

Evaluación de cambios estructurales en las proteínas de soja durante el proceso de obtención de harina desgrasada de soja



AUTORES: PABLO A. SOBRAL, GONZALO G. PALAZOLO, JORGE R. WAGNER
E-mail: jwagner@unq.edu.ar

Laboratorio de Investigación en Funcionalidad y Tecnología de Alimentos (LIFTA). Departamento de Ciencia y Tecnología. Universidad Nacional de Quilmes. Buenos Aires.

Resumen / Abstract

En este trabajo se aplicaron las técnicas de calorimetría diferencial de barrido modulado (MDSC) y espectroscopía infrarroja por transformadas de Fourier (FTIR) para analizar los cambios estructurales en las proteínas durante dos procesos de obtención de harina desgrasada de soja. Los ensayos calorimétricos se llevaron a cabo sobre muestras molidas dispersadas en agua y en NaCl 1M. En esta última condición, se obtuvieron termogramas con tres picos bien definidos, siendo el de menor temperatura atribuible fundamentalmente a la desnaturalización de la ureasa y el factor antitriptico de Kunitz.

Las muestras tratadas en la etapa de desolventización y tostado mostraron una reducción prácticamente total de la entalpía asociada a esta transición, lo cual se correlacionó con valores indicativos de inactivación (actividad ureásica: $\Delta pH < 0,03$ y actividad antitriptica 10-20% del valor inicial). Los ensayos FTIR dieron espectros con las zonas amida I, II y III, características de estructura secundarias de proteínas. Los cambios principales se observaron en la zona amida I (pico principal a 1630 cm^{-1}) después de la desolventización y tostado y tienen relación con reacciones de agregación proteica. Una disminución del 20% de este pico se corresponde a una reducción del mismo orden de la solubilidad en KOH y del 3-4% de lisina reactiva.

In this work, Modulated Differential Scanning Calorimetry (MDSC) and Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) techniques were applied to analyze structural changes in proteins during two processes used to obtain defatted soybean meal. Calorimetric assays were performed on ground samples dispersed in water and 1 M NaCl. In this condition, thermograms were obtained with three well-defined peaks, and the peak that appeared at the lower temperature was mainly attributed to urease denaturation and the antitryptic factor of Kunitz.

Samples treated during the desolventizing-toasting stage showed an almost total reduction of enthalpy associated to this transition, which correlated with indicative values of inactivation (urease activity: $\Delta pH < 0.03$ and antitryptic activity: 10-20% of initial value). FTIR essays showed spectra with amide I, II and III bands, which are characteristic of secondary structures of proteins. The major changes were observed in the amide I band (main peak at 1630 cm^{-1}) after desolventizing and toasting and are related with protein aggregation reactions. A 20% reduction in this peak correlates with a similar reduction in KOH solubility and a 3-4% reduction of reactive lysine.

Palabras claves / Key words

Soja, harinas, proteína, DSC, FTIR, factores antitripticos, lisina, solubilidad.

Soybean, meal, protein, DSC, FTIR, antitryptic factors, lysine, solubility.

• Introducción

La producción de aceite a partir de poroto de soja genera un derivado proteico, la harina desgrasada de soja, que se destina fundamentalmente para alimentación animal, pero en condiciones adecuadas puede ser usada para consumo humano. En ambos casos, la harina desgrasada de soja debe estar correctamente inactivada por calor sin haber sufrido alteraciones considerables en las propiedades nutricionales de sus proteínas.

La presencia de los factores antitripticos activos limita el empleo de los productos de soja como alimento o ingrediente alimentario debido a que inhiben la digestión proteica (Pearson, 1983). A nivel industrial, la inactivación se controla con la ausencia casi total de la actividad ureásica. El Código Alimentario Argentino, en el artículo 1407-capítulo XIX, establece un valor de $\Delta\text{pH} < 0,3$ para esta actividad, que corresponde a una actividad antitriptica residual del 10-20% (Mustakas y col., 1981). Esta inactivación se realiza junto con la eliminación del n-hexano, por calentamiento de la soja laminada o expandida con vapor de agua a más de 100 °C (Thomas y col., 1997). Esta etapa se denomina desolventización-tostado debido a que las condiciones empleadas conducen a un tostado que le otorga un color parduzco no enzimático de la harina en grado variable (por reacciones tipo Maillard entre proteínas y oligosacáridos del grano), lo cual puede afectar además la solubilidad y digestibilidad proteica y la biodisponibilidad de lisina (Mustakas y col., 1981, Cheftel y col., 1989).

Las etapas previas a la desolventización y tostado de la harina en las cuales se aplica calor, como son el acondicionamiento, el laminado, la extrusión, la extracción y la etapa final del proceso, el secado, pueden también producir cambios en las proteínas de la harina de soja. Son tres los tipos de modificaciones que se pueden producir sobre las proteínas como resultado del calentamiento: 1) desnaturalización, 2) agre-

gación y 3) alteración de aminoácidos. El grado de desnaturalización se puede evaluar por calorimetría diferencial de barrido (DSC). Anderson (1992) mostró que con esta técnica es posible diferenciar una harina de soja activa de una inactivada. La agregación proteica, a diferencia de la desnaturalización, afecta negativamente el aprovechamiento nutricional de las proteínas.

El grado de agregación, que no es necesariamente directamente proporcional al de desnaturalización, se evalúa con medidas de los índices de dispersibilidad de la proteína (PDI) y el índice de solubilidad del nitrógeno (NSI), ambos en agua y más recientemente por medio de la solubilidad proteica en una solución diluida de KOH (Araba y Dale, 1990a,b). La alteración de aminoácidos se produce cuando el tratamiento térmico va más allá de una simple desnaturalización/agregación, por realizarse a temperaturas muy elevadas o tiempos prolongados. La pérdida de lisina disponible atribuida a reacciones de glicosilación, es una de las modificaciones de aminoácidos más comunes en harinas de soja tostadas (Mustakas y col., 1981).

Los métodos diseñados para evaluar lisina reactiva son en general tediosos y requieren una total solubilización de la muestra, lo cual es muy difícil en las harinas tostadas (Goodno y col., 1981). Los métodos mencionados no dejan de dar sólo informaciones parciales de los cambios estructurales, por ende, hace falta emplearlos en forma conjunta. Puede ser de interés disponer de nuevas técnicas capaces de detectar cambios estructurales más globales que suministren información valiosa respecto al deterioro en la calidad nutricional de las proteínas de la soja.

Uno de los métodos que está tomando cada vez mayor aplicación para analizar estructuras de compuestos complejos y en particular de proteínas, es el de espectroscopia infrarroja de transformada de Fourier (FTIR, Fourier transform infrared spectroscopy) (Haris y Severcan,

1999; Singh, 2000). Trabajos recientes muestran la capacidad de esta técnica para detectar cambios estructurales en proteínas de reserva β -conglucina (7S) y glicina (11S) presentes en harinas de leguminosas y en aislados de soja (Wang y col., 2011). Los espectros FTIR de proteínas constan fundamentalmente de tres bandas de absorción principales (denominadas amida I, II y III) que dan información del tipo de estructura β -plegada, α -hélice o estructura desordenada (*random coil*) y de la presencia de agregados proteicos.

El objetivo de este trabajo es evaluar los cambios producidos en las proteínas de soja durante las distintas etapas de los procesos de obtención de harina desgrasada de soja empleando las técnicas de Calorimetría Diferencial de Barrido Modulada (MDSC) y Espectroscopía infrarroja por transformadas de Fourier (FTIR), en comparación con métodos actuales de control.

• Materiales y Métodos

Toma y preparación de muestras

Se realizó un muestreo en las plantas de producción de harinas desgrasadas de soja de dos empresas dedicadas al procesamiento de semilla de soja (Terminal 6 Industrial y Bunge Argentina, ambas localizadas en Puerto General San Martín, Santa Fe, Argentina) y que utilizan procesos diferentes: en el caso de Terminal 6 Industrial las muestras fueron tomadas en la planta que procesa láminas de soja en un extractor de baja altura de capa (*shallow bed extractor*), mientras que la planta de Bunge en Puerto General San Martín utiliza expandir en la planta de preparación y un extractor de altura de capa alta (*Deep bed extractor*), en la planta de extracción por solvente.

Se tomaron como mínimo 500 g de muestras en las distintas etapas del proceso, desde el inicio (granos de soja) hasta la obtención del producto final (hari-

na de soja desgrasada y con bajo tenor de humedad - usualmente 12%) según se muestra en la Tabla 1. En ambos procesos se partió de porotos de soja frescos (actividad ureásica ΔpH 2,2-2,3). Las muestras de harinas desgrasadas, desolventizadas y tostadas se molieron en un molino a cuchillas y posteriormente se tamizaron con un tamiz de 500 μm de apertura. Debido a sus contenidos de humedad relativamente elevados (15-18%), las muestras de harina que salen del desolventizador - tostador - DT (HST) se refrigeraron inmediatamente para evitar la proliferación de hongos, y antes de ser molidas, se secaron en una estufa a 50 °C con presión reducida.

Actividad ureásica

Se determinó en unidades de ΔpH según el método Ba-9-58 (AOCS, validado en 1997) y se expresó como actividad ureásica relativa (%) respecto a la actividad en el poroto de soja de partida.

Actividad antitriptica

Se determinó según el método de González y Carrillo (1987), con leves modificaciones (Sobral y Wagner, 2009). Se expresó como Actividad antitriptica relativa (%) respecto a la actividad en el poroto de soja de partida.

Solubilidad proteica en KOH (KOHPS)

Los ensayos se realizaron en base a la Norma ISOCD 14244 (2011), midiendo la solubilidad en una solución de KOH 0,036M. Los resultados se expresaron como g de proteína soluble en KOH por 100 g de proteína total de la muestra.

Lisina reactiva

Se determinó con el método espectrofotométrico basado en la reacción del o-ftalaldehído (OFA) y el β -mercaptoetanol

(β -ME) con aminos primarias en medio alcalino (Church y col., 1983; Goodno y col., 1981) y se expresó en g de lisina reactiva/16 g N. La pérdida porcentual

debida al tratamiento térmico se calculó a partir del contenido de lisina reactiva de las muestras sin y con tratamiento, respectivamente.

Figura 1 - Termogramas de dispersiones en agua de muestras recolectadas en las distintas etapas de los procesos 1 (a) y 2 (b) de elaboración de harina desgrasada de soja.

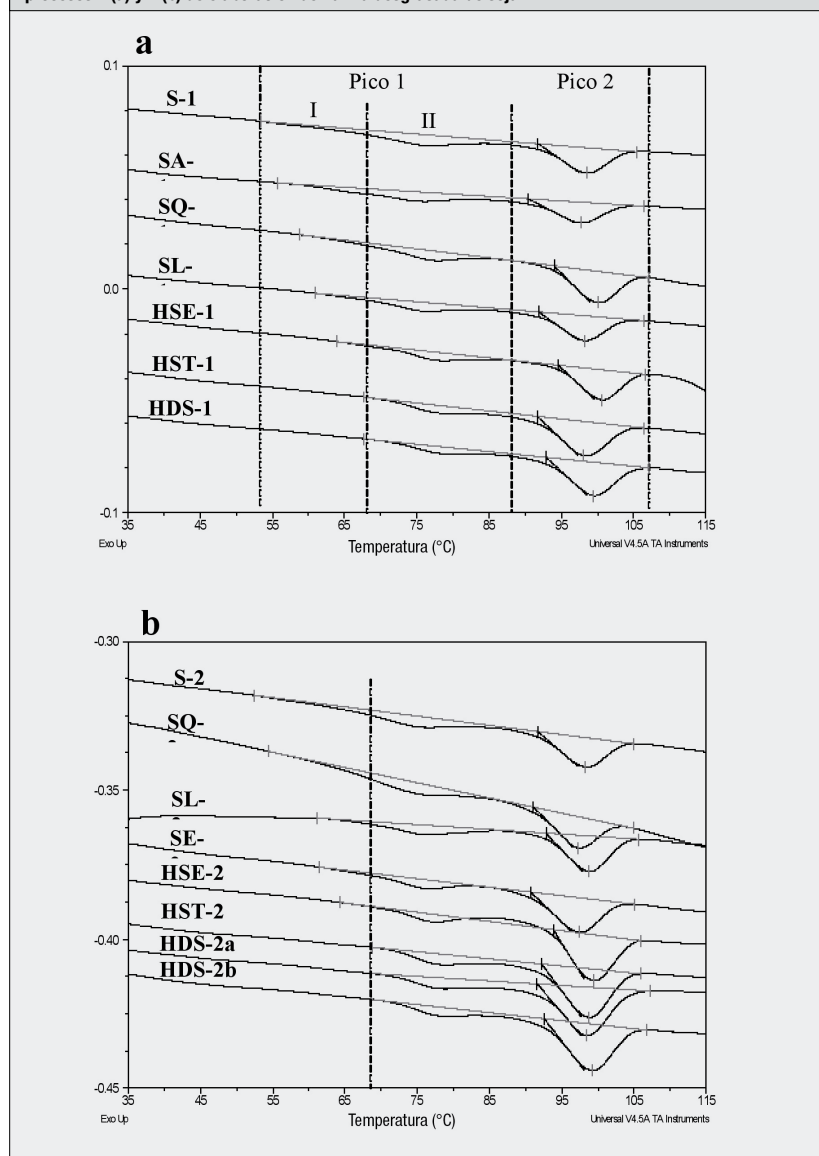


Tabla 1: Nomenclatura de muestras colectadas en las diferentes etapas de dos procesos de obtención industrial de harina desgrasada de soja.

Muestras	Proceso 1	Proceso 2
Granos de soja de partida	S-1	S-2
Granos acondicionados	SA-1	---
Granos quebrados-descascarados	SQ-1	SQ-2
Granos laminados	SL-1	SL-2
Granos laminados y expandidos	---	SE-2
Harina salida del extractor (desgrasada con n-hexano)	HSE-1	HSE-2
Harina Salida del Toaster (desgrasada-desolventizada e inactivada)	HST-1	HST-2
Harina de soja desgrasada y secada	HDS-1	HDS-2

Calorimetría diferencial de barrido modulado (MDSC)

Se empleó un equipo MDSC Q200 (TA Instruments, USA). Los estudios se realizaron sobre dispersiones acuosas de las muestras a una concentración de 30% *P/P* en agua y en NaCl 1M. Se utilizaron cápsulas herméticas estándar con 10-15 mg de dispersión, se calentaron a 5°C/min desde 20 a 120 °C con una modulación de $\pm 0,50$ °C cada 50 segundos; como referencia se usó una cápsula vacía. En los termogramas obtenidos se determinó la temperatura de pico (T_p , °C) y la entalpía parcial de cada transición, así como la entalpía total de desnaturalización proteica con el trazado de una línea de base como se indica en la Figura 1. Las entalpías se expresaron en J/g proteína seca, para lo cual se tuvo en cuenta el contenido de proteína de las muestras.

Espectroscopia infrarroja por transformadas de Fourier (FTIR)

Se prepararon dispersiones de las muestras al 10% *P/P* en agua destilada y se homogeneizó en un homogeneizador rotor/estator de alta velocidad (Ultraturrax T-25) a 20000 rpm durante 1 min. Se colocaron 100 μ l de dispersión en el ATR ZnSe, cubriendo todo el cristal y secando suavemente con secador de cabello desde una distancia de aproximadamente 15-20 cm hasta total deshidratación. Se obtuvieron los espectros de absorbancia con un FTIR Shimadzu modelo IR Affinity -1. Las condiciones de medida fueron: Apodización: Happ-Genzel, número de barridos: 25, Resolución: 4 (cm^{-1}) y rango del espectro: 650 a 4000 cm^{-1} .

Análisis estadístico

Los resultados fueron analizados por ANOVA y la diferencia significativa entre valores fue determinada por el test de Fisher (Systat, 5.0; Systat, Point Richmond, CA) con un nivel de signifi-

cancia de 0,05. Cada valor informado es la media de al menos dos determinaciones y está expresada con su desviación estándar.

Resultados y discusión

Las muestras analizadas en este trabajo provienen de dos líneas de producción de harina de soja desgrasada (Tabla 1). En el proceso 1 se realiza la extracción con n-hexano sobre granos de soja descascarados y laminados, en tanto que en el proceso 2 se incluye una etapa adicional que consiste en una extrusión de la soja laminada. Sobre los collets producto de la extrusión, se realiza la extracción del aceite. En las Figura 1 a y b se muestran los termogramas DSC de las muestras en agua correspondiente a los procesos 1 y 2, respectivamente.

Los termogramas DSC de los granos de soja de partida (S-1 y S-2) presentan dos endotermas denominadas picos 1 y 2 con valores de temperaturas de pico (T_p) de 77 y 98 °C respectivamente. En base a estudios previos el pico 1 correspondería a la desnaturalización de la β -conglucina (globulina de reserva 7S) junto con el factor antitriptico de Kunitz (KTI), la ureasa y la fracción más termolábil del factor antitriptico de Bowman-Birk (Sorgentini y Wagner, 1999). Otras proteínas con actividad enzimática como la α -amilasa y la lipoxigenasa tienen temperaturas de inactivación inferiores a los 90 °C (Kwok y Niranjana, 1995), por lo que también contribuirían al pico 1.

Por su parte, el pico 2 corresponde a la desnaturalización de la glicina (globulina de reserva 11S) y la lectina. Con el objeto de analizar los termogramas DSC en agua, se dividió el área del pico 1 en dos partes: I y II, por debajo y encima de 68 °C respectivamente. A simple vista se observa una disminución paulatina del área I-I con las distintas etapas de ambos procesos y la desaparición total de dicha área después de la desolventación y tostado de la harina (HST). Los

valores de las entalpías de cada transición y de la entalpía total de los ensayos en agua se muestran en la Tabla 2a.

En el proceso 1 se observa que la disminución más importante en el área I-I se da al pasar de HSE (0,54 J/g) a HST (0 J/g), en cambio en el proceso 2 hay una disminución adicional en la etapa de extrusado o expandido (SL 0,67 J/g \rightarrow SE 0,40 J/g) y luego una reducción paulatina y no total (HSE 0,22 J/g \rightarrow HST 0,034 J/g). Estos resultados coinciden con los tempranamente informados por Andersen (1992), que en un estudio por microcalorimetría (a 1,2 °C/min) mostró que las harinas de soja activas exhiben un pico endotérmico cercano a 60 °C, que desaparece en las harinas inactivadas por calor.

Sessa (1992) mostró que el KTI se desnaturaliza a una temperatura cercana a los 100-105 °C, inferior a la de desnaturalización de 7S y 11S (>110 °C) cuando la humedad de la harina es del 20%. Este dato permite entender por qué, en las condiciones de temperatura y presión del vapor de agua de las torres de tostado en ambos procesos, es posible lograr una adecuada inactivación sin desnaturalizar las proteínas de reserva de la harina de soja.

Respecto del área I-II de los termogramas en agua, se ve en ambos procesos una disminución en las primeras etapas (acondicionamiento, quebrado, laminado) que no supera el 45% de desnaturalización. Aún siendo evidente la ocurrencia de desnaturalización proteica durante el proceso, el valor de entalpía total permanece prácticamente invariable.

Este resultado puede explicarse de al menos dos maneras: a) Las proteínas se desnaturalizan parcialmente conduciendo a especies más resistentes que luego se desnaturalizan totalmente a temperaturas superiores o b) Los tratamientos térmicos producen cambios en las interacciones de las proteínas con otros componentes del grano, modificando su estabilidad térmica.

En apoyo de esta última hipótesis se sabe que los fosfolípidos se vuelven extraíbles en éter de petróleo cuando se somete la harina a un tratamiento térmico, más si este supera los 100 °C, fenómeno que se conoce como “jumping” (Kemper, 2012.). Estos fosfolípidos libres son susceptibles de asociarse o formar complejos con las proteínas de la soja, especialmente con la globulina de reserva 11S (Ohtsuru y Kito, 1983) y posiblemente cambien su entalpía de desnaturalización. En el proceso 1 la única etapa en la que realiza un calentamiento a más de 100 °C es la de desolventización y tostado, en tanto que en el proceso 2 se realiza además en la extrusión. Precisamente después de estas etapas se observa un aumento significativo del área del pico 2, en el cual se produce la desnaturalización de 11S (Tabla 2).

Sorgentini y Wagner (1999) mostraron que las proteínas de reserva de soja, a diferencia de las proteínas de suero de soja, tienen una estabilidad térmica dependiente de la fuerza iónica, de modo que si se calienta una dispersión de aislado de soja en una solución de NaCl 1M, las transiciones térmicas de 7S y

11S se producen a 17,4 °C y 20,3 °C, respectivamente, por encima de las obtenidas en agua.

En la Figura 2 se observa que el termograma de la harina de soja activa entera está compuesto por tres picos bien defi-

nidos. Los picos 2 y 3 corresponden a la desnaturalización de las proteínas de reserva 7S y 11S que se hacen más termoestables por efecto de la alta fuerza iónica, contribuyendo la lectina al pico 2. El pico 1 (que corresponde a KTI, ureasa y otras proteínas minoritarias del

Figura 2 - Termogramas de dispersiones en NaCl 1M de algunas muestras provenientes del proceso 1 de elaboración de harina desgrasada de soja.

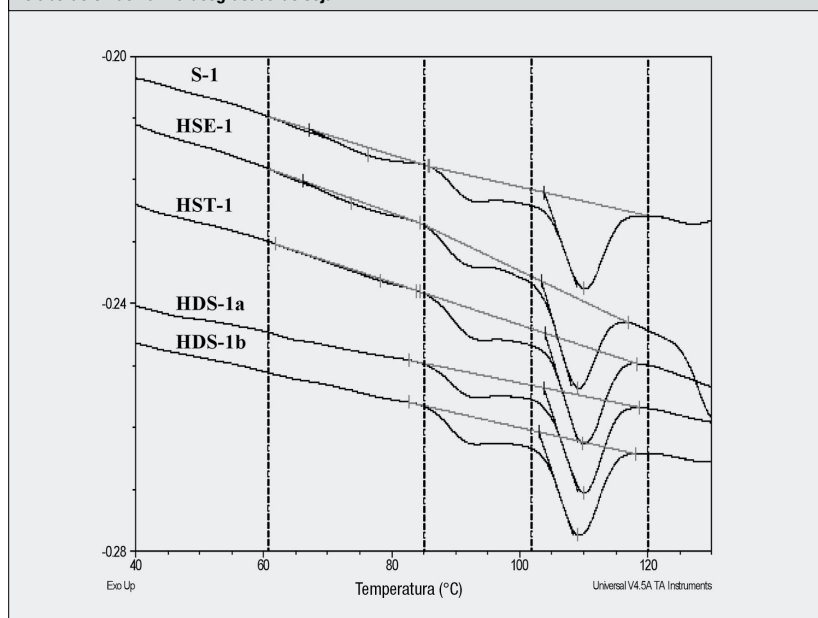


Tabla 2: Entalpías parciales y totales de desnaturalización térmica en harinas de soja correspondientes a los procesos 1 y 2. Los termogramas

MDSC fueron realizados con dispersiones de las muestras en agua (A) y en NaCl 1M (B)

A. Ensayos en agua										
Muestras		ΔH (J/g proteína seca)								
		Pico 1				Pico 2		ΔH Total		
		Área I		Área II						
S-1	S-2	1,73 ± 0,24 ^a	1,12 ± 0,06 ^a	4,56 ± 0,23 ^a	3,06 ± 0,21 ^a	7,78 ± 0,40 ^a	6,34 ± 0,31 ^a	13,97 ± 0,70 ^a	10,52 ± 0,83 ^{a,b}	
SA-1	----	1,37 ± 0,15 ^a	-----	3,57 ± 0,30 ^b	-----	6,93 ± 0,50 ^a	-----	11,66 ± 0,93 ^a	-----	
SQ-1	SQ-2	0,94 ± 0,10 ^b	1,03 ± 0,05 ^a	2,74 ± 0,11 ^c	2,79 ± 0,15 ^a	6,92 ± 0,33 ^a	5,53 ± 0,24 ^b	10,15 ± 0,41 ^b	9,35 ± 0,56 ^a	
SL-1	SL-2	0,61 ± 0,08 ^c	0,67 ± 0,06 ^b	2,49 ± 0,17 ^c	2,41 ± 0,16 ^b	6,80 ± 0,63 ^{a,b}	6,18 ± 0,45 ^a	10,32 ± 0,93 ^b	9,25 ± 0,74 ^a	
----	SE-2	-----	0,40 ± 0,05 ^c	-----	1,91 ± 0,30 ^b	-----	7,06 ± 0,40 ^c	-----	9,38 ± 0,81 ^a	
HSE-1	HSE-2	0,54 ± 0,10 ^c	0,22 ± 0,08 ^d	2,62 ± 0,15 ^c	1,93 ± 0,18 ^b	6,30 ± 0,37 ^b	7,85 ± 0,63 ^c	9,46 ± 0,38 ^b	10,00 ± 0,85 ^a	
HST-1	HST-2	0,000 ^d	0,034 ± 0,021 ^e	2,57 ± 0,10 ^c	2,25 ± 0,21 ^b	9,73 ± 0,80 ^c	8,95 ± 0,47 ^d	12,3 ± 1,07 ^a	11,24 ± 0,82 ^b	
HDS-1	HDS-2	0,000 ^d	0,040 ± 0,026 ^e	1,86 ± 0,52 ^d	2,03 ± 0,24 ^b	7,70 ± 1,10 ^a	8,08 ± 0,57 ^{c,d}	9,55 ± 1,60 ^b	10,07 ± 0,70 ^a	

B. Ensayos en NaCl 1M										
Muestras		ΔH (J/g proteína seca)								
		Pico 1		Pico 2		Pico 3		ΔH Total		
S-1	S-2	1,03 ± 0,35 ^a	1,61 ± 0,23 ^a	2,39 ± 0,36 ^{a,b}	1,46 ± 0,19 ^a	6,62 ± 0,12 ^a	5,51 ± 0,10 ^a	10,04 ± 0,40 ^{a,d}	8,57 ± 0,15 ^a	
SQ-1	SQ-2	0,94 ± 0,23 ^a	1,212 ± 0,16 ^a	2,75 ± 0,29 ^a	1,86 ± 0,22 ^a	6,60 ± 0,10 ^a	5,23 ± 0,90 ^a	9,63 ± 0,18 ^a	8,49 ± 0,60 ^a	
SL-1	SL-2	0,85 ± 0,12 ^a	1,03 ± 0,14 ^a	2,01 ± 0,15 ^a	1,54 ± 0,05 ^a	5,86 ± 0,26 ^b	5,37 ± 0,31 ^a	8,72 ± 0,50 ^b	7,94 ± 0,30 ^b	
HSE-1	HSE-2	0,40 ± 0,14 ^b	0,65 ± 0,23 ^b	1,85 ± 0,08 ^a	1,60 ± 0,09 ^a	5,32 ± 0,22 ^c	6,68 ± 0,36 ^b	7,57 ± 0,11 ^c	8,93 ± 0,47 ^a	
HST-1	HST-2	0,076 ± 0,060 ^c	0,12 ± 0,21 ^c	1,76 ± 0,18 ^a	3,63 ± 0,10 ^b	8,11 ± 1,32 ^d	10,25 ± 0,50 ^c	11,06 ± 1,04 ^d	14,16 ± 0,60 ^c	
HDS-1	HDS-2	0,020 ± 0,034 ^c	0,07 ± 0,05 ^c	2,62 ± 1,38 ^a	1,96 ± 0,55 ^a	9,50 ± 2,34 ^d	8,29 ± 1,51 ^c	11,84 ± 1,63 ^{a,d}	11,31 ± 1,21 ^d	

Los valores son promedios con sus desviaciones estándar resultantes de al menos tres determinaciones. En cada columna, valores con letras iguales indican que no hay diferencias significativas entre ellos (p<0,05)

suelo de soja), disminuye en ambos procesos haciéndose imperceptible en las harinas inactivadas por calor.

En la Tabla 2b se observa que la entalpía correspondiente al pico 1 disminuye en ambos procesos en la etapa de extracción, pero recién se reduce a valores inferiores al 10% del inicial en la muestra HST. De igual modo a lo que se observó en los ensayos en agua, la entalpía del pico 3 (atribuible exclusivamente a 11S), aumenta en la muestra HST, lo que reafirma la idea de la formación de complejos con fosfolípidos o algún otro cambio estructural. La entalpía total en los ensayos con NaCl 1M no se mantie-

ne constante, sino que se reduce hasta la extracción y aumenta luego del tostado.

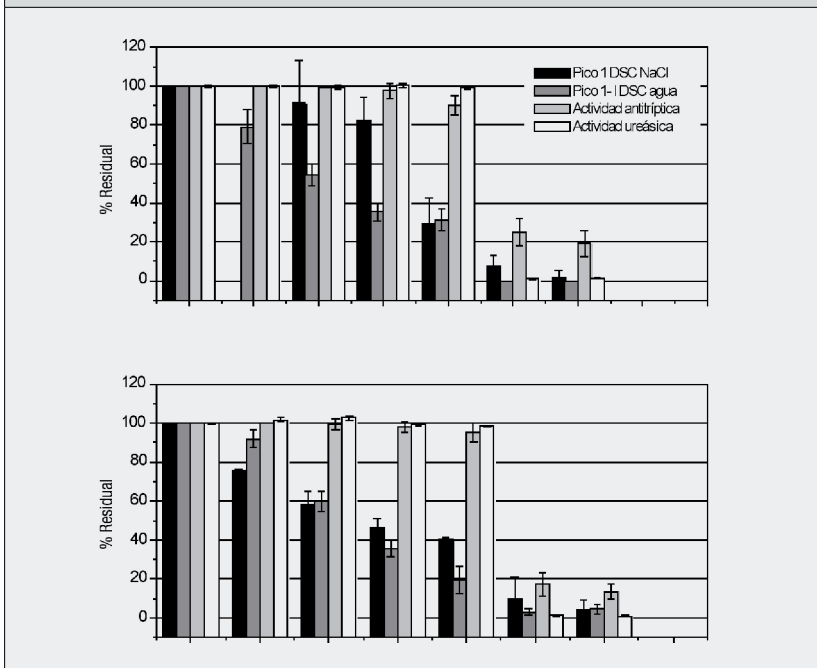
Cabe destacar que las harinas desgrasadas secadas de los dos procesos (HDS-1, HDS-2) tienden a valores de entalpía levemente inferiores a las HST, debido a que el secado y posterior almacenamiento generan una desnaturalización adicional.

La entalpía asociada a los picos 1-I (en agua) y 1 (en NaCl) expresadas como un porcentaje residual respecto al poroto de soja inicial, se comparó con los porcentajes residuales de las actividades ureásica y antitriptica (Figura 3). Como es esperable, las actividades antitriptica

y ureásica van asociadas, disminuyendo en forma brusca recién en el proceso de desolventización y tostado.

La actividad ureásica se reduce en esta etapa a valores inferiores a 1,33% (<0,03 unidades de ΔpH), en tanto que la actividad antitriptica alcanza valores entre 10 y 20% del valor inicial, lo que se considera una adecuada inactivación (Thomas y col., 1997). Esta actividad residual es atribuida al factor de Bowman-Birk, que es más termoestable que el KTI y que requeriría temperaturas superiores a 120 °C para su inactivación (Sobral y Wagner, 2009).

Figura 3 - Comparación entre los valores residuales de las actividades antitriptica y ureásica y de entalpías de desnaturalización correspondientes a muestras de dos procesos de elaboración de harina desgrasada de soja.



Los residuales de entalpía, a diferencias de las actividades mencionadas, comienzan a disminuir antes del tostado, alcanzando valores menores en el proceso 2 que incluye la etapa adicional de expansión. En estas etapas se estarían desnaturalizando especies proteicas no ligadas a la actividad ureásica ni antitriptica, como son la amilasa, la lipoxigenasa entre otras. Recién luego de la desolventización y tostado (muestras HST) los valores residuales de entalpía de los picos 1-I y 1 fueron en todos los casos menores al 10%.

Para evaluar si el grado de desnaturalización proteica e inactivación alcanzado durante la etapa de desolventización y tostado no afecta la calidad nutricional de las proteínas de la harina de soja, se determinó el contenido de lisina reactiva y la solubilidad en KOH (Tabla 3). El grupo ε-amino de la lisina es muy reactivo y uno de los más susceptibles de dar reacciones tipo Maillard con compuestos carbonílicos presentes en la harina cuando ésta es sometida a un calentamiento. Los valores de lisina reactiva (también denominada lisina disponible) de las harinas salidas del extractor de ambos procesos (HSE-1 y HSE-2) son los esperables para una harina de soja activa (Hurrell y col., 1979; Kratzer y col., 1990), y la pérdida porcentual de lisina en las muestras HST es del orden del 3% y no supera el 5% una vez que la harina desgrasada inactiva es secada, enfriada y almacenada.

Tabla 3: Lisina reactiva y solubilidad proteica en KOH y sus pérdidas después de la etapa de desolventización y tostado en muestras de harinas de soja provenientes de los procesos 1 y 2

Muestras proceso 1	Lisina reactiva		Proteina soluble en KOH	
	Contenido (g/16 g N)	Pérdida (%)	KOH PS (%)	Pérdida (%)
SL-1	nd	nd	94,9 ± 1,3	---
HSE-1	6,30 ± 0,04	0	97,8 ± 0,4	0
HST-1	6,16 ± 0,03	3,25	83,6 ± 1,4	14,5
Muestras proceso 2				
SE-2	nd	nd	92,3 ± 0,7	----
HSE-2	6,73 ± 0,05	0	97,1 ± 1,2	0
HST-2	6,50 ± 0,01	3,42	79,1 ± 1,4	18,5
HDS-2	6,42 ± 0,08	4,53	75,4 ± 1,0	22,3

Estos valores responden a lo establecido por el Código Alimentario Argentino para harinas de soja para alimentación humana. El valor más elevado de solubilidad en KOH lo dan las muestras HSE (97-98%), lo cual indica que, de haber agregados proteicos, éstos están mayoritariamente formados por uniones no covalentes y fácilmente disociables a alto pH. El tratamiento térmico en las condiciones de inactivación produjo en ambos procesos una pérdida de KOHPS del 14-18%, lo cual es aceptable según lo informado por otros autores (Araba y Dale, 1990a,b, Parsons y col., 1991). Sin embargo, estas pérdidas son superiores a las de lisina reactiva, dado que las reacciones de glicosilación mencionadas no son específicas de lisina y además se suma la formación de agregados con uniones covalentes por otras vías como son la formación de isopéptidos y de puentes disulfuro (Cheftel y col., 1989).

Son muchos los trabajos de otros investigadores que mostraron la versatilidad y alcance de la técnica FTIR para detectar cambios estructurales en proteínas aisladas y en sistemas biológicos (Kong y Yu, 2007, Singh, 2000, Susi y Byler, 1986), pero no hay información del uso de esta técnica en proteínas de soja. En principio, se debe saber que los espectros FTIR de proteínas, lípidos y carbohidratos son diferentes, debido a sus distintas estructuras. Siendo las harinas de soja sistemas compuestos por estas especies y que van cambiando su composición, estructura e interacciones durante el proceso de obtención, sería esperable que puedan detectarse diferencias por FTIR.

La Figura 4 muestra los espectros FTIR en el rango de número de onda donde se encuentran los picos característicos de proteínas. Para ambos procesos se puede observar que los espectros de las muestras S a SL (para proceso 1) y SE (para proceso 2) son prácticamente similares (Figuras 4 a y c). Aparece un pico a 1740 cm^{-1} que denominamos A, que de acuerdo a Nzai y Proctor (1998), puede atribuirse al alto contenido de aceite, ya que es un pico característico del enlace C=O

de triglicéridos y fosfolípidos. En las harinas desgrasadas el pico A se reduce casi totalmente, quedando un pequeño hombro atribuible a los fosfolípidos residuales que quedan en la harina (Figuras 4 b y d).

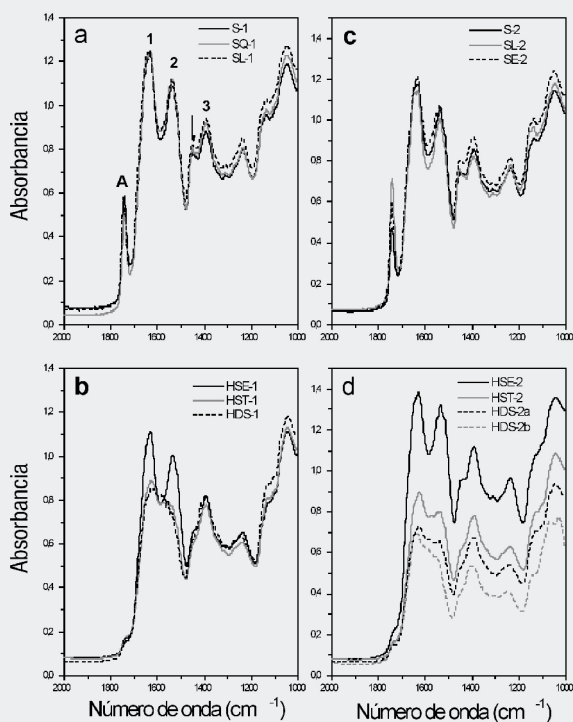
Entre las muestras HSE y HST la diferencia en las zonas amida I y II es notable en ambos procesos. Los picos 1 y 2 dan información de la estructura secundaria ya que corresponden a las zonas de vibración denominadas amida I, estiramiento del enlace C=O y amida II, balanceo del enlace NH de la unión peptídica (Singh, 2000). Estos picos son bien definidos y de mayor intensidad en HSE y disminuyen notablemente en las harinas inactivadas. El pico marcado con una flecha (1450 cm^{-1}) que se encuentra en la zona intermedia amida II-amida III, puede corresponder a vibraciones de distintas uniones: enlaces C=C de anillos aromáticos, deformación de COH de polisacáridos y también a fosfolípidos (Nzai y Proctor, 1998). Este pequeño pico

se detecta en los espectros de todas las muestras previas a la desolventización y tostado (S hasta HSE) (Figuras 4 a, c) y desaparece (o queda sólo un hombro) a partir de esta etapa (muestras HST y HDS), lo cual puede tener relación con las reacciones de glicosilación y/o con las interacciones proteína-fosfolípidos provocadas por el calentamiento. Si se tiene en cuenta que en estas muestras hay una glicosilación efectiva detectable por la reducción de lisina reactiva, nos podríamos inclinar por la primera opción.

Las intensidades de los picos 1 y 3 (1630 y 1392 cm^{-1} , respectivamente) correspondientes a los espectros FTIR de todas las muestras estudiadas, se graficaron en las Figuras 5 a, b. Puede observarse que el pico 3 varía en menor grado que el pico 1. Esto puede deberse a que el pico 3 tiene relación con los polisacáridos de la cáscara de soja (dato no mostrado). La intensidad del pico 1 alcanza valores de absorbancia cercanos o superiores a 1,2 para las muestras S a HSE, y disminuye

Figura 4

Espectros FTIR de muestras de dos procesos de elaboración de harina desgrasada de soja, proceso 1 (a y b), proceso 2 (c y d). Los picos 1, 2 y 3 son las principales señales de las regiones amida I (1600-1700 cm^{-1}), amida II (1500-1600 cm^{-1}) y amida III (1200-1450 cm^{-1}), respectivamente. El pico A corresponde a C=O de lípidos.



a valores menores a 0,8 y cercanos a los del pico 3 para las muestras HST y HDS. La relación de intensidades de los picos 1 y 3 da cuenta de estos cambios espectrales; para ambos procesos las harinas de soja desgrasadas inactivas reducen la intensidad pico 1/pico 3 en un aproximadamente un 70-80%. Pareciera que estos resultados tienen relación con la pérdida de solubilidad en KOH de las proteínas de soja (Tabla 3), aunque se requieren estudios confirmatorios.

• Conclusiones

Los estudios por calorimetría diferencial de barrido modulado de muestras prove-

nientes de dos procesos industriales de obtención de harinas desgrasadas de soja mostraron una progresiva desnaturalización de las proteínas más termolábiles, fundamentalmente en las etapas que incluyen un tratamiento térmico. En la etapa de desolventización y tostado se detecta una reducción muy marcada de la entalpía atribuible al factor antitriptico de Kunitz, lo cual correlaciona con la reducción de las actividades antitriptica y ureásica. No se observó desnaturalización de las proteínas de reserva 7S y 11S, por el contrario, se detectó un aumento de la endoterma correspondiente a 11S que estaría indicando cambios estructurales debidos a glicosilación (Maillard) e interacción con

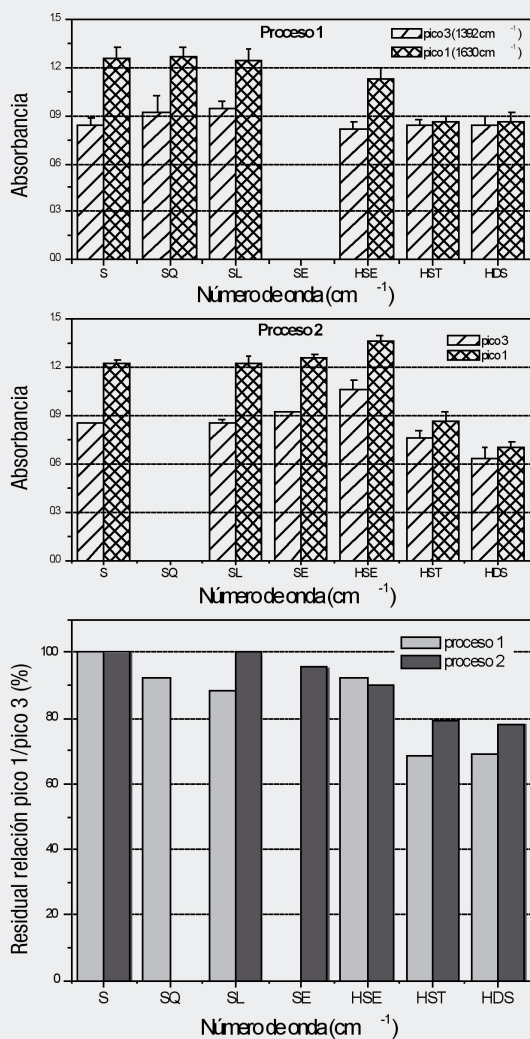
fosfolípidos. Las reacciones de agregación asociadas condujeron a una disminución del contenido de lisina reactiva y de la solubilidad de las proteínas en KOH, dentro de un rango aceptable. En este trabajo se pudo comprobar que estos cambios estructurales en las proteínas de soja, ocurridos en mayor grado durante la inactivación térmica de la harina desgrasada, pueden ser fácilmente detectados con un análisis FTIR.



Bibliografía

- Anderson R.L. 1992 Effects of Steaming on Soybean Prot-ins and Trypsin Inhibitors. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 69, 12, 1170-1176.
- Araba, M., Dale, N.M., 1990a. Evaluation of protein solubility as an indicator of overprocessing soybean meal. *Poultry Science* 69, 76–83.
- Araba, M., Dale, N.M., 1990b. Evaluation of protein solubility as an indicator of underprocessing of soybean meal. *Poultry Science* 69, 1749–1752.
- Chefel JC, Cuq JL, Lorient D. Propiedades nutricionales de las proteínas. En: *Proteínas alimentarias*. Ed. Acribia. S.A. 1989. Cap. 5, 107-139.
- Church, F.C., Swaisgood, H.E., Porter, D.H., Catignani, G.L. (1983). Spectrophotometric assay using o-phthalaldehyde for determination of proteolysis in milk and isolated milk proteins. *Journal of Dairy Science*, 66, 1219-1227.
- González, R. and Carrillo, D. 1987. *Nutrición humana. Manual de prácticas*. Editorial Pueblo y Educación. La Habana (Cuba). 34.
- Goodno, C.C., Swaisgood, H.E., Catignani, G.L. (1981). A fluorimetric assay for available lysine in proteins. *Analytical Biochemistry*, 115, 203-211.
- Haris P.A., Severcan F. 1999 FTIR spectroscopic characterization of protein structure in aqueous and non-aqueous media. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 7 1999 207–221.
- Hurrell, R.F., Lerman, P, & Carpenter, K.J. Reactive lysine in foodstuffs as measured by a rapid dye-binding procedure. *Journal of Food Science*, 44, 1221-1231 (1979).

Figura 5: Intensidad de picos 1 y 3 (1630 y 1392 cm⁻¹) de los espectros FTIR de harinas de soja y su relación en función de las diferentes etapas de dos procesos industriales.



- ISOCD 14244 (ISO 2011). Oilseed meals-Soya meals-Determination of soluble protein in potassium hydroxide solution. En revision.
- Kemper T. 2012. DT Hop-Jumping Effect. Informe de Desmet Ballestra Group.
- Kong J. y Yu S. Fourier Transform Infrared Spectroscopic Analysis of Protein Secondary Structures. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* 2007, 39(8), 549–559.
- Kwok , K. C., & Niranjana, K. (1995). Review: effect of thermal processing on soymilk. *International Journal of Food Science & Technology*, 30(3), 263-295.
- Kratzer, F.H., Bersch, S., Vohra, P. Evaluation of heat-damage to protein by Coomassie Blue G dye-binding. *Journal of Food Science*. 55, 805-807 (1990).
- Mustakas G.C., Moulton K.J., Baker E.C., Kwolek W.F. 1981 Critical Processing Factors in Desolventizing-Toasting Soybean Meal for Feed. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 58, 3, 300-305.
- Ohtsuru M. y Kito M. 1983. Association of phosphatidylcholine with soybean 11S globulin. *Agric. Biol. Chem.* 47: 1907.
- Parsons, C. M., Hashimoto, K., Wedekind, K., & Baker, D. H. (1991). Soybean protein solubility in KOH as an in vitro test for in vivo protein quality: Effects of particle size and overprocessing. *Journal of Animal Science*, 69, 2918–2924.
- Pearson, A.M. 1983. Soy proteins. In *Developments in Food Protein-2* (B.J.F. Hudson, ed), 67. Applied Science. Pub., London.
- Sessa D.J. Hydration Effects on the Thermal Stability of Proteins in Cracked Soybeans and Defatted Soy Flour. *Lchcnsm.·Wiss. u.·TechnoL.* 25. 365-370 (1992).
- Singh, B.R. 2000 Infrared análisis of peptides and proteins. Principles and applications. ACS Symposium Series 750. American Chemical Society, Washington.
- Sobral P.A., Wagner J.R. Relación entre la composición y la actividad antitrípica de sueros de soja y el comportamiento térmico de sus proteínas aisladas. *Información Tecnológica*. 2009, 20 (5), 65-73.
- Sorgentini D.A., Wagner, J.R. Comparative study of structural characteristics and thermal behavior of whey and isolate soybean proteins. *Journal of Food Biochemistry*. 1999, 23 (5), 489-507.
- Susi H, Byler DM. Resolution-enhanced fourier transform infrared spectroscopy of enzymes. *Methods Enzymol* 1986, 130: 290–311.
- Wang C., Jiang L., Wei D., Li Y., Sui X., Wang Z., Li D., Effect of Secondary Structure determined by FTIR Spectra on Surface Hydrophobicity of Soybean Protein Isolate. *Procedia Engineering* 15 (2011) 4819–4827.
- Thomas M., van Kol E.M. R. A. H., Tamminga S., Verstegen M.W.A., van der Poel A.F. B. 1997 Effects of Water, Steam and Shear Conditioning on the Protein Quality of Soy Grits. *J Sci Food Agric* 74, 392-400.

• Agradecimientos

Los autores agradecen a la Asociación Argentina de Grasas y Aceites (ASA-GA), que ha financiado estos estudios en el marco de un convenio con la Universidad Nacional de Quilmes.