

Avaliação biológica de soja com baixas atividades de inibidores de tripsina e ausência do inibidor Kunitz

Edna Mayumi Yuahasi Miura, Marco Aurélio R. Binotti, Daliane Souza de Camargo, Ivone Yurika Mizubuti, Elza Louko Ida

Departamento de Tecnologia de Alimentos e Medicamentos. Centro de Ciências Agrárias da Universidade Estadual de Londrina

RESUMO. Cultivar de soja BR 36 com atividades de inibidores de tripsina convencional e linhagem BRM 95-5262, geneticamente modificadas para conter baixas atividades de inibidores de tripsina, contendo 40 e 20 e 30 e 20% de atividades residuais relativa de inibidores de tripsina, respectivamente, foram utilizados para ensaios biológicos com ratos. Os valores médios de PER e NPR indicaram que os tratamentos de soja crua foram inferiores aos tratamentos de soja processada termicamente. Entretanto, para tratamentos de soja processada termicamente não houveram diferenças significativas ($p \geq 0,05$). Porém, quando as atividades de inibidores de tripsina foram de 8,61 e 8,44 UIT/mg de amostra ou 20 e 30% de atividades residuais relativa das respectivas sojas BR 36 e BRM 95-5262, observou-se que os valores médios de PER e NPR não foram significativos. Os valores médios de CDA e CDV dos tratamentos de sojas cruas foram inferiores à caseína e similares aos tratamentos de sojas processadas termicamente. Portanto, pode-se concluir que a avaliação biológica obtida com a proteína de soja foi dependente das atividades iniciais de inibidores de tripsina e do seu respectivo tratamento térmico e houve vantagem na utilização da soja BRM95-5262 com baixas atividades de inibidores de tripsina.

Palavra chave: Soja, inibidores de tripsina, ensaio biológico, ratos.

SUMMARY. Biological evaluation of soybean line with low trypsin inhibitor activities. The soybean cultivar BR 36 with conventional levels of trypsin inhibitors activity and the soybean line BRM95-5262, which was genetically selected to contain low activity of trypsin inhibitors were used for biological assays with rats. BR 36 and BRM95-5262 contained 40 and 20, and 30 and 20% of relative residual activity of trypsin inhibitors, respectively. The mean values of PER and NPR showed that treatments with crude soybeans were minor than treatments with soybean thermally processed. However, the treatments of thermally processed soybean did not showed significative differences ($p \geq 0.05$). When the trypsin inhibitors activity were 8.61 and 8.44 UIT/mg of samples or 20 and 30% of relative residual activity of cultivar BR 36 and line BRM95-5262, respectively, it was observed that mean values of PER and NPR were not significatives. The mean values of CDA and CDV of treatments with crude soybeans were minor than treatment with casein and similar to the treatments with soybean thermally processed. So, it can be concluded that the biological evaluation obtained with soybean protein were dependent of initial trypsin inhibitors activities and of its respective thermal treatment. There was advantage in the use of BRM95-5262 soybean line with low trypsin inhibitors activity.

Key words: Soybean, trypsin inhibitors, biological assay, rats.

INTRODUÇÃO

A soja tem sido amplamente utilizada como fonte de óleo comestível e proteína para alimentação humana e animal. A existência da soja é descrita desde 1000 anos antes de Cristo no Japão e na China e somente a partir do século XIX esta leguminosa passou a ter importância econômica.

A farinha de soja contém cerca de 40% de proteína e a partir do desengorduramento é possível produzir vários produtos para consumo humano e animal, tais como, concentrados, isolados e texturizados protéicos (1).

A soja tem sido descrita por conter antinutrientes que limitam a sua utilização. O mais importante e extensivamente investigado dos antinutrientes protéicos foram os inibidores de proteases (2). Estes antinutrientes apresentam

especificidade de inibir as enzimas proteolíticas e, conseqüentemente, reduzem a digestão protéica de alimentos, proporcionando diminuição no ganho de peso e crescimento dos animais (3). Desta forma, para aumentar o valor nutricional da soja e seus produtos, há necessidade de processamentos térmicos para inativá-los.

Com finalidade de reduzir custos no processamento de soja e diminuir os teores destes antinutrientes, foram desenvolvidos cultivares de soja com baixo teor de inibidor de tripsina (IT) e ausência do inibidor Kunitz. Tem-se também investigado cultivar com ausência do inibidor Bowman-Birk. Cultivares livres desses dois inibidores de tripsina também tem sido investigado (4).

Comercialmente, já existe cultivar de soja com ausência do inibidor Kunitz. Porém, para maximizar o valor nutricional

seria necessário processamento térmico menos drástico quando comparado com cultivar de soja com atividades de IT convencional (5,6), bem como manutenção da qualidade protéica.

O objetivo deste trabalho foi avaliar alguns parâmetros biológicos da linhagem de soja com baixas atividades de IT e ausência do inibidor Kunitz.

MATERIAL E MÉTODOS

Matéria prima e ensaios analíticos

Foram utilizados cultivar de soja BR36 com atividades de IT convencional e linhagem BRM 95-5262 com baixa atividade de IT e ausência do inibidor Kunitz. A linhagem BRM 95-5262 foi proveniente do cruzamento das linhagens Paraná (2) com PI 157440 (com ausência de inibidor de tripsina Kunitz). Estas amostras foram cedidas pela Embrapa/CNPsoja (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária-Centro Nacional de Pesquisa de Soja, Londrina - Pr).

A atividade dos inibidores de tripsina (AIT) foi determinada conforme metodologia preconizada por Kakade et al. (7), com modificação no processo de extração segundo Liu & Markakis (8). A determinação de proteína bruta foi realizada de acordo com AOAC(9).

Processamento térmico

As amostras de soja foram previamente moidas e desengorduradas. Em seguida, ajustou-se para 16% de umidade com adição de água destilada. O processamento térmico foi feito em banho maria a 95°C com fixação da porcentagem de atividade residual relativa de IT (Tabela 1) em 40 e 20 e 30 e 20% de atividades residuais relativa de IT para BR 36 e BRM 95-5262, respectivamente.

TABELA 1

Tempo de retenção em minutos do processamento térmico (95°C) para obtenção das amostras

| Soja | Tempo (min) | AIT (UIT/mg) | % IT* |
|-------------|-------------|--------------|-------|
| BR 36 | 0 | 43,06 | 100 |
| | 43 | 17,22 | 40 |
| | 126 | 8,61 | 20 |
| BRM 95-5262 | 0 | 28,15 | 100 |
| | 14 | 8,44 | 30 |
| | 31 | 5,63 | 20 |

* % IT = porcentagem de atividades residuais relativa de IT
AIT = atividade dos inibidores de tripsina
UIT/mg = unidade inibidora de tripsina/mg

Delineamento estatístico e ensaio biológico com ratos

Os ensaios biológicos foram conduzidos no biotério do Departamento de Tecnologia de Alimentos e Medicamentos

da Universidade Estadual de Londrina. Foram utilizados 56 ratos machos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus* var. *albinus*, Rodentia) com 21 a 23 dias de idade e recém desmamados.

O delineamento estatístico utilizado foi o inteiramente casualizado com 8 tratamentos e 7 repetições, considerando cada animal como uma repetição. Os tratamentos foram: T1 = aptotérico; T2 = caseína; T3 = cultivar BR36 cru; T4 = cultivar BR36 com 40% da atividade residual relativa de IT; T5 = cultivar BR36 com 20% da atividade residual relativa de IT; T6 = linhagem BRM 95-5262 cru; T7 = linhagem BRM 95-5262 com 30% da atividade residual relativa de IT e T8 = linhagem BRM 95-5262 com 20% da atividade residual relativa de IT.

Para as análises estatísticas utilizou-se o programa SAS. Foram feitas análises de variâncias e teste de Tukey para verificar diferenças entre médias.

Com exceção da ração aptotérica, todas as rações foram formuladas para conter 10% de proteína bruta, conforme recomendações da AOAC (9). Para atender as exigências nutricionais dos ratos, todas as rações foram balanceadas para conter 3.800 kcal de energia metabolizável (EM) por kg. A Tabela 2 apresenta a composição das rações experimentais. As misturas de minerais e vitaminas foram obtidas comercialmente da empresa Nuvital. Foi utilizado como fibra a a - celulose de procedência Sigma.

TABELA 2
Composição das rações experimentais

| Ingredientes | Rações experimentais | | | | | | | |
|--------------------|----------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | T1 | T2 | T3 | T4 | T5 | T6 | T7 | T8 |
| Caseína | - | 12,31 | - | - | - | - | - | - |
| BR 36 | - | - | 18,18 | 18,18 | 18,18 | - | - | - |
| BRM 95-5262 | - | - | - | - | - | 21,75 | 21,75 | 21,75 |
| Óleo | 5,00 | 5,00 | 5,00 | 5,00 | 5,00 | 5,00 | 5,00 | 5,00 |
| Minerais | 0,025 | 0,025 | 0,025 | 0,025 | 0,025 | 0,025 | 0,025 | 0,025 |
| Vitaminas | 0,05 | 0,05 | 0,05 | 0,05 | 0,05 | 0,05 | 0,05 | 0,05 |
| Fibra | 13,465 | 13,55 | 8,805 | 8,805 | 8,805 | 7,68 | 7,68 | 7,68 |
| Total | 100,00 | 100,00 | 100,00 | 100,00 | 100,00 | 100,00 | 100,00 | 100,00 |
| Valores calculados | | | | | | | | |
| PB (%) | 0,00 | 10,00 | 10,00 | 10,00 | 10,00 | 10,00 | 10,00 | 10,00 |
| EM (kcal/kg) | 3.800 | 3.800 | 3.800 | 3.800 | 3.800 | 3.800 | 3.800 | 3.800 |

PB = proteína bruta ; EM = energia metabolizável

Os animais foram distribuídos em gaiolas metabólicas individuais apropriadas para permitir a coleta individual de fezes. A água e a ração foram fornecidos a vontade durante todo o período experimental de 28 dias e as fezes foram coletadas na terceira e quarta semana e pesadas, secas a 40°C e armazenadas para posterior análises.

A relação de eficiência protéica (PER) foi determinada conforme o método descrito pela AOAC (9) e o quociente de eficiência líquida da proteína (NPR) de acordo com

metodologia descrita por Walker (10), utilizando médias de ganho de peso e consumo de proteína durante 28 dias. Os coeficientes de digestibilidade aparente (CDA) e verdadeira (CDV) foram determinados conforme procedimentos descritos por Urbano et al. (11) e Sullivan & Carpenter (12), respectivamente, utilizando dados de consumo de nitrogênio excretado durante a terceira e quarta semana.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise de variância para os valores biológicos de PER, NPR, CDA e CDV indicou que houve diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre os tratamentos.

Os valores médios de PER, NPR, CDA e CDV dos diferentes tratamentos estão apresentados na Tabela 3. Os valores de PER do padrão caseína diferiram dos tratamentos de soja cruas. Entretanto, os tratamentos de soja processadas termicamente não diferiram do padrão caseína, indicando desta forma, a eficiência do processamento térmico com relação ao valor de PER. Os valores médios de PER de 1,08 e 1,24 dos tratamentos de soja BR 36 e BRM 95-5262 cruas, respectivamente, não diferiram entre si, sendo inferiores aos valores médios de 1,45 descritos por Kakade, Hoffa & Liener (13). O maior valor médio de PER encontrado para o tratamento BRM95-5262 com 20% de atividades residuais relativas foi de 2,24, sendo que estes valores estão próximos aos descritos por Ologhobo (14) para farinha de soja processada em autoclave e tostada e inferiores aos relatados por Kakade et al.(13) e Anderson et al.(15). Friedman (16), na sua revisão de literatura sobre o valor de proteínas de diferentes fontes alimentares, descreveu que geralmente o valor de PER acima de 2,00 está relacionado com proteína de boa a alta qualidade e o valor de PER abaixo de 1,5, com proteína de qualidade baixa a pobre.

Os tratamentos de soja com 20% de atividades residuais relativa de IT apresentaram diferenças significativas ($p \leq 0,05$) para os valores de PER. Isto, possivelmente foi devida a diferença nas quantidades de unidades inibidoras de tripsina (BR 36/20% com 8,61 UIT/mg e BRM 95-5262/20% com 5,63 UIT/mg de amostra). Com isso, os resultados de PER indicaram que seriam necessários mais tempo de processamento térmico para que a soja BR 36 tenha valor de PER similar ao BRM 95-5262 com 20% de atividades residuais relativa. Considerando as mesmas atividades de IT ao redor de 8,5 UIT/mg de amostra, neste caso BR36 e BRM95-5262 com 20 e 30% de atividades residuais relativa de IT respectivamente, observou-se que os valores médios de PER não foram significativos ($p \geq 0,05$). Portanto, para avaliação biológica da proteína é importante também, considerar a concentração inicial de atividade de IT da amostra original e não as porcentagens de atividades residuais relativa como muitos investigadores tem considerado.

Os valores de NPR dos tratamentos de soja BR 36 e BRM 95-5262 crua não foram significativos entre si ($p \geq 0,05$). Porém, estes valores foram menores quando comparados com o padrão caseína. Resultados similares de NPR foram observados por Ologhobo (14). Observando o cultivar e a linhagem de soja (Tabela 3), os resultados de NPR para todos os processamentos térmicos não diferiram entre si ($p \geq 0,05$). Os dois tratamentos contendo 20% de atividades residuais relativa de IT não apresentaram diferenças significativas ($p \geq 0,05$) para NPR, embora tenha sido observado diferenças entre os valores de PER.

Considerando a atividade de IT inicial das amostras de soja, observa-se na Tabela 3 que o processamento térmico melhorou os valores de PER e NPR. Os resultados de PER e NPR estão indicando a importância da utilização de linhagem de soja com baixas atividades de IT devido a redução do tempo de processamento e possivelmente a manutenção da qualidade protéica.

Nos ensaios biológicos, os coeficientes de digestibilidade aparente e verdadeira (CDA e CDV) foram determinados com a finalidade de observar a quantidade de proteína ingerida e absorvida em todos os tratamentos realizados. Os valores médios de CDA (Tabela 3) da caseína diferiu significativamente ($p \leq 0,05$) de todos os tratamentos. Os tratamentos com soja crua BR36 e BRM95-5262 apresentaram valores médios de CDA de 68,34 e 75,05, respectivamente, e não diferiram ($p \geq 0,05$) entre si. Resultados similares de CDA para soja crua foram observados por Rackis et al.(17), Bressani (18), Gumbmann & Friedman (19) e Ologhobo (14). Entretanto, Struthers et al. (20) verificaram valores médios de CDA (83,50%) superiores para farinha de soja crua. Comparando os tratamentos de soja crua com as processadas termicamente, observou-se que não houve

TABELA 3
Valores médios de PER, NPR, CDA e CDV dos diferentes tratamentos

| Tratamento | PER | NPR | CDA | CDV |
|--------------------|---------|---------|----------|---------|
| Caseína | 2,23 AB | 2,78 A | 88,62 A | 92,40 A |
| BR 36 crua | 1,08 C | 1,70 C | 68,34 C | 71,97 B |
| BR 36/40%IT * | 1,92 B | 2,41 AB | 75,83 BC | 78,33 B |
| BR 36/20%IT | 1,93 B | 2,37 B | 74,52 BC | 74,82 B |
| BRM 95-5262 crua | 1,24 C | 1,84 C | 75,05 BC | 78,31 B |
| BRM 95-5262/ 30%IT | 2,07 AB | 2,37 B | 76,71 B | 78,99 B |
| BRM 95-5262/20%IT | 2,24 A | 2,72 AB | 76,55 B | 78,77 B |
| CV (%) | 10,00 | 10,08 | 6,14 | 5,84 |

Médias seguidas de letras diferentes, na vertical, diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

* IT = inibidor de tripsina

CV = coeficiente de variação

diferenças significativas ($p \geq 0,05$) para os valores de CDA. Com relação aos valores de CDV, verifica-se que o valor da caseína foi de 92,40% e diferiu ($p \leq 0,05$) de todos os demais tratamentos, as quais não apresentaram diferenças significativas ($p \geq 0,05$) entre si. Ologhobo (1989) também não observou diferenças entre a farinha de soja crua e processada termicamente para os valores de CDV.

Esperava-se que do ponto de vista nutricional, que os tratamentos com a farinha de soja processada apresentassem maiores valores de CDA e CDV que a farinha de soja crua, no entanto no decorrer do experimento observou-se que, segundo dados coletados, houve menor consumo e menor excreção nos tratamentos com farinha de soja crua e maior consumo e maior excreção nos tratamentos com farinha de soja processada, portanto justifica os resultados obtidos, os quais não diferiram entre si. Com isso sugere-se mais estudos de avaliação biológica com a farinha de soja crua e processada termicamente.

Os valores médios de CDV para os tratamentos de soja processadas termicamente de BR36/20% IT e BRM95-5262/30% IT, foram de 74,82 e 78,99, respectivamente, sendo que estes valores estão próximos aos descritos por Ologhobo (14) e Bressani (18) para as farinhas de soja processadas termicamente (69 a 79%). Entretanto, Rackis et al (17) e Struthers et al. (20) observaram valores de CDV de 80% a 85% nas farinhas processadas termicamente.

CONCLUSÃO

Os resultados permitem concluir que os valores de PER e NPR obtidos com a proteína de soja foram dependentes da atividade inicial de IT e do seu respectivo tratamento térmico. O processamento térmico não melhorou os valores de CDA e CDV nas farinhas de soja utilizadas.

REFERÊNCIAS

- Snyder HE, Kwon TW. Soybean Utilization. Avibook New York, 1987, p. 346.
- Pusztai A, Watt WB, Stewart JC. A comprehensive scheme for the isolation of trypsin inhibitors and the agglutinin from soybean seeds. *J Agric Food Chem.*, 1991;39:862-866.
- Liener IE. Implications of antinutritional components in soybeans foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition.* 1994;34: 31-67.
- Domagalski JM, Kollipara KP, Bates AH, Brandon DL, Friedman M, Hymowitz T. Nulls for the major soybean Bowman-Birk protease inhibitor in the genus *Glycine*. *Crop Science*, 1992;32:1502- 1505.
- Anderson-Hafermann JC, Zhang Y, Parsons CM. Effect of heating on nutritional quality of conventional and Kunitz trypsin inhibitor-free soybeans. *Poultry Sci.*, 1992;71:1700-1709.
- Herkelman KL, Cromwell GL, Cantor AH, Stahly TS, Pfeiffer TW. Effects of heat treatment on the nutritional value of conventional and low trypsin inhibitor soybeans for chicks. *Poultry Sci.*, 1993;72:1359- 1369.
- Kakade ML, Rackis JJ, McGhee JE, Puski G. Determination of trypsin inhibitor activity on soy products: a collaborative analysis of an improved procedure. *Cereal Chemists*, 1974;51:376-382.
- Liu K, Markakis P. An Improved colorimetric method for determining antitryptic activity in soybean products. *Cereal Chemists*, 1989;66:415-422.
- A.O.A.C. Association of Official Analytical Chemists - Official Methods of Analysis. Fifteenth edition. Arlington, Virginia. Volume two. 1990. 1298p.
- Walker AF. The estimation of protein quality. Chapter 8. In: *Developments in food protein*. Edited by HUDSON, B.E.F., vol. 2. London and New York. 1983. 339p.
- Urbano G, López-Jurado M, Hernández J. Nutritional assessment of raw, heated, and germinated lentils. *J. Agric. Food Chem.*, 1995; 43:1871-1877.
- Sullivan DM, Carpenter DE. Methods of analysis for nutrition labeling. Chapter 29. Copyright by AOAC International. Arlington, Virginia, USA, 1993. 624p.
- Kakade ML, Hoffa DE, Liener IE. Contribution of trypsin inhibitors to the deleterious effects of unheated soybeans fed to rats. *J. Nutri.*, 1973;103:1772-1778.
- Ologhobo AD. Improving the nutritive value of soybean (*Glycine max* (L) Merr.) through processing: biochemical and protein quality studies. *Trop. Agri. (Trinidad)*, 1989;66:290-296.
- Anderson RL, Rackis JJ, Tallent WH. Biologically active substances in soy products. In: *Soy protein and human nutrition*. Ed. By Wileke HL, Hopkins DT, Waggle DL. Academic Press, New York, 1979.
- Friedman M. Nutritional value of proteins from different food sources. A review. *J. Agric Food Chem.*, 1996;44:6-29.
- Rackis JJ, McGhee JE. Biological threshold levels of soybean trypsin inhibitors by rat bioassay. *Cereal Chemists*, 1975;52:85-92.
- Bressani R. The role of soybean in food systems. *J Am Oil Chem Soc.*, 1981;58:392-399.
- Gumbmann MR, Friedman M. Effect of sulfur amino acid supplementation of raw soy flour on the growth and pancreatic weights of rats. *J Nutri.* 1987;17:1018- 1023.
- Struthers BJ, McDonald JR, Dahlgren RR, Hopkins DT. Effects on the monkey, pig and rat pancreas of soy products with varying levels of trypsin inhibitor and comparison with the administration of cholecystokinin. *J Nutri.* 1983;113:86-97.

Recibido: 14-04-2000

Aceptado: 16-11-2000