

Actividad ureásica en productos de soja. Propuesta de un nuevo método

M.C. Olguin, M.I. Zingale, G.C. Revelant, M.E. Vignale

Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. U.N.R. Suipacha. Argentina

RESUMEN. La evaluación de la actividad ureásica residual en productos de soja es habitualmente empleada como indicador de la eficacia del tratamiento de inhibición practicado. El propósito de este trabajo consistió en realizar una comparación entre el método propuesto por la AACC (22-90), basado en medir diferencias de pH y una técnica en la que se mide la actividad ureásica por su acción hidrolítica de la urea y posterior dosaje del amonio producido mediante la reacción de Berthelot. Se utilizaron los dos métodos para procesar 20 muestras de harina de porotos de soja sin tratar y con diferentes tratamientos térmicos de inactivación. El nuevo método correlaciona satisfactoriamente con el de la AACC, $r = 0,9416$, ($p < 0.0001$), asimismo, presenta mayor especificidad ya que mide la concentración del producto de la reacción y ofrece una respuesta más amplificada que el incremento de pH.

Palabras clave: Harinas de soja, antinutrientes, actividad ureásica.

SUMMARY. Ureasic activity in soy products. Proposal of a new method. The evaluation of residual ureasic activity in soy products is usually employed as an indicator of the efficiency of the inhibition treatments. The purpose of this study is to compare the AACC method (22-90), based on differences of pH, with an assay where ureasic activity is measured by its hidrolitic action on urea and quantification of the ammonium produced with Berthelot reaction. Twenty different samples of soy bean flour with and without thermal inactivation treatments were assessed with the two methods. The new method has a good correlation with that of the AACC - $r = 0,9416$ ($p < 0.0001$). It also presents a better specificity because it measures the concentration of the reaction product and shows a more amplified answer than the increase of pH.

Key words: Soybean flours, antinutrients, urease activity.

INTRODUCCION

Los porotos de soja y sus derivados tienen gran riqueza en proteínas de elevado valor biológico y razonable digestibilidad, que los convierten en una fuente nitrogenada de reemplazo con costo sustancialmente inferior a las proteínas de origen animal. Sin embargo, la presencia de compuestos químicos tales como inhibidores de tripsina y de quimotripsina, lectinas, taninos, fitatos y saponinas, denominados genéricamente antinutrientes o factores antinutricionales (1- 4) disminuyen la eficiencia nutricional de dietas de soja respecto a lo que se podría esperar si sólo se tuviera en cuenta su composición química. Estos antinutrientes, de naturaleza proteica y diferente termoestabilidad, son inactivados mediante tratamientos térmicos habituales durante el acondicionamiento de los productos de soja antes de su consumo. La temperatura, el tiempo de aplicación y las condiciones de humedad a las que se lleva a cabo el tratamiento deben ser rigurosamente controladas debido a que se corre el riesgo de ocasionar, en eventuales casos de temperaturas y tiempos anormalmente elevados disminución de la biodisponibilidad de aminoácidos esenciales como la lisina, con defectos nutricionales de gravedad variable. La determinación del crecimiento en

animales de laboratorio, especialmente en ratas al destete, constituye el indicador más realista de la calidad nutricional de productos de soja (5,6). Sin embargo esta metodología es poco factible de ser llevada a cabo a nivel industrial, por lo que debe ser reemplazada por pruebas más sencillas y rápidas. Entre ellas se destacan la solubilidad proteica (7) y la actividad ureásica.

La actividad ureásica presente en los porotos de soja crudos disminuye notoriamente después de los tratamientos térmicos, y su evaluación es habitualmente empleada como indicador de la eficacia del tratamiento de inhibición practicado.

El propósito de este trabajo consistió en realizar una comparación entre el método propuesto por la AACC (22-90) -modificación del de Caskey-Knapp (8)-, con una técnica en la que se mide la actividad ureásica por su acción hidrolítica de la urea y posterior dosaje del amonio producido, mediante la reacción de Berthelot (9).

MATERIAL Y METODOS

Productos de soja

Las muestras de porotos de soja provenían de cultivos de la zona sur de la provincia de Santa Fe. Las harinas de soja

las proveyeron Galpro SA (San Lorenzo, provincia de Santa Fe), Alpro SA (Pergamino, provincia de Buenos Aires) y Extender S.A. (Provincia de Buenos Aires). Las provistas por Alpro presentaban información sobre los tratamientos de inactivación a que fueron sometidas.

Tratamiento de las muestras

Porotos crudos: se emplearon molidos, tanto con el contenido original de aceite como desgrasados (dos muestras) por medio de extracción con hexano normal en frío.

Porotos tratados: muestras de 250 g de porotos crudos fueron sometidas a tratamientos en el laboratorio. Estos consistieron en: (a) Remojo en agua destilada durante dos horas y hervor en agua destilada en recipiente de vidrio abierto durante 5, 10, 20 y 45 minutos, molienda y secado a 37 °C con corriente de aire. (b) Autoclavado: 5 minutos a vapor fluente; 5, 10 y 15 minutos a 1 atmósfera, molienda y secado a 37 °C (c) Aire seco a 100 °C, molienda.

Harinas comerciales: Galpro (Harinas G): inactivadas industrialmente, enteras y desgrasadas. Alpro (Harinas A): desgrasada con vapor de agua; tratada 2 minutos a 152 °C calor seco; aire seco a 140 °C; vapor 15 minutos a 1 atmósfera; vapor 5 minutos a 5 atmósferas. Extender: desgrasada, inactivada industrialmente.

Preparación de los extractos

Las muestras de porotos molidos y de harinas de soja tratadas con distintas metodologías se utilizaron para preparar extractos según la metodología descrita por Liener para la determinación de la actividad hemaglutinante de productos de soja (10). Se incubaron 5g de productos de soja con 25 ml de NaCl 0.9% estéril durante 1 hora entre 4-8°C y centrifugaron durante 15 minutos a 3500 rpm. Los extractos obtenidos se emplearon para evaluar la actividad ureásica mediante el nuevo método.

Descripción de la metodología

Método de referencia: AACC Método 22-90 (Método de Caskey- Knapp modificado): medida de la diferencia de pH registrada entre 200 mg de una muestra de productos de soja en 10 ml de buffer de fosfatos 0.05 M de pH 7.0 conteniendo 3g% de urea y 200 mg de la misma muestra en 10 ml de buffer sin urea luego de la incubación durante 30 minutos a 30° C.

Nuevo método:

Reactivos: (a) Sustrato:Urea 0.01M

(b) Reactivos de Color: (I) Fenol 532mmol/l; Nitroprusiato de Na 0.85 mmol/l; etilén bis ditiocarbamato manganeso 0.3 mmol/l

(II) NaClO 36,6 mmol/l; p-toluén sulfoncloramida 0,12 mmol/l; NaOH 0.625 mmol/l

Técnica: 20 ul de extracto se emplean como reactivo

enzimático incubándose con 20 ul de sustrato durante 5 minutos a 37 °C. Se agregan 0.5 ml de Reactivo I y 0,5 ml de Reactivo II. Se incuba 5 minutos y se diluye con 8 ml de H2O destilada. Se efectúa la lectura espectrofotométrica a 540 nm. Los valores de la lectura se corrigen teniendo en cuenta la cantidad de harina que representa el volumen de extracto y refiriéndola a 200 mg, cantidad de muestra empleada en el método de referencia.

La actividad ureásica, que se cuantifica por medio de la concentración de amonio producido, se compara con la actividad desarrollada por un extracto de soja comercial provista por laboratorios Wiener a la que se le asigna 100% de actividad.

Evaluación del límite de detección y la sensibilidad del método propuesto

Para evaluar el límite de detección y la sensibilidad del método propuesto así como la posibilidad de diferenciar entre muestras con y sin actividad ureásica residual se efectuaron diluciones de la ureasa comercial provista por Wiener laboratorios con solución fisiológica y se usaron 20 ul de las mismas reemplazando a las muestras en el caso de la reacción de la AACC y en reemplazo de los extractos en el caso de la técnica propuesta.

Evaluación de la actividad ureásica en muestras de productos de soja

La actividad ureásica residual de 20 muestras de porotos y harinas de soja sometidas a diferentes tratamientos fue evaluada mediante las dos técnicas. En el caso de la técnica propuesta se expresó la actividad ureásica de las diferentes muestras como porcentaje respecto de la actividad de la ureasa comercial sin diluir a la que se le atribuyó 100% de actividad.

Los valores de actividad residual expresan la eficacia de los distintos tratamientos, que según varios autores (11,12) se relacionan con la humedad, tiempo y temperatura a que se llevan a cabo.

Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron analizados mediante la aplicación de correlación lineal con análisis de la linealidad. Se utilizó el programa estadístico Instat.

RESULTADOS Y DISCUSION

En la Tabla 1 se detallan los resultados obtenidos en el experimento de evaluación del límite de detección y de la sensibilidad para detectar actividad de ureasa por medio del nuevo método. Se verifica que hasta una dilución 1/10 de la enzima comercial se mantiene un nivel de respuesta similar al de la original. El límite de detección del método propuesto alcanza hasta niveles de 0.004 partes de ureasa, nivel en el

que el método basado en la determinación de diferencia de pH no acusa respuesta y que por lo tanto resultaría en informar esa muestra como sin actividad ureásica residual. La sensibilidad del método propuesto evaluada como respuesta en densidad óptica de una parte de ureasa medida en base a su actividad, considerando la zona de la linealidad de la curva - entre 0.005 y 0.04 partes de ureasa-, es de 0.0036 unidades de densidad óptica para 0.001 partes de ureasa.

TABLA 1
Evaluación del límite de detección y la sensibilidad del método propuesto para detectar actividad enzimática de ureasa

Dilución Ureasa comercial	D.O. a 540 Nuevo método	% Actividad	Diferencia de pH Método AACC
1/250	0.027	10.6	0.00
1/200	0.023	9.0	0.00
1/100	0.041	16.1	0.00
1/50	0.093	36.6	0.00
1/25	0.150	59.0	0.03
1/10	0.241	94.0	0.06
1/5	0.245	96.4	0.07
1/2	0.29	116.5	0.09
Pura	0.254	100.0	0.14

En la Tabla 2 se detallan los valores de actividad ureásica residual obtenidos en diferentes muestras de productos de soja sometidas a diferentes tratamientos cuantificados por medio del método propuesto y del de la AACC. Los datos son un promedio de tres o cuatro determinaciones y se expresan como promedio y error estándar del promedio. Los resultados obtenidos permiten visualizar la relación inversa entre la temperatura, la humedad y el tiempo de tratamiento con los niveles de actividad ureásica residual. Así se puede observar que los tratamientos con calor húmedo ocasionan mayor inactivación y que el remojo previo al hervor en recipiente abierto resulta más efectivo que el tratamiento con vapor fluyente sin remojo previo. Estos hallazgos coinciden con lo observado por Kabara y otros (13). También resulta interesante el hecho de que el tratamiento con aire a 100° C no produce disminución de la actividad ureásica comparada con la que presentaron los protos sin tratar.

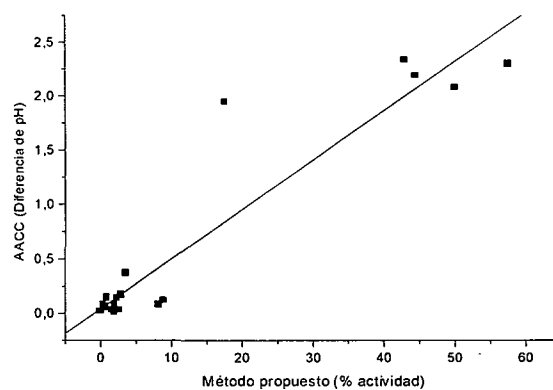
Los resultados de actividad ureásica residual obtenidos por los dos métodos fueron analizados estadísticamente y se obtuvo un coeficiente de correlación de 0.9416 ($p < 0.0001$), Test de Pearson. Empleando el test de Spearman se obtuvo un coeficiente de correlación de 0.7957 ($p < 0.0001$). Los valores de error estándar del promedio de los replicados para las distintas muestras se muestran en la Tabla 2. Para los cálculos se empleó el programa estadístico Instat.

TABLA 2
Medida de la actividad ureásica residual por ambos métodos en muestras de productos de soja con diferentes tratamientos de inactivación

Muestra	n	Tratamiento	% Actividad Nuevo método	Diferencia de pH Método AACC
1	3	Por. Crudos desg	44.5 ± 0.983	2.19 ± 0.017
2	3	Por. Crudos enteros	57.5 ± 0.825	2.30 ± 0.057
3	3	Por. crudos desg	42.9 ± 1.126	2.34 ± 0.029
4	4	Por. Ent. Herv. 5 min sec 37°	3.6 ± 0.253	0.37 ± 0.016
5	3	Por. Herv. 10 min sec 37°	8.2 ± 0.404	0.80 ± 0.007
6	3	Por. hervidos 20 min	0.4 ± 0.056	0.08 ± 0.006
7	3	Por. hervidos 45 min	0.0 ± 0.000	0.02 ± 0.007
8	4	Por. Ent. Vap. Fl. 5 min	17.5 ± 0.793	1.95 ± 0.075
9	4	Por. Ent. 1 atm 5 min	1.9 ± 0.104	0.01 ± 0.004
10	3	Por. Ent. 1 atm 10 min	2.3 ± 0.173	0.14 ± 0.011
11	4	Por. Ent. 1 atm 15 min	0.0 ± 0.000	0.08 ± 0.006
12	4	Por. Ent. aire 100° C	50.0 ± 1.684	2.08 ± 0.043
13	4	Harina G. desg. inac.	8.9 ± 0.455	0.12 ± 0.006
14	4	Harina G. Inac.	0.9 ± 0.009	0.15 ± 0.009
15	4	Harina A. desg. con vapor	1.6 ± 0.085	0.03 ± 0.004
16	3	Harina A aire seco 140° C	1.9 ± 0.153	0.09 ± 0.009
17	4	Harina A. 2 min 152° C	2.9 ± 0.111	0.17 ± 0.011
18	3	Harina A 15 min 1 atm	1.8 ± 0.088	0.03 ± 0.006
19	4	Harina A. vapor 5 atm	0.6 ± 0.071	0.06 ± 0.006
20	3	Harina Extender desg.	2.5 ± 0.153	0.03 ± 0.009

Los resultados se expresan como promedio y error estándar de la media

FIGURA 1
Correlación entre la actividad ureásica evaluada por el método de la AA-CC y el método propuesto



Los resultados obtenidos nos permiten concluir que el límite de detección del método propuesto alcanza hasta niveles de 0.004 partes de ureasa, nivel en el que el método basado en la determinación de diferencia de pH no acusa respuesta. La sensibilidad del método propuesto permite diferenciar satisfactoriamente muestras con actividades

residuales correspondientes a diferencias en 0.001 partes de ureasa. La correlación obtenida entre el método de la AACC 22- 90 y el propuesto es altamente significativa. La precisión alcanzada en la metodología propuesta resulta satisfactoria como se aprecia en los valores obtenidos para error estándar. Asimismo, el nuevo método presenta mayor especificidad, ya que se mide la concentración del producto de la reacción. Las respuestas cuantificadas en forma de actividad enzimática resultan más amplificadas que las expresadas como diferencia de pH (Tabla 1).

AGRADECIMIENTO

Se agradece la colaboración recibida de parte de Wiener Laboratorios S.A.I.C. Riobamba 2944, Rosario, Argentina, consistente en la provisión de reactivos.

REFERENCIAS

1. Lalles JP. Nutritional and antinutritional aspects of soyabean and field pea proteins used in veal calf production: a review. *Livest Prod Sci.* 1993; 34: 181-202,
2. Birk Y. Protein proteinase inhibitors of plant origin and their significance in nutrition. In: J. Huisman, T.F.B. van der Poel and I.E. Liener, editors. *Recent Advances of Research in Antinutritional Factors in Legume Seeds*, Pudoc, Wageningen, 1989, p. 83-94.
3. Huisman J. Antinutritional factors (ANFs) in the nutrition of monogastric farm animals. In: E.J. Weerden and J. Huisman, editors. *Nutrition and Digestive Physiology in Monogastric Farm Animals*, Pudoc, Wageningen, 1989, p.17-35.
4. Liener IE. Antinutritional factors in legume seeds: state of the art. In: J. Huisman, T.F.B. van der Poel and I.E. Liener, editors. *Recent Advances of Research in Antinutritional Factors in Legume Seeds*, Pudoc, Wageningen, 1991, p.6-14.
5. Grant G. Antinutritional effects os soybean: a review. *Prog Food Nutr Sci* 1989; 13:209-214.
6. Olguin M.C., Hisano N. D'Ottavio A.E., Zingale M.I., Gayol M.C., Revelant G. et al Alteraciones intestinales y disminución del crecimiento en ratas prepúberes alimentadas con soja. *Medicina (Buenos Aires)* 1999; 59:747-752
7. Araba M & Dale NM. Evaluation of protein solubility as an indicator of overprocessing of soybean meal, *Poultry Science* 1990, 69: 76-83.
8. Caskey CD, Knapp F, Method for determining inadequately heated soybean meal. *Ind Eng Chem.* 1944, 16: 640-641.
9. Henry RJ, Cannon D.C. and Winselman J.W. *Clinical Chemistry Principles and Techniques* Ed.2 Harper and Row Publishers, Inc. New York, 1974: 504-506.
10. Liener IE & Hill EG. The effect of heat treatment on the nutritive value and hemagglutinating activity of soybean oil meal. *J Nutr.* 1953, 99:609-620)
11. Qin GX, Verstegen MWA, Van der Poel AFB. Effect of temperature and time during Steam Treatment on the Protein Quality of Full fat Soybeans from different origins. *J. Sci. Food Agric* 1998; 77, 393-398
12. Anderson RL. Effects of Steaming on Soybean proteins and Trypsin Inhibitors, *JAACS* , 1992, Vol 69, (12)1170-1176
13. Kabbara SAR, Abbas IR, Scheerens JC, Tinsley AM, Berry JW. Soaking and cooking parameters of tepary beans: effect of cooking time and cooking temperature on hardness and activity of nutritional antagonists. *Plant Food Human Nutr.* 1987, 37:151-159.

Recibido: 01-12-2000

Aceptado: 19-06-2001