

Centro de Investigación en Alimentación Y Desarrollo, R. [.

OBTENCIÓN DE UN HIDROLIZADO ENZIMÁTICO DE PROTEÍNAS DE SOYA DE BAJA ALERGENICIDAD

Por

RAMÓN ADOLFO RUIZ SALAZAR

MAESTRO EN CIENCIAS CON

TESIS APROBADA POR LA

EN NUTRICION Y ALIM

DIRECCION DE NUTRICION

COMO REQUISITO PARCIAL PA

EL GRADO DE



CONTENIDO

	Página
LISTA DE TABLAS.....	x
LISTA DE FIGURAS.....	xii
RESUMEN.....	xiii
INTRODUCCION.....	1
ANTECEDENTES.....	3
La Proteína de Soya	3
Proteína Vegetal como Alimento.....	3
El Frijol Soya como Recurso Alimentario.....	5
Composición Química del Frijol Soya	6
La proteína del Frijol Soya.....	8
Principales Factores Antinutricionales Presentes en el Frijol Soya.....	10
Principales Productos de Proteína de Soya.	15
La Proteína de Soya en las Fórmulas Infantiles.....	19
El problema de la Alergia Alimentaria en Infantes	20
Química y Biología de los Alergenos en Alimentos.	20
La Alergia Alimentaria.....	24
La Alergia Alimentaria en Infantes	26
Fórmula Infantil Hipoalergénica.....	28
Detección de Alergénos.....	33
El Proceso de Hidrólisis Enzimática de Proteínas.....	35
Aspectos Generales..	35
El Enlace Peptídico.....	36

	Página
Enzimas Proteolíticas.....	37
Sustratos de Proteinasa.....	38
Parámetros de control en el Proceso de Hidrólisis.....	39
Descripción del Proceso de Hidrólisis.....	40
Hidrolizados Protéicos de Perfil Nutricional.....	42
MATERIALES Y MÉTODOS	46
Reactivos.....	46
Acondicionamiento y Caracterización Parcial de la Materia Prima.....	47
Acondicionamiento.....	47
Caracterización.....	47
Obtención y Caracterización Parcial de un Concentrado Enzimático de Páncreas de Cerdo.....	51
Obtención del Extracto Enzimático.....	51
Activación de Zimógenos.....	54
Concentración y Liofilización del Extracto Enzimático de Páncreas.....	55
Caracterización Parcial del Concentrado Enzimático Liofilizado.....	55
Experimento de Hidrólisis y Análisis de los Productos.....	56
Curva de Proteólisis.....	56
Experimento de Hidrólisis.....	57
Análisis de los Productos de Hidrólisis.....	57
Obtención y Caracterización Parcial de la Fracción de Interés.....	59
Elección de la Fracción de Interés.....	59

	Página
Obtención Masiva de la Fracción de Interés.....	59
Análisis de la Fracción de Interés.....	60
RESULTADOS Y DISCUSION.....	67
Obtención y Caracterización Parcial del Concentrado Enzimático.....	67
Limpieza de Páncreas.....	67
Fraccionación con Sales de Amonio.....	67
Activación de Zimógenos.....	69
Caracterización Parcial del Concentrado Enzimático.....	71
Hidrólisis de Pasta de Soya y Análisis de los Productos.....	71
Curva de Proteólisis.....	71
Hidrólisis de Proteínas de Soya.....	74
Caracterización de la Fracción de Interés y Comparación con la Materia Prima Original.....	80
Concentración de Proteína.....	80
Solubilidad de Proteína.....	81
Actividad de Inhibidor de Tripsina.....	82
Detección de Lectinas.....	83
Antigenicidad.....	84
Alergenicidad.....	86
Aminograma.....	87
Valor Nutritivo de la Proteína.....	89
CONCLUSIONES.....	93
BIBLIOGRAFIA.....	95

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
1. Composición Aproximada del Frijol Soya y sus Partes.....	7
2. Porcentaje y Componentes de las Fracciones Ultracentrifugadas de Proteínas de Soya Extraíbles en Agua.....	9
3. Contenido de Aminoácidos de Algunos Productos de Proteínas de Soya	11
4. Factores Antinutricionales de Frijol Soya y sus Productos.....	16
5. Principales Tipos de Productos de Soya	18
6. Alergenos de Alimentos.....	22
7. Principales Síntomas de Alergia Alimentarias.....	25
8. Evolución de Fórmulas Infantiles Especiales.....	29
9. Perfil de Peso Molecular de Hidrolizados Proteicos	44
10. Registro de la Fase Móvil de la Cromatografía Líquida de Alta Resolución.....	52
11. Orden de Elución y Tiempos de Retención de Aminoácidos.....	53
12. Dietas Empleadas para los Estudios Biológicos de Calidad de Proteína.....	65
13. Grado de Hidrólisis de las Proteínas de Soya por la Acción del Concentrado Enzimático entre 0 - 24 h	75
14. Distribución de Tamaño de Partícula de la Pasta de Soya Molida	77
15. Balance de Masa de los Productos Obtenidos por Hidrólisis y Ultrafiltración	79
16. Perfil de Aminoácidos de Materia Prima y Fracciones de Ultrafiltración de 12 h de Hidrólisis.....	88

17. Perfil de Aminoácidos de Fracción de Interés Leche Humana y de Vaca.....	90
18. Comparación de Calidad de Proteína entre Caseína y Fracción de Interés.....	92

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Diagrama de Flujo para el Procesamiento de Proteína de Soya . . .	17
2. Manufactura de Hidrolizados de Proteínas para Productos Nutricionales.....	41
3. Actividad Semejante a Tripsina de los Precipitados en Sulfato de Amonio Después de Incubar a 37°C.....	68
4. Activación de Zimógenos con Tripsina Exógena de los Precipitados con Sulfato de Amonio a 37°C	70
5. Comparación de las Actividades Semejantes a Tripsina y Quimiotripsina del Concentrado Enzimático con Enzimas Comerciales	72
6. Efecto de la Temperatura sobre la Actividad Proteolítica del Concentrado Enzimático de Páncreas.....	73

RESUMEN

El objetivo de este trabajo de tesis, fue producir un hidrolizado enzimático de proteínas de soya de baja alergenicidad para utilizarse en fórmulas infantiles. Para lograrlo se preparó y caracterizó un concentrado enzimático de páncreas porcino usándose en proporciones de 0.02 y 0.04 (enzima:sustrato, p/p). La hidrólisis se realizó a diferentes temperaturas (35-55°C), con agitación constante y pH controlado a 8. Cada 6 h se tomaron alícuotas, se fraccionaron en celda de Amicon con membranas de 10 000, 3000 y 500 Da. Se analizaron proteína total (Lowry y Kjeldahl), aminograma (HPLC), grado de hidrólisis (N α -amino), solubilidad a diferentes pH, antigenicidad (con anticuerpos de conejo inmunizados con pasta) y actividades de inhibidores de tripsina y lectinas (ELISA), a la materia prima, alícuotas y fracciones. A la fracción entre 500-3000 Da, se le determinó además calidad de proteína in vivo en ratas de laboratorio. El extracto enzimático con 90% de proteína, presentó actividades de tripsina y quimiotripsina superiores a las enzimas crudas comerciales. Las condiciones óptimas de hidrólisis fueron enzima:sustrato 0.04, 50° C y 12 h. La fracción de interés entre 500 y 3000 Da conformó un 25% de la proteína inicial, con casi 90% de solubilidad en el rango de pH 6-8, con un perfil de aminoácidos semejante al de leche humana excepto por metionina. Dicha fracción presentó in vivo valor biológico y NPU semejantes ($p=0.05$) a los de la caseína, aunque su digestibilidad verdadera, fue un poco menor. Además, no presentó actividad de factores antifisiológicos y su antigenicidad fue al menos 16 000 veces menor que la de pasta de soya. En conclusión se obtuvo una fracción proteica con excelente perfil de aminoácidos, buena calidad de proteína (in vivo) y las características físicas y biológicas requeridas para formular un producto hipoalergénico para lactancia.

INTRODUCCION

La producción de péptidos de tamaño y composición definidos es una necesidad desde el punto de vista nutricional. Los péptidos se utilizan para alimentar pacientes con problemas intestinales, insuficiencia pancreática, malnutrición y otras enfermedades (Bautista et al., 1996; Schmidt et al., 1994; Milla, 1991). También se usan en las fórmulas para lactantes y niños pequeños con diarreas, intolerancias y alergias a las proteínas de la leche de vaca (Cordle, 1994; Halcken et al., 1993; Milla, 1991). En el primer caso, los péptidos tienen la ventaja, sobre los aminoácidos libres, de que se absorben más fácilmente y no producen la alta presión osmótica que culmina en diarreas. En las intolerancias y alergias a las proteínas, los péptidos además de las ventajas anteriores, tienen la de que a diferencia de las proteínas, el sistema inmunológico no los reconoce si son suficientemente pequeños. De esta manera, no desencadenan una respuesta alérgica (Ena et al., 1995; Halcken et al., 1993).

En muchos lugares, se sigue usando fórmula de soya como primera alternativa para alimentar niños alérgicos o intolerantes a las proteínas de la leche de vaca (Milla, 1991). Esta práctica ya está proscrita para niños alérgicos, porque más del 35% de ellos, desarrolla alergia a las proteínas de la soya sin hidrolizar (Halcken et al., 1993). En principio, las proteínas de la soya tienen el mismo potencial alergénico que cualquier otra proteína dietaria. Aunque en los casos de intolerancias a proteínas de leche de vaca y lactosa, su uso es adecuado (Egbert, 1996).

Debido a que la alergia a las proteínas de la leche de vaca es común durante el primer año de vida (entre 0.2-5% de los nacidos vivos), se han desarrollado las fórmulas hipoalérgicas (Mahmoud et al., 1992). Hay fórmulas basadas en péptidos obtenidos con hidrólisis extensiva de las proteínas de la leche de vaca, para alimentar a los que ya presentaron

sintomas. Para los niños con alto riesgo de alergias, como son los hijos de padres alérgicos, se recomiendan las fórmulas con péptidos obtenidos por hidrólisis parcial (Restani et al., 1995). Estas últimas, son mejor aceptadas por los infantes, ya que contienen menos aminoácidos libres y no presentan sabor amargo.

Sin embargo, ha habido casos de infantes con reacciones de hipersensibilidad provocados por las proteínas hidrolizadas de leche de vaca. Lo que puede deberse a la presencia de epitopes a los cuales algunos infantes fueron sensibilizados (Ena et al., 1995). Estos hallazgos muestran la necesidad de mejorar las fórmulas existentes, posiblemente explorando el uso de diferentes sistemas enzimáticos y de diversas fuentes proteicas. También, con el uso de la ultrafiltración, para remover las posibles proteínas y péptidos de alto peso molecular obtenidos de hidrólisis limitadas o menos extensivas (Halken y cols. 1993). El reto para la industria alimentaria es obtener péptidos de muy baja alergenicidad, con alto valor nutricional y sabor agradable (Rugo et al., 1992).

Quisimos tomar el reto, y consideramos la soya como una alternativa. Esto porque es una buena fuente de proteína, que desde hace muchos años se utiliza para elaborar fórmulas infantiles especiales (Egbert, 1996). También, la pasta de soya está disponible en México durante todo el año, a precio menor que la leche de vaca en polvo. Además, las fórmulas hipoalergénicas en el mercado, todas a base de proteínas lácteas, son de importación y por tanto, caras. Por último, no hay antecedentes bibliográficos de hidrólisis de proteínas de soya, con el objetivo de desarrollar fórmulas hipoalergénicas.

Así, nuestro objetivo fue: producir por medio de hidrólisis enzimática, una fracción de pasta de soya consistente en péptidos pequeños, con bajo contenido de aminoácidos libres, buena calidad nutricional y bajas alergenicidad y antigenicidad. Nuestra meta: que la fracción obtenida, pueda ser utilizada en las fórmulas infantiles hipoalergénicas.

ANTECEDENTES

La Proteína de Soya

Proteína Vegetal como Alimento

Las proteínas son un componente esencial e imprescindible de la dieta para que subsistan animales y humanos. La función básica de las proteínas en nutrición, es la de suplir adecuadamente (en cantidad y tipo) los aminoácidos necesarios para todas las funciones metabólicas. Así, el concepto de proteína de calidad tiene que ver con dos factores: su patrón de aminoácidos como primer determinante y la digestibilidad y biodisponibilidad de esos aminoácidos como segundo factor (FAO/WHO, 1991; Friedman, 1996).

En los países en desarrollo la principal carencia alimenticia son los productos proteicos. Estos son los más costosos de producir y por lo tanto los más difíciles de adquirir (Badui, 1981). El problema de obtener suficiente proteína para una población mundial en constante crecimiento esta lejos de mejorar. Se estima que la población mundial incrementará su número de 6 billones para el año 2000 a 8.3 billones para el año 2025 (Fukushima, 1994) Friedman (1996). calcula en 11 billones la población mundial para el año 2030. Además comenta las enormes diferencias que existen entre los países en desarrollo y desarrollados, en cuanto a sus fuentes de proteína. Si se incluye el factor calidad de proteína entonces estas diferencias se agravan aún más.

La conjugación de los dos factores: incremento de los costos en la obtención de proteína de origen animal y la creciente demanda de proteínas de la población mundial, influyó en la investigación y búsqueda de nuevas fuentes de proteína. Dentro de las alternativas manejadas, se destaca la promoción y uso de la proteína vegetal como alimento. Codex Alimentarius y FAO (1978), en función del creciente uso de esta última como alimento, desarrollaron los siguientes puntos como especificaciones y propuestas:

1 - La proteína vegetal diseñada para consumo humano, debe llenar un requerimiento nutricional definido y ser de uso seguro.

2.- La proteína vegetal usada como alimento o ingrediente, debe representar incentivos económicos para productores y consumidores.

3.- La proteína vegetal debe mejorar la dieta de poblaciones en riesgo nutricional y donde la leche, carne, pescado y derivados sean insuficientes o estén fuera del alcance económico de la mayoría.

4.- Los países mas desarrollados donde abunde la proteína vegetal como subproducto de la extracción de aceite, deben promover y divulgar su uso (Hutchinson, 1979).

Los productos primarios de proteína vegetal se denominan harinas cuando contienen menos de 65% de proteína. Cuando la proteína se concentra entre el 65-90% se llaman concentrados y si contienen mas de 90%, son aislados (Roberts, 1979). En los alimentos procesados hoy en día, las proteínas vegetales se usan para reemplazar ingredientes tradicionales que están en los alimentos en bajas concentraciones, y que son de importancia funcional más que nutricional. También, se usan en la fortificación de alimentos para mejorar su concentración de proteínas y para reemplazar parcial o totalmente las proteínas. Ejemplo del primer uso, es el reemplazo de la leche y huevos en productos de panadería; ejemplo del segundo uso, es la fortificación de alimentos infantiles o de la tortilla. En el tercer caso, el ejemplo es el uso de la proteína vegetal como extensor de productos cárnicos; así mismo lo es el reemplazo de las proteínas de leche de vaca en fórmulas infantiles (Roberts, 1979).

Son fuentes económicamente importantes en la obtención de proteína vegetal para alimentación: el frijol soya, las semillas de algodón y girasol, el cacahuate, la papa y el trigo (Roberts, 1979).

El Frijol Soya como Recurso Alimentario.

En China el significado de la palabra con la cuál se nombra al soya es "el gran frijol" (Simmons, 1991). Esto no debe sorprendernos debido al papel tan importante que ha jugado el soya en la dieta y cultura orientales, donde por centurias no solo ha servido como alimento sino también como medicina (Messina, 1995). Fukushima (1994), anlista los alimentos orientales derivados del frijol soya y los clasifica en dos grandes grupos: fermentados y no fermentados, destacando el tofu, el miso, el shoyu y el tempeh

A principios del presente siglo, se introdujo en América el cultivo del frijol soya. Se inició así un desarrollo pronunciado no solo en lo relacionado a la siembra, sino también en la tecnología de procesos y en el desarrollo de ingredientes con nuevas propiedades funcionales. A diferencia de Oriente, los productos derivados del soya son utilizados más como ingredientes que como alimento directo. Es decir, en los sistemas alimentarios se aprovechan sus propiedades funcionales.

Las razones que hacen importante al frijol soya como recurso alimentario ante la senedad del problema alimentario, abarcaría las siguientes.

1.- Las proteínas de oleaginosas son la mayor fuente de proteína de origen vegetal para el hombre, de estas el 70 % de la producción mundial corresponde a soya (Fukushima, 1994). Lusas y Riaz (1995), estima la producción mundial de harina de soya por año en 2 300 000 toneladas métricas, la de concentrados de soya en 150 000 y la de aislados de soya en 200 000.

2 - Por razones de salud, ya que existe un creciente interés en fuentes de proteína bajas en grasa y colesterol (Central Soya , 1993; Messina, 1995).

3.- Las proteínas de soya son una alternativa nutricional al uso de las proteínas de origen animal (Fukushima, 1994; Friedman, 1996).

4.- El frijol soya es la fuente mas eficiente de proteína que combina: alta calidad nutricional - bajo costo (Central Soya, 1993).

Es importante considerar los principales atributos nutricionales de los alimentos de soya. Desde los más básicos (proteína de alta calidad, libre de colesterol y lactosa, rico en ácidos grasos ω -3), hasta los más peregrinos como prevención y tratamiento de enfermedades cardiovasculares y cáncer (Kennedy, 1995; Messina, 1995; Carrol y Kurowska, 1995). De esta forma, se justifican los esfuerzos por integrar a la dieta este tipo de alimentos.

Composición Química del Frijol Soya

El frijol soya está clasificado como leguminosa y también pertenece al grupo de semillas aceitosas conocidas como oleaginosas. Está disponible en un amplio número de variedades, mismas que han sido seleccionadas por composición, desarrollo a determinada latitud, resistencia a enfermedades o bien otras características agronómicas (Harris y Karmas, 1977).

El frijol soya tiene un alto contenido de aceite y proteína, lo cual le caracteriza y distingue entre todas las leguminosas. La Tabla 1 muestra su composición proximal.

Este grano además, presenta un buen aporte de minerales como potasio y fósforo. Y en comparación con los granos de cereales los productos de soya son una buena fuente de vitaminas del complejo B. Aunque el tostado producido por la desolventización de la pasta de soya destruye la mitad de la tiamina (Liener, 1980).

El aceite es la principal razón económica del cultivo del soya en Occidente. Constituye el segundo nutrimento en importancia y en proporción representa una quinta parte de la semilla. Destacan en su composición, los ácidos grasos polinsaturados los que significan un 75 % del total (Harris y Karmas, 1977).

Tabla 1. Composición Aproximada del Frijol Soya y sus Partes

Fracción	%	(%)			
		Proteína*	Grasa	Carbohidratos	Cenizas
Grano completo	100	40	21	34	5
Cascarilla	8	9	1	86	4
Cotiledón	90	43	23	29	5
Hipocotiledón	2	41	11	44	4

* Factor (N x 6.25)

Harris y Karmas, 1977.

Aproximadamente una tercera parte de la semilla la constituyen azúcares solubles y polisacáridos insolubles. Entre los azúcares, son de importancia la rafinosa y la estaquiosa por su contribución a la flatulencia producto de la ingestión de algunos alimentos basados en soya. También contiene galactomananos, xilanos y celulosa, predominantemente en la cascarilla.

La Proteína del Frijol Soya.

La composición, valor nutricional y funcionalidad de la proteína de soya ha sido muy estudiada. El contenido de proteína para distintas variedades de soya cultivada en América, varía desde un 38.6% hasta un 42.9% (Hams y Karmas, 1997). la mayor parte de estas proteínas (aproximadamente 80-85%) están clasificadas como globulinas (Kinsella, 1979; Ge y Zhang, 1993, Plumb y cols., 1994) La glicinina representa el 60% del total de las globulinas (Plumb y cols., 1994).

La Tabla 2 enlista el rango de tamaño molecular de las proteínas de soya. Esta clasificación se basa en los respectivos tiempos de sedimentación, determinándose 4 fracciones principales. Las fracciones 2S y 7S son heterogéneas, pero las fracciones 11S y 15S son probablemente proteínas puras (Wijeratne, 1995). Las fracciones 7S (β -conglucina) y 11S (glicinina) constituyen la mayor parte de la proteína

Glicinina es un hexámero de 360 kDa es decir con 6 subunidades de 60 kDa. Cada subunidad tiene 2 cadenas; un polipéptido ácido de 40 kDa y un polipéptido básico de 20 kDa unidos por enlaces disulfuro (Plumb y cols., 1994). La β -Conglicina es una glicoproteína de 180 kDa con 3 subunidades de 76, 72 y 53 kDa (Giampietro et al., 1992). La fracción 15S es la mas pequeña y la menos conocida, aunque hay evidencia de que esta fracción es un dímero de glicinina. Esto la relaciona a la fracción 11S (Wolf y Nelsen, 1996).

Tabla 2. Porcentaje y Componentes de las Fracciones Ultracentrifugadas de Proteínas de Soya Extraíbles en Agua

Fracción	%	Componente	PM (Da)
2s	22	Inhibidores de tripsina	8000 - 21,500 ¹⁾
		Citocromo C	
7s	31	Hemaglutininas	110,000
		Lipoxigenasa	102,000
		Beta-amilasa	61,000
		7s globulina (β-conglicinina)	180,000 - 210,000 ^{1,2)}
11s	31	11s globulina (glicinina)	360,000 ¹⁾
15s	11	Polimeros (Dimeros de glicinina)	600,000 ^{1, 3)}

¹⁾ Wijeratne, 1995; ²⁾ Kinsella, 1979; ³⁾ Wolf y Nielsen, 1996.

Como función primaria, la proteína dietaria provee de los aminoácidos esenciales y el nitrógeno requerido por el organismo para así llevar a cabo la síntesis de tejido y otros compuestos necesarios para las funciones metabólicas normales. En este sentido, la proteína del frijol soya ha sido considerada de una relevante importancia nutrimental. Esto, porque presenta un valor biológico de 62.5% el cual está relativamente cerca del 73% que presenta caseína (Ge y Zhang, 1993). Su digestibilidad es de 90% comparado al 99% de la caseína, 98% de la proteína de huevo y 93% de la proteína de trigo (FAO/WHO, 1991). Además, la proteína de soya sustenta el equilibrio de nitrógeno corporal tanto como una proteína animal. Esto último se demostró cuando se comparó un concentrado de proteína de soya con proteínas de leche, en adultos y jóvenes, usando el método de balance de nitrógeno por 10 días. La media diaria de consumo de concentrado de soya para soportar el balance de nitrógeno fue 95 mg de N/kg (Friedman, 1996).

La Tabla 3 muestra la composición de aminoácidos de la proteína de frijol soya. Aunque el patrón de aminoácidos es insuficiente para predecir la utilización de esa proteína, se considera el perfil de aminoácidos del frijol soya como bueno, comparable al de las proteínas de origen animal. Este perfil, presenta buenos niveles de aminoácidos indispensables con excepción de los aminoácidos azufrados, metionina y cisteína, siendo metionina el aminoácido limitante (Friedman, 1996; FAO/WHO, 1991).

Principales Factores Antinutricionales Presentes en el Frijol Soya.

Desde que el cultivo de el soya se introdujo a los Estados Unidos fue reconocido como una valiosa fuente de proteína, utilizándose en la alimentación animal y mas recientemente en la dieta del hombre. Sin embargo, se debe reconocer la presencia de una serie de factores que afectan la calidad de la proteína y por consiguiente, limitan su uso. Liener (1994, 1981) comenta y clasifica estos factores en: estables y no estables (lábil) al calor. Entre los

Tabla 3. Contenido de Aminoácidos de algunos Productos de Proteína de Soya (g aminoácido/16 g de N)

Aminoácido	Harina de soya ²	Concentrado ¹	Aislado ¹
Asp	11.7	12.00	11.9
Tre	3.6	4.16	3.7
Ser	4.9	5.65	5.5
Glu	18.6	19.64	20.5
Pro	5.2	5.17	5.3
Gli	4.0	4.37	4.0
Ala	4.0	4.35	3.9
Cis	5.2	1.56	1.0
Met	1.1	1.35	1.1
Val	1.2	4.91	4.8
Ile	4.7	4.76	4.9
Leu	7.7	7.80	7.7
Tir	3.4	3.93	3.7
Fen	5.0	5.20	5.4
His	2.5	2.65	2.5
Lis	5.8	6.28	6.1
Arg	7.3	7.53	7.8
Tri	1.1	1.50	1.4

¹ Harris y Karmas, 1977; ² Friedman, 1996.

primeros, están las saponinas, factores flatulentos, lisinoalanina, alérgenos y estrógenos. Entre los que no soportan calor, están los inhibidores de tripsina, las hemaglutininas o lectinas y los fitatos.

Inhibidores de tripsina. Son los factores antinutricionales más estudiados de el soya. Pertenecen a dos familias principales: el inhibidor de tripsina de Kunitz, y el inhibidor de tripsina de Bowman-Birk. El primero es una proteína de 21 kDa de peso molecular, que incluye 2 puentes disulfuro. El segundo es una proteína de 8 kDa, con un alto contenido de cisteína y 7 puentes disulfuro. Ambos inhiben a las enzimas humanas tripsina y quimiotripsina (Reseland y cols., 1996). Se encuentran en los cuerpos proteicos del cotiledón en cantidades (según la variedad) de 35 a 123 mg de inhibidor por gramo de proteína. Cuando el frijol soya es procesado para obtener harina o pasta desgrasada, el inhibidor no es removido, por el contrario la harina se ve enriquecida en los niveles del inhibidor por el efecto de concentración (Anderson y Wolf, 1995).

El inhibidor de tripsina es responsable del 30 al 50 % del efecto inhibidor del crecimiento en ratas y de la hipertrofia pancreática de animales alimentados con harina de soya integral (Rackis, 1980). La hipertrofia del páncreas va acompañada por un incremento en su actividad secretora, como lo demostraron Reseland y cols. (1996). El proceso de calor al que son sometidos los productos de soya, debe ser controlado para que inactive a los inhibidores y no afecte otros nutrimentos, aumentando el valor nutricional del producto (Rouhana y cols, 1996). La proteólisis del inhibidor de tripsina es otra forma de disminuir la actividad de los inhibidores de tripsina (Vaintraub y Yattara, 1995). Esta disminución de actividad dependerá del grado y tipo de hidrólisis (Alder-Niesen, 1986; Vaintraub y Yattara, 1995).

Hemaglutininas o lectinas. Las lectinas son proteínas ampliamente distribuidas en la naturaleza, presentes en alimentos comunes en la dieta del hombre. Hace mucho tiempo se sabe que se encuentran en el frijol soya y otras leguminosas (Calderón de la Barca et al., 1991; Liener, 1981). Las lectinas tienen la

propiedad de ligarse a carbohidratos libres o localizados en los glicoconjugados de las superficie de las células de la membrana intestinal. Por ello, se relacionan al bajo valor nutricional de el frijol soya crudo.

Las lectinas del frijol soya al igual que los inhibidores de tripsina se destruyen con el calor, aunque hay evidencia de que resisten la inactivación por calor seco (Calderón de la Barca et al . 1991)

Fitatos. El ácido fítico es derivado del inositol, está fosforilado en los 6 grupos hidroxilo, por lo que puede unirse iónicamente a proteínas en medio acuoso (Rham y Jost, 1979). En el frijol soya, el ácido fítico se encuentra principalmente en los cuerpos proteicos en el cotiledón, tanto en forma soluble como insoluble (Anderson y Wolf, 1995). Se sabe que forma complejos (quelatos) con metales como el zinc, hierro, cobre y calcio. por lo que disminuye la absorción de estos metales en el intestino (Liener 1981; Anderson y Wolf, 1995)

Por otro lado, recientes trabajos sugieren que el ácido fítico tiene propiedades anticancerígenas (Messina y Barnes, 1991). Para el control de los niveles de ácido fítico en productos de soya, se sugiere el uso del calor, hidrólisis enzimática, cromatografía de intercambio iónico y el control de pH (Liener. 1981; Anderson y Wolf, 1995; Rham y Jost, 1979).

Saponinas. La mayoría de las listas de factores antinutricionales del soya en el pasado incluían a las saponinas. No porque hubiera una evidencia fuerte, sino mas bien su toxicidad era atribuida a la simple analogía con saponinas de otras fuentes que si inducían toxicidad (Anderson y Wolf, 1995; Liener. 1981). Recientemente a las saponinas presentes en frijol soya se les han atribuido efectos anticancerígenos e hipocolesterolémicos (Messina y Barnes, 1991). Por ello, existe justificación para removerlas de la lista de factores antinutricionales.

Las saponinas de el frijol soya son compuestos muy complejos; de composición y estructura diversa, lo cual hace difícil su análisis. Son estables al calor, y no son detectables en concentrados de proteína de soya procesados

con alcohol. Se ha comprobado que la fermentación de alimentos a base de proteínas de soya, degrada las saponinas (Anderson y Wolf, 1995).

Factores de flatulencia. Uno de los factores limitantes mas importantes, para la integración de el frijol soya a la dieta humana es la flatulencia asociada a su consumo (Liener, 1981). La flatulencia es atribuida a la ausencia de la enzima α -galactosidasa en la mucosa del intestino humano (Rackis, 1981) Esta enzima es necesaria para romper los enlaces α -galactosidicos de los azúcares rafinosa y estaquiosa. Consecuentemente, estos oligosacáridos pasan intactos al intestino delgado, donde son metabolizados por la microflora intestinal, produciendo gases como: el dióxido de carbono, hidrógeno y metano (Liener, 1981). Debido a que estos factores flatulentos son estables al calor, se recomienda para su eliminación: hidrólisis enzimática, germinación de la semilla y ultrafiltración de extractos acuosos (Liener, 1981).

Alergenos. Los alergenos de alimentos pueden ser definidos como sustancias con la capacidad de iniciar y provocar una reacción inmunológica en sujetos sensibles, conocida como alergia alimentaria (Taylor, 1992). En este sentido, la alergia al frijol de soya es considerada una de las mas comunes. Es superada en frecuencia solamente por las alergias al cacahuate, leche de vaca y huevo (Herian et al., 1990). En contraste con los factores antinutricionales asociados a alimentos, los alergenos presentan sus efectos solo en los individuos con predisposición al alergeno en cuestión (Liener, 1981). La reactividad inmunoquímica de la mayoría de las proteínas de soya es destruida en los tratamientos con calor. Sin embargo, el hecho de que los mecanismos que desencadenan una reacción alérgica no requieran de mucho material ofensivo (alergeno), permite clasificar a los alergenos del soya como estables al calor (Liener, 1981).

Un estudio dirigido por Ogawa y cols. (1991) identificó 16 proteínas del soya reconocidas como alergenos, con pesos moleculares entre 14 y 70 kDa. Diez de estos alergenos pertenecen a la fracción 7S, tres a la fracción 2S y dos

a la fracción 11S. El mayor alérgeno del soya (Gly m Bd 30 kDa) es una globulina de 30 kDa de masa, perteneciente a la fracción 7S. Otros alérgenos importantes pertenecientes a esta misma fracción son las subunidades α y β de la β -conglícinina. Otras investigaciones también señalan al inhibidor de tripsina de Kunitz, como responsable de algunos casos de alérgia al frijol soya (Liener, 1981; Ogawa y cols., 1991. Herian y cols., 1990).

La Tabla 4, enlista el contenido de diferentes factores antinutricionales en frijol soya y en algunos de sus productos.

Principales Productos de Proteína de Soya

Tecnología básica y usos. El proceso comercial para la obtención de aceite de soya y hojuelas desgrasadas, incluye en las primeras etapas la limpieza, quebrado y descascarillado de semillas. El material descascarillado es acondicionado y hojueado para someterlo a la extracción del aceite con hexano (Harris y Karmas, 1977)

La Figura 1 muestra el diagrama de flujo para el procesamiento de frijol soya, el cual es acondicionado y recibe distintos tratamientos para obtener: hanna de soya integral activa, harina de soya integral desactivada, pasta de soya, proteína de soya texturizada, concentrados y aislados de proteínas entre otros. Lusas y Riaz (1995), informa que la producción de aislado anual es de 200,000 ton/métricas, las que se usan en la producción de, embutidos, alimentos para bebé y productos de panadería, principalmente.

La Tabla 5, enlista las principales familias de productos y su composición química. Existen numerosos tipos de harinas, aislados y concentrados que se diferencian por sus características funcionales (Central Soya, 1993).

La industria de extracción de aceite de soya es una industria bien establecida en nuestro país. Tan solo de E.U.A. se importan 2 millones 600 mil toneladas de esta leguminosa por año, y el 95% de los aceites comestibles

Tabla 4. Factores Antinutricionales de Frijol Soya y sus Productos

	Inhibidor ^{1 a} tripsina	Ac. Fítico ^{2 a}	Saponinas ^{2 a}	Lectinas ^{3 c}	Factores ^{4 =} Flatulentos
Frijol soya	35 - 123	1 - 2.3	0.2 - 0.5	3600	-
Harina tostada	15.9	-	0.53	-	-
Harina desgrasada	-	1.3 - 1.9	-	155	71
Harina texturizada	-	0.9 - 2.0	-	13	-
Concentrado	8.4 - 11.2	1.3 - 2.2	0.0	-	36
Aislado	1.4 - 29.4	0.9 - 2.0	0.81	-	13

¹ mg/g proteína ² g/100 g materia seca ³ µg/g de producto ⁴ vol. de gas ml/h

^aAnderson y Wolf, 1995; ^bLiener, 1981; ^cCalderón de la Barca et al., 1991.

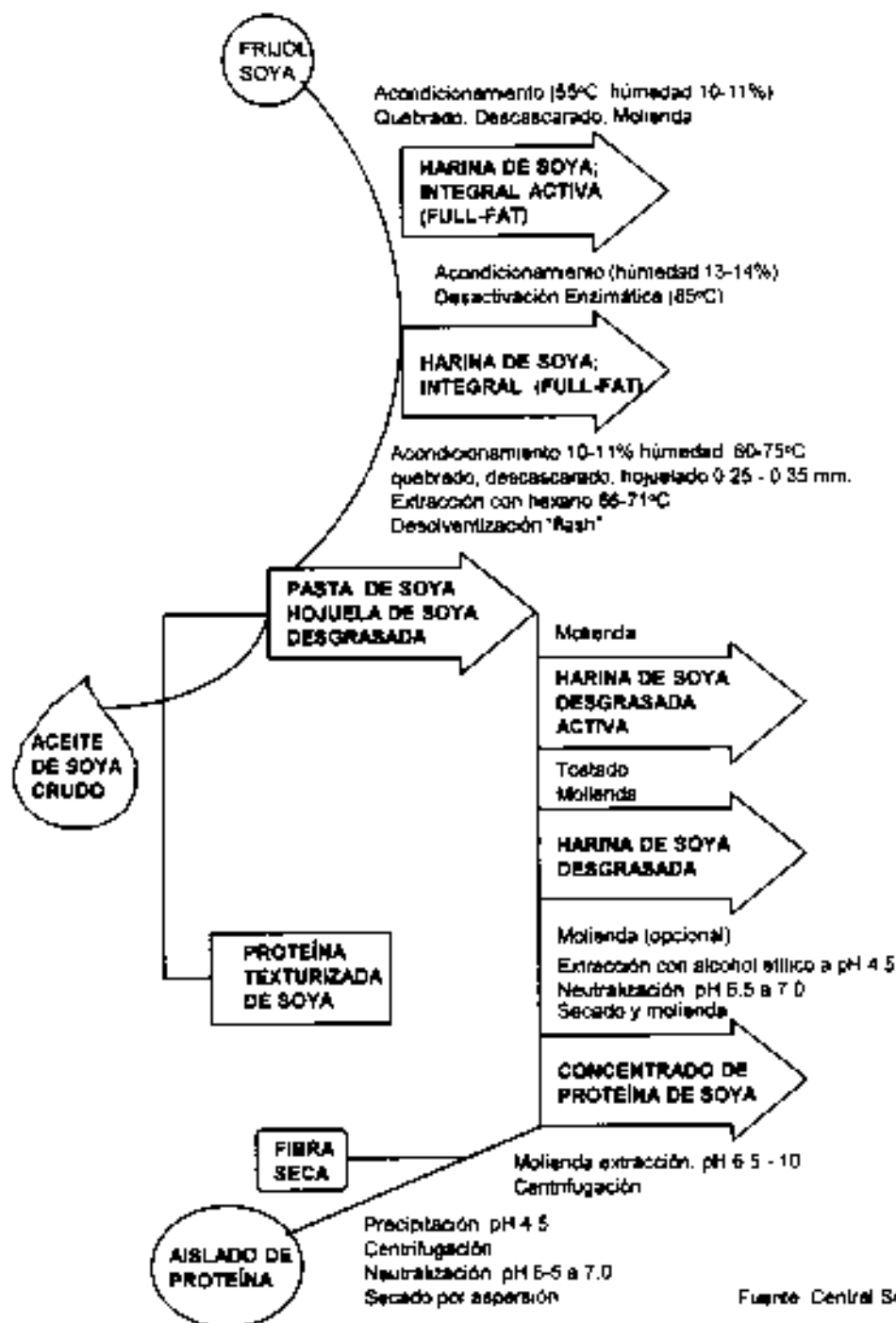


Figura 1. Diagrama de Flujo para el Procesamiento de Proteína de Soya

Tabla 5. Principales Tipos de Productos de Soya

	Proteína	Humedad	Ceniza	Carbohidratos solubles	Fibra
Harina de soya	50%	+	+	+	+
Concentrados de soya	70%	+	+	-	+
Aislados de soya	90%	+	+	-	-

+ presente - No presente

Central Soya, 1993.

producidos en México son 100% de soya (Independiente, 1996). Como subproducto de la extracción del aceite, se obtiene pasta de soya para consumo humano y animal, de la cual a su vez, se obtiene soya texturizada. Sin embargo, no se producen ni aislados ni concentrados de proteína.

La Proteína de Soya en las Fórmulas Infantiles.

Durante siglos el frijol soya ha sido usado en la nutrición infantil por la cultura china y japonesa (Businco et al., 1992). Sin embargo, la primera referencia del uso de la soya en la alimentación infantil en América data de 1909, cuando John Ruhrah usó un producto de soya como sustituto de la leche de vaca. Desde entonces, por razones de carácter económico, de nutrición y/o salud, las proteínas de soya han presentado una buena alternativa para integrarse a las fórmulas infantiles (Sarett, 1981; Fomon, 1979).

En 1929 se utilizó un polvo a base de harina integral de soya en infantes alérgicos a proteínas de leche de vaca. Desde entonces, se han usado este tipo de fórmulas en infantes que padecen este desorden (Businco et al., 1992; Sarett, 1981). Por otra parte, en los años 60's se descubrió que gran parte de los problemas derivados de la intolerancia a fórmulas basadas en leche de vaca, se debía a la deficiencia de la enzima lactasa. Por ello, se desarrollaron fórmulas de soya libres de lactosa (Sarett, 1981).

Recientemente, se han utilizado aislados de proteína de soya para desarrollar "fórmulas superiores". Estas han sido fortificadas con L-metionina y se les han adicionado vitaminas y minerales esenciales para el infante. La incorporación de estos aislados en las fórmulas infantiles, implica reducción en niveles de hemicelulosa, fitatos y carbohidratos responsables de flatulencia (Businco et al., 1992; Sarett, 1981). Businco et al (1992) y Fomon (1979), mencionan algunos estudios en infantes sanos alimentados con estas fórmulas a base de soya, a los que se asocia; crecimiento normal y un estado nutricional normal.

Algunos autores (Restani y cols., 1995; Halcken y cols., 1993 y Cantani, 1993) comentan que el uso de estas fórmulas reduce significativamente la prevalencia de alergias en infantes de alto riesgo y en alérgicos a proteína de leche de vaca. Dicho efecto es controversial, pues hay estudios que asocian el consumo de fórmulas a base de soya con síntomas de carácter alérgico (Businco y cols., 1992; Giampietro y cols., 1992; Boza y cols., 1994). Restani y cols. (1995), informa que entre el 10 y el 20% de niños con alergia a leche de vaca, no toleran los derivados de soya.

Algunas de las principales ventajas y propiedades de la proteína de soya para su integración a fórmulas infantiles según Businco y cols. (1992) son: inmunogenicidad y alergenicidad mas bajas que las proteínas de leche de vaca. También presentan un valor nutricional similar al de las fórmulas a base de leche de vaca y mejor sabor que las fórmulas a base de proteínas fuertemente hidrolizadas. Por último, son menos caras que las fórmulas a base de proteína animal fuertemente hidrolizada.

El Problema de la Alergia Alimentaria en Infantes

Química y Biología de los Alergenos en Alimentos.

Un alérgeno de alimentos se puede definir, como la sustancia que al ser consumida por un individuo sensible, le provoca una reacción alérgica. Aunque muchos alimentos son conocidos por su alergenicidad, existe muy poca información sobre la naturaleza de la mayoría de los alergenos (Taylor, 1992). Unos cuantos sin embargo, están plenamente identificados (Taylor, 1992; Taylor y Nordle, 1996; Ogawa y cols. 1991, Burks y cols, 1992; Herian y cols., 1990).

Los alimentos contienen un enorme número de proteínas potencialmente antigénicas, pero solamente un pequeño porcentaje de las mismas es capaz de provocar una reacción alérgica. Virtualmente todos los alergenos de alimentos

son proteínas, a excepción del RNA de transferencia del camarón (Nordlee y Taylor, 1995; Taylor 1992).

Características generales de los alérgenos. En términos generales los alérgenos son glicoproteínas. los más conocidos presentan pesos moleculares entre 14 y 70 kDa (Hefle, 1996). Aunque en cacahuete existen con pesos moleculares de 150 a 200 kDa (Lehrer y cols. 1996). Cordle (1994), enfatiza el hecho de que proteínas menores de 10 kDa son débilmente inmunogénicas. Los alimentos alérgicos más comunes en los niños son la leche de vaca, el huevo, la soya, el cacahuete, el trigo y la nuez. En los adultos, además de éstos están el pescado y los mariscos (Hefle, 1996; Nordlee y Taylor. 1995). La Tabla 6 señala los alérgenos de alimentos ya identificados y su peso molecular correspondiente. La simple observación de esta tabla muestra que los alimentos más alérgicos contienen mayor variedad de alérgenos. Un ejemplo es el huevo que tiene una mezcla de 4 a 6 alérgenos (Hefle, 1996; Taylor, 1992). La mayoría de los alérgenos son resistentes al proceso de digestión, lo que les permite la posibilidad de ser absorbidos intactos. También presentan algún grado de resistencia al calor y cocinado (Hefle, 1996; Taylor. 1992).

Hefle (1996) comenta que los alérgenos no presentan un patrón típico en su secuencia de aminoácidos, aunque entre algunos se pueden ver similitudes. Tampoco existe un patrón típico de estructura terciaria que pueda relacionar a los alérgenos, y como se observa de la Tabla 6, los alérgenos son proteínas con muy diferente función biológica.

La porción de una molécula de antígeno/alérgeno que interactúa con las células del sistema inmune o anticuerpos, se llama epítipo. Estos epítipos son conformacionales o lineales (secuenciales). Los primeros dependen de la estructura terciaria, los segundos de la secuencia de aminoácidos (Lehrer et al., 1996). En este sentido, el calor de los procesos de producción promueve la desnaturalización y la pérdida de la estructura terciaria del alérgeno, por lo que hay una mayor exposición de los sitios de enlace (epítipos) a la IgE. Se sabe

Tabla 6. Alergenos de Alimentos

Alimento	Alergeno	Peso molecular kDa
Leche de vaca ^{1,5}	β -Lactoglobulina	18.0
	α -Lactoalbúmina	14.5
	Caseínas	21-38
Cacahuete ^{2,7}	Ara h ₁	63.5
	Ara h ₂	17.0
Soya ^{1,6}	β -conglucina	43-70
	Inhibidor de tripsina de Kunitz	20
	Gly M Bd	34
Camarón ¹	Antígeno I	9-20
	Antígeno II	31-34
Nuez de Brasil ⁴	Albúmina 2S rica en metionina	9
Bacalao ¹	Alergeno M (parvalbúmina)	12
Huevo ^{1,8}	Ovomucoide	28
	Ovoalbúmina	45
	Ovotransferrina (Conalbúmina)	80
Arroz ^{1,2}	Fracción de Albúmina	14-16

¹Taylor, 1992; ²Hefle, 1996; ³Lehrer y cols., 1996; ⁴Nordlee y cols., 1996;⁵Bolaños, 1996; ⁶Ogawa y cols., 1991; ⁷Burks y cols., 1992; ⁸Pownie, 1977.

que para asuntos de alergenidad, la estructura terciaria de la mayoría de los alérgenos de los alimentos es menos importante que la secuencia de aminoácidos, pero más importante que el tamaño molecular (Hefle, 1996)

Bases biológicas de las alergias alimentarias. Son muchos los aspectos involucrados en la aparición de la hipersensibilidad alimentaria. La mayoría de estos aspectos no son bien entendidos, otros son controversiales. El mecanismo inmunológico básico involucrado en las reacciones alérgicas a alimentos, es probablemente la reacción de hipersensibilidad inmediata mediada por inmunoglobulinas E (IgE) específicas al alérgeno (Taylor, 1992).

Cuando ciertos individuos ingieren alérgenos, estos por diversas causas pasan a través del epitelio intestinal y circulan en la sangre, como sucede con toda la gente. Sin embargo su sistema inmune reacciona a estos alérgenos manufacturando IgE (Hefle, 1996). Estas IgE son producidas por las células B y son específicas al alérgeno. Al viajar los IgE por el torrente sanguíneo alcanzan a los mastocitos y a los basófilos, y se unen a ellos. Estas son células muy similares entre sí. Los primeros se encuentran en muchos tejidos del cuerpo (tracto respiratorio, tracto gastrointestinal y piel); los segundos en la sangre (Hefle, 1996; Nordlee y Taylor, 1995). Subsecuentemente, la interacción del alérgeno con el complejo anticuerpo IgE específico-mastocito o basófilo, induce la liberación de mediadores que son potentes fármacos (histaminas, prostaglandinas, leucotrienos). Manifestándose acto seguido, los síntomas clínicos que caracterizan una reacción alérgica (Lehrer y cols. 1996; Nordlee y Taylor, 1995).

La unión entre el alérgeno y la IgE específica en la superficie del mastocito o basófilo, impone ciertas características estructurales al alérgeno. Una de ellas es el tamaño, que deberá ser apropiado al sitio de unión con la IgE. Se sabe que puede haber más de un sitio de unión con la IgE (Taylor, 1992), y que estos múltiples determinantes alérgénicos no necesitan ser idénticos (Nordlee y Taylor, 1995).

La Alergia Alimentaria.

Una gran variedad de reacciones adversas postprandiales se pueden confundir con alergias alimentarias, porque los síntomas son parecidos. Como reacción adversa se clasifica a toda aquella respuesta clínica anormal que se atribuya o relacione con la exposición a un alimento o aditivo. Estas reacciones pueden ser inmunológicas o no inmunológicas (Lehrer y cols, 1996)

La alergia alimentaria es un tipo específico de reacción adversa mediada inmunológicamente y es causada por la respuesta anormal del cuerpo como resultado de la ingestión del alimento ofensor. La mayoría de las alergias alimentarias son mediadas por anticuerpos IgE y la sintomatología se presenta de minutos o pocas horas después de haber ingerido el alimento ofensor (Muñoz-Furlong, 1996; Lehrer y cols, 1996). Las manifestaciones de la alergia alimentaria pueden aparecer en cualquier órgano o sistema. Por regla general los individuos alérgicos presentan pocos de estos síntomas (1 a 3) siendo los gastrointestinales los más comunes, sobre todo en niños muy pequeños (Chandra y Prasad, 1994; Hefle, 1996). El síntoma alérgico más severo es el choque anafiláctico. El cual puede ocurrir a cualquier edad (Chandra y Prasad, 1994), aunque es muy poca la gente que presenta este tipo de reacción (Muñoz-Furlong, 1996). La Tabla 7 enlista los síntomas experimentados durante las reacciones alérgicas

Por otra parte, se ha reportado que un 25% de los adultos cree tener algún tipo de alergia alimentaria. Sin embargo, se estima que realmente de 1 a 2% de los adultos presenta algún tipo de alergia alimentaria (Hefle, 1996; Muñoz-Furlong, 1996), la verdad es que la prevalencia real es difícil de estimar (Chandra y Prasad, 1994). En niños menores de 6 años la prevalencia se estima de 1 a 3% (Hefle, 1996). Lehrer, (1996), basado en estudios clínicos, la lleva hasta un 4%, Chandra y Prasad (1994) la estiman hasta en un 6%, pudiendo llegar hasta un 25% en niños con dermatitis atópica.

Tabla 7. Principales Síntomas de Alergia Alimentaria

Sistema	Síntoma
Respiratorio	Rinitis Asma
Piel	Edema en la lengua Angioderma Urticaria Eczema (dermatitis atópica)
Gastrointestinal	Dolor abdominal Diarrea Nauseas Vómito
Choque anafiláctico	

Hefle, 1996.

Factores involucrados en el desarrollo de alergias alimentarias. Un gran número de factores están involucrados en el desarrollo de las alergias alimentarias. De acuerdo a Lehrer y cols (1996), la cantidad de alimento alergénico que es consumido es un factor importante. Esto es influido por la dieta y cultura de un país; tiene además, un efecto significativo en la prevalencia de una alergia alimentaria específica para una región. De acuerdo a los mismos autores, también la ruta de exposición al alérgeno es importante. La ruta más común es la de la ingestión. Sin embargo, la ruta de contacto por la piel, por inhalación o por mucosa bucal a pesar de ser poco mencionadas, son importantes en las llamadas alergias ocupacionales. La permeabilidad del intestino, puede ser el factor más importante, esta se ve influenciada por el grado de madurez de la barrera o mucosa intestinal y por la presencia de infecciones gastrointestinales. Son otros factores involucrados, el procesamiento al que es sometido el alimento, que puede afectar el contenido final del alérgeno, así como los factores intrínsecos propios de cada alimento. Por último, el grado de sensibilidad del individuo, el cual tiene que ver principalmente con factores genéticos.

La Alergia Alimentaria en Infantes.

El periodo neonatal es el más crítico en la vida del infante, pues comienza su vida independiente. El estado de maduración de las diferentes partes del tracto gastrointestinal es un factor crucial en la decisión de cuando, qué y como alimentar al infante (Lebenthal y Leung, 1987). La adaptación más importante del tracto gastrointestinal del recién nacido, al ambiente extrauterino, es el desarrollo de la mucosa intestinal. Ello porque esta es una barrera que detiene la penetración de bacterias, virus y antígenos (proteínas de alimentos) (Xanthou, 1987). Esto implica mecanismos de defensa que trabajan en el lumen y en la superficie luminal (Walker y Hanson, 1985).

Si estos complejos procesos de defensa son destruidos o si existen deficiencias en los componentes de la barrera, las proteínas y macromoléculas podrán atravesarla (Chandra y Prasad, 1994). Afortunadamente, la naturaleza ha provisto un excelente producto para este período crítico en la vida del neonato: la leche humana la cual no solo es un importante nutrimento, sino que al mismo tiempo, protege y estimula la maduración del intestino. Al respecto, existe suficiente evidencia de que decrece la penetración de antígenos en recién nacidos después de haberse alimentado con calostro (Walker y Hanson, 1985). Aunque la alimentación al seno materno tiene una absoluta prioridad en la nutrición del recién nacido, las fórmulas infantiles continúan siendo necesarias para suplementar o sustituir esta práctica (Jost y cols, 1987). Esto ocurre, cuando hay fracaso de lactancia, síndrome de insuficiencia de leche, por sensibilidad del infante a la leche, por errores metabólicos (Miller y Chopra, 1984), o bien si la madre opta por no amamantar al infante.

Las fórmulas infantiles se consideran como un alimento artificial y tienen como base o fuente de proteína: la leche de vaca entera, caseínas, suero de leche o proteínas de soya (Cantani, 1993). Alimentar al bebé a una edad muy temprana con este tipo de fórmulas, abre la posibilidad de que proteínas o fragmentos de ellos pasen a través de la mucosa intestinal. Hay suficiente evidencia que asocia este hecho con la aparición de alergias en infantes de alto riesgo. La naturaleza de la respuesta alérgica del infante dependerá de su grado de sensibilidad y de la concentración y tipo de alérgeno ingerido (Walker y Hanson, 1985).

En la práctica, la alergia alimentaria más común en la infancia es la alergia a proteínas de leche de vaca (Cantani, 1993). Siendo los principales manifestaciones alérgicas: dermatitis atópica, urticaria, vómito, diarrea, cólico, pudiendo llegar hasta el choque anafiláctico (Halcken y cols, 1993).

Fórmula Infantil Hipoalérgica.

A pesar del amplio uso que tienen las fórmulas artificiales a base de leche de vaca, en recientes años el porcentaje de madres que alimentan al seno a sus bebés se ha incrementado (Boza, 1994). Si bien las fórmulas infantiles son adecuadas nutricionalmente, tienen el inconveniente de someter al neonato a fuertes cargas alérgicas, lo que implica un alto riesgo de alergia en infantes sensibles (Cantani, 1993). El mayor beneficio en el desarrollo de la moderna fórmula infantil, es la evolución de fórmulas especiales para infantes con necesidades especiales. Estos infantes presentan: alergia a proteínas de leche, intolerancia a lactosa, diarrea y/o enfermedades gastrointestinales, bajo peso al nacer y errores metabólicos (Sarett, 1981). En la Tabla 8 se muestra el desarrollo de estas fórmulas especiales.

Las fórmulas a base de proteína hidrolizada son llamadas "fórmulas hipoalérgicas" y son las recomendadas por la Comisión de la Comunidad Europea (1991), para alimentar a infantes en casos especiales. Estos son, los infantes con riesgo de contraer alergias, los ya alérgicos o los que presentan signos clínicos de intolerancia a la proteína dietaria (Boza y otros, 1994). El subcomité de nutrición y enfermedades alérgicas de la Académica Americana de Pediatría (1990), especifica que una fórmula puede ser designada como hipoalérgica si: 1) Su proteína base ha sido modificada para reducir su antigenicidad y 2) Cuando el 90% de sujetos alérgicos a esa proteína base, toleran esa fórmula sin presentar síntomas alérgicos (Haiken y cols. 1993).

Las fórmulas hipoalérgicas se basan en la teoría de que modificando suficientemente la estructura nativa de las proteínas se logra reducir drásticamente su antigenicidad (Boza y cols., 1994; Jost y cols., 1987). Pahud y cols. (1985), mencionan algunos estudios que sugieren el uso del calor para lograr disminuir la alergenidad de las proteínas en el suero de leche. Sin embargo, es la hidrólisis enzimática de proteínas el mejor camino para lograr reducir la antigenicidad y conservar un perfil nutricional adecuado para fórmulas

Tabla 8. Evolución de Fórmulas Infantiles Especiales

	Formulas a base de:				
	Leche evaporada	Leche descremada	Soya	Proteína hidrolizada	Fórmula moderna
Proteína	Leche de vaca	Leche de vaca	Soya	Leche de vaca Caseína Lactosuero	Proteína hidrolizada Aminoácidos Péptidos
Carbohidrato	Lactosa	Lactosa	Sacarosa Jarabe de maíz	Sacarosa Jarabe de maíz	Glucosa Jarabe de maíz
Grasa	Grasa de mantequilla	Aceite vegetal	Aceite vegetal	Aceite vegetal	Aceite vegetal

Sarett, 1981

infantiles. El tratamiento con calor no reduce lo suficiente el potencial del material antigénico, tendiendo a producir nuevos epítopes, no presentes en el material original. Además, induce reacciones de Maillard mismas que reducen el valor nutricional de la proteína (Boza y cols., 1994)

Las desventajas de la hidrólisis enzimática son: la gran producción de aminoácidos libres, un sabor más amargo y un aumento en la osmolaridad de la fórmula. El control adecuado de las principales variables involucradas en el proceso de hidrólisis, permiten tanto evitar estos problemas, como mejorar otras características deseables. Requieren controlarse parámetros tales como: pH, temperatura, concentración de sustrato, la relación enzima/sustrato y el tipo y selectividad de la enzima (Boza y cols., 1994 ; Adler-Nissen, 1986).

Lahi y Braun (1994), señalan que la historia o el progreso en el campo de las fórmulas infantiles hipoalérgicas, se puede dividir en tres etapas.

1. Hidrolizados de primera generación a base de caseína hidrolizada, caracterizados por una composición molar de aminoácidos libres del 70% y péptidos no mayores a 8 aminoácidos de longitud. Estos aparecieron en el mercado hace aproximadamente 40 años.

2. Los de segunda generación, a base de proteínas de suero de leche hidrolizadas, con una composición molar de 40-60% de aminoácidos libres y péptidos no mayores de 12 aminoácidos de longitud. Están en el mercado desde hace 10 años aproximadamente.

3. Hidrolizados de tercera generación, a base de proteínas de leche, con menos del 20% de composición molar de aminoácidos libres y péptidos no mayores de 15 aminoácidos de longitud, los cuales tienen pocos años en el mercado.

Boza y cols. (1994), enumera varias características que debe presentar un hidrolizado de proteína para incluirse en las fórmulas infantiles hipoalérgicas. Estas son: alto contenido de di- y tripéptidos, los cuales son

fácilmente absorbidos, una proporción baja de aminoácidos libres, limitado sabor amargo, alto valor nutricional y baja antigenicidad.

En este sentido, el tamaño molecular de los péptidos, producto de la hidrólisis y la especificidad de la enzima usada, son factores claves en la producción de hidrolizados proteicos para fórmulas hipoalérgicas (Deeslie y Cheryan, 1991). Se conoce que con bajos grados de hidrólisis se mantienen las propiedades funcionales de las proteínas. Pero si el propósito es preparar fórmulas infantiles hipoalérgicas, se requiere de hidrólisis más intensas (Mullally y cols., 1995). Esto garantizará que los alérgenos no estarán presentes en el producto final. Sin embargo, una hidrólisis enzimática moderada acompañada de ultrafiltración es suficiente para reducir drásticamente el contenido de antigenicidad.

Como ejemplo de la importancia del tamaño molecular de las proteínas y su posible participación en manifestaciones alérgicas está un estudio de Ogawa y cols. (1991) en soya. Estos autores probaron 16 proteínas con pesos moleculares entre 14 y 70 kDa: mismas que fueron reconocidas por los anticuerpos del suero de pacientes con dermatitis atópica. En otro trabajo (Halcken y cols., 1993), se estudió un hidrolizado comercial de suero de leche ultrafiltrado, con péptidos menores de 8 kDa y antigenicidad reducida 30,000 veces. Dicho producto, no causó problemas al alimentar con él a 66 niños con alergia a proteína de leche de vaca.

Mucha de la investigación realizada en el campo de la hidrólisis de proteínas, ha tenido como objetivo primordial el control de las alergias alimentarias (Cordle, 1994; Mahmoud y cols., 1992; Boza y cols., 1996; Ena y cols., 1995; Hussein y cols., 1995; Bautista y cols., 1996; Parrado y cols., 1993). Este es un tema muy complejo, pues la mayoría de los elementos de una enfermedad o reacción alérgica son altamente variables (Cordle, 1994, Chandra y Prasad, 1994)

Las fórmulas basadas en proteínas de soya se han usado como una alternativa a problemas alérgicos a proteínas de leche de vaca e intolerancia a lactosa (Sarett, 1981). Sin embargo, también se ha encontrado que su consumo se relaciona a la aparición de síntomas de carácter alérgico (Hill y cols. 1984; Giampietro y cols. 1992; Businco y cols. 1992). Incluso existen reportes de que fórmulas infantiles hipoalérgicas basadas en proteínas hidrolizadas de leche de vaca y suero de leche, han provocado serias reacciones inmunológicas en sujetos muy sensibles (Restani y cols., 1995; Vanberesteijn y cols., 1995; Businco y cols., 1992).

En un estudio sobre fórmulas hipoalérgicas, Rugo y cols. (1992) concluye que hay diferencias considerables en la actividad alérgica de las mismas. Esto se debe a la fuente de proteína, grado de hidrólisis, tratamiento de calor y a la aplicación de la ultrafiltración. Por lo que recomienda probar cuidadosamente y con seguridad a través de métodos in vivo o in vitro la baja o nula alergenicidad de las fórmulas, antes de que estas se introduzcan a la dieta de infantes de alto riesgo .

Un par de estudios regionales realizados por Calderón de la Barca y cols. (1995), sobre factores que influyen en el desarrollo de alergias alimentarias y sobre fórmulas utilizadas en la lactancia revelaron los siguientes datos de interés .

1 - Los regímenes de lactancia y ablactación no son los adecuados, no sólo para niños con alto riesgo, sino para todos en general

2 - El 90 % de los niños alérgicos a alimentos, lo fueron a las fórmulas basadas en proteínas de leche de vaca.

3.- El mercado de las fórmulas infantiles está dominado por empresas transnacionales

4 - Hay solo dos fórmulas etiquetadas como hipoalérgicas, en el mercado.

5.- Por lo general el precio de las fórmulas infantiles es muy elevado. esto es mas significativo en la fórmula hipoalergénica, que puede costar hasta 8 veces mas que una fórmula láctea.

El incremento en la prevalencia de las alergias alimentarias y los costos tan altos que implica su manejo (Chandra y Prasad, 1994), ofrecen una oportunidad para que se realice investigación en este campo. Rugo y cols. (1992) señala los retos básicos que deberá enfrentar la industria de alimentos infantiles en el futuro. Estos serán el desarrollo de hidrolizados de bajo peso molecular, de una actividad alérgica residual baja, de un alto valor nutricional y un aceptable sabor

Detección de Alérgenos.

La existencia de métodos seguros para detección y/o cuantificación de alérgenos es muy importante para la industria alimentaria (Nordlee y Taylor, 1995). Según estos mismos autores (1996), los métodos para detección de alérgenos en alimentos pueden tener varios usos, que incluyen :

- 1.- Detección de contaminación de los alimentos con material potencialmente alérgico.
- 2 - Alérgenicidad de proteínas transferidas a alimentos via ingeniería genética.
- 3.- Determinación de alérgenicidad de alimentos y de ingredientes específicos, derivados de conocidas fuentes alérgicas.
- 4.- Evaluación de varios procesos de operación y su influencia sobre la alérgenicidad del alimento.

Los inmunoensayos usando antisuero o anticuerpos específicos a proteínas son los principales métodos para detección de alérgenos (Taylor y Nordlee, 1996), algunos ejemplos los encontramos en los trabajos de Tukur y cols. (1996), Piomb y cols. (1994), Herian y cols. (1990), Ogawa y cols (1991), Hussein y cols (1995) y Hefle (1995).

Por otra parte, los aspectos más importantes para la selección y desarrollo del método apropiado son: la sensibilidad requerida, la especificidad del anticuerpo, la necesidad de detectar un alérgeno específico o bien algunas proteínas del alimento alérgico, la estabilidad del antígeno durante el proceso y preparación, el método de extracción del antígeno de la matriz alimentaria y la disponibilidad del suero (Taylor y Nordlee, 1996; Nordlee y Taylor, 1995).

Según Cordle (1994), los resultados obtenidos por métodos inmunquímicos pueden ser agrupados en cuatro categorías.

1.- Excelentes predictores de hipoalergenicidad. Ejemplo para esta categoría es el resultado negativo en ensayos de hiperinmunización vigorosa usando animales de laboratorio. Este tipo de pruebas (ELISA o Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima y el radioinmunoensayo) miden inmunogenicidad y son altamente sensibles para detectar material inmunológicamente activo.

2.- Predictores menos definitivos de hipoalergenicidad. Estos métodos son menos sensibles y/o específicos que los anteriores, destacan: el análisis de inmunoprecipitación negativa, usando suero específico para el hidrolizado, la prueba de sensibilización negativa en cerdos, la prueba negativa de RAST (prueba radioalergoabsorbente), la distribución de peso molecular y el grado de hidrólisis.

3.- Indicadores de posible actividad alérgica. Estos resultados positivos deberán ser corroborados con pruebas clínicas. Ejemplo de esto es el resultado positivo en ensayos de hiperinmunización vigorosa usando animales de laboratorio, identificación de material con peso molecular mayor a 3000 Da, y pruebas positivas en la piel de pacientes alérgicos entre otros.

4.- Excelentes predictores de actividad alérgica. Estos resultados proveen una fuerte evidencia de que el hidrolizado retiene actividad alérgica. En este caso se sugiere que el material no deberá ser usado en ensayos clínicos que involucren pacientes alérgicos a dicho material. Ejemplo, el

resultado positivo de ensayos de sensibilización oral en cerdos, estos incluyen protocolos de sensibilización de hasta 35 días. También son ejemplos la identificación de alérgenos intactos a través de espectroscopia de masas, cromatografía líquida o electroforesis en gel de poliacrilamida.

El Proceso de Hidrólisis Enzimática de Proteínas

Aspectos Generales.

La enzimología es una parte muy importante de la bioquímica de alimentos. La conexión entre investigación sobre enzimas y alimentos ha tenido un gran desarrollo desde sus orígenes, con los trabajos de Pasteur y Liebig en el siglo pasado. De hecho, 60% de las publicaciones de *Journal of Food Biochemistry* tienen que ver con las enzimas (Schwimmer, 1995).

Las enzimas se involucran con los alimentos de varias formas:

1) las enzimas propias del alimento provocan efectos indeseables, o bien, ayudan a crear la identidad del alimento.

2) Como fuente externa se adicionan para ayudar en el proceso, o para impartir ciertas características al producto final. Este es el caso de las industrias lácteas, cervecera, cármica y panadera.

3) Como herramienta de trabajo aprovechando sus características en distintas pruebas; ELISA, digestibilidad *in vitro*, etc. (Schwimmer, 1995).

Las principales razones para hidrolizar proteínas son: aumentar calidad nutricional, retardar el deterioro, impartir textura, incrementar o disminuir solubilidad e influir en las propiedades de coagulación y emulsificación. También se usan para prevenir interacciones indeseadas, remover sabores u olores desagradables, remover ingredientes tóxicos e inhibitorios y disminuir antigenicidad (Lahl y Braun, 1994; Boza y cols., 1994; Central Soya, 1993).

Hay dos caminos para lograr la hidrólisis de proteína: químico y enzimático. El primero se hace a través de agentes ácidos (hidrólisis ácida) o

agentes alcalinos (hidrólisis alcalina). Sin embargo, es la hidrólisis enzimática la preferida, por ser más gentil con el producto final, impartándole características que le hacen más apropiado para aplicaciones nutricionales (Boza y otros, 1994; Lahl y Braun, 1994).

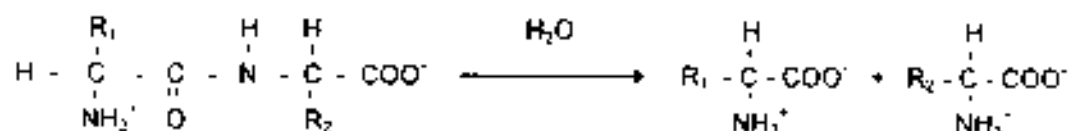
El Enlace Peptídico

Las moléculas proteicas por hidrólisis ácida se desdoblán hasta 20 aminoácidos distintos, de acuerdo a su grupo R (cadena lateral). Aunque se conocen aproximadamente 150 aminoácidos más, los que se encuentran libres o combinados pero nunca formando proteínas (Lehninger, 1993).

Las proteínas son polímeros de aminoácidos los cuales se hallan unidos entre sí covalentemente, en lo que se llama enlace peptídico. Este es la condensación entre el grupo carboxilo de un aminoácido y el grupo amino del siguiente, liberándose una molécula de agua. El enlace C-N del enlace peptídico posee alrededor del 40% de carácter de enlace doble. Además el enlace C-N es relativamente rígido propiedad que es muy importante en la estructura de las proteínas.

Cada tipo de molécula proteica posee en su estado nativo una estructura tridimensional característica, la cual está fuertemente influenciada por el grupo R de cada aminoácido. Este grupo R podrá estar cargado o no, ser alifático o aromático o bien hidrofílico o hidrofóbico (Lehninger, 1993).

Ruptura del enlace peptídico. Las proteasas catalizan la degradación hidrolítica de las cadenas de péptidos



La mayoría de las reacciones catalizadas por proteasas (serinas) ocurre en tres pasos: Primero, la formación del complejo de Michaelis entre el sustrato y la enzima. Segundo, el rompimiento del enlace peptídico liberando uno de los dos péptidos resultantes. Por último, el ataque nucleofílico sobre el complejo para liberar el otro péptido y reconstruir la enzima libre. El grupo carboxilo libre y el grupo amino libre formados después de la hidrólisis estarán más o menos ionizados, dependiendo del pH de la reacción de hidrólisis (Adler-Nissen, 1986).

La ruptura de los enlaces peptídicos ocasiona una serie de eventos complejos que alteran la funcionalidad y la antigenicidad de las proteínas (Boza y cols, 1994. Mahmoud y cols. 1992).

Enzimas Proteolíticas

Las enzimas son proteínas producidas por todos los seres vivos y catalizan miles de transformaciones de las moléculas dentro de la célula con un alto grado de especificidad y eficiencia. Recientemente, las enzimas proteolíticas han ganado considerable atención en la comunidad industrial (Mullally y cols, 1995).

Clasificación. Las enzimas proteolíticas se pueden clasificar de acuerdo a varios criterios. El criterio usado por la comisión de enzimas de la Unión Internacional de Bioquímica, se basa en su mecanismo de acción sobre distintos sustratos. Consiste en cuatro grupos: serina, thiol, metal y proteinasas ácidas, las que se distinguen entre sí por su sensibilidad a varios inhibidores (Löffler 1986). Para fines prácticos las proteasas se clasifican en dos grandes grupos: exopeptidasas y endopeptidasas.

En la hidrólisis comercial de proteínas, las proteasas se clasifican de acuerdo a dos criterios generales: primero la especificidad por el enlace peptídico sobre el que actúan y segundo, el mecanismo o forma en la que actúan. Normalmente se prefiere una mezcla de exo y endo peptidasas lo cual ayuda a obtener el perfil deseado de aminoácidos, di y tri péptidos y péptidos.

De hecho, uno de los campos de mayor investigación en desarrollo de hidrolizados de proteína, es la obtención de la mezcla óptima de enzimas para producir la relación deseada de aminoácidos y péptidos (Lahl y Braun, 1994)

Fuentes. Las proteasas comerciales para uso industrial son aisladas de tejidos animales, plantas y microorganismos. Se han estudiado mucho las proteasas de origen pancreático, de las cuales existen patrones definidos de purificación (Mullally y cols, 1995) La bibliografía reporta a la pancreatina (una mezcla de tripsina y quimiotripsina) como de uso práctico y generalizado (Lahl y Braun, 1994. Mahmoud y cols, 1992). Otras opciones conocidas, son las enzimas de origen vegetal como: papaina, ficina y bromelina, las cuales no son selectivas. También hay enzimas de origen microbiano, las cuales son mas selectivas (Lahl y Braun, 1994. Ena y cols., 1995).

Cuantificación de la actividad En el marco de un proceso de hidrólisis, las características mas importantes de una enzima son: su pureza y actividad específica. Esto describe la fuerza o concentración de la actividad enzimática. La actividad específica de una enzima se ve influenciada por varios factores que incluyen: activación de una enzima por otra, autólisis o degradación, presencia o ausencia de iones metálicos, factores propios del tejido fuente (Mullally y cols, 1995). La actividad de la enzima se conoce midiendo experimentalmente su habilidad para catalizar una reacción bajo condiciones controladas y un sustrato específico. Esta actividad se reporta como la cantidad de producto formado o sustrato, que reaccionó en una unidad de tiempo por peso de preparación enzimática (Novo, 1986).

Sustratos de Proteinasas

El sustrato natural para las enzima proteolíticas son las proteínas. La definición de proteína en nutrición y ciencia de alimentos, se basa en los procedimientos analíticos para cálculo de N proteico a través de la técnica Kjeldahl (Adler-Nissen, 1986). Estos sustratos pueden provenir de fuentes:

vegetal, animal o microbiológica. Por cuestiones de rendimiento y costos, normalmente se usan como sustrato alimentos o subproductos ricos en proteína.

Entre los sustratos de origen animal destacan las proteínas de pescado y sangre de animales de matadero. Estos se usan en la producción de hidrolizados para formular alimento de animales de engorda. También se usan las proteínas de leche y carne de vaca. Con ellos se producen hidrolizados para alimentación infantil o dietas especiales. La albúmina de huevo, proteínas de suero de leche, colágeno y gelatina son sustratos que producen hidrolizados de perfil funcional definido (Adler-Nissen, 1986).

Entre los sustratos de origen vegetal destacan los concentrados y aislados de soya, para la producción de hidrolizados de perfil funcional definido. También se usan otras proteínas de origen vegetal como las de cacahuete, trigo, papa, girasol y algodón (Adler-Nissen, 1986)

Parámetros de Control en el Proceso de Hidrólisis

Los parámetros críticos en la producción comercial de hidrolizados se refieren: a las condiciones iniciales y a las condiciones durante y al final del proceso. Respecto a las condiciones iniciales, los parámetros son: la concentración de sustrato, la relación enzima/sustrato, la temperatura y el pH. La primera, la concentración del sustrato, indica solo el peso porcentual de la proteína en la mezcla de reacción, al principio de la hidrólisis. Es una definición pragmática, pues no indica la concentración futura de sustrato (Adler-Nissen, 1986). La segunda, la concentración de enzima, es relativa a la concentración de sustrato, normalmente se expresa como porcentaje en peso (Adler-Nissen, 1986). La temperatura y el pH, tienen que ver con la optimización de la cinética de la mezcla de enzimas seleccionada y con su actividad. El rango de temperaturas más usado va de 32° - 50° C. La pancreatina por ejemplo tiene un pH óptimo de 7.0 (Lahl y Braun, 1994).

Ya establecidos los parámetros iniciales, la reacción proteolítica deberá vigilarse, para ello existen varios métodos (Adler-Nissen, 1986).

a) El índice de solubilidad en TCA (ácido tricloroacético) se basa en la distribución de peso molecular del hidrolizado y mide el porcentaje de N que es soluble en ácido tricloroacético, bajo ciertas condiciones (Adler-Nissen, 1986).

b) Los métodos del ácido trinitrobenzilsulfónico (TNBS), del o-phthaldialdehído (OPA). (Adler-Nissen, 1986) y de la ninhidrina (Kabat, 1961). cuantifican los grupos amino libres por métodos químicos. Los resultados se dan como grado de hidrólisis o bien la relación AN/TN (nitrógeno α -amino libre del hidrolizado / nitrógeno total del sustrato)

c) pH Stat. Esta técnica es la más usada para control de procesos de hidrólisis. Su principio es que las proteasas al romper los enlaces peptídicos liberan grupos H que pueden ser titulables. Cuando el pH se mantiene constante, hay una relación proporcional entre los equivalentes de enlaces peptídicos hidrolizados y los equivalentes de base consumida (Nova, 1986).

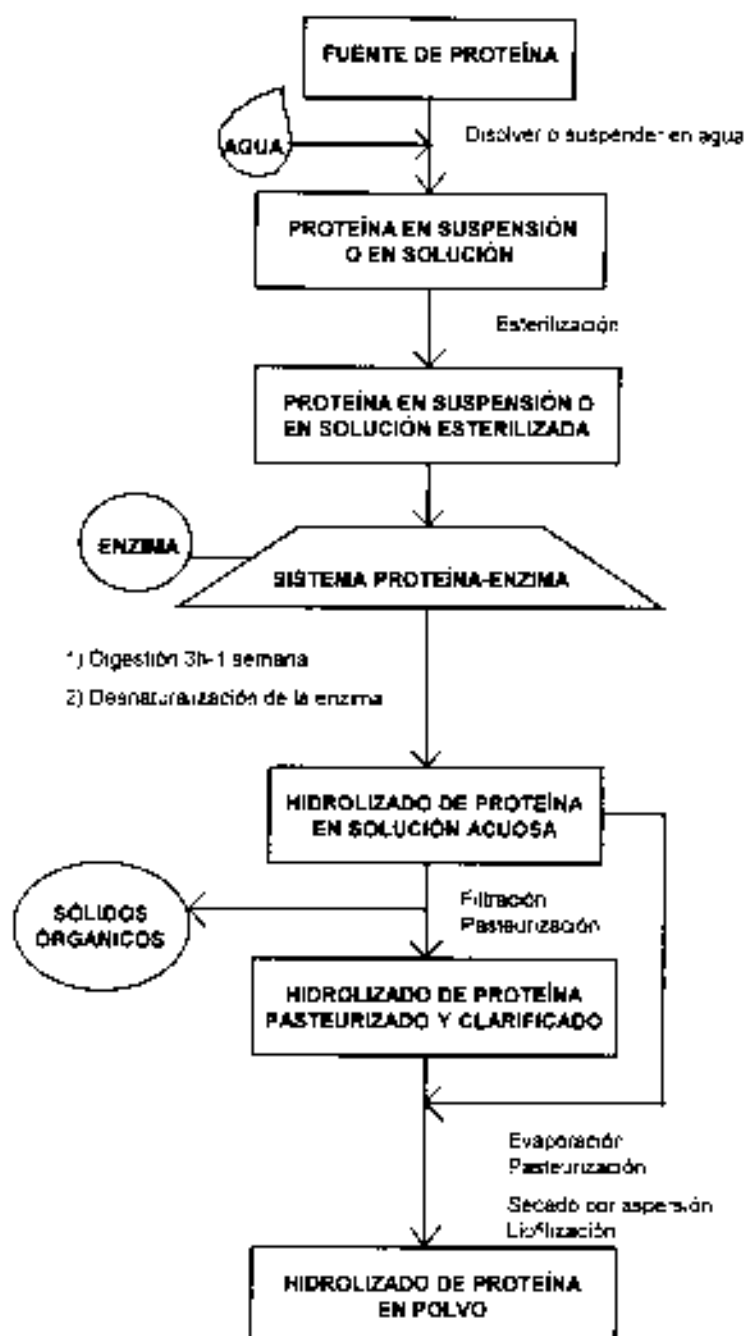
d) Otros métodos que también presentan un gran potencial para usarse durante los procesos de producción son la viscosimetría y la osmometría.

El tiempo es una variable que está directamente relacionada con el grado de hidrólisis deseado (Lahl y Braun, 1994). Finalmente, los hidrolizados se caracterizan de acuerdo a su funcionalidad, distribución de peso molecular, aminoácidos libres, proteína residual intacta, alergenicidad y otras (Boza y cols, 1994; Adler-Nissen, 1986; Mullally y cols. 1995).

Descripción del Proceso de Hidrólisis

La Fig. 2 muestra de una manera general el proceso de producción de hidrolizados Lahl y Braun (1994) y Central Soya (1993). destacan algunos puntos de interés.

A) El factor enzima(s) es muy importante, ante todo mezcla óptima, eficacia o concentración de actividad, pureza y economía.



Fuente: Lat y Braun 1954

Figura 2. Manufactura de hidrolizados de proteínas para productos nutricionales

B) Debido a los tiempos y condiciones de hidrólisis, la pureza sanitaria, tanto de enzimas como de sustrato, debe ser muy alta para que en la solución acuosa se evite el crecimiento y proliferación de bacterias. El hidrolizado en suspensión puede esterilizarse si es necesario.

C) Para terminar el proceso de hidrólisis se procede a ajustar el pH, o simultáneamente la temperatura se eleva a un punto en el cual el sistema enzimático sea más sensible por calor.

D) Un camino alternativo para terminar actividad enzimática, sería la remoción de la enzima por filtración o ultrafiltración.

E) Es importante remover del hidrolizado péptidos de alto peso molecular y material antigénico potencial, si el producto final está destinado a alimentación para infantes.

F) La ultrafiltración del hidrolizado es importante para remover residuos de enzima, y fragmentos de sustrato insoluble.

G) Para el secado del hidrolizado, lo más usado comercialmente es el secado por aspersión por ser más económico, aunque puede usarse liofilización, o secado convencional en rodillos.

H) En general, el control de calidad del hidrolizado requiere atención en áreas como: microbiología, características fisicoquímicas, parámetros bioquímicos (actividad enzimática residual) e inmunológicos y calidad nutricional.

Hidrolizados Proteicos de Perfil Nutricional

La hidrólisis de proteína es un campo muy atractivo para la nutrición humana (Frokjaer, 1994). Pues a través de ella se pueden manejar un sin número de propiedades de las proteínas: químicas, físicas, biológicas e inmunológicas (Cordle, 1994).

Usos. Los hidrolizados de proteína utilizados en nutrición humana tienen dos usos básicos: en formulaciones médicas especiales y en formulaciones de

productos de consumo general (Frokjaer, 1994). De los primeros destacan fórmulas o preparados para: infantes y adultos alérgicos, pacientes con enfermedad de Crohn, colitis ulcerativa, síndrome del intestino corto y pancreatitis (Schmidt y cols, 1994) Ejemplos de los segundos son: fórmulas infantiles, dietas para la senectud, dietas para deportistas, dietas para control de peso y bebidas enriquecidas con proteína (Frokjaer, 1994).

Clasificación. Los hidrolizados de proteína usados en formulaciones nutricionales son generalmente clasificados en dos grandes categorías, parcial y severamente hidrolizados. Cada cual posee diferentes propiedades que influyen en su utilización final (Mahmoud, 1994).

Actualmente no existen especificaciones para diferenciar a los hidrolizados sobre una base química. Los severamente hidrolizados tienen una reducción drástica de su reactividad inmunológica, por lo que se usan principalmente en fórmulas infantiles hipolergénicas. Los parcialmente hidrolizados son más difíciles de definir a causa del amplio rango en grado de hidrólisis (Mahmoud, 1994).

La Tabla 9 presenta el perfil de peso molecular de las diferentes clases de hidrolizado de proteína.

Criterios de producción. Los criterios más importantes en la producción de hidrolizados del perfil nutricional para aplicación en fórmulas infantiles son comentados por Lahl y Braun (1994), Boza y cols (1994), Fukushima (1994) y Frokjaer (1994).

A) Valor Nutricional. Primero, tiene que ver con la fuente de proteína, es decir, tipo y proporción de aminoácidos. Segundo, está relacionado con la ausencia de factores antinutricionales y con una mayor digestibilidad en el hidrolizado, que en la fuente original de proteína. Se debe subrayar que la leche materna es el modelo para fórmulas infantiles.

Tabla 9. Perfil de Peso Molecular de Hidrolizados Protéicos

Fracción	Grado de hidrólisis %		
	Parcial		Severo
	Escaso	Moderado	
Peso molecular (Daltons)			
< 500	3.8	9.8	90.2
500 - 1000	1.1	13.5	5.5
1000 - 2000	1.8	13.7	2.9
2000 - 5000	3.7	16.6	1.4
> 5000	89.7	46.4	0

Mahmoud, 1994

B) Costo.- Aquí destaca la economía y disponibilidad de la fuente de proteína, el costo de la enzima y su poder de actividad, así como la rentabilidad del proceso de hidrólisis

C) Sabor.- Un factor al que en un principio se le dio poca importancia, y que se ha constituido en limitante para el consumo de hidrolizados es el sabor o gusto del producto. Este es muy importante para la aceptación por parte del consumidor. Es por eso que se estudian compuestos que promuevan malos sabores (ej. enzimas, péptidos amargos). También se desarrolla metodología para eliminarlos o no permitir su desarrollo o aparición.

D) Antigenicidad.- Además de la calidad nutricional, es crítico el potencial de antigenicidad de los hidrolizados de proteína. Es muy importante asegurarse que la administración oral de los mismos no induzca sensibilización por la presencia de proteína o péptidos residuales en el material. Esto tiene que ver con la reducción de tamaño o peso molecular de la proteína nativa.

E) Solubilidad y Funcionalidad Es deseable un bajo grado de hidrólisis, para mantener las propiedades funcionales de la proteína nativa. Hayakawa y Nakai (1985) sugieren que la hidrofobicidad de los aminoácidos aromáticos es un factor que afecta la solubilidad de las proteínas de soya y leche. Debe reconocerse que las propiedades físicas son importantes aún en fórmulas infantiles Mahmoud y cols. (1992), subrayan la importancia de la relación que hay entre el grado de hidrólisis y las propiedades físicas como solubilidad, estabilidad y emulsificación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Acorde a los objetivos particulares, el presente trabajo se dividió en 4 etapas.

- 1.- Acondicionamiento y caracterización parcial de la materia prima
- 2.- Obtención y caracterización parcial de un concentrado enzimático de páncreas de cerdo liofilizado.
- 3.- Hidrólisis enzimática y análisis de sus productos.
- 4 - Caracterización parcial de la fracción de hidrólisis de interés

Reactivos

El BAPNA (α -N-benzoil-D-L-arginina-p-nitroanilida), el GPNA (Glutaril-L-fenilalanina-p-nitroanilida), DMSO (Dimetil sulfóxido), etilen glicol monometil éter, Folin, glicina, 2-mercaptoetanol, ninhidrina, ovoalbúmina, albúmina bovina, NaOH, y TRIS (tris-hidroximetil-aminometano) fueron de Sigma Chemical Co (St. Louis, MO.). El ácido acético, ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, cloruro de bario, cianuro de potasio e hidróxido de sodio fueron de Merck-México, S A

El cloruro de calcio, el TCA (ácido tricloroacético), alcohol etílico, sulfato de amonio, sulfato de cobre, fenoftaleína, fosfatos de potasio mono y di-básico, tween 20, acetato de sodio y cloruro de sodio fueron de Aldrich (Milwaukee WI). Ácido bórico y azul de Coomassie de Pharmacia-LKB (Upsala, Suecia). Rojo de fenol de Spectrum, aglutinina de soya de Vector, TMB (tetra metil bencidina) de GIBCO BRL, anticuerpos de puerco anticonejo-HRP de DAKO (Copenhague, Dinamarca) y DAB (di-aminobencidina) de Kem en Tec. Todos los demás reactivos usados fueron de grado analítico.

Acondicionamiento y Caracterización Parcial de la Materia Prima

La materia prima o sustrato a hidrolizar fue pasta de soya desgrasada, un subproducto de la industria de extracción del aceite de frijol soya. Se consiguió en la industria Gamesa ubicada en Cd. Obregón Sonora, desde donde se trasladó a los laboratorios de CIAD en bolsas de polietileno de 1 kg. perfectamente selladas. Estas se guardaron en cámaras de congelación hasta antes de iniciar el estudio.

Acondicionamiento.

Con el fin de estandarizar y reducir el tamaño de partícula de la pasta, se sometió a molienda. Para esto se usó un molino industrial marca ALPINE (Augusburg-HAUPT-ANTR-8400) con capacidad de 400 kg/h.

Caracterización

La pasta de soya desgrasada y molida se sometió a los siguientes análisis: proteína total, tamaño de partícula, actividad de inhibidor de tripsina, actividad de lectina y aminograma.

Proteína total o cruda. Por el método 920.105 de la A O A. C. (1990). El equipo usado fue una balanza Metler AE 240, un digestor LABCONCO y un destilador MicroKjeldahl LABCONCO. Se corrieron dos muestras por triplicado, cada una pesando aproximadamente 0.2 g del material directamente en el matraz Kjeldahl. El factor usado fue 6.25 y el resultado se reportó como porcentaje de proteína.

Tamaño de partícula. Se usaron cuatro mallas estándar Tyler, número 40, 60, 80 y 100 y un agitador de mallas Thomas. Se pesaron 500 y 200 g de pasta de soya molida, se armaron las mallas de mayor a menor abertura de poro, con un plato recolector al final. Se depositó la pasta de soya sobre la malla No. 40 y se cubrió. Se agitó en la escala 80 del agitador por 20 min. Finalmente se colectó

cuidadosamente el material que quedó en cada malla y se pesó. Esta prueba se hizo por duplicado para cada peso y los resultados se reportaron como porcentaje de pasta de soya retenido en cada malla.

Actividad de Inhibidor de tripsina. Se determinó por el método 71-10 de la A.A.C.C. (199). La extracción se hizo por triplicado agitando a baja velocidad 1 g de muestra en 50 ml de NaOH 0.01 N por 3 h. Para iniciar la determinación (por duplicado), se hizo una dilución de la suspensión anterior 1:10. Los resultados se reportaron como unidades de inhibidor de tripsina por gramo de proteína (UIT/g proteína).

Detección y actividad de lectina. Para detectar la presencia de lectinas se usó la prueba de doble inmunodifusión pasiva en gel de agarosa (Ouchterlony y Nilsson, 1975). El gel se preparó al 1% de agarosa en buffer Tris/Glicina 26 mM, pH 8.6 y se mantuvo a 56° C hasta usarse. Se gelificaron 2.8 ml en portaobjetos de vidrio previamente marcados con un rotulador. Después, se le hicieron 5 pozos de 3 mm de diámetro, en un arreglo tal, que uno quedó en el centro y los otros cuatro alrededor, equidistantes tanto entre sí, como desde el pozo central. En el pozo central se cargaron 5 µl de anticuerpos de conejo anti-aglutinina de soya comerciales y en los pozos periféricos 5 µl de la solución de pasta de soya antes de someterse a hidrólisis. La placas se dejaron difundir toda la noche en una cámara húmeda a temperatura ambiente.

Al siguiente día, las placas se lavaron con agua destilada y presionaron bajo varias capas de papel absorbente, por tres veces durante 20 min. Después se secaron con un secador de aire y se tiñeron con una solución de azul brillante de Coomassie R-250 durante 5 min (azul brillante de Coomassie R-250 al 0.5%, en etanol al 45%, ácido acético 10%). Finalmente se decoloraron con una solución conteniendo etanol y ácido acético en las mismas concentraciones que la del colorante y se dejaron secar al aire. La presencia de la lectina se detecta por la aparición de bandas de precipitación coloreadas entre el pozo central y los pozos con muestra.

Para cuantificar la cantidad de lectina, se usó el Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzima (ELISA). Para el desarrollo de esta técnica se utilizó: 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 + 0.05% de rojo de fenol. Para el lavado final, se utilizó buffer salino de fosfatos sin azida de sodio (0.02 M PO_4^{3-} + 0.15 M NaCl) y como sustrato cromogénico para peroxidasa, TMB (3'3'-5'5'-Tetrametilbencidina).

La placa de ELISA se cargó con 100 μl de buffer de cubierta por pozo. Luego se cargó, por duplicado con las muestras, con aglutinina de soya (SBA) como control positivo y con solo buffer de cubierta como control negativo. Se hicieron diluciones dobles seriadas y se guardó la placa en refrigeración toda la noche. Al siguiente día, se bloqueó añadiendo 100 μl por pozo de el buffer de bloqueo (mismo de dilución conteniendo 1% de leche en polvo) y se agitó durante 1 h a temperatura ambiente. Se lavó 3 veces durante 5 min con buffer de lavado y dilución, se cargó cada pozo con 100 μl de una dilución 1:1 000 de anticuerpos de conejo anti-SBA y se puso en agitación por 2 h. Se lavó 3 veces con buffer de lavado y se incubó durante 1 h con anticuerpos de puerco anti-inmunoglobulinas de conejo marcados con peroxidasa. Se lavó de nuevo 3 veces con buffer de lavado y una vez con PBS sin azida. Se desarrolló la actividad de la enzima con TMB durante 25 min. se detuvo la reacción con H_2SO_4 1 M y se leyó a 450 nm en un lector de ELISA (Bio-Rad, Mod. 450).

Para detectar actividad hemaglutinante, se usó la prueba de hemaglutinación utilizando eritrocitos humanos tripsinizados al 2% en PBS (Allen et al., 1973). Brevemente, se cargaron 25 μl de PBS a todos los pozos de una placa de microaglutinación. Se diluyeron seriadamente las muestras cuidando de mezclar bien antes de transferir, y se aplicaron en cada pozo 25 μl de la suspensión de eritrocitos tripsinizados al 2%. Después, se puso la placa en agitación a temperatura ambiente durante 30 min. El título de

hemaglutinación (TH) se tomó como el inverso de la última dilución en donde se observó visualmente la aglutinación (Calderón de la Barca et al . 1991).

Aminograma. La composición de aminoácidos de la pasta de soya se determinó por cromatografía líquida de alta resolución (CLAR), usando el método reportado por Vázquez-Ortiz y cols (1995).

La muestra (0.001 g) fue completamente hidrolizada en un tubo Pierce de 5 ml, al vacío. Para ello, se mezcló con una cantidad igual de tioglicolato de sodio y 3 ml de HCl concentrado. Cada muestra por triplicado, se hidrolizó en un digestor Pierce (Reacti-Therm. mod. 18870), durante 6 h a 150-160°C. Posteriormente, se evaporó a sequedad bajo vacío usando un rotavapor (Buchi Mod. 011), con baño de agua (Buchi Mod. 461) a 60°C. Se lavó dos veces con 5 ml de agua destilada y se almacenó a 4° C hasta su análisis.

Para el análisis, se pesaron 10 mg de OPA en matraz volumétrico de 10 ml, se disolvieron en 3 ml de buffer de borato de potasio, se añadieron 250 μ l de metanol, 37.5 μ l de Brij 35 al 30% y 25 μ l de 2-mercaptoetanol. Se aforó a 10 ml con buffer de borato de potasio y se dejó la mezcla en un vial oscuro durante toda la noche a 4° C. Al día siguiente, se preparó una solución de ácido α -aminobutírico (2.5 μ mol/ μ l) en 100 μ l de agua grado CLAR. Se utilizaron 2 ml de un estándar comercial de aminoácidos (0.1 μ mol/ μ l) a los que se les añadieron 2 ml de ácido α -aminobutírico como estándar interno. Se aforó a 50 ml con agua grado CLAR y se guardó en refrigeración.

Las muestras hidrolizadas se disolvieron en buffer de citrato de sodio pH 2.2 (2 ml). Se tomaron 200 μ l de esta solución, se les añadieron 40 μ l de la solución de estándar interno y se aforaron a 1 ml con buffer de citratos. Se mezclaron 0.5 ml de la solución anterior o 0.5 ml de la solución de estándares de aminoácidos, con 0.5 ml de la solución de OPA. Se filtraron en una jeringa Milipore con filtro acroso de 0.22 micras.

El tiempo de reacción se estandarizó a 2 min, cumplidos estos la muestra filtrada y dervada se inyectó en la portilla de inyección (10 μ l) de la bomba Varian 9010 (Solvent Delivery System). La muestra se hizo pasar a través de una columna de 10 cm de largo por 4.6 mm de diametro Microsorb Shortone RP C-18 (80-200, Rainin), empacada con partículas de octadecil dimetilsilano. El registro de la fase móvil (solvente A: buffer de acetato de sodio 0.1 M con tetrahidrofurano, solvente B: metanol) se muestra en la Tabla 10. La detección la realizó un detector Fluorichrom II de Varian, con lámpara de deuterio. La velocidad de flujo fue de 1.5 ml/min, a 25-27°C, durante 22 min.

La Tabla 11 muestra el orden de elución y el tiempo de retención de los 15 aminoácidos detectados por la técnica. Finalmente, el análisis de los cromatogramas se realizó con el paquete: Star Chromatography versión 4.0 de Varian.

Obtención y Caracterización Parcial de un Concentrado Enzimático de Páncreas de Cerdo

Obtención del extracto enzimático

Se obtuvieron 3 muestras de páncreas de cerdo fresco (1, 2 y 7 kg) de la matanza del día, en tres días diferentes, de los rastros de la compañía ALPRO y se transportaron en hielo a los laboratorios de CIAD.

El extracto de enzimas proteolíticas se obtuvo de acuerdo a la metodología reportada por Mullally y cols. (1995) con ligeras modificaciones. Primero, los páncreas se limpiaron manualmente del tejido graso y del tejido no propio. Después, fueron macerados en una licuadora Waring por 10 seg. con un volumen de ácido sulfúrico frío 0.125 M, igual al del páncreas fresco (1:1). Se añadió otro volumen de H₂SO₄ frío 0.125 M, y se procedió a la extracción. Ésta se llevó a cabo a 4°C, con agitación moderada pero constante, por un tiempo de 14 a 16 h. La suspensión fue filtrada en malla de tela. El retenido se

Tabla 10. Registro de la Fase Móvil de la Cromatografía Líquida de Alta Resolución

Tiempo (Minutos)	Solvente (%)	
	Solvente A	Solvente B
0	100	0
0.5	80	20
7.5	80	20
10	50	50
15	50	50
18	20	80
20	0	100

Solvente A: buffer acetato de sodio 0.1 M (con tetrahidrofurano)

Solvente B: metanol grado CLAR

Tabla 11. Orden de Elución y Tiempos de Retención de Aminoácidos.

Aminoácido	Orden	Tiempo de retención (minutos)
Asp	1	1.9
Glu	2	3.0
Ser	3	6.5
His	4	7.5
Gli	5	10.3
Tre	6	10.8
Arg	7	12.0
Ala	8	14.6
Tir	9	15.4
Est. Int.*	10	17.4
Met	11	19.0
Val	12	19.3
Fen	13	19.7
Ile	14	20.5
Leu	15	20.8
Lis	16	22.1

*Estándar interno

ficó por 10 seg con un volumen igual de H_2SO_4 frío 0.125M y nuevamente se filtró y se unió al filtrado anterior. El filtrado se centrifugó en un equipo Beckman J2-21 a 5000 rpm, 15 min a 4°C.

Se desechó el precipitado de la centrifugación anterior y el sobrenadante se fraccionó con sulfato de amonio al 25 y 40% de acuerdo a Harris (1989). Las soluciones con sulfato de amonio permanecieron en agitación constante toda la noche a 4°C. después de lo cual, se centrifugaron a 10 000 rpm, 20 min a 0°C. Los sobrenadantes se decantaron y los precipitados se resuspendieron en la menor cantidad de agua destilada posible. Así se obtuvieron dos precipitados y dos sobrenadantes correspondientes a la fraccionación de 25 y 40%. Cada una por separado, se dializó contra una solución de NaCl al 1% con agitación constante a 4°C. La diálisis se continuó hasta no detectar sulfato de amonio en la solución de diálisis, por la prueba con cloruro de bario.

Activación de Zimógenos.

Para activar los zimógenos, se tomó un volumen de cada fracción (precipitado y sobrenadante de 25% de saturación y precipitado y sobrenadante de 40% de saturación) y se mezcló con un volumen igual de buffer Tris-HCl 0.1 M, pH 7.0 con CaCl_2 0.01 M. Se le añadió un 9% (v/v) de una solución de tripsina (1 mg/ml) en el mismo buffer. Se hicieron controles sin la adición de tripsina exógena (un volumen de muestra problema + un volumen de buffer Tris HCl 0.1 M pH 7.0) y con solo tripsina. Todas estas mezclas se incubaron a 37°C. con agitación constante y se tomaron alícuotas de 2 ml a las 0, 3, 6, 10, 20, 37 y 47 h. Estas alícuotas se ensayaron para actividad específica semejante a tripsina (Erickson et al., 1983).

Medición de la actividad semejante a tripsina. Para la determinación de actividad enzimática el volumen total de reacción fue de 3 ml, el cual contenía: 2 ml de α -N-benzoyl-D,L-Arginina-p-Nitroanilida (BAPNA) 1.050 mM en sulfóxido de dimetilo (DMSO)-Buffer Tris-HCl 50 mM, pH 8.2; 0.5 ml de CaCl_2 mM, pH

8.2; 0.25 ml de muestra y 0.25 ml de agua destilada. Se hizo un blanco con agua destilada en lugar de extracto enzimático (Erickson et al., 1983).

La mezcla de reacción y el blanco fueron incubados a 40°C por 1 h en baño de agua, inmediatamente después de adicionar el sustrato. Transcurrido el tiempo, la reacción se detuvo adicionando 0.5 ml de ácido tricloroacético al 10%, se reposó por 30 min a temperatura ambiente y se filtró a través de papel Whatman No. 1. Al filtrado se le determinó absorbancia a 410 nm en un espectrofotómetro (Milton Roy Co Mod. Spectronic 21). La actividad específica se reportó como μg de p-nitroanilida/min x ml de extracto. Se utilizó el coeficiente de extinción de 8800 para la p-nitroanilida (Erlanger y cols, 1961); y se usó la ecuación: $C = A/bE$ donde:

C = Concentración del producto (p-nitroanilida) en g/L

A = Absorbancia determinada

E = Coeficiente de extinción molar

b = Longitud de la celda (1 cm)

Con los resultados obtenidos se hizo la curva de activación, graficando tiempo contra actividad y se calculó el tiempo óptimo de activación.

Concentración y Liofilización del Extracto Enzimático de Páncreas.

La fracción con mayor actividad se concentró por ultracentrifugación en celda de Amicon, a 4°C con membrana de corte a 10 kDa, atmósfera de nitrógeno y 75 psi de presión. Una vez concentrada, la fracción se congeló a -70°C y se liofilizó (liofilizador Labconco; LIPH-LOCK12) a completa sequedad.

Caracterización Parcial del Concentrado Enzimático Liofilizado.

El concentrado enzimático liofilizado se caracterizó con las siguientes pruebas.

Proteína total o cruda. Por el método 920.105 de la A.O.A.C. (1990).

Actividad semejante a tripsina. La determinación de la actividad específica semejante a tripsina del concentrado liofilizado, se realizó con la misma técnica de Erickson y cols. (1983) ya citada. Para ello, se diluyó primero a 1 mg/ml y luego con diluciones dobles seriadas hasta una concentración de 0.031 mg/ml.

Actividad semejante a quimiotripsina. La técnica usada fue la de Erickson y cols. (1983). Esta consistió en preparar un volumen de 3 ml con 0.5 ml de Glutamil-L-fenilalanina-p-nitroanilida (GNPA) 4.98 mM y 0.5 ml de CaCl_2 100.2 mM ambos disueltos en buffer Tris-HCl 50 mM, pH 8.2. Se le añadieron 1.5 ml del mismo buffer, 0.25 ml de concentrado en solución (iniciando con 1 mg/ml) y 0.25 ml de agua destilada. El blanco contenía agua destilada en lugar de concentrado en solución. Tanto las mezclas de reacción como el blanco se incubaron por 1 h a 40°C en baño de agua caliente. Para detener la reacción se adicionaron 0.5 ml de ácido tricloroacético al 10%. Se reposó por 30 min a temperatura ambiente y se filtró a través del papel Whatman No. 1. Al filtrado se le determinó absorbancia a 410 nm. La actividad del concentrado enzimático semejante a quimiotripsina se reportó como μg de p-nitroanilida/min x mg de proteína utilizando el coeficiente de extinción 8800 y la ecuación ya citada en la actividad semejante a tripsina.

Comparación de Actividad con Enzimas Comerciales. La actividad semejante a tripsina y quimiotripsina del concentrado enzimático, se comparó con la de dos enzimas comerciales: Tripsina cruda tipo II de páncreas de cerdo y α -quimiotripsina (EC. 3.4.21.1.) de páncreas bovino de Sigma Chemical Co.

Experimento de Hidrólisis y Análisis de los Productos

Curva de Proteólisis.

Previo al montaje del experimento de hidrólisis se corrió una curva de proteólisis a distintas temperaturas, para ver el efecto de esta, sobre la actividad proteolítica del concentrado liofilizado. Este ensayo se hizo de

acuerdo a un método reportado por Erickson et al. (1983). Se usó albúmina bovina (Sigma 96-99% pureza) como sustrato. En tubos de ensayo, se mezclaron 10 ml de una solución al 1% de albúmina, 5 ml de buffer Tris-HCl 0.1 M, pH 7.6 y se ajustó el pH a 8.0 con NaOH 0.5 N. Se equilibraron los tubos durante 5 min a 4 temperaturas: 40, 45, 50, 55° C. Luego se añadieron 5 ml de una solución al 1% del concentrado enzimático a cada tubo y se incubaron en baño de agua a las temperaturas seleccionadas, durante 4 horas. Se tomaron alícuotas de 2 ml a los tiempos 0, 2 y 4 h. Se les añadieron 3.5 ml de TCA al 5%, se dejaron reposar por 30 min a temperatura ambiente y se filtraron en papel Whatman No. 1. Al filtrado se le leyó absorbancia a 280 nm. Se tomó una muestra sin concentrado enzimático y una curva de referencia de albúmina a distintas concentraciones. Se graficó tiempo contra concentración de proteína en solución.

Experimento de Hidrólisis

El volumen de reacción fue de 250 ml y la concentración de sustrato al 4% (p/v). Se probaron relaciones enzima/sustrato de 2% y 4%. El pH se mantuvo constante con la adición periódica de NaOH 0.51 N, esto se midió con un potenciómetro Coming (pH-METER 340). La temperatura fue controlada a 50°C durante el tiempo que duró el experimento. Para esto se utilizó un baño de agua (LAB-LIN) con agitación constante. Se tomaron alícuotas de 50 ml a 0, 6, 12 y 24 h. Se inactivó la enzima llevando la temperatura a 85°C por 30 min. Ya inactivada la enzima, se centrifugó a 1 500 rpm por 10 min, a temperatura ambiente en una centrifuga Centra GP83.

Análisis de los Productos de Hidrólisis

Concentración de proteína en solución. A los productos de la hidrólisis, antes y después de centrifugar, así como después de la ultrafiltración (permeado y retenido), se les midió concentración de proteína (Lowry et al., 1951).

Grado de hidrólisis. El avance de la hidrólisis proteica a través del tiempo (grado de hidrólisis) se midió con el método de la ninhidrina (Kabat, 1961), que detecta nitrógeno α -amino. Para ello, se utilizó una solución de ninhidrina de 200 mg disueltos en 15 ml de metilcelosolve (etilenglicol monometil eter) y 5 ml de buffer de acetato, conservada en frasco ambar.

Se colocaron 0.2 ml de muestra (alícuotas a distintos tiempos) conteniendo 0.05 a 15 μg de N en un tubo de ensayo. Se les añadieron 0.2 ml de reactivo de ninhidrina activado con KCN (a 2 ml de la solución de ninhidrina, se añadieron 0.05 ml de KCN 0.01 M). Luego se mezclaron (Vortex GENIE 2) vigorosamente y se tapó la boca de cada tubo de ensayo con una canica de vidrio. Se calentaron en baño de agua hirviendo por 5 min, se enfriaron a temperatura ambiente y se les añadió 1 ml de alcohol etílico al 50%. Finalmente se leyeron en un espectrofotómetro a 570 nm. Se incluyeron blancos con agua destilada en lugar de muestra y una curva estándar de glicina, iniciando con 1 mg/ml. Los resultados se dan como μg de N α -amino/ μg de proteína x 100.

El grado de hidrólisis también fue medido a través de la ecuación de Alder-Nissen (1966):

$$DH = \frac{B \times N}{MP} \times \frac{1}{\alpha} \times \frac{1}{H} \times 100$$

Donde:

B = Consumo de Base

N = Normalidad de la base

α = Grado de disociación de los grupos amino

MP = Masa de proteína en reacción

H = Número de enlaces peptídicos en el sustrato

El parámetro $1/\alpha$ es una constante igual a 1.13 y H es igual a 7.8 meq/kg

El grado de hidrólisis fue calculado conociendo el volumen y normalidad de base gastada para mantener el pH constante en 8.0. También se corrió un control sin la adición de enzima.

Lo anterior se hizo en todos los experimentos de hidrólisis con volúmenes de reacción desde 250 ml hasta 3 litros.

Ultrafiltración fraccionada. Las muestras tomadas a los distintos tiempos, se ultrafiltraron en una celda de ultrafiltración de 200 ml (Amicon Mod. 8200). Las condiciones de operación fueron 75 psi de presión, atmósfera de nitrógeno y un volumen de reducción de 85%. Se utilizaron membranas de corte a 10 000, 3000 y 500 Da. La UF rindió cuatro fracciones por alícuota: una > 10 000 Da, otra entre 10 000 y 3 000 Da, otra entre 3 000 y 500 Da, y finalmente una <500 Da. El proceso de ultrafiltración se hizo a 4°C.

Balace de Masa. Utilizando los datos de la determinación de proteínas en solución, se hizo un balance de masa con respecto a proteína.

Obtención y Caracterización Parcial de la Fracción de Interés.

Elección de la Fracción de Interés

Los parámetros considerados, de acuerdo al objetivo fueron: peso molecular, cantidad de proteína y concentración (baja) de aminoácidos libres.

Obtención Masiva de la Fracción de Interés.

Una vez seleccionada la fracción de interés, se procedió a obtenerla en cantidad suficiente para su evaluación biológica (balance de nitrógeno, 10 días). Primero, se preparó un concentrado enzimático de páncreas a partir de 7 kg de materia cruda. Con dicho concentrado, se hidrolizó pasta de soya en un volumen de reacción total de 15 litros (separado en lotes de 3 litros). Las condiciones fueron: concentración de sustrato 4% (p/v), relación enzima/sustrato al 4%, temperatura 50°C, pH constante en 8.0, agitación

constante y un tiempo de hidrólisis de 12 h. Al final, se inactivó la enzima llevando cada lote de hidrólisis a 85°C por 30 min

Todo el lote de hidrólisis (15 L) se centrifugó a 1500 rpm por 15 min a 4°C. Se colectó el sobrenadante y se añadió agua destilada hasta hacer un volumen de 17 L. Para agilizar el proceso de ultrafiltración, el volumen total fue ultrafiltrado en un equipo ROMICON (MODELO HF-LAB-5), equipado con un cartucho (membrana) sencillo, de corte a 10 000 Da (Romicon Koch Membrane Systems, PM10). Esta fue acondicionada de acuerdo al protocolo indicado en el manual, el flujo fue de 560 ml/min y el porcentaje de recuperación fue de 93%.

Ya libre el hidrolizado de moléculas mayores a 10 000 Da, se ultrafiltró en dos celdas Amicon (Modelo 8200 y 8400), también con los parámetros ya establecidos. Se utilizaron membranas de corte a 3 000 (YM3) y 500 (YCO5) Da. Para remover el exceso de NaOH de los hidrolizados, se utilizó ultradiafiltración en las mismas celdas de Amicon, utilizando de 3 a 4 volúmenes de agua destilada. Finalmente, se liofilizaron los productos.

Análisis de la Fracción de Interés.

La fracción de interés liofilizada se caracterizó con las siguientes pruebas: proteína total, solubilidad, actividad de inhibidor de tripsina, actividad de lectinas, antigenicidad, alergenicidad, aminograma y la evaluación de calidad de proteína.

Proteína Total o Cruda. Por el método 920.105 de la A.O.A.C. (1990).

Solubilidad. El perfil de solubilidad con respecto al pH fue determinado usando un método reportado por Campbell y cols. (1996) con ligeras modificaciones. Para esto, soluciones de la fracción de interés, de la materia prima y de aislado de soya comercial de concentración de proteína conocida, fueron suspendidas en agua destilada y en solución de NaCl al 2%. El pH se ajustó a 6, 6.5, 7.0 y 7.5 con la adición de fosfato mono y dibásico de potasio 1 M. Estas soluciones se agitaron por 2 h a 4°C para luego filtrarse a través de filtro acuoso de 0.22

micras y leerles absorbancia a 280 nm. El porcentaje de solubilidad fue calculado haciendo soluciones referencia de 100% de solubilidad a pH 12 de pasta de soya, fracción de interés y aislado de soya comercial.

Actividad de inhibidor de tripsina, actividad de lectina, aminoograma. Se determinaron con los métodos ya mencionados en la parte de acondicionamiento y caracterización parcial de la materia prima.

Antigenicidad. El ensayo de antigenicidad se hizo en varias etapas: obtención de anticuerpos por inmunización de conejos, purificación de los anticuerpos por cromatografía de afinidad, prueba de actividad y el ensayo mismo de antigenicidad.

Siguiendo el protocolo de Jurd y Bøg-Hansen (1990), se inmunizó un conejo de 1.5 kg de peso con 1 ml de una emulsión de pasta de soya (pasta 1 mg/ml + adyuvante completo de Freund, 1:1), aplicándole subcutáneamente en la parte superior de manos y patas y en la espalda, cinco punciones de 0.2 ml cada una. A las 4 semanas, se le administró al mismo animal, una dosis amplificadora, esta vez utilizando adyuvante incompleto de Freund, en las mismas condiciones que la primera vez. Una semana después se sangró el conejo en la vena de la oreja. La sangre colectada se dejó coagular a temperatura ambiente por cuatro horas y se separó el suero por centrifugación (IEC-CENTRE-4B) por 10 min, a 2 500 rpm.

La purificación de los anticuerpos se realizó de acuerdo a las recomendaciones del fabricante de la matriz con proteína A (Kem-En-Tec, Copenhagen, Dinamarca). Se equilibró una columna cromatográfica con proteína A inmovilizada en agarosa, con Tris-HCl, 0.1 M, pH 8.6, 1 M de NaCl), hasta que el graficador (Bio-Rad 1325) dió una línea base estable. La muestra (anti-suero de conejo) se diluyó 1:1 con buffer de dilución (Tris/HCl 0.2 M, pH 8.6, 2 M NaCl) y se aplicó a la columna a un flujo de 1.5 ml/min. El flujo fue regulado por una bomba peristáltica (Bio-Rad). La cromatografía se monitoreó con un detector de ultravioleta (Bio-Rad) y se fraccionó en un colector de

fracciones (Bio-Rad 2110). El buffer de lavado fue el mismo de equilibrio y una vez lavado todo el material que no se enlazó a la proteína A, la columna se eluyó con citrato de sodio-HCl, 0.1 M, pH 3.0. El eluato se colectó y mezcló en forma continua y vigorosa con buffer de neutralización (K_2HPO_4 , 0.2 M, pH 9.3), un volumen de eluato por medio volumen de buffer. Terminada la elución, la columna se lavó nuevamente con buffer de lavado hasta ajustarle el pH a 8.6. El eluato se dializó contra NaCl al 1% y finalmente se concentró en la celda de Amicon (Modelo 8200) a 55 psi de presión y con membrana de corte a 10 kDa (PM 10).

La actividad de los anticuerpos producidos se probó por medio de inmunodifusión pasiva en gel de agarosa y por ensayo de manchas con derivados de peroxidasa. En estas pruebas se incluyeron algunos productos de hidrólisis y la fracción de interés, por lo que se consideró como un preeliminar de la detección de antigenicidad.

La doble inmunodifusión pasiva en gel de agarosa se hizo en forma similar a como se describe en el apartado de detección y actividad de lectina. En el pozo central se cargaron 5 μ l de la IgG purificada (conejo anti-pasta de soya) y en los periféricos, las diversas muestras: pasta de soya, soya texturizada, hidrolizado de 24 h y fracciones de los hidrolizados de 12 h.

El ensayo de manchas en membrana de nitrocelulosa se hizo en tiras de 3 mm de ancho y 8 cm de largo. A las membranas se les aplicaron 2 μ l de cada muestra a ensayar, espaciadas 1 cm. Por duplicado, se aplicaron: solución de hidrolizado al tiempo 0, a las 12 h y a las 24 h, pasta de soya, fracciones de 12 h de hidrólisis (> 3 000 Da, entre 3 000 y 500 Da y < 500 Da) y producto de 24 h de hidrólisis sin fraccionar. Cada tira se hizo por duplicado, con el fin de usar una de ellas como control para cada grupo de muestras.

Una vez secas las manchas, las tiras de nitrocelulosa se colocaron en las minicharolas de incubación múltiple y se bloquearon durante 2 min con buffer tris-salino de bloqueo (0.05 M TRIS/HCl, 0.1 M NaCl y NaN_3 15 mM, 2%

Tween 20, pH 7.2). Luego se incubaron durante 2 h con los anticuerpos a ensayar (IgG de conejo anti-pasta de soya) en dilución 1:300, en buffer de incubación y lavado (mismo de bloqueo con 0.05% de Tween en lugar de 2%). Los controles se incubaron con el buffer solo. Se dieron 3 lavados de 5 min con buffer de lavado, y se incubaron 1 h adicional con 1 ml de anticuerpos de puerco anticonejo-HRP (1:2 000). Se lavó 3 veces por 5 min con buffer de lavado y 2 veces con agua destilada también por 5 min. Las membranas se transfirieron a una caja petri para ser teñidas. Se incubaron de 5 a 30 min en una solución de DAB (diaminobencidina), una pastilla en 10 ml de agua destilada, mas 3 μ l de H₂O₂ al 30%. La reacción se paró (al aparecer las manchas) por lavado con agua destilada.

El potencial antigénico de las proteínas de pasta de soya y sus hidrolizados (fracción de interés) fue medida por la técnica de ELISA, siguiendo en general el protocolo descrito en la sección de "Actividad de lectina". En este caso, el primer anticuerpo fue el preparado en conejo anti-pasta de soya dilución 1:500, en lugar del anticuerpo anti-SBA aplicado antes para la determinación de lectina.

Prueba de Alergenicidad. Para esta prueba, se utilizaron sueros de niños alérgicos en un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA). En total, se ensayaron 5 sueros diferentes de niños menores de dos años, que habían presentado alergia a productos de soya y dos sueros de niños alérgicos a otros alimentos (Frisby Urrea, 1996). El ELISA se realizó con los mismos buffers que los anteriores. En este caso, una placa se cubrió con solución de pasta de soya en buffer de carbonatos (350 μ g/ml) y la otra con una solución de la misma concentración de la fracción entre 500 y 3000 Da. Después de una noche de incubación y de bloqueo con albúmina bovina o gelatina al 1%, las placas se incubaron durante otra noche a 4° C. con los sueros de los niños (por duplicado), empezando con una dilución 1:40. Al siguiente día, se hicieron las incubaciones con anticuerpos de conejo anti-IgE humano (1:1000), después

con anticuerpos de puerco anti-inmunoglobulinas de conejo conjugados a peroxidasa (1.2000). Al final, como en los demás casos, la reacción enzimática se desarrolló con TMB y se leyó a 450 nm.

Aminograma. Se realizó en la misma forma que la señalada para el análisis de la pasta de soya. Las comparaciones entre perfiles de aminoácidos obtenidos para pasta de soya, fracción de interés, fracción < a 500 Da y el perfil para el lactante (FAO/WHO, 1991), se hicieron aplicando análisis de varianza y prueba de comparación de medias de Tukey del paquete estadístico statgrafic (STSC, inc., 1989).

Evaluación de Calidad de Proteína. Se utilizaron 16 ratas (8 hembras y 8 machos) Sprague Dawley, de 4 días post-destete, con 58.5 g de peso promedio. Estas fueron colocadas individualmente en jaulas metabólicas (NALGENE), en un bioterio a 25°C, con luz regulada automáticamente en ciclos de 12 h de luz y 12 h de oscuridad, con libre acceso a agua y dieta sólida. La composición de la dieta basal se hizo de acuerdo al A.O.A.C. (1984), para lograr dietas isoenergéticas al 10% de proteína.

Las ratas fueron asignadas al azar a 1 de 3 dietas (ver Tabla 12): dieta control de caseína 6 ratas, dieta problema proteína de soya + metionina (0.47g/100g prot) 6 ratas y una dieta libre de nitrógeno 4 ratas. Para cada grupo, la mitad fue hembras y la otra mitad machos. Los indicadores empleados para estimar la calidad de la proteína fueron: digestibilidad verdadera, valor biológico y NPU (utilización neta de proteína), de acuerdo a las fórmulas reportadas en Protein Quality Evaluation (FAO/WHO, 1991).

La digestibilidad verdadera es la porción del nitrógeno del alimento que es absorbida y está dada por la fórmula:

$$DV = \frac{I - (F - Fk)}{I}$$

I = Nitrógeno consumido

F = Nitrógeno fecal

Fk = Nitrógeno endógeno fecal (metabólico)

Tabla 12. Dietas Empleadas para los Estudios Biológicos de Calidad de Proteína

Ingredientes	%
Aceite de maíz	8.0
Almidón de maíz	34.8
¹ Premezcla de vitaminas	1.0
¹ Premezcla de minerales	5.0
¹ Celulosa	1.0
Agua	5.0
Azúcar	34.8
¹ Caseína ANRC (control)	10.0
² Fracción de interés (experimental)	10.0
Cr ₂ O ₃	0.2
Cloruro de colina	0.2

¹ USB Amersham Life Science

² Mas 0.47 g de metionina por 100g de proteína

El valor biológico es la porción de nitrógeno absorbido que es retenido para mantenimiento y/o crecimiento y está dado por la siguiente fórmula:

$$VB = \frac{I - (F - Fk) - (U - Uk)}{I - (F - Fk)}$$

I = Nitrógeno consumido

F = Nitrógeno fecal

Fk = Nitrógeno endógeno fecal

U = Nitrógeno urinario

Uk = Nitrógeno endógeno urinario

El NPU es la porción de nitrógeno consumido que es retenido, y responde a la fórmula:

$$NPU = VB \times DV$$

NPU = Utilización neta de proteína

VB = Valor biológico

DV = Digestibilidad verdadera

Durante 10 días, se colectaron diariamente orina, heces y restos de las dietas. A la orina se le añadió HCl concentrado hasta bajar el pH a 3.0 y se almacenó a 4°C. Las heces fueron secadas en estufa a 110°C. Las ratas fueron pesadas al inicio y al final de los 10 días de experimentación. Se determinó proteína total o cruda a heces, orina y dietas por el método 920.105 de la A.O.A.C. (1990). La humedad de las dietas se determinó con el método 950.46 de la A.O.A.C. (1990).

A los resultados de DV, VB y NPU en la evaluación de proteína, se les hizo análisis de varianza y prueba de comparación de medias de Tukey del paquete estadístico Statgrafic (STSC, Inc., 1989).

RESULTADOS Y DISCUSION

Los resultados se presentan bajo el siguiente formato:

- 1.- Obtención y caracterización parcial del concentrado enzimático de páncreas de cerdo liofilizado, nombrado en el texto solo como concentrado enzimático (CE)
- 2.- Hidrólisis de pasta de soya y análisis de sus productos
- 3.- Caracterización de la fracción de interés y comparación con la materia prima.

Obtención y Caracterización Parcial del Concentrado Enzimático (CE)

Limpieza de Páncreas

Se corrieron tres experimentos de obtención del CE, empezando con diferentes cantidades de material. De cada kg de páncreas fresco, después de la limpieza manual, se obtuvieron 870 gr (= 3.6 g) de páncreas limpio.

Fraccionación con Sales de Amonio

Se obtuvieron 4 fracciones, dos precipitados y dos sobrenadantes correspondientes a 25 y 40% de saturación. La actividad semejante a tripsina fue usada como un indicador de actividad proteolítica. Tripsina no es importante únicamente por su actividad intrínseca, sino también por la activación de otros zimógenos en el páncreas (Mullally y cols, 1995)

Las fracciones correspondientes a los sobrenadantes de 25 y 40% de saturación no presentaron actividad semejante a tripsina (AST), aún después de incubarlos a 37°C por 3, 6, 20, 30 y 47 h, por lo que fueron desechados. Las fracciones correspondientes a los precipitados de 25 y 40% de saturación fueron resuspendidas e incubados a 37°C, sin añadirles tripsina exógena. En la Fig. 3 se muestra que a las 20 h de incubación, se dió un máximo en la

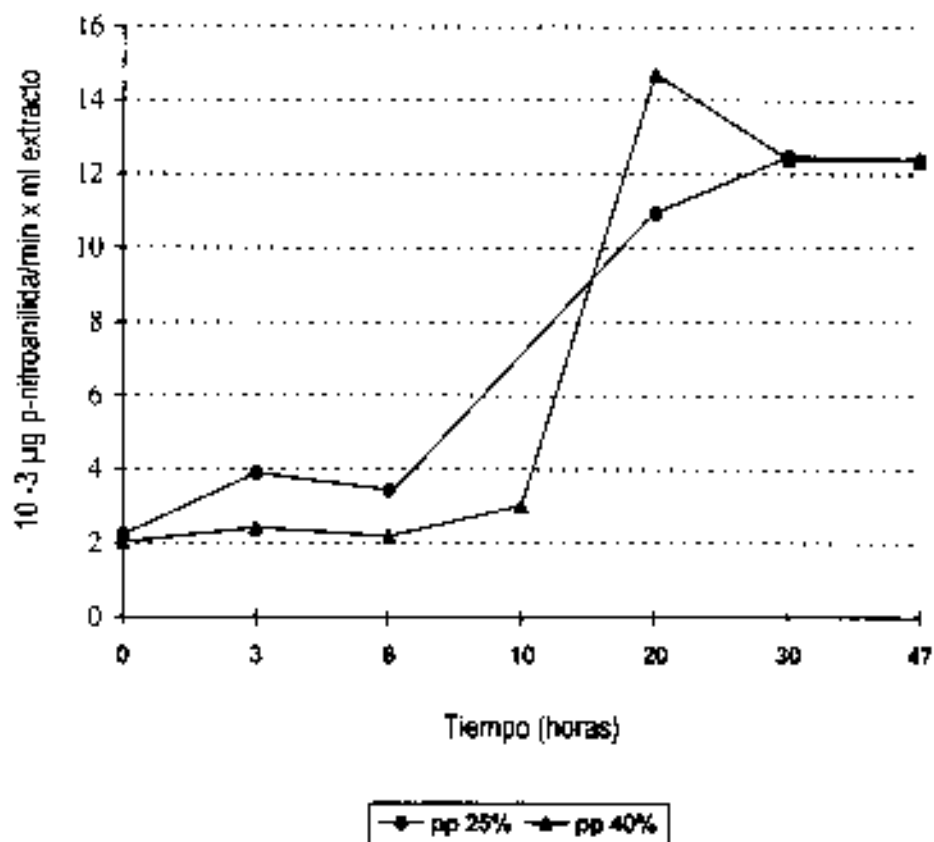


Figura 3. Actividad Semejante a Tripsina de los Precipitados en Sulfato de Amonio después de Incubar a 37°C

actividad semejante a tripsina. Por lo que estas fracciones fueron las indicadas para obtención del CE

Activación de Zimógenos

A las fracciones correspondientes a los precipitados a 25 y 40% de saturación se les adicionó tripsina exógena, para acelerar la conversión de los zimógenos a enzimas. Aunque la activación de proteasas pancreáticas es independiente de la adición de tripsina exógena, se ha demostrado que sin ella, la activación es muy lenta (Desnuelle y Roverly, 1961). Esto es visualmente fácil de observar si se comparan las Fig. 3 y 4 de este estudio. En el primer caso (Fig. 3), sin la adición de enzima exógena, el máximo de activación se dio hasta las 20 h de incubación, mientras que con la adición de enzima, la activación se dispara desde las 3 h de incubación (Fig. 4).

En la Fig. 4 se muestra además, que existe una ligera superioridad en la AST de la fracción correspondiente al 40% de saturación (F40) sobre la de 25% (F25). En la curva de la F40 se muestra que la actividad semejante a tripsina se mantiene en un nivel alto, con promedio de $27.2 (\pm 0.9) \times 10^{-3}$ μg de p-nitroanilida/min x ml de extracto, entre las 3 y las 20 h de activación. Este hecho fue observado también por Mullally y cols. (1995); la actividad de tripsina se incrementa a un máximo y mantiene estable su nivel de actividad por un periodo muy prolongado.

Por los resultados expuestos, se seleccionó la precipitación con sulfato de amonio al 40% y un tiempo de activación de 6 h para la obtención masiva del concentrado enzimático. La activación se realizó inmediatamente después de obtener la fracción correspondiente, pues se ha demostrado que un almacenamiento mayor a 5 días a 4°C, disminuye marcadamente la actividad de tripsina y quimiotripsina (Mullally y cols, 1995).

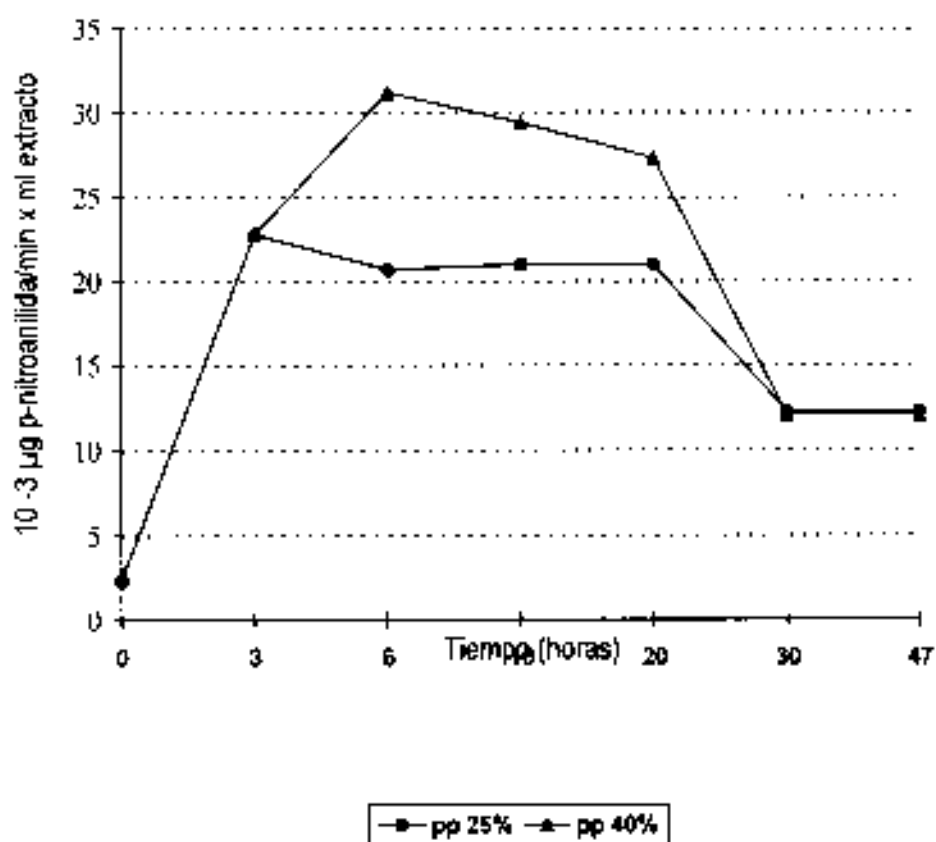


Figura 4. Activación de Zimógenos con Tripsina Exógena de los Precipitados con Sulfato de Amonio, a 37°C

Caracterización Parcial del Concentrado Enzimático

Rendimiento. De cada kg de páncreas limpio, se obtuvo un promedio de 4.87 g (± 0.19) de concentrado enzimático. Este fue un polvo blanco, de buena solubilidad y con un contenido de proteína de 90.5% (± 0.75). Esta concentración de proteína es muy buena si se compara con 95% y 85% que presentaron tripsina II y quimiotripsina comerciales (Sigma Chemical, Co.) respectivamente.

Actividad Semejante a Tripsina (AST) y a Quimiotripsina (ASQ). Se compararon la AST y la ASQ del concentrado enzimático con las de preparaciones enzimáticas comerciales. La Fig. 5 muestra que la AST y la ASQ del concentrado enzimático preparado en este estudio, fueron superiores. La superioridad en actividad semejante a tripsina fue mas marcada que la semejante a quimiotripsina. Esto podría deberse a que la extracción ácida usada en las etapas iniciales, afectó a quimiotripsina ya que esta es muy sensible al ácido (Mullally y cols, 1995).

Hidrólisis de Pasta de Soya y Análisis de los Productos

Curva de Proteólisis

El efecto de la temperatura sobre la actividad proteolítica del concentrado enzimático se muestra en la Fig. 6. Se observa que la curva a 50° C en sus tres puntos (0, 2 y 4 h) es superior a las otras curvas (40°, 45° y 55° C). Después de la hidrólisis y precipitación con TCA, la concentración de péptidos solubles alcanza su máximo en la curva a 50° C, a las 4 h (0.491 mg/ml). A los 55° C se evidencia un detrimento en la actividad proteolítica. Tanto a las 2 como a las 4 h, la concentración de péptidos solubles a 55° C está por debajo de la concentración correspondiente a las curvas a 45° C y 50° C. Al respecto se sabe, que la tripsina porcina y en general las proteasas de

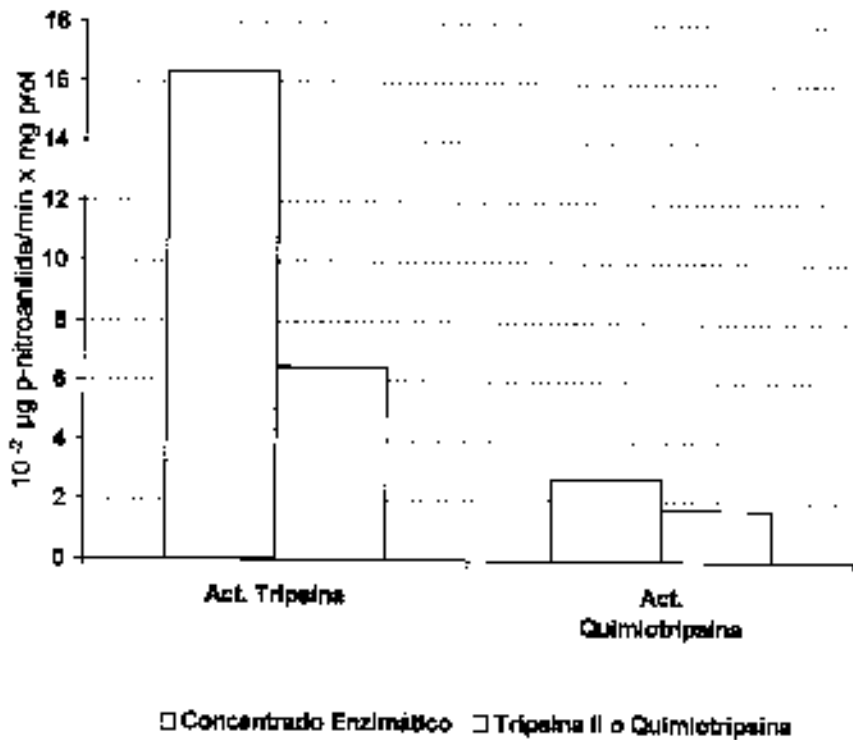


Fig 5. Comparación de las Actividades Semejantes a Tripsina y Quimiotripsina del Concentrado Enzimático con Enzimas Comerciales

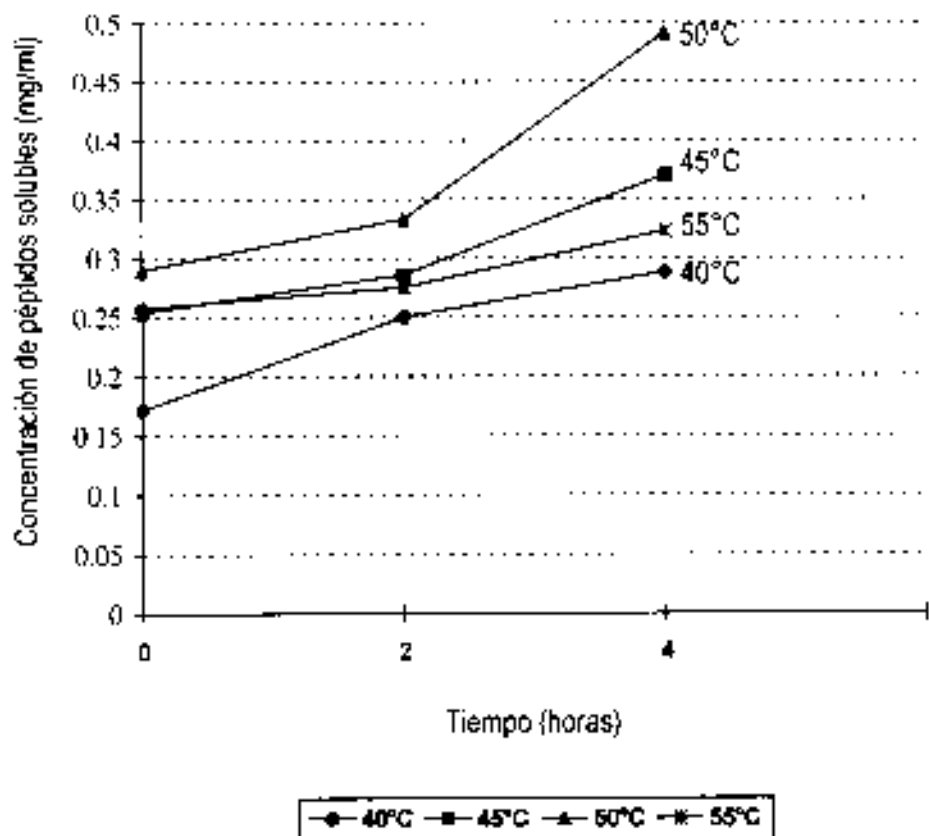


Fig 6. Efecto de la Temperatura sobre la Actividad Proteolítica del Concentrado Enzimático de Páncreas

páncreas de cerdo, son más termoestables que la tripsina de origen bovino (Mullally y cols, 1995). De hecho, la tripsina porcina se desnaturaliza parcialmente a 55°C, aunque más del 70% de su actividad se retiene después de 1 h de calentamiento a esta temperatura (Jost y cols, 1977).

Hidrólisis de Proteínas de Soya

Temperatura. Conociendo el efecto de la temperatura sobre la actividad proteolítica del concentrado enzimático, se seleccionó la de 50°C para el experimento de hidrólisis. Como se observa en la Tabla 13, el nitrógeno α -amino siguió aumentando hasta las 24 h de hidrólisis. Esto indica la estabilidad del extracto enzimático al calentamiento a 50°C, como ya se señaló antes. También coincide con el mantenimiento de activación de los zimógenos hasta las 20 h (Fig. 4).

pH. Se utilizó el pH de 8.0 para el experimento de hidrólisis por dos razones. Primero, porque el pH entre 7.8 y 8.5 es el más adecuado para las enzimas tripsina y quimiotripsina del concentrado enzimático (Kim y cols, 1996; Benyon y Bond, 1989; Novo, 1986). Segundo, porque a este pH la proteína de soya presenta muy buena solubilidad. La solubilidad del nitrógeno antes de iniciar el experimento de hidrólisis fue de un 80.4% (± 4.5) a pH 8. Rham y Jost (1979), para una harina de soya desgrasada, similar a la utilizada en este estudio, reportan un 80% de nitrógeno soluble al mismo pH. De acuerdo a los mismos autores, este porcentaje aumenta ligera pero progresivamente hasta 82% al aumentar el pH hasta 11. A partir de pH 11.3, este porcentaje comienza a decrecer.

Sustrato. La pasta de soya desgrasada es un subproducto de la extracción del aceite de soya, está disponible durante todo el año y su precio por kg a octubre de 1996 es de \$ 2.50 (pesos mex.). Su contenido de proteína fue de 46.3% (± 0.5), y el de humedad 9.5%. Estos datos se tomaron en cuenta al

Tabla 13. Grado de Hidrólisis de la Proteínas de Soya por la Acción del Concentrado Enzimático entre 0 - 24 h

Tiempo (h)	$\frac{\mu\text{g N } \alpha\text{-amino}}{\mu\text{g de proteína}} \times 100$	Grado de Hidrólisis (%)
0	1.18 (± 0.075)	0
6	1.31 (± 0.045)	13.20 (± 0.36)
12	2.02 (± 0.025)	42.78 (± 2.68)
24	3.01 (± 0.015)	ND*

* ND No determinado

considerar la concentración de sustrato (4% p/v) y la relación enzima/sustrato (4%) con las cuales se realizó la hidrólisis.

La molienda a que fue sometida la pasta de soya previa al experimento de hidrólisis, homogeneizó su tamaño de partícula de tal forma que su distribución quedó parecida a la de una harina comercial. La Tabla 14 muestra esta distribución.

Grado de hidrólisis. La acción proteolítica del concentrado proteico sobre el sustrato, se siguió por medio de la prueba de la ninhidrina. El principio de esta prueba involucra la reacción a 100° C de los grupos amino primarios con la ninhidrina, para dar color púrpura de Ruhemann (McKenzie y Murphy, 1970). La intensidad del color será proporcional a la cantidad de N α -amino presente en la muestra. El método estándar no distingue entre aminoácidos libres, polipéptidos y proteínas (Barbehenn, 1995). Por lo que en este caso, se detectó el aumento en la concentración de los grupos amino primarios.

En la Tabla 13 (segunda columna), se muestra el incremento de la relación μg de N α -amino/ μg de proteína $\times 100$. A las 6 h hubo un incremento de 11% en la cantidad de N α -amino, con respecto al inicial. A las 12 h este incremento fue del 71% y a las 24 h fue de 155%. Por otro lado, en la misma Tabla 13 se anota en la tercera columna, el grado de hidrólisis en porcentaje, calculado en función del gasto de la base NaOH, para mantener el pH en 8. A las 6 h de hidrólisis estaba en 13.2% y a las 12 h en 42.8%. El dato a las 24 h no se determinó, pues en los experimentos de hidrólisis, al retirar las alícuotas de 50 ml cambiaba la cantidad de masa proteica en reacción y esto altera el resultado de la ecuación.

La ventaja del método de la ninhidrina, es que proporciona valores absolutos, indicando el aumento real de grupos amino libres (Alder-Nissen, 1986). Por otro lado, el método propuesto por Alder-Nissen basado en el consumo de base, es independiente de la variabilidad del sustrato y su gran ventaja es el alto nivel de reproducibilidad entre lotes distintos (Novo, 1986).

Tabla 14. Distribución de Tamaño de Partícula de la Pasta de Soya Molida

Malla/ Fracción	%
Fx > 40	8.50 ± 0.82
40 > Fx > 60	15.82 ± 1.60
60 > Fx > 80	19.65 ± 2.10
80 > Fx > 100	27.48 ± 2.20
Fx < 100	28.41 ± 3.20

Ninguna de las dos técnicas da información sobre el perfil de pesos moleculares de los productos de hidrólisis. Por eso, para conocer dicho perfil, hubo que apoyarse en el proceso de ultrafiltración y en la determinación de proteína en solución.

Como el objetivo del trabajo fue la producción de un hidrolizado con alto contenido de péptidos entre 500 y 3000 Da y con la menor concentración de aminoácidos libres, no se requiere una hidrólisis exhaustiva. Así, los indicadores de hidrólisis por sí solos, no predicen el mejor tiempo de hidrólisis y se requirieron análisis adicionales para optimar las condiciones del proceso.

Ultrafiltración Fraccionada (UF) y Concentración de Proteína. Se realizó el proceso de ultrafiltración fraccionada obteniendo 4 fracciones: >10 000 Da, entre 10 000 y 3 000 Da, entre 3 000 y 500 Da y < 500 Da. El corte a 10 000 Da se hizo para acelerar el siguiente paso de UF. Por esta razón en la Tabla 15 únicamente se incluyen tres fracciones, > 3 000 Da (esta incluye la fracción >10000 Da), entre 3000 y 500 Da y < 500 Da.

Ayudados en la prueba de Lowry para determinación de proteína, se hizo el balance de masa que se presenta en dicha Tabla 15. Se observa que la fracción entre 3 000 y 500 Da (fracción de interés) aumenta desde una concentración de 6% de proteína al tiempo 0, hasta un máximo de 25.1% a las 12 h, para luego disminuir a un 21.2% a las 24 h de hidrólisis. Por otro lado, la fracción < 500 Da, presumiblemente rica en aminoácidos libres, aumenta su concentración desde un 3% al tiempo 0 hasta un máximo de 16.4% a las 24 h. Se observa que la concentración de proteína en la fracción de interés, se reduce casi un 4% entre las 12 y las 24 h. Esto va unido a un aumento de la fracción < 500 Da para el mismo periodo de tiempo (12 y 24 horas), lo cual sugiere que la fracción de interés se está degradando. Los anteriores resultados permiten señalar al tiempo 12 horas como el óptimo de hidrólisis, pues se logró incluir un 25.1% de la proteína inicial en la fracción de interés.

Tabla 15. Balance de Masa de los Productos Obtenidos por Hidrólisis y Ultrafiltración*

Fracción	Tiempo (horas)			
	0	6	12	24
Fx > 3000 Da	85.68 ± 4.00	57.70 ± 1.90	52.33 ± 0.96	51.30 ± 0.91
500 < Fx < 3000	6.0 ± 0.24	21.30 ± 1.02	25.10 ± 2.75	21.26 ± 0.52
Fx < 500 Da	3.0 ± 0.15	13.40 ± 0.55	13.00 ± 0.57	16.40 ± 0.93
Total	94.68	92.4	90.43	88.96

* Datos de Concentración de proteína en %

con un mínimo de péptidos menores de 500 Da y muy probablemente, de aminoácidos libres.

Para el grado de hidrólisis logrado a las 12 h con el CE (42.8%), un 38% de la proteína inicial está por debajo del rango de 3 000 Da. Ena y cols (1995) usando pepsina y proteínas de suero como sustrato, para un grado de hidrólisis entre 30 y 38%, lograron poner debajo de 3 000 Da de un 48% a un 58% de la proteína inicial. Para corolasa pp y proteínas de suero como sustrato, con grados de hidrólisis entre 16 y 54% lograron poner debajo de 3 000 Da de un 28 a un 54% de la proteína inicial. Por otro lado, Aubes-Duafau y cols (1995), usando pepsina y hemoglobina como sustrato, para un 13% de grado de hidrólisis lograron incluir 15% de la proteína inicial en el rango < 500 Da. Lo anterior pone en relieve la importancia de la especificidad de la enzima para ciertos enlaces peptídicos y su influencia sobre el perfil de peso molecular de los péptidos obtenidos (Lahl y Braun, 1994).

Finalmente, si colocamos el perfil de peso molecular en el tiempo 12 h obtenido en este estudio en la Tabla 9, nuestro proceso de hidrólisis podría ser clasificado como moderado.

Caracterización de la Fracción de Interés y Comparación con la Materia Prima Original

Concentración de Proteína

La fracción de interés ($500 < F_x < 3\ 000$ Da) obtenida por los procesos de: hidrólisis, ultrafiltración y liofilización es un polvo de color "amarillo paja claro". Su concentración de proteína después de estos procesos se aumentó en un 23%. Pasó del 46% que presentó la pasta de soya (materia prima) a un 69.3% (± 2.3) que presentó la fracción de interés. Según la clasificación de Roberts (1979), la pasta de soya se considera harina (< 65% de proteína) y la

fracción de interés se clasificaría como un concentrado (entre 65 - 90% de proteína).

Solubilidad de Proteína

Ya fue mencionado que la solubilidad de las proteínas de pasta de soya a pH 8 fue de 80.4% (\pm 4.5). El proceso de hidrólisis (realizado a pH 8) incrementó la solubilidad de las proteínas hidrolizadas hasta un 89.3% (\pm 3.4), como se pudo inferir a partir de las determinaciones de proteína por Lowry y microKjeldahl.

Debido a que la fracción de interés eventualmente se utilizará para elaborar una fórmula infantil o puede tener potencial para otro tipo de alimentos industrializados, también se probó su solubilidad en otras condiciones. La solubilidad de la fracción de interés en el rango de pH 6.0 - 7.5 con 2% de NaCl y sin NaCl, prácticamente se mantuvo sin cambios: 88.8% (\pm 4.3) y 87.5% (\pm 4.5) respectivamente. Fue especialmente alentador, encontrar mas de 90% de solubilidad a pH 7, que se aproxima al de las fórmulas infantiles (6.8). Bajo las mismas condiciones de experimentación, la fracción de interés, mostró una marcada superioridad sobre un aislado de soya comercial usado en fórmulas infantiles. Este aislado presentó, en nuestras determinaciones, 35.2% (\pm 7.0) de solubilidad de proteína sin adición de sal y 40.8% (\pm 2.4%) con 2% de NaCl. Hermansson (1979) informa que los aislados de proteína de soya comerciales, presentan un porcentaje de solubilidad de proteína entre 25 y 70% en el rango de pH de 6.0 a 8.0.

Además de la fracción de interés, en este estudio también nos pareció importante determinar la solubilidad de las demás fracciones obtenidas, por su posible incorporación a productos cármicos. Mas del 50% de la materia prima original, quedó por encima de los 3 000 Da. 18% de éste, entre 3 000 y 10 000 Da. Estas fracción y subfracción, presentaron un 87% de solubilidad en el

rango de pH 6.0-7.5, con o sin 2% de NaCl. Dichos resultados son muy promisorios debido a que al pH de los productos cárnicos (6.5) solo se solubiliza el 37% de las proteínas en los aislados de soya, lo cual limita su uso (Egbert, 1996). Finalmente, aunque en este estudio no se determinó capacidad emulsificante; Elizalde et al. (1996), encontraron que las proteínas de soya parcialmente hidrolizadas, se emulsifican mejor a estos pH's que la proteínas integra. Así nuestras fracciones, podrían tener como mercado al de los productos cárnicos emulsificados.

Actividad de Inhibidor de Tripsina

Los inhibidores de tripsina propios del soya, representan uno de los mayores factores responsables de bajar la calidad nutricional de sus proteínas (Liener, 1981). De ahí la importancia de destruir o inactivar estos factores durante los procesos.

La materia prima reveló $47\ 778 \pm 530$ UIT (unidades de inhibidor de tripsina) por g de proteína. Esta misma materia prima procesada por extrusión, lo cual implica altas presiones de vapor y altas temperaturas (180 - 230° F) por tiempos cortos (10 - 30 seg), mostró una reducción del 80% de la actividad inhibitoria ($9\ 610 \pm 177$ UIT/ g de proteína). Nuestra fracción de interés, tuvo una reducción de la actividad inhibitoria del 97.5%, pues presentó $1\ 186.1 \pm 9.5$ UIT/g de proteína. Por otro lado, Rackis (1981), informa que los concentrados y aislados de soya comerciales tienen 33 y 26% respectivamente, de la actividad inhibitoria de una harina de soya parcialmente tostada.

Rouhana y cols. (1996) con procesados a altas temperaturas por tiempos cortos, lograron reducir un 20% de actividad inhibitoria extra, sobre la pasteurización tradicional de leche de soya. Lo anterior implica la superioridad de la hidrólisis enzimática, sobre el calor (extrusión, pasteurización) y otros procesos, en la reducción de los niveles de actividad inhibitoria de tripsina. Debido a que los inhibidores de tripsina de la soya tienen pesos moleculares

mayores (21 y 8 kDa) que los de la fracción de interés (3 - 0.5 kDa), podría pensarse que esta última, de entrada estaría libre de actividad inhibitoria. Sin embargo, Vaintraub y Yattara (1995) hicieron un estudio de proteólisis enzimática del inhibidor de tripsina de Kunitz (ITK). Su modelo para la ruptura enzimática del ITK, permite que a pesar de la hidrólisis, exista una alta actividad inhibitoria y concluyen que una proteólisis limitada tiene un pequeño efecto sobre la actividad del ITK.

Lo anterior demuestra que el radio de inactivación proteolítica de proteínas con actividad biológica, depende de las características de proteólisis y de los productos resultantes.

Detección de Lectinas

El soya contiene una lectina lábil al calor húmedo cuando está aislada, pero que por su interacción con otros componentes del alimento, puede mantener algún grado de actividad después del procesamiento (Calderón de la Barca et al., 1994 y 1991). Aunque esta lectina no produce sola un efecto antifisiológico muy marcado, se ha demostrado que su acción combinada con inhibidores de tripsina y saponinas tiene grandes implicaciones en la nutrición (Grant et al., 1987).

La inmunodifusión pasiva en gel de agarosa de la materia prima y sus productos de hidrólisis y ultrafiltración, contra anticuerpos anti-lectina de soya, reveló banda de reacción y precipitación solo para la materia prima. En ninguno de los productos de hidrólisis (incluyendo fracción de interés) se detectó, por este método, la presencia de lectina. Lo anterior muestra que el proceso de hidrólisis no dejó epítopes suficientes en la molécula de lectina para ser reconocidos por los anticuerpos. Al menos no los suficientes para ser detectados por este método.

Por medio de la prueba de ELISA, que es mas sensible que la inmunodifusión en gel, se confirmaron estos hechos. No se detectó la lectina de soya en la fracción de interés, ni en ninguno de los productos de hidrólisis.

La prueba de aglutinación de eritrocitos (actividad hemaglutinante) dió negativo para todos los productos de hidrólisis. Aún usando eritrocitos tripsinizados, el resultado negativo se mantuvo. Esta prueba, aunque es la única de las tres que mide realmente actividad, es todavía menos sensible que las dos anteriores.

Mas que a la hidrólisis enzimática, que deja actividad parcial en algunas lectinas, el efecto del calor fue determinante, la lectina de soya resiste calor seco pero no calor húmedo (De Muelenaere, 1964). Nuestros resultados, concuerdan con los de Liener (1979) y Calderón de la Barca et al. (1991), quienes encontraron que el calor húmedo, como el del textunzado, es suficiente para inactivar entre el 96-99% de la actividad de lectina de soya. Por ello, se recomienda precaución en la inclusión de harina de soya cruda o ligeramente tostada, en formulaciones para pan y otros productos de panadería. En nuestro caso, el uso de calor húmedo y la hidrólisis enzimática garantizan la destrucción de lectinas y por ende la desaparición de actividad hemaglutinante.

Antigenicidad

Ya realizados los protocolos de inmunización y de obtención y purificación de anticuerpos anti-proteínas de la pasta de soya, se probó la actividad (título) de los mismos. El hecho de utilizar productos de hidrólisis (incluyendo Fx de interés) en las pruebas, nos permite considerar estas pruebas como preliminares de antigenicidad.

La inmunodifusión pasiva en gel de agarosa mostró una banda de precipitación de color fuerte y bien definida con la pasta de soya, otra banda un poco menos fuerte aunque bien definida con la fracción mayor a 3 000 Da de 12 h de hidrólisis. Estos anticuerpos también reconocieron, aunque debilmente

a las proteínas de la soya texturizada. Finalmente, los productos de hidrólisis de 12 h menores a 3 000 Da y el hidrolizado de 24 h (sin fraccionar), no presentaron bandas de precipitación. Los anteriores resultados indican que los anticuerpos anti-pasta de soya producidos en el conejo están inmunológicamente activos. También se concluye, que al nivel de detección de esta técnica, los productos de hidrólisis de 12 h mayores de 3 000 Da, aun presentan epitopes reconocibles por los anticuerpos, a diferencia de los péptidos menores de 3 000 Da que no fueron reconocidos.

Los resultados anteriores se confirmaron en el ensayo de manchas: positividad para las proteínas de la pasta de soya y los productos de hidrólisis de 12 h mayores de 3 000 Da, pero no para los menores de este peso molecular. Preliminarmente, nos acercamos a la confirmación de que la hidrólisis enzimática es el mejor camino para reducir antigenicidad (Boza y cols, 1994). Esta última, dependerá del tamaño de los péptidos, siendo menos antigénicos aquellos que no rebasan los 10 residuos de aminoácidos. Cordle (1994), enfatiza el hecho de que proteínas pequeñas, menores a 10 000 Da son débilmente inmunogénicas, y péptidos menores a 2 500 Da, no son inmunogénicos.

Finalmente, el potencial antigénico de las proteínas de pasta de soya y de la fracción de interés se midió con una prueba de ELISA. Esto para conocer la disminución real de la antigenicidad de la fracción de interés, considerando como el 100% la de la pasta de soya. En las placas de ELISA se cargaron las siguientes soluciones; pasta de soya como referencia (dilución 1/128) y dos veces la fracción de interés (dilución 1/128), cada fracción de interés obtenida de lotes de hidrólisis diferentes. Ambas soluciones partían de sus respectivas soluciones madre, con concentración de proteína semejante. Además se corrió un control negativo sin pasta de soya. En este primer ensayo, la antigenicidad de la fracción de interés no fue detectable y fue el menos 4 000 veces menor que la de la pasta.

La prueba se repitió cargando mas diluida la solución de pasta de soya (1/1024) y la fracción de interés mas concentrada (1/16). En este caso, tampoco fue detectable la antigenicidad de la fracción de interés y fue al menos 16000 veces menor que la de la pasta de soya que se usó como materia prima.

Halken y cols (1993), mencionan un producto (Profylac), etiquetado como hipoalergénico y basado en proteina del lactosuero bovino, hidrolizada enzimáticamente y ultrafiltrada. Contiene péptidos menores a 8 kDa de peso molecular, y su antigenicidad fue probada contra proteínas nativas del lactosuero, mostrando una reducción de la antigenicidad de 30 000 veces.

Por otro lado, Hussein et al. (1995), reporta la hidrólisis enzimática de proteínas de leche de bufalo, logrando reducir la antigenicidad en una serie de experimentos del 89 al 3% y en una segunda del 64 al 30%.

Los resultados obtenidos concuerdan con lo encontrado por Gortler y cols. (1995), quienes señalan que la hidrólisis enzimática y la ultrafiltración son la combinación de métodos mas eficiente para reducir el contenido de antígenos. Así lo probaron en fórmulas hipoalergénicas cuya fuente de proteína se sometió a estos procesos. Esto es así porque la dificultad de controlar la homogeneidad en peso molecular de los hidrolizados, se salva con el uso de membranas de ultrafiltración (Deeslie y Cheryan, 1991).

Alergenicidad

Como se esperaba, hubo niveles altos de anticuerpos en los sueros de los 5 niños alérgicos contra pasta de soya, mientras en los dos restantes no. Por el contrario, las lecturas de la placa de ELISA que contenía la fracción entre 500 y 3000 Da, fueron negativas tanto para los 5 niños alérgicos a soya, como para los 2 alérgicos a otras proteínas. Esto significa, que los anticuerpos IgE de los niños alérgicos a la soya, no reconocieron a la fracción del hidrolizado.

Aunque fueron solo cinco los sueros probados, se tienen antecedentes en el mismo laboratorio en donde se hizo este trabajo, de que entre ellos había

reacción a diferentes proteínas de la soya. Incluso uno de ellos, presentaba anticuerpos IgE específicos para una proteína menor de 20 kDa. Como se sabe, hay una diversidad de proteínas alergénicas en la soya, que van desde los 14 hasta los 70 kDa (Herian et al., 1990; Ogawa et al., 1991). Aparentemente, a ninguna le quedaron epitopes (después de hidrólisis y ultrafiltración) reconocibles por los anticuerpos IgE de los niños alérgicos a soya. Esta, no es una prueba conclusiva para inferir que el producto preparado es seguro, principalmente debido al pequeño número de sueros ensayados.

Si se obtuvieran resultados semejantes a los descritos, con mayor número de sueros, la prueba es bastante buena. En un estudio realizado por Halken et al. (1993), se les dió un hidrolizado de proteínas de leche a niños alérgicos a estas proteínas. Los autores encontraron que solo 3 de 46 presentaron anticuerpos IgE anti-hidrolizado (niveles bajos) antes de tomarlo. En ninguno de los 43 restantes se indujo la producción de IgE después de tomar el hidrolizado durante 6 meses y en los 3 iniciales, no aumentaron dichos niveles, ni se presentaron síntomas de alergia.

Aminograma

La calidad de una proteína depende en primer término de su perfil de aminoácidos. Por lo que se corrieron aminogramas para pasta de soya, como materia prima original, la fracción de interés y la fracción < 500 Da. El objetivo era determinar los cambios que la hidrólisis y la ultrafiltración hubieran provocado en la relación de aminoácidos. La fracción < 500 Da se consideró para su posible aprovechamiento, pues representa más del 10% de la proteína original. En la Tabla 16 se compara el perfil de aminoácidos de pasta de soya, fracción de interés y fracción < 500 Da. No hubo diferencias significativas ($p > 0.05$) entre la proteína nativa (pasta de soya) y la fracción de hidrolizado de interés, en cuanto a composición de aminoácidos determinada por CLAR. Por el contrario, la fracción < 500 Da presentó un perfil significativamente diferente.

Tabla 16. Perfil de Aminoácidos de Materia Prima y Fracciones de Ultrafiltración de 12 h de Hidrólisis

Aminoácidos (% proteína)	Pasta de soya	500 < Fx < 3000 Da	Fracción < 500 Da
Treonina	4.00	4.67	2.60
Fen + Tir	10.70	10.95	9.62
Metionina	1.55	1.43	0.99
Valina	5.01	5.51	2.88
Isoleucina	7.07	6.26	3.43
Leucina	7.92	8.17	5.70
Lisina	8.43	7.39	4.78
Histidina	3.36	3.53	2.11

En la Tabla 17 se compara la fracción de interés con el perfil de aminoácidos para lactantes, establecido por FAO/WHO (1991). Este se basa en la leche materna. También aparece una tercera columna, para efectos de comparación con el perfil de aminoácidos de la leche de vaca completa. En esta Tabla, distinguimos que el aminoácido limitante de la soya: metionina, sigue manifestándose así en la fracción de interés. Esto permite vislumbrar la adición de metionina a un producto hipoalergénico basado en nuestra fracción de interés. Para calcular la cantidad a adicionar, nos tendríamos que basar en el contenido de cisteína (1-2%) reportado para proteína de soya (del Valle, 1981, Bressani, 1981, Central Soya, 1993), ya que no lo determinamos. Así, tendríamos de 2.4-3.4% de aminoácidos azufrados y nos restaría añadir 0.8-1.8% de metionina, para llegar al nivel requerido por el lactante.

Por otro lado, el perfil de la fracción < 500 Da, no la hace apta para unirla a la fracción de interés, pues afectaría al balance final de aminoácidos. Con respecto a la leche de vaca entera, el perfil de aminoácidos de la fracción de interés, presenta también similitud.

Valor Nutritivo de la Proteína.

La evaluación biológica en relación al valor nutritivo de las fuentes de proteína, es un soporte básico que fundamenta la composición química expresada por el perfil de aminoácidos. La presencia y actividad de factores antifisiológicos así como de factores de la fisiología del tracto intestinal y su retención posterior a nivel corporal, son factores que pueden modificar las expectativas del solo perfil de aminoácidos.

El bioensayo con ratas sirvió para comparar la fracción de interés (concentrado de soya) con caseína como fuentes de proteína única, en dos grupos de animales. La fracción de interés fue enriquecida con metionina

Tabla 17. Perfil de Aminoácidos de Fracción de Interés Leche Humana y de Vaca

Aminoácidos (% proteína)	Perfil para el lactante ¹	500 < Fx < 3000 Da	Leche de vaca ¹
Treonina	4.3	4.67	4.4
Fen + Tir	7.2	10.95	10.2
Met + Cis	4.2	1.43*	3.3
Valina	5.5	5.51	6.4
Isoleucina	4.6	6.26	4.7
Leucina	9.3	8.17	9.5
Lisina	6.6	7.39	7.8
Histidina	2.6	3.53	2.7
Triptofano	1.7	ND	1.4

¹ De acuerdo a FAO/WHO (1991)

* Solo metionina

ND = No determinado

comercial, hasta igualar su concentración con el requerimiento para el lactante (FAO/WHO, 1991). La cantidad añadida (0.47%), se determinó considerando que la fracción ensayada contenía la misma proporción de cisteína reportada para la pasta de soya. Esto porque se considera la posibilidad de utilizar el concentrado en fórmulas infantiles hipoalergénicas.

La Tabla 18 compara los resultados de valor biológico, digestibilidad y NPU entre ambos grupos. Para valor biológico y NPU no se encontraron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre caseína y la fracción de interés obtenida de la soya. La media de digestibilidad de la fracción de interés (93.7%), fue ligeramente menor a la media de caseína (95.9%). Se sabe que las medias de digestibilidad de hidrolizados de proteínas lácteas, son superiores a las de sus respectivas fuentes originales de proteína (Boza et al., 1994). Aunque en este estudio, no se comparó el hidrolizado con la fuente original, sino con caseína. Ahora, que si comparamos la digestibilidad obtenida para la fracción en estudio, con la que han encontrado otros autores para pasta de soya, el valor de la primera es mayor que la de la pasta. De acuerdo a Liener (1980), el rango de digestibilidad de la harina de soya desgrasada, es de 88-92% contra un 93.7% que encontramos nosotros en la fracción

Uno de los posibles factores para explicar la digestibilidad diferente, podría ser la presencia de fibra, la cual no determinamos y añadimos a priori 1% a la dieta de experimentación. Esta explicación es poco probable, porque normalmente los concentrados de soya contienen entre 3-5% de fibra y nuestra fracción, no puede presentar más, sino menos, debido a la ultrafiltración.

La digestibilidad del producto y su biodisponibilidad de lisina pudieron haberse afectado por la descomposición de cisteína debida al tratamiento alcalino y al calentamiento. Aunque las consecuencias nutricionales serían pequeñas, debido al exceso de lisina que contiene el producto (Liener, 1981).

Tabla 18. Comparación de Calidad de Proteína entre Caseína y Fracción de Interés

Análisis	Caseína	Fracción de Interés
Valor biológico (%)	65.6 ^a	63.6 ^b
Digestibilidad (%)	95.9 ^b	93.7 ^c
NPU (%)	63.4 ^d	59.6 ^e

Diferentes superíndices indican diferencias significativas a $p=0.05$

CONCLUSIONES

Se obtuvo un concentrado enzimático de páncreas de cerdo por extracción ácida y precipitación con sales de amonio al 40% de saturación. El tiempo de activación de los zimógenos en el proceso de obtención, se redujo de las 20 a las 3 h, con la adición de tripsina exógena. El concentrado enzimático liofilizado presentó muy buena concentración de proteína (90%), y actividad semejante a tripsina y quimiotripsina superior a dos concentrados enzimáticos comerciales. Además, su termoestabilidad a 50°C fue comprobada por la actividad proteolítica desarrollada hasta por 24 h.

El experimento de hidrólisis rindió un 25% de la proteína inicial en la pasta de soya con tamaño entre 500 y 3000 Da y bajo en aminoácidos libres. Esta fracción del 25% pudo recuperarse por ultrafiltración y liofilización, para obtener un concentrado de soya de 69% de proteína, con una solubilidad de nitrógeno del 89%, superior al 80% observado en la materia prima.

La hidrólisis de las proteínas de soya permitió que factores antifisiológicos como inhibidores de tripsina y hemaglutininas prácticamente desaparecieran, de la fracción de interés. La actividad residual de inhibidor de tripsina bajó a niveles de 2.5% y las lectinas no fueron detectables por un método tan fino como es la prueba de ELISA.

Así tampoco, la antigenicidad en la fracción de interés fue detectable por varias técnicas que incluyen también la prueba de ELISA. De acuerdo a varios autores (Cordle, 1994; Leary, 1992; Kleinman, 1992), este tipo de resultados negativos se consideran excelentes predictores de hipoalergenicidad. Además, la prueba de alergenicidad, aunque con sueros de solo cinco sujetos, confirmó dicha característica de hipoalergenicidad.

La hidrólisis enzimática inducida en pasta de soya, no promovió cambios en el patrón de aminoácidos de la fracción de interés, con respecto a la composición de aminoácidos de la pasta de soya. El hecho de no incluir la

fracción < 500 Da en el concentrado final, previene desbalancear la composición de aminoácidos indispensables y remover aminoácidos libres que pueden aumentar la osmolaridad de la fórmula.

Finalmente, el balance de nitrógeno reveló que el hidrolizado de soya es una buena fuente de proteína, comparada a caseína con respecto a digestibilidad, valor biológico y utilización neta de proteína (NPU).

Todo lo anterior, nos permite concluir que la fracción de interés obtenida por hidrólisis enzimática de proteínas de soya, puede ser una buena alternativa a la de las de leche de vaca, utilizadas en fórmulas infantiles hipoalergénicas. Esto desde el punto de vista nutricional, inmunológico y muy probablemente en el económico.

BIBLIOGRAFÍA

A.A.C.C. 1976. *Approved Methods of the American Association of Cereal Chemists*. Vol. 2. St. Paul Minnesota, EUA.

Adler-Nissen J. 1986. Some Fundamental Aspects of Food Protein Hydrolysis. A Review of Food Protein Hydrolysis. *Methods in Food Protein Hydrolysis*. En: *Enzymic Hydrolysis of Food Proteins*. Elsevier Applied Science Publishers, Londres, Inglaterra. pp 9-25,57-109. 110-131.

Allen AK, Neuberger A, Sharon N. 1973. The purification, composition and specificity of wheat germ agglutinin. *Biochem J*. 131:155-162.

Anderson RL y Wolf WJ. 1995. Compositional Changes in Tripsin Inhibitors, Phytic Acid, Saponins, and Isoflavones Related to Soybean Processing. *J. Nutr*. 125:5815-5885.

A.O.A.C. 1984. *Official Methods of Analysis*. S. Williams Ed. Association of Official Analytical Chemists. USA pp 156. 879.

A.O.A.C. 1990. *Official Methods of Analysis*. S. Williams Ed. Association of Official Analytical Chemists. USA pp .

Aubes-Dufau. I, Seris, J. y Combes, D. 1995. Production of Peptic Hemoglobin Hydrolysates: Bitterness Demonstration and Characterization. *J. Agric. Food. Chem*. 43:1982-1988.

Badui DS. 1981. *Química de los Alimentos*. Ed. Alhambra. España. pag 107.

Bautista J, Hernandez-Pinzon I, Alaiz M, Parrado J y Millán F. 1996. Low Molecular Weight Sunflower Protein Hydrolysate with Low Concentration in Aromatic Aminoacid. *J Agric. Food Chem*. 44:967-971.

Barbehenn R. 1995. Measurement of Protein in Whole Plant Samples with Ninhydrin. *J. Sci. Food Agric*. 69:353-359.

Bolaños AV. 1996. *Análisis de la Relación Caseína:Proteína Sérica de los Productos Utilizados en la Lactancia*. Tesis de Licenciatura. Universidad de Sonora- C.I.A.D. Hermosillo, Son.

Boza JJ, Jiménez J, Martínez O, Suárez M y Gil A. 1994. Nutritional Value and Antigenicity of Two Milk Protein Hydrolysates in Rats and Guinea Pigs. *J Nutr.* 124:1978-1986.

Boza JJ, Jiménez J, Baro L, Martínez O, Suárez M y Gil A. 1996. Effects of Native and Hydrolyzed whey Protein on Intestinal Repair of Severely Starved Rats at Weaning. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutrition.* 22:186-193.

Bressani R. 1981. The Role of Soybeans in Food Systems. *JAOCS* 58:392-400.

Burks W, Williams L, Connaughton C, Cockrell G, O'Brien T y Helm R. 1992. Identification and Characterization of a second Major Peanut Allergen, Ara II, with use of the sera of Patients with Atopic Dermatitis and Positive Peanut Challenge. *J. Allergy Clin. Immunol.* 90:962-969.

Businco L, Bruno G, Giampietro PG, Cantani A. 1992. Allergenicity and Nutritional Adequacy of Soy Protein Formulas. *J. Pediatr.* 121:21-28.

Calderón de la Barca AM, Vázquez-Moreno L y Robles M. 1991. Active Soybean Lectin in Foods: Isolation and Quantitation. *Food Chem.* 39:321-327.

Calderón de la Barca AM, Jara-Marini ME y Vázquez-Moreno L. 1994. Haptenic Carbohydrates Affect the Thermal Denaturation of Soybean Lectin. *J. Food Biochem.* 17:295-302.

Calderón de la Barca AM, Frisby AL y Stone H. 1995. Factores que influyen en el desarrollo de Alergias Alimentarias en Infantes de Hermosillo, Son. II Reunión de Investigación en Salud en el Estado de Sonora. Hermosillo, Son.

Calderón de la Barca AM, Bolaños A, Aguilar A y Román R. 1995. Composición Proteica de los Productos Utilizados en la Lactancia. VII Jornadas Conmemorativas Científicas y Culturales del Centro Médico Nacional del Noroeste. Cd. Obregón. Son.

Campbell N, Shih F, Hamada J y Marshall W. 1996. Effect of Limited Proteolysis on the Enzymatic Phosphorylation of Soy Protein. *J Agric Food Chem.* 44:759-762.

Cantani A. 1993. Alergia Alimenticia: Adecuación Nutricional y Alergenicidad de las Fórmulas Hipoalergénicas. *An. Esp. Pediatr.* 38:283-290.

Carrol K y Kurowska E. 1995. Soy Consumption and Cholesterol Reduction: Review of Animal and Human Studies. *J. Nutr.* 125:594-597.

Central Soya 1993. The Protein Book. A guide to Soya Proteins. Chemutgy Division.

Chandra, R. K. y Prasad. C. 1994. Alergias Alimentarias Diagnóstico y estrategias de prevención. *Cuadernos de Nutrición.* 17:21-28.

Codex Alimentarius /FAO Commission. 1978. Report of the 12th Session. Alinorm 78:41 Roma, Italia.

Cordle CT. 1994. Control of Food Allergies using Protein Hydrolysates. *Food Technol.* 48:72-76.

Deeslie WD y Cheryan M. 1991. Fractionation of Soy Protein Hydrolysates Using Ultrafiltration Membranes. *J. Food Sci.* 57:411-413

De Muelenaere HJ. 1964. Effect of Heat Treatment on Hemagglutining Activity of Legumes. *Nature* 201:1029-1030.

Del Valle F. 1981. Nutritional Qualities of Soya Protein as Affected by Processing. *JAACS.* 58:419-429.

Desnuelle P y Rovey M. 1961. The Protein of the Exocrine Pancreas. *Adv. Protein Chem.* 16:139-195.

Egbert, R. 1996. Productos de Proteína de Soya y sus Usos en Sistemas de Carne Procesada. *Soya Noticias.* 245:1-4

Elizalde B, Bartholomai G y Pilosof A. 1996. The Effect of pH on the Relationship Between Hydrophilic/Lipophilic Characteristics and Emulsification Properties of Soy Proteins. *Lebensn.-Wiss. Technol* 29:334-339.

Ena JM, Van Berestein E, Robben A y Schmidt D. 1995. Whey Protein Antigenicity Reduction by Fungal Proteinases and Pepsin/Pancreatin Combination. *J. Food Sci.* 60:104-110.

Erickson M, Gordon D y Anglemier A. 1983. Proteolytic Activity in the Sarcoplasmic Fluids of Parasitized Pacific Whiting (*Merluccius productus*) and Unparasitized True Cod (*Gadus macrocephalus*). *J Food Sci.* 48:1315-1319.

Erlanger, B. Kokowsky, N. Y Cohen. W. 1961. The Preparation and Properties of Two New Chromogenic Substrates Arch. Biochem Biophys. 95:271.

FAO/WHO. Report. 1991. Protein Quality Evaluation.

Fomon SJ y Ziegler EE. 1979. Soy Protein Isolates in Infant Feeding in Soy Protein and Human Nutrition. De. Wilche. H. Hopkins, D., and Waggle. D , Academic Press. New York. pp 79-81.

Friedman M. 1996. Nutrition Value of Proteins form Different Food Source. A Review. J. Agric. Food Chem. 44:6-29.

Fnsby Urrea AL. 1996. Factores que influyen en el desarrollo de alergias alimentarias en infantes de Hermosillo. Son. Tesis de Maestria. CIAD. Hermosillo, Son.

Frokjaer S. 1994. Use of Hydrolysates for protein Supplementation. Food Technol. 48: 86-88.

Fukushima D. 1994 Recent Progress on Biotechnology of Soybean Proteins and Soybeans Protein Food Products. Food Biotech. 8:83-135.

Giampietro PG, Ragno V, Daniele S, Cantani A, Ferrara M, Businco L. 1992. Soy Hypersensitivity in Children with Food Allergy. Ann. Allergy. 69:143-146.

Ge SJ y Zhang LX. 1993. Predigestion of Soybean Proteins with Immobilized Trypsin for Infant Formula. Applied Biochem. Biotech. 43:199-209.

Gortler I, Urbanek R y Forster J. 1995. Characterization of Antigens and Allergens in Hypo-allergenic Infant Formulae. Eur. J. Pediatr. 154:289-294

Grant G, Watt WB, Stewart JC & Pusztai A. 1987. Effects of Dietary Soybean (*Glycine max*) Lectin and Trypsin Inhibitors upon the Pancreas of Rats. Med. Sci. Res. 15:1197-1198.

Independiente EI. 1996. Inicia la UNISON taller sobre refinamiento de aceites vegetales. Año 3 No 906. Sección D. Pag 6. Hermosillo. Son.

Halken S, Host A, Hansen L y Osterballe O. 1993. Safety of a New, Ultrafiltrated whey Hydrolysate Formula in Children wiht Cow Milk Allergy: A Clinical Investigation. Pediatr. Allergy Immunol. 4:53-59.

Harris EL. 1989. Concentration of the Extract. En: *Protein Purification Methods*. Harris EL, Angal S (eds.) IRL Press. Oxford, Inglaterra. pp 154-157.

Harris R y Karmas E. 1977. Effects of Refining operations on Legumes. En: *Nutritional Evaluation of Food Processing*. Harris R y Karmas E. (eds.) The Avi. Publishing Company. Connecticut. pp 158-176

Hayakawa S y Nakai S. 1985. Relationships of Hydrophobicity and net Charge to the Solubility of Milk and Soy Proteins. *J Food Sci.* 50:486-491.

Heffle S L. 1995. Immunoassay Fundamentals. *Food Technol.* 49:102-107.

Heffle S. 1996. The Chemistry and Biology of Food Allergens. *Food Technol.* 50:86-91.

Herian M, Taylor S y Bush, R. 1990. Identification of Soybean Allergens by Immunoblotting with Sera from Soy-Allergic Adults. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 92:193-198.

Hermansson AM. 1979. Methods of Studying Functional Characteristics of Vegetable Proteins. *J. Am. Oil Chem. Soc* 56: 272-279.

Hill DH, Ford RP, Shelton MJ y Hosking CS. 1984. Study of 100 infants and Young Children with Cow's Milk Allergy. *Clin. Rev. Allergy.* 2:125-142.

Hussein S, Gelencser E y Hajos GY. 1995. Reduction of Allergenicity and Increasing the Biological Value of Buffalos Milk Proteins by Enzymatic Modification. *J. Food Biochem.* 19:239-252.

Hutchinson J. 1979. The Status of F.A.O. and Codex Alimentarius Developments on Vegetable Proteins. *J.A O C.S* 58:227-229.

Ikeda K, Matsuda Y, Katsumaru A, Teranishi M, Yamamoto T y Kishida M. 1995 Factors Affecting Protein Digestibility in Soybean Foods. *Cereal Chem* 72:401-405.

Jost R, Monti JC y Pahud JJ. 1977. Partial Enzymatic Hidrolysis of whey Protein by Trypsin. *J. Dairy Sci.* 60:1387-1393.

Jost R, Monti JC y Pahud JJ. 1987. Whey Protein Allergenicity and its Reduction by Technological Means. *Food Technol.* 41:118-121.

Jurd RD y Bøg-Hansen TC. 1990. Production of Polyvalent Antibodies for Immunoelectrophoresis. En: *Gel Electrophoresis of Proteins A Practical Approach*. Ed. Hames, B. D. y Rickwood, D. IRL Press. Oxford, England. pp 366-376.

Kabat. 1961. *Kabat and Meyer's Experimental Immunochemistry*. Segunda Edición. De. Carlos C. Thomas. Springfield ILL.

Kennedy, A. 1995. The Evidence for Soybean Products as Cancer Preventive Agents *J. Nutr.* 125:733-743

Kim S, Park P y Rhee K. 1990. Functional Properties of Proteolytic Enzyme Modified Soy Protein Isolate *J Agric. Food. Chem.* 38:651-656.

Kinsella JE. 1979. Functional Properties of Soy Proteins. *J.A.O.C.S.* 16:242-256.

Kleinman RE. 1992. Cow Milk Allergy in Infancy and Hypoallergenic Formulas. *J Pediatr.* 121:S116-S121.

Lahl W y Braun S. 1994. Enzymatic Production of Protein Hydrolysates to Food Use *Food Technol.* 48:68-71

Lalles JP, Peltre G. 1996. Biochemical Features of Grain Legume Allergens in Human and Animals *Nutr Rev.* 54:101-107.

Leary HL. 1992. Nonclinical Testing of Formulas Containing Hydrolyzed Milk Protein. *J Pediatr* 121:S42-S46.

Lebenthal E. y Leung Y. 1987. Development Changes of the Gastrointestinal Tract. En *Feeding the Sick Infant*. L Stern, Ed. Raven Press. New York. pp 1-25

Lehrer S, Homer W, y Reese G. 1996. Why are Some Proteins Allergenic?. Implications for Biotechnology. *Crit. Rev Food Sci. Nutr.* 36(6):553-564.

Lehninger A. 1993. Las Proteínas y sus Funciones Biológicas. Los Aminoácidos Sulfuros de las Proteínas. En *Bioquímica*. Segunda Edición. Editorial Omega. Barcelona, España. pp 59-95.

Liener IE. 1979. Significance for Humans of Biological Active Factors in Soybean and other Food Legumes. *JAOC.S.* 56:121-129.

Liener IE. 1980. Nutritional Value of Food Protein Products. En: Soybean: Chemistry and Technology. Vol 1 Proteins. A Smith y S Circle, Eds AVI Publishing. Westport, Connecticut. pp 203-277.

Liener IE. 1981. Factors Affecting the Nutritional Quality of Soya Products. J.A.O.C.S. 58:406-415.

Liener IE. 1994. Implication of Antinutritional Components in Soybean Foods. Cri. Rev. Food Sci. Nutr. 34:31.

Loffler A. 1986. Proteolytic Enzymes: Sources and Applications. Food Technol. 40: 63-70.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-275.

Lusas EW y Riaz MN. 1995. Soy Protein Products: Processing and Use. J. Nutr. 125:573S-5805S.

Mahmoud M. 1994. Physicochemical and Functional Properties of Protein Hydrolysates in Nutritional Products. Food Technol. 48: 89-94.

Mahmoud MI, Malone WT y Cordle CT. 1992. Enzymatic Hydrolysis of Casein: Effect of Degree of Hydrolysis on Antinigenicity and Physical Properties. J. Food Sci. 57:1223-1229.

McKenzie HY, Murphy H. 1970. General Methods and Elemental Analysis. En: Milk Proteins Chemistry and Molecular Biology. HA, McKenzie, Ed. Academic Press. New York, E.U.A. pp. 150-161.

Messina M y Barnes S. 1991. The Role of Soy Products in Reducing Risk of Cancer. J. N. Cancer Inst. 83:541-546.

Messina M. 1995. Modern Applications for an Ancient Bean: Soybeans and the Prevention and Treatment of Chronic Disease. J. Nutr. 125:267-269.

Milla PJ. 1991. The Clinical use of Protein Hydrolysates and Soya Formulae. Eur. J. Clin. Nutr. 45:23-28.

Miller SA y Chopra JG. 1984. Problems with Human Milk and Infant Formulas. Pediatrics Suppl. 74:839.

Muilally MM, O'Callaghan DM, Fitzgerald RJ, Donnelly WJ y Dalton JP. 1995. Zymogen Activation in Pancreatic Endoproteolytic Preparations and

Influence on some whey Protein Hydrolysate Characteristics. *J. Food Sci.* 60:227-233.

Muñoz-Furlong A. 1996 The Basic of Food Allergies. *Cereal Foods World.* 41:71-72.

Nordlee J y Taylor S. 1995. Immunological Analysis of Food Allergens and Other Food Proteins. *Food Technol.* 49:129-132.

Nordlee J, Taylor S, Townsend J, Thomas L, Bush R. 1996. Identification of a Brazil-Nut Allergen in Transgenic Soybeans. *N. Engl. J. Med.* 334: 688-692.

NOVO. 1986. Enzyme Classes. *Enzyme Techniques*. En: *Novo Handbook of Practical Biotechnology*. Segunda Edición. Boyce CO, Ed. Bagsvaerd, Dinamarca. pp 63-100, 101-124.

Ogawa T, Bando N, Tusuji H, Okajima H, Nishikawa K, y Sasaoka K. 1991. Investigation of the IgE-Binding Proteins in Soybeans by Immunoblotting with the Sera of the Soybean-Sensitive Patients with Atopic Dermatitis. *J. Nutr. Sci. Vitaminol* 35:555-566.

Ouchterlony O and Nilsson LA. 1975. Immunodiffusion and immunoelectrophoresis. In *Handbook of Experimental Immunology*. Weir DM Ed. Blackwell Scientific Publications. Edinburgh, Scotland.

Pahud J, Monti J y Jost R. 1985 Allergenicity of whey Protein: Its Modification by Tryptic *in vitro* Hydrolysis of the Protein. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 4:408-413.

Parrado J, Millán F, Hernández-Pinzon I, Bautista J y Machado A. 1993. Characterization of Enzymatic Sunflower Protein Hydrolysates. *J. Agric. Food Chem* 41:1521-1525.

Plumb G, Clare Mills E, Talton M, Christopher C, Dursel M, Lambert N y Morgan M. 1994. Effect of Thermal and Proteolytic Processing on Glycinin, The 11s Globulin of Soy (*Glycine Max*): A Study Utilizing Monoclonal and Polyclonal Antibodies. *J. Agric. Food Chem.* 42:834-840.

Powrie W. 1977. Chemistry of Egg and Egg Products. En: *Egg Science and Technology*. W Stadelman y O Cotterill, Eds. AVI Publishing. Westport. Connecticut pp 65-91.

Rackis JJ. 1980. Biological Active Components. En: Soybean. Chemistry and Tecnology. Vol. 1 Proteins. A Smith, S Circle, EDs. AVI Publishing Westport, Connecticut. pp 158-202.

Rackis JJ. 1981. Flatulence Caused by Soya and its Control Through Processing. J.A.O.C.S. 58:503-510.

Restani P, Velona T, Pfebani A, Ugazio A, Polesi E, Muraro A, Galli G. 1995. Evaluation by SDS-PAGE and immunoblotting of residual antigenicity in hydrolyzed protein formulas Clin. Exp. Allergy. 25:651-658.

Reseland J, Holm H, Jacobsen M, Jennsen T y Hanssen L. 1996. Proteinase Inhibitors Induce Selective Stimulation of Humas Trypsin and Chymotrypsin Secretion. J. Nutr. 126:634-642.

Rham O y Jost T. 1979. Phytate-Protein Interactions in Soybean Extracts and Low-Phytate Soy Protein Products. J. Food Sci. 44:596-600.

Rouhana A, Adler-Nissen J, Cogan U y Frøkiaer H. 1996. Heat Inactivation Kinetics of Trypsin Inhibitors During High Temperature Short Time Processing of Soymilk. J. Food Sci. 61:265-269.

Roberts LH. 1979. Vegetable Protein Legislation. an Industry Perspective. J.A.O.C.S. 58:201-205.

Rugo E, Wahl R y Whan U. 1992. How Allergenic are Hypoallergenic Infant Formulae. Clin. Exp. Allergy. 22:635-639.

Sarett HP. 1981 The modern Infant Formula. En. Infant and Child Feeding. Bond T, Filer L, Leveille G, Thompson A, Well W. Eds. Academic Press. New York. pp 99-117.

Savage WP, Wei LS, Sutherland JW y Schmidt SJ. 1995 Biologically Active Components Inactivation and Protein Insolubilization During Heat Processing of Soybeans. J. Food Sci. 60:164-168.

Schmidt M, Taylor SY, Nordlee J. 1994. Use of Hydrolysate-Based Products in Special Medical Diets. Food Technol. 48: 77-81.

Schwimmer S. 1995. Fifty-one Years of Food Related Enzyme Research - A Review. J. Food Biochem. 19:1-25.

Simmons FJ. 1991. *Food in China. A Cultural and Historical Inquiry*. Crc. Press. Inc., Boca Raton. Fl.

Statgrafic. 1989. STSC, Inc. EUA.

Taylor, S. 1992. Chemistry and Detección of Food Allergens. *Food Technol.* 46:146-152.

Taylor S y Nordlee J. 1996. Detection of Food Allergens. *Food Technol.* 50:231-238.

Torun B, Viteri F y Young V. 1981. Nutritional Role of Soya Protein for Humans. *J.A.O.C.S.* 58:400-406.

Tukur H, Lalles JP, Plumb G, Clare Mills EN, Morgan M, Toullec R. 1996. Investigation of the Relationship between *in vitro* ELISA Measures of Immunoreactive Soy Globulins and *in vivo* Effects of Soy Products. *J. Agric. Food Chem.* 44:2155-2161.

Vaintraub IA y Yattara HB. 1995. Proteolysis of Kunitz Soybean Trypsin Inhibitor. Influence on its Activity. *J. Agric. Food Chem.* 43:862-866.

Vanberesteijn E, Meijer RJGM, Schmidt DG. 1995. Residual Antigenicity of Hypoallergenic Infant Formulas and the Occurrence of Milk-Specific IgE Antibodies in Patients with Clinical Allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 96:365-374.

Vazquez Ortiz F, Caire G, Higuera Y y Hernández G. 1995. High Performance Liquid Chromatographic Determination of Free Amino Acids in Shrimp. *J Liquid Chromatogr.* 18:2059-2068.

Walker A y Hanson D. 1985. The Mechanisms of Food Allergic Reactions and Local Antibody Production in Infancy. En: *Nutrition for Special Needs in Infancy*, ed. Fima Lifshitz. Marcel Dekker Inc. New York. pp 75-97.

Wijeratne W. 1995. Propiedades Funcionales de las Proteínas de Soya en un Sistema de Alimentos. *Soya Noticias*. Jul-Sept. 13-19.

Wolf W y Neisen T. 1996. Partial Purification and Characterization of the 15s Globulin of Soybean, a Dimer of Glycinin. *J. Agric Food Chem.* 44:785-791.

Xanthou M. 1987. Immunology of Breast Milk. En: *Feeding the Sick Infant*, ed. Leo Stern. Raven Press. New York. pp 101.119.