6 ratas a cada dieta y 4 a una dieta libre de nitrógeno. Se llevaron registros diarios de peso, proteína ingerida y excreción de orina y heces. Se determinó el contenido de nitrógeno en heces, orina y dietas y humedad de las dietas (12). La calidad proteica se evaluó como utilización neta de proteína (NPU) y digestibilidad verdadera (13). Dichos estimadores fueron comparados por análisis de varianza (GLM-ANOVA) y por comparación de medias de Tukey-Kramer (14).

Evaluación de factores antifisiológicos

Se determinó actividad de inhibidor de tripsina (método 71-10) (15), a la pasta de soya, hidrolizado, FIIIa y todas las fracciones enriquecidas de soya. La extracción se hizo por triplicado agitando 1 g de muestra en 50 ml de NaOH 0.01 N, 3 h. Los resultados se reportaron como unidades de inhibidor de tripsina/ g proteína (UIT/g proteína). A estos mismo materiales y las fracciones no enriquecidas se les determinó actividad de lectina por prueba de hemaglutinación con doble dilución seriada, con eritrocitos humanos tripsinizados al 2% en buffer de fosfatos 0.1M. El título de hemaglutinación (TH) se tomó como el inverso de la última dilución que mostró aglutinación (16).

Antigenicidad

Se produjeron anticuerpos anti-pasta de soya en conejos (17), se purificaron en proteína A (Kem-En-Tec, Dinamarca) y se midió su actividad (18). El potencial antigénico de la pasta de soya y sus hidrolizados se midió con un inmunoensayo ligado a enzimas (ELISA) (19). Se utilizaron buffer de cubierta de carbonatos 100 mM, pH 9.6; buffer de lavado y dilución: Tris 0.1 M/HCl, pH 7.4 + 0.05% Tween-20. Para el lavado final, se utilizó buffer salino de fosfatos (PO_4^{3-} 0.02M + NaCl 0.15 M). Se cargaron 100 μl de las muestras diluidas por duplicado en las placas de ELISA y se incubaron a 4 °C, 12 h. Se bloquearon con leche al 1%; se incubaron con los anticuerpos anti-pasta de soya (1:500) y se detectaron con anticuerpos de puerco anti-inmoglobulinas de conejo, peroxidados y TMB (tetrametilbencidina). Se leyó 450 nm (Bio-Rad, Mod. 450).

Evaluación sensorial

Se evaluaron dos fracciones enriquecidas con Met: FI-E y FII-E. Para ello, se seleccionó un panel entre 10 individuos con una serie de 25 pruebas triangulares (20). Se determinó su capacidad de discernir entre dos muestras iguales (cafeína al 0.07%) y una desigual de agua destilada (21), misma prueba que se usó para sensibilizarlos al reconocimiento del sabor amargo. De allí se seleccionaron los más sensibles, a los cuales se les explicó y entrenó para discriminar diferencias de intensidad del sabor amargo utilizando cafeína al 0.03% (amargor

ligero), 0.07% (poco amargo), 0.1% (muy amargo) y 1% (extremadamente amargo), de acuerdo a Jellinek (1989). La evaluación se hizo por medio de pruebas de intervalos con una escala continua no estructurada, con extremos "ligeramente amargo" y "extremadamente amargo". El análisis de los resultados se realizó por t de Student (14).

RESULTADOS Y DISCUSION

Hidrólisis y síntesis

El grado de hidrólisis de la proteína de soya, a las 6 h fue de 23.5%, de acuerdo a la cantidad de NaOH gastada para mantener el pH en 8 (23). En el proceso de obtención del hidrolizado, hay dos puntos principales de pérdidas de material proteico: en el primero, se perdió un 17.6% con respecto al contenido inicial, al aplicar una centrifugación ligera para remover el material insoluble después de la hidrólisis. Después, en el secado por aspersión se perdió otro 20%, pérdida que aunque onerosa, podría ser conveniente si se considera que el secador de espreas procesa 2 L de hidrolizado en una hora, sin afectar las propiedades funcionales del producto. Esta aseveración se hace en base a la comparación de las propiedades y el rendimiento obtenidos para un hidrolizado secado en liofilizador (7) y los presentados por el hidrolizado secado en este estudio. Desde el punto de vista industrial, es más conveniente el secado por aspersión, ya que muy pocas industrias cuentan con un liofilizador.

Por otra parte, la reacción de plasteína es un proceso enzimático alternativo a la hidrólisis para producir resíntesis. Esta consiste en incubar, a un pH óptimo, una solución muy concentrada (30-50% p/v) de hidrolizado con una proteasa (24). Esta reacción, como la de hidrólisis es controlada por la concentración de proteína, la actividad de agua del medio de reacción y la naturaleza hidrofóbica de las especies involucradas. Aunque esta reacción se conoce desde hace años, hasta hace poco solo era una curiosidad, con poca aplicación en alimentos.

FAO/WHO recomienda 4.2 g de Metionina+Cisteína (Met+Cis)/100 g de proteína para infantes y 2.5 g de estos mismos, para los otros grupos de edad. Considerando 1-2% de Cis en la soya (25,23), se requeriría un 3.2% de Met para una fórmula infantil y 1.5% para otros productos. En este estudio se logró enlazar hasta un 3.5% extra de metionina al 1.45% que contenía el hidrolizado antes de enriquecerlo, obteniéndose con ello un 4.95% de metionina total. La metionina sola sobrepasa el requerimiento de aminoácidos azufrados para cualquier grupo etario. La cantidad de metionina añadida a la mezcla de reacción fue de 3 a 8 veces menor que la utilizada por Hájós et al. y Hussein et al. para enriquecer otras proteínas con el mismo aminoácido para el mismo nivel de enriquecimiento. También el tiempo de reacción disminuyó en 5.3 veces con respecto al utilizado en los dos estudios señalados. La disminución en los dos parámetros, significa

una posibilidad grande de abatir costos y hacer de este proceso una aplicación real.

Ultrafiltración fraccionada (UF)

En el primer modelo a nivel laboratorio, se ultrafiltró secuencialmente la proteína de soya hidrolizada en una celda de 200 ml, con membranas planas. Se obtuvieron fracciones mayores de 10 kDa (FI), entre 3 y 10 kDa (FII) y entre 0.5 y 3 kDa (FIIIa). En este caso, el objetivo era obtener el máximo de la fracción de menor masa molecular (FIIIa), que sería la más útil en fórmulas infantiles hipoalergénicas, ya que los péptidos menores de 3 kDa no producen respuesta antigénica ni alérgica (27). De acuerdo a los resultados del balance de masa la FIIIa fue aumentando de 5.2% de proteína al inicio de la hidrólisis, a 18.6% a las 6 h, con un máximo de 21.9% a las 12 h y una disminución a 18.5% a las 24 h. Por otro lado, la proporción de proteína en el permeado de la FIIIa, aumentó desde un 2.6% al tiempo 0 hasta un máximo de 14.3% a las 24 h. Esto sugiere que la FIIIa se estaba degradando entre las 12 y las 24 h; por ello, el tiempo de 12 h fue el óptimo de hidrólisis.

Después del primer ensayo en la celda pequeña, se escaló a un equipo de UF de cartucho (como los utilizados a nivel industrial). Los rendimientos variaron para cada una de las fracciones; primero porque la FIII ya no incluyó los péptidos menores de 1 kDa y segundo porque la hidrólisis fue de 6 h. Así se ultrafiltraron secuencialmente tanto el hidrolizado sin enriquecer como el enriquecido, obteniéndose fracciones mayores de 10 kDa, entre 3 y 10 kDa y entre 1 y 3 kDa. Estas se denominaron FI, FII y FIII (las no enriquecidas) y FI-E, FII-E y FIII-E (las enriquecidas con metionina), respectivamente. La medida del corte de las membranas en peso molecular, corresponde casi exactamente a la especificación de cada una de ellas, como pudo comprobarse previamente por filtración en gel (7). En la Tabla 1 se muestran los porcentajes de proteína obtenidos al ultrafiltrar el hidrolizado (obtenido de ambos procesos de UF) antes y después (sólo la UF en cartucho) de la síntesis. Como se observa, la actividad hidrolítica continua durante la segunda fase de la modificación enzimática.

TABLA 1
Distribución de proteína antes y después de enriquecimiento con metionina de los hidrolizados

Fracción	% Proteína	
	UF celda	UF cartucho
FI +FII	52.3	55.7
FIII	25.1	9.0
FI-E+FII-E		23.6
FIII-E		28.5

En el procedimiento de enfriado y centrifugación inmediato a la hidrólisis, se recuperó sólo el sobrenadante conte-

niendo polipéptidos y otras moléculas solubles. Esto permitió la remoción de moléculas no proteicas ya que en la fracción de hidrólisis la concentración de proteínas aumentó a 59%, mientras la pasta contenía solo un 46%. Durante el proceso de ultrafiltración posterior a la síntesis, se removieron aún más moléculas no proteicas incrementando la concentración de proteínas en las fracciones del sintetizado hasta 82.4%.

Aunque se lograron concentraciones altas de proteína en las fracciones, el rendimiento total después de la síntesis fue bajo (52%), debido a que la quimotripsina induce parcialmente la hidrólisis y los péptidos menores de 1 kDa se pierden. Para fines de producción industrial se debe optimizar el proceso de acuerdo a la fracción proteica que se vaya a utilizar. Así por ejemplo, si se quiere producir una fórmula hipoalérgica, se debe obtener primordialmente la FIII-E, utilizar las otras fracciones para amortizar costos y sacrificar los péptidos menores de 1 kDa. Esto último, se podría mejorar si se desarrollan membranas de 500 Da de punto de corte para nivel industrial, porque la fracción de 500-1000 Da es también útil. Ya que actualmente se utiliza en forma industrial la hidrólisis enzimática, el proceso industrial es rentable. Por ello, también lo sería la síntesis enzimática que no requiere de infraestructura adicional y sólo aumenta ligeramente el tiempo de procesamiento.

Propiedades funcionales

El comportamiento funcional de los polipéptidos está determinado por una serie de interacciones que relaciona a un conjunto de propiedades (1,28). Todas las fracciones menores de 10 kDa presentaron 100% de solubilidad a los pH ensayados (Figura 1). Es especialmente interesante este dato para el pH 7, que se aproxima al de las fórmulas infantiles (6,8), ya que el aislado de soya comercial -usado en las fórmulas infantiles- presentó sólo un 64.5% de solubilidad a pH 7. La solubilidad de la fracción FI-E>10 kDa fue 10% menor a pH 7 que las demás fracciones y el hidrolizado completo, pero mayor que la del aislado comercial. Las soluciones más turbias (Figura 2) las produjeron las fracciones con menor solubilidad; tal fue el caso de la FI-E>10 kDa con solubilidades bajas y valores de turbidez altos a los dos pH's.

Los polipéptidos deben ser solubles en fase acuosa para tener capacidad de espumado. Así, las moléculas se despliegan en la interfase, para formar capas cohesivas alrededor de las burbujas de aire. Tal fue el caso de la pasta y el aislado, con la solubilidad y espumado más bajas a pH 4 (Figura 3). Una excepción fue la FI>10 kDa con solubilidad 60% menor a pH 4 que a pH 7 y con espumado mayor ($p < 0.05$) a pH 4. Incluso a un mismo pH, el comportamiento de las fracciones no fue homogéneo ya que en las de solubilidad igual a 100%, la capacidad de espumado varió. Por otra parte, los péptidos de mayor tamaño producen espumas más estables (9), una muestra fueron las FI>10 kDa y 10>FII>3 kDa, pero no la FI-E>10 kDa, debido a su baja solubilidad.

FIGURA 1

Solubilidad de la pasta, aislado comercial, hidrolizado y las fracciones de soja a pH 4 y 7

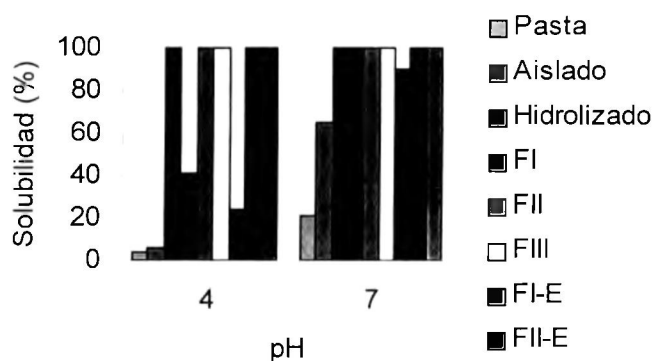


FIGURA 2

Turbidez del aislado, hidrolizado y fracciones de soja después de 30 minutos a pH 4 y 7

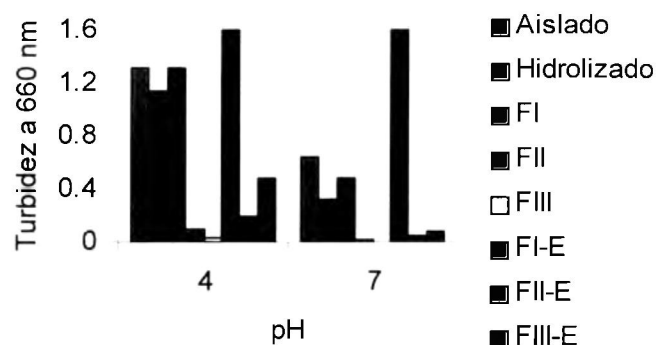
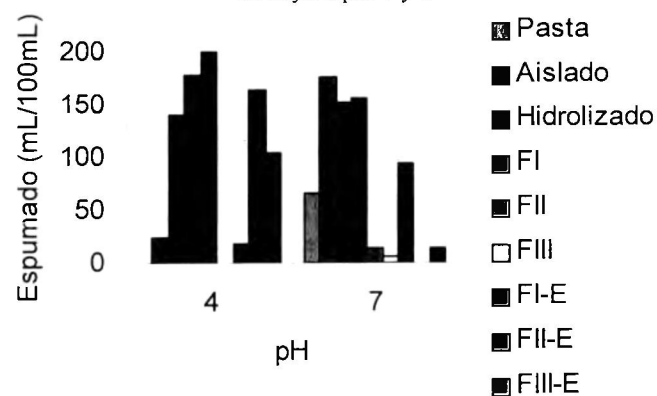


FIGURA 3

Espumado de la pasta, aislado, hidrolizado y fracciones de soja a pH 4 y 7

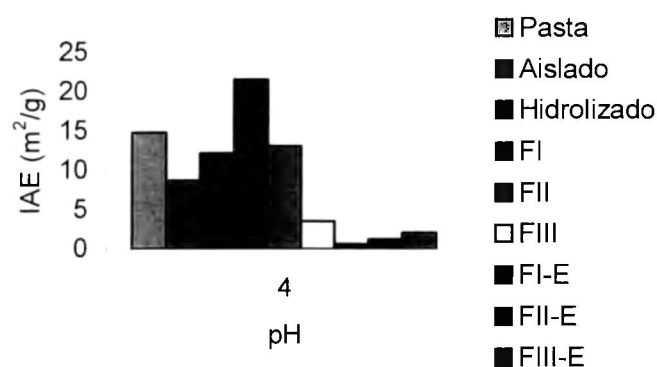


La solubilidad completa a estos pH's y buena claridad en general, hacen a las fracciones obtenidas aptas para bebidas fortificadas, como los suplementos para deportistas o ancianos (29, 1). Si se considera su buena capacidad de espumado, también es posible su uso en bebidas fortificadas para la población en general. Por otro lado, la buena actividad

emulsificante de la FI > 10 kDa (Figura 4), la hace apta para embutidos (29).

FIGURA 4

Índice de actividad emulsificante de la pasta, aislado, hidrolizado y fracciones a pH 7



Composición de aminoácidos

La determinación del perfil de aminoácidos en una proteína ha sido utilizado como predictor del valor biológico. La Tabla 2 muestra los resultados de los aminogramas del hidrolizado y sus fracciones. El análisis estadístico mostró que el hidrolizado no fue diferente ($p > 0.05$) de la proteína intacta (no mostrado). Las FI-E y FIII-E contenían suficiente metionina como para suplir los requerimientos de aminoácidos azufrados de los lactantes (4.3%), que con base en el patrón de la leche materna recomienda FAO/WHO. Así, la fracción FIII-E sería más adecuada que la leche de vaca en las fórmulas infantiles, ya que esta última contiene sólo 3.3% de aminoácidos azufrados (13). Para los demás grupos de edad la recomendación es de 2.5% y se satisface con el contenido de Met de la FII-E, ya que la Cis es más de 1% (25).

TABLA 2

Contenido de aminoácidos del hidrolizado y de sus fracciones antes y después de la incorporación de metionina (g/100 g proteína)

	Hidrolizado	FI	FII	FIII	FI-E	FII-E	FIII-E
Asp	11.28	11.80	10.96	10.59	8.58	8.95	13.13
Glu	18.78	22.55	19.48	18.45	17.30	21.14	27.36
Ser	3.78	4.27	3.35	3.76	2.78	2.71	3.71
His	2.57	2.04	2.43	2.86	1.54	1.944	2.47
Gli	4.34	5.88	4.54	6.02	5.10	5.52	5.78
Tre	4.71	2.61	3.48	4.78	3.80	2.46	4.85
Arg	6.88	6.80	6.54	4.79	4.23	3.53	4.73
Ala	4.33	4.41	4.74	6.37	4.43	3.44	5.69
Tir	3.25	2.78	2.53	2.23	1.82	1.50	1.80
Met	1.45	1.42	1.53	1.17	4.98	2.24	4.42
Val	5.38	5.32	5.16	4.95	5.95	4.13	6.53
Fen	5.18	5.66	5.85	4.76	4.54	1.95	4.00
Ile	4.84	6.23	4.52	4.42	5.74	4.25	6.13
Leu	7.24	9.45	7.63	6.74	8.42	5.03	7.47
Lis	6.19	7.85	7.36	6.73	4.62	5.34	6.27

Evaluación de la calidad de proteína

La presencia y actividad de factores intrínsecos y extrínsecos en el tracto gastrointestinal, pueden modificar las expectativas del solo perfil de aminoácidos de una proteína, por ello se ensayaron una fracción de hidrólisis y la combinación de dos fracciones con síntesis, en ratas. Para comparación, se utilizaron caseína y un producto comercial, como fuente única de proteína.

En la Tabla 3 se presentan los indicadores de calidad proteica de las fuentes ensayadas. La FIIIa tiene péptidos de tamaño molecular pequeño (0.5-3 kDa), los cuales se absorben muy bien (32), aunque es deficiente en aminoácidos azufrados por lo que se le adicionó metionina libre. La combinación FI-E+FII-E, presenta péptidos de mayor tamaño (> 3kDa) que FIIIa, pero como están enriquecidos con metionina si cubren el requerimiento de aminoácidos azufrados. Así, se compensa un tratamiento con el otro para obtener indicadores de calidad proteica similares ($p>0.05$).

TABLA 3

Digestibilidad verdadera (DV) y utilización neta de proteína (NPU) obtenido en ratas alimentadas con caseína (dieta control), Ensure[®] y dietas formuladas con las fracciones FIIIa y FI-E + FII-E.

Parámetro	Dieta Caseína	Dieta Ensure [®]	Dieta FI-E+FII-E	Dieta FIIIa
Digestibilidad Verdadera (%)	96.4 ^a	90.1 ^b	91.2 ^{ab}	93.5 ^c
NPU (%)	68.8 ^c	65.7 ^b	64.4 ^b	64.7 ^b

Diferentes letras por región, denotan diferencias significativas entre dietas ($p=0.05$).

Como se observa en la Tabla 3, la digestibilidad aumenta gradualmente con la disminución del tamaño peptídico de proteínas de la misma fuente (30), aunque el NPU de cada proteína depende también del contenido de metionina enlazada covalentemente. Lo anterior se sustenta en el hecho de que FIIIa (menor tamaño) presentó mejor digestibilidad pero igual NPU que FI-E+FII-E (mayor tamaño). Por otra parte, aunque Ensure[®] mostró menor digestibilidad que las fracciones de soya ensayadas, contiene además del aislado de soya, caseinatos lo que explica su valor de NPU comparable al de las fracciones y ligeramente menor al de caseína ($p<0.05$). Aunque en este estudio, no se compararon las fracciones de soya con su fuente original (pasta), sino con caseína, sus indicadores son mejores que los reportados para diversos productos de soya (31).

Se sabe que los padecimientos crónico-degenerativos que acompañan a las personas de la tercera edad, disminuyen su capacidad de absorción de nutrimentos. Por eso, se han diseñado para ellos formulaciones con proteínas modificadas,

oligopéptidos y aminoácidos libres (32); las fracciones obtenidas en este estudio, podrían ser una alternativa. Aunque ahora sólo se ha demostrado una calidad proteica comparable a la de la proteína del producto comercial de referencia, se sabe que los péptidos tienen mayor posibilidad de absorción que las proteínas integrales (30).

Factores antifisiológicos

A la pasta de soya, hidrolizado y a las fracciones antes o después de enriquecimiento con metionina se les analizó actividad de lectina e inhibidor de tripsina, que están entre los factores antifisiológicos más comunes en la soya (31). En la Tabla 4 se muestra que la pasta de soya contenía 47 778 UIT (unidades de inhibidor de tripsina) por g de proteína, reduciéndose a un 15.3% de su actividad inicial en el hidrolizado y todavía poco más en las fracciones de síntesis (11.6, 8.4 y 7.5% en FI-E y FII-E y FIII-E, respectivamente). La mayor reducción de este componente antifisiológico fue para la fracción más pequeña sin enriquecer (FIIIa) con un título remanente del 2.5%. Así, en la proteína modificada con metionina existe una reducción de actividad en el orden del 90%, superior al 37% obtenido por Hajós et al. en un proceso similar.

TABLA 4

Factores antifisiológicos y antigenicidad.

Material	Inhibidor de tripsina ^a (UIT/g proteína)	Hemaglutinación ^b (TH)	Antigenicidad ^c (Título)
Pasta de soya	47 778	64	1
Hidrolizado	7 333	32	0.5
FI	ND	32	1
FII	ND	0	1.9×10^{-5}
FIII	ND	0	2.4×10^{-6}
FIIIa	1 186	0	6.1×10^{-7}
FI-E	5 556	32	0.25
FII-E	4 000	0	9.8×10^{-6}
FIII-E	3 571	0	1.2×10^{-6}

a Unidades inhibitorias de tripsina/g proteína

b Inverso de la máxima dilución que mostró aglutinación

c Dilución de la proteína en la pasta de soya en la cual se obtuvo la misma absorbancia.

ND No determinado

La actividad residual del inhibidor de tripsina se atribuye al inhibidor de Kunitz que no se inactiva por completo durante una proteólisis limitada (33) y a la posible restitución de esta actividad a pH neutro o ligeramente alcalino (34), como el utilizado en el proceso de resíntesis. Es por ello, que en el trabajo de Hajós et al., hubo mucho menor reducción de esta actividad, ya que ellos solo hidrolizaron durante 2 h. Por otra parte, en los productos comerciales de soya que se usan en alimentos, los niveles de inhibidores de tripsina se reducen en un 80% en el extruido y 67 y 74% en concentrados y aislados de soya (35). Así, los hidrolizados (enriquecido o no) obteni-

dos en este estudio, tienen ventaja en este punto sobre los productos comerciales de soya que se utilizan para formular alimentos.

Con respecto a la actividad de lectina, el título de hemaglutinación de la materia prima (pasta) se redujo en un 50% en el hidrolizado y en las fracciones de mayor peso molecular (FI y FI-E). La actividad hemaglutinante se perdió por completo en todas las fracciones restantes (menores de 10 kDa). De acuerdo a Liener et al., el proceso de hidrólisis puede dejar actividad parcial de algunas lectinas, la cual puede reducirse o eliminarse por completo por medio del calor húmedo. Así, por procesos de pasteurización podría eliminarse cualquier actividad remanente de estas fracciones en una formulación industrial.

Antigenicidad

Los títulos de antigenicidad para todos los materiales ensayados se muestran en la Tabla 4. En ella se observa una reducción de epítipes reconocibles por los anticuerpos-anti pasta de soya, al 50% en FI e hidrolizado y 75% para FI-E, habiendo eliminación casi completa de estos para todas las demás fracciones. La reducción del poder antigénico de todos los materiales fué proporcional a la disminución del tamaño peptídico. Además, todas las fracciones enriquecidas disminuyeron sus títulos en un 50-75% con respecto a sus fracciones homólogas sin enriquecer.

Halken et al., estudiaron un producto (Profylac®) etiquetado como hipoadérgico y basado en proteína del lactosuero, hidrolizada enzimáticamente y ultrafiltrada. Este producto contiene péptidos menores a 8 kDa, y su antigenicidad fue probada contra proteínas nativas del lactosuero, mostrando una reducción de la antigenicidad de 30 000 veces. La estimación teórica para una fracción peptídica similar en nuestro estudio (FII+FIII), es del mismo orden de magnitud. Por otra parte, Hussein et al., reportan una disminución del potencial antigénico de proteínas de leche de búfalo modificadas, dependiente del enriquecimiento con metionina. A un porcentaje similar de enriquecimiento al alcanzado en nuestro estudio (4.37%), ellos encontraron una reducción en el orden del 90% con respecto a la proteína intacta, siendo esta reducción casi total en nuestro caso. Esto demuestra que la modificación enzimática (hidrólisis y síntesis) y la UF son la combinación de métodos más eficiente para reducir el contenido de antígenos.

Evaluación sensorial

Se seleccionaron 6 panelistas con la mejor capacidad de detección del sabor amargo, de acuerdo a los resultados de las pruebas triangulares. Su evaluación sensorial mostró que las fracciones FI-E y FII-E no son significativamente ($p > 0.01$) diferentes entre sí, aunque la FI-E presentó un amargo menor ($p < 0.01$) a la FII-E con respecto al estándar de cafeína al 0.07%, catalogado como "poco amargo".

De acuerdo a Deeslie y Cheryan, el sabor amargo se desarrolla en los productos de proteólisis limitada y luego

decrece en una etapa más extensiva. En este estudio, el hidrolizado inicial se clasificaría como moderado de acuerdo al grado de hidrólisis. Sin embargo, durante la síntesis, la hidrólisis continuó (aunque en menor grado). Ello porque se observó en el balance de masa (como proteína), que las dos fracciones de mayor masa se redujeron y aumentó la FIII-E a 19% con respecto a la FIII que era 9% del total.

La evaluación sensorial se realizó en el material proteico puro y no en productos formulados. Por ello, los demás componentes de los alimentos que contengan este material, podrían enmascarar totalmente el ligero sabor amargo. Tal es el caso de fórmulas líquidas para personas con problemas de mala absorción, que contienen saborizantes de vainilla, fresa, chocolate y nuez como el Ensure® o el Sustacal®. También las papillas para infantes pueden llevar saborizantes naturales, aunque estas serían formuladas con la FI-E que no presentó sabor amargo.

En conclusión, al realizar la hidrólisis y síntesis enzimáticas en forma secuenciada, se logró una verdadera modificación muy ventajosa en todas las propiedades proteicas. Se obtuvieron fracciones enriquecidas con metionina, en el menor tiempo y a una concentración de aminoácido añadido mínimos. Después de la ultrafiltración, todas las fracciones menores de 10 kDa (FIII, FIII-E, FII y FII-E) presentaron 100% de solubilidad a todos los pH's, más de 90% de claridad y regular capacidad espumante.

La FIII-E debido a la calidad nutricia de su proteína y a que no causa respuesta antigénica y no contiene factores antifisiológicos, puede utilizarse como única fuente de proteína para fórmulas infantiles hipoadérgicas. La FII-E suple los requerimientos de aminoácidos azufrados para niños y adultos y es adecuada para fórmulas fortificadas solubles y como única fuente de proteína en nutraceuticos. La FI se asemeja al aislado de soya comercial en sus propiedades funcionales y por ello, podría ser una alternativa para diversos productos que lo incluyen, a fin de amortizar los costos de producción. Por último, la FI-E debido a su alto contenido de metionina, a la estabilidad de su espuma, a su actividad emulsificante y nulo sabor amargo, puede ser una buena fuente de proteína para papillas infantiles.

Así, por medio de la modificación enzimática, se obtuvieron péptidos de tamaño definido, con concentraciones adecuadas de aminoácidos para los requerimientos del grupo etario al que van dirigidas. Estos presentan propiedades bioquímicas, funcionales, nutrimentales y sensoriales que permiten formulaciones nutritivas y agradables a los sentidos del consumidor. La unión covalente de la metionina evita el sabor desagradable que produce el añadirla en forma libre. También el definir el tamaño de los péptidos, por ultrafiltración fraccionada y no por lo extensivo de la hidrólisis enzimática, ayuda a controlar las propiedades. En esta forma se eliminan péptidos amargos, se mejoran la digestibilidad y absorción a nivel intestinal y se obtienen ventajas en funcionalidad.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen la ayuda técnica de Francisco Vázquez en la cuantificación de aminoácidos por HPLC, Verónica Valdez en la extracción de enzimas pancreáticas y de J. René Valenzuela en los ensayos inmunoquímicos. Así mismo, se agradecen los atinados comentarios de los Drs. Mauro Valencia y Francisco Goycoolea durante la realización de los bioensayos y la parte tecnológica, respectivamente.

REFERENCIAS

- Mahmoud M. Physicochemical and functional properties of protein hydrolysates in nutritional products. *Food Technol* 1994;48:49.
- Hajós G, Gelencsér E, Grant G, Bardocz S, Sakhri M, Duguid TJ, et al. Effect of proteolytic modification and methionine enrichment on the nutritional value of soya albumins for rats. *J Nutr Biochem* 1996;7:481.
- Kasche V. Proteases in peptide synthesis. In: Beynon RJ, Bond JS, editors. *Proteolytic enzymes a practical approach*. England: Oxford University - IRL, 1990:125.
- Arai S, Yamashita M, Fujimaki M. Nutritional improvement of food proteins by means of the plastein reaction and its novel modification. In: Friedman M, editor. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. USA:Plenum, 1978:663.
- Halken S, Host A, Hansen L, Osterballe O. Safety of a new, ultrafiltered whey hydrolysate formula in children with cow milk allergy: A clinical investigation. *Pediatr Allergy Immunol* 1993;4:53.
- Rugo E, Wahl R, Whan U. How allergenic are hypoallergenic infant formulae. *Clin Exp Allergy* 1992;22:635.
- Calderón de la Barca AM, Ruiz Salazar RA, Jara MME. Enzymatic hydrolysis and synthesis of soy protein to improve its amino acid composition and functional properties. *J Food Sci*. In press.
- Parrado J, Bautista J, Machado A. Production of soluble enzymatic protein hydrolyzate from industrially deffated undehulled sunflower meal. *J Agric Food Chem* 1991; 39:447.
- Deeslie WD, Cheryan M. Functional properties of soy protein hydrolyzates from continuous ultrafiltration reactor. *J Agric Food Chem* 1988; 36:26.
- Li-Chan E, Nakai S, Wood DF. Hydrophobicity and solubility of meat proteins and their relationship to emulsifying properties. *J Food Sci* 1984; 49:345.
- Vázquez OF, Caire G, Higuera I, Hernández G. High performance liquid chromatographic determination of free amino acids in shrimp. *J Liquid Chromatogr* 1995; 18:2059.
- Association of Official Analytical Chemists. *Official Methods of Analysis of the AOAC*. 15th. Edited by Kenneth Helrich; Virginia 22201. USA, 1990.
- FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations and WHO. World Health Organization. 1991. Protein Quality Evaluation. Report of the joint expert consultation. Rome: 4-8, December 1989. FAO Food and Nutrition Paper 51.
- NCSS. Number Cruncher Statistical Systems (computer program). Statistical System for windows, version 6.0. USA:Hintse JL. 1996.
- AACC. American Association of Cereal Chemists Inc. Approved methods committee. Compilers. *Approved Methods of the American Association of Cereal Chemists*. Method 71-10: Determination of trypsin inhibitor activity of soy products. St. Paul(MI): American Association of Cereal Chemists, 1976.
- Allen AK, Neuberger A, Sharon N. The purification, composition and specificity of wheat germ agglutinin. *Biochem J* 1973; 131:155.
- Jurd RD, Bog-Hansen TC. Production of polyvalent antibodies for immunoelectrophoresis. In: Hames BD, Rickwood D. Eds. *Gel electrophoresis of proteins. A practical approach*. New York: Oxford university-IRL press 1989; 366.
- Chu NM, Janckila AJ, Wallace H, Yam L. Assessment of a method for immunochemical detection of antigen on nitrocellulose membranes. *J Histochem Cytochem* 1989; 37:227.
- González CAF, Calderón de la Barca AM, Cota M, Vallejo CB. Detección inmunoquímica de la adulteración de chorizo de cerdo con proteínas de soja. *Food Sci Technol International* 1998; 4:257-262.
- Pedrero D, Pangborn R. Evaluación sensorial de los alimentos. 1 Ed. México:Alhambra Mexicana, 1989.
- Avena BR, Cano MD. Guía para la selección y entrenamiento de jueces analíticos. *Industria Alimentaria* 1996; 4:20.
- Jellinek G. Sensory evaluation of food. USA: Ellis Horwood, 1989.
- Addler-Nissen. Some fundamental aspects of food protein hydrolysis. A review of food protein hydrolysis. *Methods in Food protein hydrolysis*. In: Addler-Nissen. *Enzymic hydrolysis of food proteins*. London: Elsevier Applied Science Publishers. 1986: 9,57,110.
- Lozano P, Combes D. α -Chymotrypsin in plastein synthesis. Effect of Hydroxylated additives on enzyme activity. *Appl Biochem Biotechnol* 1992; 33:51.
- Bressani R. The role of soybeans in food systems. *JAOCS* 1981; 58:392.
- Hussein S, Gelencsér E, Hajós G. Y. Reduction of allergenicity and increasing biological value of buffalo's milk proteins by enzymatic modification. *J Food Biochem* 1995; 19:239-252.
- Ena JM, Van BE, Robben A, Schmidt D. Whey protein antigenicity reduction by fungal proteinases and pepsin/pancreatin combination. *J Food Sci* 1995; 48:1315.
- Zhu H, Damodaran S. Heat-induced conformational changes in whey protein isolates and its relation to foaming properties. *J Agric Food Chem* 1994; 42:846.
- Lahl WJ, Braun SD. Enzymatic production of protein hydrolyzates for food use. *Food Technol* 1994; 48:68.
- Boza JJ, Jiménez J, Martínez O, Suárez M, Gil A. Nutritional value and antigenicity of two milk protein hydrolyzates in rats and guinea pigs. *J Nutr* 1994; 124:1978.
- Liener IE. Implication of antinutritional components in soybean food. *Cri Rev Food Sci Nutr*. 1994; 34:31.
- Ziegler F, Ollivier JM, Cynober L, Masini JP, Coudroy-Lucas C, Levy E, et al. Efficiency of enteral nitrogen support in surgical patients: small peptides vs non-degraded proteins. *Gut* 1990; 31:1277.
- Vaintraub IA, Yattara HB. Proteolysis of Kunitz soybean trypsin inhibitor. Influence on its activity. *J Agric Food Chem* 1995; 43:862.

34. Koide T, Ikenaka T, Ikeda K, Hamaguchi K. Studies on soybean trypsin inhibitors. IX. Reconstitution of an active derivative from two inactive fragments and the contribution of tryptophan-93. *J Biochem* 1974; 75:805-823.
35. Rackis JJ. Biological active componentes In: Smith S.C. eds. *Soybean: Chemistry and Technology*. v. 1 Proteins. Connecticut: Westport. Avi Publishing 1980; 158.

Recibido: 29-06-1999

Aceptado: 10-12-1999