

LA UTILIZACIÓN DE POLISACARIDASAS MEJORA LA ACCESIBILIDAD DE LOS ENZIMAS PROTEOLÍTICOS SOBRE LA TORTA DE SOJA.

I. Ouhida, D.Martinez-Puig, J.F. Pérez, R. Sala y J.Gasa
Departament de Ciència Animal i dels Aliments, Facultat de Veterinària
Universitat Autònoma de Barcelona

INTRODUCCION

Las recientes limitaciones establecidas al uso de ingredientes de origen animal como suplementos proteicos en alimentación animal, impulsa si cabe un mayor interés por conocer y mejorar ingredientes proteicos de origen vegetal. Entre ellos destaca por su mayor utilización la torta de soja. En particular, la harina de soja es un subproducto de la extracción de aceite con un contenido en proteína bruta elevado (alrededor del 42-52%), que le colocan como uno de los subproductos agrícolas más valiosos y apreciados. Sin embargo, la presencia de ciertos α -galactósidos puede reducir su valor nutritivo en animales monogástricos, sobre todo en aves (Leske et al., 1993). Como consecuencia, la digestibilidad de la materia seca y energía de la torta de soja es relativamente reducida con respecto a los cereales y presenta expectativas razonables de mejorar su valor nutritivo. Entre estas posibles mejoras destacaría el 10 - 15% de los Aas, considerados no digeribles por el NRC, (1994).

Junto a la presencia de α -galactósidos indigeribles (en torno al 5% de rafinosa + estaquiosa), la presencia de niveles apreciables de polisacáridos no amiláceos indigeribles solubles ó insolubles ($\pm 20\%$ PNA) puede limitar la accesibilidad de los enzimas a la proteína.

La disponibilidad reciente de numerosos complejos enzimáticos, como hemicelulasas, celulasas, pectinasas, xilanasas y proteasas podría mejorar la utilización energética y proteica de la torta de soja. El objetivo del presente trabajo ha sido estudiar la accesibilidad *in vitro* de diferentes enzimas con actividad mayoritariamente carbohidrolítica o proteolítica sobre la torta de soja extractada y tratada térmicamente con diferentes grados de intensidad.

MATERIALES Y METODOS

El presente estudio contempla el efecto de asociar enzimas de actividad carbohidrolasa (Cellulase¹; Pectinasa¹; Xilanasas¹) con una Proteasa sobre una muestra de soja extractada no tostada (NT) o tostada a temperaturas de 85°C durante 25 minutos (T-85) o 125°C durante 45 minutos (T-125).

Las muestras fueron separadas en fracciones solubles e insolubles mediante un método propuesto por Huisman et al., (1998). Brevemente, 200g de cada muestra fueron disueltas en 0.8L de agua destilada durante 2h a temperatura ambiente seguido de una ultra-centrifugación a 11000 x g durante 30 minutos. Con los residuos recuperados, el proceso se repitió 4 veces. Los extractos (WS) y los residuos (WU) fueron liofilizados y utilizados como sustratos de incubación enzimática.

La incubación *in vitro* de los enzimas se realizó en tubos Kimax (2mL) conteniendo 20 mg-sustrato/ mL de buffer (0.05 M acetato sódico, pH 5.0) a una temperatura constante de 40°C durante 12 h. Al final de la incubación, los enzimas fueron inactivados por ebullición (100°C durante 10 minutos) y el sobrenadante fue extraído mediante centrifugación (4000 x g durante 5 minutos).¹

¹ Biocellulase A Con; Biopectinase NKP; Bioxylanase 10P de la empresa Lodens Croklaan, Holanda

La actividad carbohidrolítica se determinó mediante la medida del porcentaje de liberación de monosacáridos (analizados por cromatografía de gases) del total presente en los sustratos incubados. La actividad proteolítica se determinó mediante el análisis de la cantidad de aminoácidos liberados siguiendo el método ACUTAC de Waters.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de fraccionamiento de las muestras mediante la extracción con agua y la composición de sus fracciones (Tabla 1) reflejan que el tostado de la soja redujo la solubilidad de la proteína (59% vs 44% y 36%, respectivamente a 0, 85 y 125°C). Similares descensos se observaron en la solubilidad de la fracción de carbohidratos (41 vs 28 y 22%).

Las diferencias observadas en solubilidad reflejan cambios estructurales de la proteína (desnaturalización) "per se" y de su entramado con los carbohidratos. De hecho, durante la maduración de las células de los cotiledones del grano de soja, el núcleo, las mitocondrias y el retículo endoplasmático son desplazados por "formaciones proteicas" (2-20 μ \varnothing) rodeadas de numerosas "vesículas lipídicas" (0.2-0.5 μ \varnothing). Tras el proceso de desengrasado estas vesículas acaban desapareciendo, obteniéndose fragmentos de cotiledón formados por células compuestas por un entramado de paredes, comúnmente polisacáridos no amiláceos (PNA: celulosa, hemicelulosas y pectinas), membranas y citoplasma, cuyo contenido en proteína es muy elevado.

Los contenidos en α -galactósidos (rafinosa+estaquiosa) analizados en las fracciones solubles reflejaron una elevada tendencia a solubilizarse en agua (71 vs 41 y 50%, respectivamente a 0, 85 y 125°). Sin embargo, su extracción no es completa como ha sido previamente descrito por Leske et al., (1993).

Tabla 1: fracciones (%MS⁻¹ de la torta de soja) solubles (WS) e insolubles (WU) en agua y composición (%MS-1) en proteína y carbohidratos.

	Soja original	Soja NT		Soja T-85		Soja T-125	
		WS	WU	WS	WU	WS	WU
Fracciones (%)	100	56	44	39	61	32	68
Total aminoácidos (%)	49.4	nd	47.0	nd	36.8	nd	40.4
Total monosacáridos (%)	24.5	17.9	37.5	17.9	35.4	17.3	36.1
α -galactósidos (%)							
rafinosa	1.40	1.78	nd	1.66	nd	1.74	nd
estaquiosa	3.95	5.02	nd	3.94	nd	6.64	nd

En la tabla 2 se presentan los resultados relativos a la incorporación de los diferentes enzimas sobre el sustrato soluble en agua (WS-T-85), determinados como concentración de α -galactósidos (mg/mL) en los sobrenadante después de la incubación de 40mg sustrato/mL de buffer. La incubación con proteasa incrementó las concentraciones de rafinosa y estaquiosa en relación al blanco (sin enzimas), reflejando un enlace "proteína- α -galactósidos" que se rompe con una actividad proteolítica simple. La incubación con pectinasa y celulasa, redujo sustancialmente los contenidos en α -galactósidos, resultados que no fueron observados con la xilanasas. La combinación de cada uno de ellos con proteasa, no incrementó el descenso de los α -galactósidos ya mostrado por los diferentes enzimas carbohidrolasas, lo que sugiere la presencia de una cierta actividad proteasa en pectinasa y celulasa.

En la tabla 3 se presentan los resultados relativos al efecto de los diferentes enzimas sobre los sustratos insolubles en agua, medido como porcentaje de monosacáridos liberados y Aas libres en el sobrenadante.

Tabla 2: Concentración en α -galactósidos del sobrenadante (mg/ml) despues de la incubación de 40mg/ml de soja T-85° con proteasa y/o diferentes carbohidrolasas.

	Raf	Estaq	Raf	Estaq	Raf	Estaq
Blanco	0.37	1.67	-	-	-	-
Proteasa	0.77	2.65	-	-	-	-
Carbohidrolasa "i"						
	Pectinasa		Celulasa		Xilanasa	
Carbohidrolasa "i"	0.12	1.09	0.50	0.74	0.51	2.22
Carbohidrolasa "i" + Proteasa	0.58	0.83	0.47	1.28	0.45	1.91

En relación a la actividad carbohidrolasa, la pectinasa y la celulasa presentaron porcentajes de monosacáridos liberados superiores a la xilanasa y proteasa por sí solas. La incorporación simultánea de proteasa con carbohidrolasas manifestó una elevada respuesta claramente sinérgica con la pectinasa y la celulasa, aunque no con la xilanasa, lo que demuestra la estrecha relación entre los carbohidratos y la proteína de la matriz. No se observaron diferencias en los efectos principales descritos derivados del tratamiento térmico previo de la soja.

La determinación de los aminoácidos liberados evidenció, también, la elevada actividad proteolítica de los complejos mayoritarios en actividad pectinasa y celulasa. No se observó actividad en el enzima xilanasa. La incorporación simultánea de proteasa con los diferentes carbohidrolasas permitió incrementar la liberación de Aas, en particular de forma aditiva con la pectinasa.

Tabla 3: Actividad enzimática sobre los PNA y la Proteína (Aas) en porcentaje de liberación del total presente en la las fracciones insolubles en agua (WU).

	Soja NT		Soja T-85		Soja T-125	
	Azúares libres	Aas libres	Azúares libres	Aas libres	Azúares libres	Aas Libres
Prot.	2.5	3.5	2.7	7.0	3.2	4.8
Pect.	9.2	5.5	7.0	6.0	9.3	5.9
Prot.+Pect.	21.9	9.2	19.8	10.4	21.0	12.3
Cel.	11.7	7.1	8.9	9.7	10.8	8.6
Prot.+Cel.	16.0	8.5	12.0	11.7	14.0	11.1
Xil.	5.0	1.0	4.0	1.8	4.1	1.6
Prot.+Xil	4.2	3.9	4.7	6.4	4.3	7.4

En conclusión los resultados reflejan, por una parte, una actividad interesante de pectinasa y celulasa sobre los α -galactósidos y PNA de pared vegetal, y por otra parte, la disociación del entramado "proteína-carbohidratos" parece mejorar la accesibilidad de los enzimas proteolíticos a la estructuras proteicas presentes en la soja. Sin embargo, los presentes resultados *in vitro* deberán confirmar su utilidad práctica con animales, en cuyo tracto digestivo abundan los enzimas proteolíticos y no se encuentran carbohidrolasas de pared vegetal como pectinasas y celulasas.

AGRADECIMIENTO:

El presente trabajo ha sido realizado en el marco de un convenio entre la Universidad Autónoma de Barcelona y la empresa Loders Crocklaan (ref: 162039), con financiación del proyecto 2FD 1997-1470.

REFERENCIAS:

- Huisman, M.M.H., Schols, H.A. and Voragen, A.G.J. (1998). Cell wall polysaccharides from soybean (*Glycine max.*) meal. Isolation and characterisation. *Carbohydrate-Polymers*, 37: 1, 87-95.
- Leske, K.L., Jevne, C.J. and Coon, C.N. (1993). Nutrient content and protein and energy digestibilities of ethanol-extracted, low α -galactoside soybean meal as compared to intact soybean meal. *Poult. Sci.*, 78: 1177-1183.
- NRC, (1994). *Nutrient Requirements of Poultry*, 9th rev. Ed. National Academy Press. Washington.