

CONTENIDO EN INHIBIDORES DE TRIPSINA DE LA HARINA DE SOJA SEGÚN ORIGEN: COMPARACIÓN DE DOS MÉTODOS ANALÍTICOS

Sueiro, S.¹, Hermida, M.¹, González, M.¹, Serrano, M.P.² y Mateos, G.G.²

¹Laboratorio de Mouriscade, Vilanova-Lalín. 36515 Pontevedra. gonzalo.gmateos@upm.es.

²Departamento de Producción Animal, UPM. Ciudad Universitaria, s/n. 28040, Madrid.

INTRODUCCIÓN

La harina de soja (HS) es una fuente de proteína vegetal extensamente empleada en la alimentación animal. Las habas de soja presentan altos niveles de factores antinutricionales que se reducen mediante procesado térmico. Los factores antinutricionales más importantes del haba son los inhibidores de tripsina (IT) que reducen la digestibilidad de la proteína bruta (PB) y de los aminoácidos (De Coca *et al.*, 2008; Valencia *et al.*, 2008). La calidad de la HS varía en función del procesado térmico al que ha sido sometida. Un procesado insuficiente no desnaturaliza suficientemente los IT por lo que la digestibilidad de la PB se verá reducida. Por el contrario, un sobre-procesamiento disminuye el contenido en IT pero también la biodisponibilidad de algunos aminoácidos. Mateos *et al.* (2002) indicaron que niveles altos de IT en el pienso son una de las causas más relevantes de problemas entéricos en pollos de carne. La determinación de la actividad de los IT (AIT) es el método más preciso para determinar la calidad de la HS, pero requiere un alto nivel de especialización en laboratorio. Los dos métodos más utilizados por la industria para la determinación de IT son el método 14902:2001 de las Normas UNE-EN-ISO (2002) y el método 71-10 de la AACC (1973) modificado por Hamerstrand *et al.* (1981). Ambos métodos tienen complicaciones laboratoriales, son tediosos de realizar y suponen un coste elevado. En este estudio se analizaron muestras de HS de tres orígenes (Estados Unidos, USA; Argentina, ARG; Brasil, BRA) mediante estos dos métodos para evaluar posibles diferencias en función del origen.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se analizaron un total de 150 muestras de HS (50 de cada origen) recogidas en tres años (2006 a 2008). Los métodos utilizados para determinar la AIT fueron el método 14902:2001 de las Normas UNE-EN-ISO (2002) modificado por nuestro laboratorio y el método 71-10 de la AACC (1973) modificado por Hamerstrand *et al.* (1981). Ambos métodos se basan en la reacción enzimática de la tripsina con un sustrato; L-BAPA, isómero L purificado para el método UNE-EN-ISO (2002) modificado y DL-BAPA, mezcla de los isómeros D y L para el método AACC (1973) modificado. Brevemente, las modificaciones introducidas en el método UNE-EN-ISO (2002) consistieron en moler la muestra a 0,2 mm en vez de a 0,5 mm y extraer los IT agitando la muestra durante 3 h a temperatura ambiente en vez de 24 h en frigorífico. La razón del cambio radica en que cuanto menor es el tamaño de partícula de molienda y mayor la temperatura y la agitación, mayor será la superficie de contacto y exposición de los IT para su extracción.

Por otro lado, y dado el alto coste del reactivo L-BAPA, con el fin de optimizar costes se realizó un blanco para cada cinco muestras analizadas al mismo tiempo en vez de uno por cada muestra. Tras comprobarse que, para muestras con valores de IT similares, el valor de blanco obtenido no influía en el resultado final, se redujo el consumo de reactivo a la mitad con el consiguiente ahorro económico. Para la determinación de la AIT, se pesó 1 g de muestra molida con tamiz de 0,2 mm. Se añadieron 50 ml de NaOH (ajustando el pH a 9,5) para extraer los IT y se agitó la mezcla durante 3 h a temperatura ambiente. Una vez extraídos los IT, se efectuó la reacción enzimática entre la tripsina y el sustrato en presencia de IT (37°C durante 10 min y parada mediante la adición de HAC 30%) haciendo reaccionar por un lado la tripsina y los sustratos solos en un tubo de ensayo (tubo A) y por otro lado la enzima y el sustrato (tubo B) en presencia de una cantidad de IT suficiente para generar entre un 60 y un 40% de la inhibición del color que se generó en el tubo A. Finalmente se centrifugaron los dos tubos de ensayo y se midió espectrofotométricamente a 410 nm la

absorbancia de la p-nitroanilina generada en la reacción enzimática. Las medidas espectrofotométricas resultantes junto con el factor de dilución del extracto inicial de la muestra se relacionaron con la concentración de IT. El resultado final se expresa como AIT (mg de tripsina inhibidos por g de muestra de HS en materia seca). Los resultados se analizaron mediante el procedimiento GLM de SAS (Statistical Analysis Systems Institute, 1990) para diseños al azar organizados de forma factorial. En el modelo se incluyeron los efectos principales (origen de la HS, método de análisis) y su interacción. Para la separación de medias según el origen de la HS se llevó a cabo un t-test. Los datos se presentan en una tabla como medias normales.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El contenido medio en PB (%MS) de las HS analizadas fue $53,1 \pm 1,60$ ($54,4^a \pm 1,75$ para USA, $52,0^c \pm 1,53$ para ARG y $52,9^b \pm 1,50$ para BRA). Para la lisina el valor medio (%MS) fue $3,2 \pm 0,14$ ($3,3^a \pm 0,050$ para USA, $3,2^b \pm 0,078$ para ARG y $3,2^b \pm 0,19$ para BRA). La interacción entre el origen de la HS y el método de análisis no fue significativa por lo que sólo se presentan las medias para los efectos principales (Tabla 1). Las HS USA tuvieron una mayor AIT que las HS ARG y BRA ($P < 0,001$). Esta variación en el contenido en IT según origen de la HS puede ser debido al tipo de procesado que se realiza en cada país. Un valor bajo en AIT no es indicativo necesariamente de buena calidad de la HS puesto que valores reducidos podrían también indicar que la HS está sobre-procesada. Por ello, es recomendable realizar ensayos sobre la disponibilidad de la lisina (lisina reactiva) en estas muestras.

No se detectaron diferencias significativas en el valor de AIT entre los dos métodos de análisis. Por tanto, ambos métodos pueden ser utilizados sin problema en el laboratorio. Sin embargo, debido a que el coste del reactivo utilizado en el método 14902:2001 de las Normas UNE-EN-ISO (2002) modificado es casi 40 veces mayor que el del reactivo utilizado en la metodología AACC (1973), se recomienda el uso del método AACC (1973) modificado por Hamerstrand *et al.* (1981).

Tabla 1. Influencia del origen de la harina de soja y del método analítico sobre la actividad de los inhibidores de la tripsina (AIT, mg/g MS)

Origen soja			Método análisis		e.e. n = 50	Probabilidad	
USA	Argentina	Brasil	ISO	AACC		Origen	Método
3,78 ^a ± 1,16	2,93 ^b ± 0,80	3,09 ^b ± 0,76	3,26 ± 0,98	3,27 ± 1,01	0,131	***	NS

NS: $P > 0,10$; ***: $P < 0,001$.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AACC. 1973. *Approved Methods of the American Association of Cereal Chemists*. Método 71-10. The Association: St. Paul, MN.
- De Coca-Sinova, A., Valencia, D. G., Jiménez-Moreno, E., Lázaro, R. y Mateos, G. G. 2008. *Poultry Sci.* 87: 2613-2623.
- Hamerstrand, G. E., Black, L. T. y Glover, J. D. *Cereal Chem.* 58: 42-45, 1981.
- Mateos, G. G., Lázaro, R. y Gracia, M. I. 2002. *J. Appl. Poult. Res.* 11: 437-452.
- Statistical Analysis Systems Institute. 1990. *SAS user's guide: statistics*. Versión 6, 4ª edición. Cary, NC: SAS Institute, Inc, USA.
- UNE-EN-ISO. 2002. *Animal Feedingstuffs-Determination of trypsin inhibitor activity of soya products (ISO 14902:2001)*.
- Valencia, D. G., Serrano, M. P., Lázaro, R., Latorre, M. A. y Mateos, G. G. 2008. *Anim. Feed Sci. Tech.* 147: 340-356.

A COMPARATIVE STUDY ON THE TRYPsin INHIBITOR CONTENT OF SOYBEAN MEAL OF DIFFERENT ORIGINS: INFLUENCE OF THE METHOD OF DETERMINATION

ABSTRACT: An experiment was conducted to study the trypsin inhibitor activity (TIA) of 150 samples of soybean meal (SBM) collected in 3 different countries (USA; Argentine, ARG; Brazil, BRA). In addition, the TIA of all the SBM samples was analyzed according to method 14902:2001 (UNE-EN-ISO, 2002) as modified by our laboratory or to method 71-10 (AACC, 1973) modified by Hamerstrand *et al.* (1981). Briefly, the modifications of the original UNE-EN-ISO (2002) method introduced by us consisted in grinding the sample at 0.2 mm instead of 0.5 mm, using less amount of reactive and extracting the TIA by shaking the mixture of the sample with NaOH for 3 h at ambient temperature instead at 24 h in refrigerator. The modifications introduced allowed to improve the efficacy of the extraction process. The SBM from USA had higher TIA than SBM from ARG and BRA. No differences were detected between TIA method analyses. Thus because of lower cost, AACC (1973) method is recommended.

Keywords: *trypsin inhibitor activity; methodologies; soybean meal; origin.*