

## Nutričné vlastnosti výrobkov zo sójových bielkovín.

### II. Faktory obmedzujúce nutričnú hodnotu bielkovín sóje

G. STRMISKOVÁ — J. DUBRAVICKÝ — Z. BARTEKOVÁ

Nutričné vlastnosti bielkovín sóje sú stále predmetom záujmu, ktorý sa sústreďuje na ich nutričnú ekvivalenciu pri substitúcii za živočíšne bielkoviny. Vhodnosť rozmanitých sójových bielkovín skúmaná rozličnými metódami vyvoláva aj otázky o primeranosti technológie spracovania z hľadiska inaktívacie antinutričných faktorov a možných strát esenciálnych aminokyselín frakcionáciou počas spracovania.

Ako sme už uviedli, je potrebné sójové bôby tepelne spracovať, ak sa má dosiahnuť maximálna nutričná hodnota výrobkov zo sójových bielkovín. Sú dôkazy, že takéto tepelné spracovanie je potrebné na inaktíváciu termolabilných antirastových faktorov, ako sú trypsínové inhibítory, aglutiníny a ďalšie neznáme faktory. Keďže i napriek doteraz vynaloženému úsiliu ostáva povaha zložiek tepelne nespracovaných sójových výrobkov dosť nejasná, venujeme sa im podrobnejšie.

V literatúre sa uvádza päť alebo viac *trypsínových inhibítorov*, ktoré sa vyskytujú v sójových bôboch, avšak iba dva inhibítory sa študovali podrobne. Sú to Bowmanov-Birkov inhibítor, pozostávajúci zo 71 aminokyselinových zvyškov s polohou na interakciu s trypsínom medzi Lys<sup>16</sup>-Ser<sup>17</sup> a reaktívnym centrom pre interakciu s chymotrypsínom medzi Leu<sup>43</sup>-Ser<sup>44</sup> a Kunitzov trypsínový inhibítor obsahujúci 181 aminokyselinových zvyškov. Priečne väzby v Kunitzovom inhibítore sú pomerne jednoduché, lebo majú iba dva disulfidické mostíky umiestnené na zvyškoch 39—86 a 136—145. Reaktívne centrum je umiestnené na väzbe Arg<sup>63</sup>-Ile<sup>64</sup> [1]. Hymowitz a Hadley [2] analyzovali 108 odrôd sóje a zistili široké kolísanie obsahu trypsínových inhibítorov, avšak ich aktivita nechýbala v nijakej odrode. Genetická variabilita Kunitzovho trypsínového inhibítora sa zistila polyakrylamidovou gélovou elektroforézou. Elektroforetická analýza zárodku plazmy 1595 rastlín kolekcie osív Ministerstva poľnohospodárstva USA ukázala proteínové pásy, zodpovedajúce trypsínovým inhibítorm v každej vzorke. Jedna forma inhibítora prevládala. Tento variant sa zistil v 1255 vzorkách [3] a vyskytuje sa vo väčšine komerčných variet, pestovaných v súčasnosti v USA [4].

Kakade a spol. [5] selektívne odstránili trypsínové inhibítory z extraktov sójového šrotu afinitnou chromatografiou a týmito extraktmi krmili krysy.

Výsledky zahrňujúce asi 60 % účínok dokumentovali, že trypsínové inhibítory boli prítomné, pretože sa vyskytovala pankreatická hypertrofia a rastová inhibícia. Predpokladá sa, že rezistencia natívnych (nevarených) sójových bielkovín na proteolytické trávenie je zodpovedná za zvyškovú pankreatickú hypertrofiu a rastovú inhibíciu po odstránení trypsínových inhibítorov. Trypsínové inhibítory bránia pôsobeniu trypsínu. Pankreas potom vylučuje zvýšené množstvo enzýmov a nastáva hyperplázia. V týchto prípadoch sa zistil dvojnásobný nedostatok sírnych aminokyselín, pretože v sóji ich je nedostatok a zvýšené pankreatické vylučovanie enzýmov spôsobuje zvýšenú vnútornú stratu metionínu a cysteínu.

Trypsínové inhibítory sú termolabilné pri teplotách nad 85 °C. Preto sa odporúča, aby sa produkty obsahujúce sójové bielkoviny uvarili počas niektorého štádia spracovania. Stredne intenzívne spracovanie v autokláve umožňuje ich inaktiváciu bez príliš veľkej zmeny hodnôt bielkovín. Pri tomto spracovaní sa čas často bezdôvodne predlžuje.

Rackis [6] sledoval rozdelenie aktivity trypsínových inhibítorov v sójových výrobkoch surových a tepelne spracovaných. Výsledky uvádza tabuľka 1.

Tabuľka 1. Obsah antitrypsínového faktora vo výrobkoch zo sóje

Typ sójového preparátu	Trypsínový inhibítor (mg/g múky)	
	v surovom prípr.	po oprac. parou
Sójová múka	40,0	0,8
Sójová múka (obehodný produkt)	—	0,8—1,1
Bielkovina zrážaná kyselinou	14,0	0,8
Extrakt. zložky sójovej srvátky	72,0	1,0
Bielkovina sójovej srvátky	208,0	1,0
Bielkovina zrážaná kyselinou (obehodný produkt)	—	0,3—3,6

Tieto údaje indikujú vysokú úroveň aktivity trypsínových inhibítorov v nevarených bielkovinových výrobkoch, kým tepelne spracované výrobky vykazujú nepatrnú úroveň aktivity. Takisto treba konštatovať, že aj bielkoviny zrážané kyselinami, ako napr. priemyselne vyrábané izoláty, obsahujú nepatrné množstvá trypsínových inhibítorov. Táto skutočnosť je pochopiteľná, keď sa uvaží veľký rozsah aktivity inhibítorov obsiahnutých v surovej srvátke zo sójových bôbov, ktorá sa zistila počas priemyselnej výroby izolátov.

Iba nedávno sa zistilo, že časť inhibítorov sa musí inaktivovať, aby sa stali neškodnými pre krysy. Vyvinula sa zdokonalená metóda na stanovenie konečnej aktivity trypsínových inhibítorov v zahriatych odtučnených sójových vložkách [7]. Postup sa potom použil na skúšku zvyškových inhibítorov v odtučnených vložkách, ktoré sa varili v pare pri premenlivom čase, aby sa zistili série vložiek so stúpajúcimi hladinami aktivity [8]. Týmito vložkami s premenlivou hladinou aktivity sa krmili krysy. Pri vložkách, vykazujúcich 31—45 % aktivity inhibítorov surových vložiek sa pankreatická hypertrofia ešte nevyskytla. Avšak maximálna hmotnosť tela, stráviteľnosť dusíka a PER sa získali iba vtedy, keď sa vložky viac tepelne spracovali a mali zvyškovú inhibítorovú aktivitu iba 13—21 % z pôvodných vložiek.

Pokiaľ ide o citlivosť k trypsínovým inhibítorm, zistili sa druhové diferencie. Na rozdiel od krýs a ďalších druhov, psi môžu prijať 15 % sójovej múky bez škodlivého účinku na telesnú hmotnosť, hmotnosť pankreasu alebo sekréciu pankreasu. Stabilita trypsínových inhibítorov v rozličných potravinárskych produktoch nie je ešte známa, ale vyskytujúce sa zvyškové inhibítory nie sú problémom vo varených mäsových produktoch, obsahujúcich pridané sójové bielkoviny [9]. Nordal a Fossum [9] zistili, že mäso alebo mäsové extrakty spôsobujú, že trypsínový inhibítor je citlivejší na teplo. Nemerateľná aktivita trypsínových inhibítorov sa zistila v zmesi mäsa a bielkovinového izolátu, zahrievanej iba 5 minút pri 90 °C.

*Aglutíníny* sa považujú za antinutričné faktory v sóji, no ich význam v tomto ohľade zatiaľ nie je vyjasnený. Turnier a Liener [10] prepustili pufrový extrakt surovej odtučnenej sójovej múky cez kolonku Sepharosou viazaného Concavalinu A, ktorý odstránil aktivitu aglutinínu, ale nemal nijaký účinok na aktivitu trypsínových inhibítorov. Autori kŕmili extraktom bez aglutinínu mladé krysy a zistili, že pomer rýchlosti rastu a bielkovinovej účinnosti nie je významne rozdielny od hodnôt, ktoré sa získali pri pôvodnom extrakte, obsahujúcom aglutiníny. Po zahrievaní pôvodného extraktu autori pozorovali badateľné zlepšenie v raste podobne ako po zahrievaní surovej sójovej múky. Aj Rackis [6] uvádza, že aglutiníny sa ľahko inaktívujú teplom. V dôsledku toho majú malý vplyv na nutričnú hodnotu výrobkov zo sójových bielkovín.

*Saponíny* sú komplex glykozidov diterpenoidných alkoholov a vyskytujú sa vo veľmi malých množstvách vo výrobkoch zo sójových bielkovín. Hoci sa predpokladalo, že majú antinutričné vlastnosti, najnovšie práce ukázali, že pri kŕmení hydiny, krýs a myši sú neškodné. Ani saponíny, ani podobné saponíny sa nenašli v krvi počas pokusov s kŕmením. V dôsledku toho sa zdá, že tieto látky sa naabsorbovali v žalúdku a v tenkom čreve a nemajú teda nijaký význam, pokiaľ ide o ich vplyv na nutričnú hodnotu výrobkov zo sójových bielkovín.

Z technologického hľadiska pôsobia nepriaznivo tri druhy *lipoxygenáz*. Spôsobujú nežiadúcu arómu vytváraním hydroperoxidov mastných kyselín [11]. Pred drtением a odstraňovaním šupky sa musia sójové bôby blanžirovať, aby sa tieto enzýmy odstránili. Inaktiváciu týchto enzýmov spôsobuje aj macerovanie v alkoholickom roztoku. Klasické tepelné spracovanie je tu neúčinné.

Na *kyselinu fytovú* je v sóji viazané 75 % celkového fosforu. Je to zdroj zle absorbovateľného fosforu s rachitogénnymi vlastnosťami. V črevách tvorí s minerálnymi prvkami komplexy (s vápnikom, zinkom a i.). Počas procesu extrakcie bielkovín môže reagovať kyselina fytová s bielkovinami a vytvárať komplexy. Túto látku možno odstrániť dialýzou alebo ultrafiltráciou, prechodom cez iontomeniče, disociáciou fitínovo-bielkovinových komplexov, zmenami v hodnotách pH [12]. Zistilo sa, že odstránenie fytínového fosforu nepatrne mení pH sójových bielkovín.

V súčasnosti venujú viacerí autori pozornosť vplyvu pôsobenia alkalického spracovania na sójové bielkoviny, pretože pri ňom dochádza k stratám nutričnej hodnoty aj ku vzniku toxického lyzínalanínu. Strata nutričnej hodnoty nastáva z dvoch dôvodov:

a) Vytváraním kovalentných väzieb medzi bielkovinovými reťazcami, ktoré

sú ťažko napadnuteľné proteolytickými enzýmami a ktoré vytvárajú zníženú stráviteľnosť.

b) Rozkladom a izomerizáciou aminokyselín, ktoré znižujú chemický „index“ a biologickú hodnotu. K rozkladu dochádza pri cysteíne, izoleucíne a lyzíne, k izomerizácii najmä pri lyzíne, metioníne, alaníne a kyseline glutanovej.

Väčšinu aminokyselín, ktoré sú vo forme D, nemôže organizmus využiť. Pri príliš nešetrnom spracovaní alebo vysokom pH môže prebehnúť izomerizácia pri všetkých aminokyselinách. Strata aminokyselín môže nastať z dvoch dôvodov. V oboch prípadoch nastáva transformácia určitých rezíduí aminokyselín. Tak sa izoleucín transformuje na aloizoleucín a arginín na ornitín. Ostatné vzniknuté aminokyseliny pochádzajú z kondenzácie medzi zvyškami toho istého reťazca alebo dvoch bielkovinových reťazcov. Tvorja sa aj kovalentným vonkajším a vnútorným viazaním, čo vedie ku vzniku lyzínalanínu [13, 14], tionínu [15], oritínalanínu [16]. Mechanizmus týchto zmien začína pravdepodobne desulfuráciou cysteínu. Tak vzniká dehydroalanín, ktorý kondenzáciou s lyzínom dáva lyzínalanín alebo s cysteínom lantionín [17].

De Groot a Slump [18] zistili, že pri spracovaní sójovej múky pri pH 12,2 počas 4 hodín a pri teplote 40 °C nastali straty lyzínu a tvoril sa lyzínalanín. Štúdie sledujúce kŕmenie kryš ukázali, že čistá utilizácia alkalicky opracovaných bielkovín poklesla, a že okolo 40 % prijatého lyzínalanínu sa vylúčilo najmä fekáliami. Autori opracovali aj izolované sójové bielkoviny alkáliami pri rozličnom pH, čase a pri rozličnej teplote a stanovili obsah lyzínalanínu v bielkovinách. Zistili, že už jedna hodina pri 40 °C a pH 12,2 stačila na tvorbu lyzínalanínu. Avšak nezistili nijaký lyzínalanín po štvorhodinovom opracovaní pri teplote 40 °C a pH 8. Stanoviteľné množstvá lyzínalanínu sa pozorovali po 4 hodinách pri pH 10 a teplote 40 °C. De Groot a Slump si všimli, že u niektorých krysičích samičích mláďat sa vyvinula nefrokalcinóza, ale táto sa oslabila pridaním väčšieho množstva vápnika do stravy. Podľa citovaných autorov existuje korelácia medzi stratou nutričnej hodnoty a tvorením lyzínalanínu, ktoré boli takto spracované v sójových bielkovinách.

Tvorbu lyzínalanínu pri alkalickom opracovaní bielkovín sóje ďalej potvrdili Woodard a Short [19]. Dávnejšie Woodard a Alvarez [20] zistili, že keď kŕmili krysy priemyselne spracovanou sójovou bielkovinou (modifikovanou alkalickým opracovaním kvôli zmene fyzikálnych vlastností), vyvolávala u nich nefrotoxickú reakciu, charakterizovanú vzäčšovaním jadier a vzrastom cytoplazmatických častíc buniek v zadnej časti proximálnych tubúl. Túto renálnu léziu nazvali cytomegália. Woodard a Short [19] zistili, že obchodné jedlé izoláty sójových bielkovín obsahujú neurčiteľné množstvo lyzínalanínu a možnosť vzniku cytomegálie je zanedbateľná. Avšak pri opracovaní jedlého izolátu bielkovín s 0,1 N NaOH počas 8 hodín pri 60 °C dochádza k tvorbe 2,6 % lyzínalanínu v bielkovinách, a keď opracovanou bielkovinou kŕmime krysy, vyvinie sa cytomegália.

Dodatčne van Beek a spol. [21] kŕmili krysy spletanými vláknami vyrobenými z izolátu sójových bielkovín. Spletací proces zahŕňa stupeň alkalického opracovania a vlákna obsahujú okolo 0,2 % lyzínalanínu. Pri vyššej hladine bielkovín strava obsahuje 0,04 % lyzínalanínu. Nepozorovali nijaký nepriaznivý účinok okrem nefrokalcinózy u mláďat; tento účinok bol eliminovaný zvýšením obsahu vápnika alebo znížením obsahu fosforu v strave. Renálna cytomegália sa neprejavila ani u jednej z kryš.

Woodard a Short [22] krmili krysy syntetickým lyzínalanínom, jeho hladina v strave sa pohybovala od 0 do 0,3 % a zistili, že po 4 týždňoch sa ukázali na renálnych tubulárnych bunkách všetkých krýs karyomegalické reakcie. Pri vysokej hladine sa pozorovali aj bunkové nekrózy a tubulárne deštrukcie. Zdanlivo voľné aminokyseliny sú toxikejšie ako ich peptidicky viazané formy, nachádzajúce sa v alkalicky opracovaných bielkovinách. Príslušné štúdie de Groota a spol. [23] ukazujú, že strava obsahujúca 0,14 % lyzínalanínu vo forme alkalicky opracovaného sójového šrotu, izolovanej sójovej bielkoviny alebo kazeínu nespôsobujú patologické zmeny u krýs. Avšak priemyselný izolát sójovej bielkoviny pridaný do stravy poskytuje pozorovateľnú hladinu lyzínalanínu, indikujúceho cytomegáliu. Krysy kŕmené stravou obsahujúcou buď syntetický lyzínalanín, buď kyslý hydrolyzát alkalicky opracovaného izolátu sójovej bielkoviny, vykazujú vážnu tubulárnu nefrózu, charakterizovanú nekrózou, regeneráciou a cytomegáliou epitelových buniek. Voľný lyzínalanín sa zdá byť aspoň 10-krát aktívnejší ako v peptidicky viazanej forme, voľné aminokyseliny sa vylučujú najmä močom.

Toxicita lyzínalanínu sa takto overila vo viacerých laboratóriách. Samozrejme, použitie alkálií pri opracovaní sójových bielkovín sa musí minimalizovať a starostlivo kontrolovať.

## Súhrn

V druhej časti predloženej štúdie o nutričných vlastnostiach výrobkov zo sójových bielkovín sme poukázali na biologický účinok trypsinových inhibítorov, aglutinínov a ďalších antinutričných faktorov a na vplyv pôsobenia alkalického opracovania na sójové bielkoviny.

## Literatúra

1. WOLF, W. J.: Chemistry and technology of soybeans. In: Pomeranz, Y.: *Advances in Cereal Science and Technology*. St. Paul, Minnesota, Amer. Assoc. Cereal Chemists, 1976.
2. HYMOWITZ, T. — HADLEY, H. H.: Inheritance of a trypsin inhibitor variant in seed protein of soybeans. *Crop. Sci.*, 12, 1972, s. 197.
3. HYMOWITZ, T.: Electrophoretic analysis of SBTI-A<sub>2</sub> in the USDA soybean germplasm collection. *Corp. Sci.* 13, 1973, s. 420.
4. CLARK, R. W. — MIES, D. W. — HYMOWITZ, T.: Distribution of a trypsin inhibitor variant in seed proteins of soybean varieties. *Crop. Sci.*, 10, 1970, s. 486.
5. KAKADE, M. L. — HOFFA, D. E. — LIENER, I. E.: Contribution of trypsin inhibitors to the deleterious effects of unheated soybeans fed to rats. *J. Nutr.*, 103, 1973, s. 1772.
6. RACKIS, J. J.: *Food Technol.*, 20, 1966, s. 102.
7. KAKADE, M. L. — RACKIS, J. J. a spol.: Determination of trypsin inhibitor activity of soy products. A collaborative analysis of an improved procedure. *Cereal Chem.*, 51, 1974, s. 376—382.
8. RACKIS, J. J. — MCGHEE, J. E. — BOOTH, A. N.: Biological threshold levels of soybean trypsin inhibitors by rat bioassay. *Cereal Chem.*, 52, 1975, s. 85—92.
9. NORDAL, J. — FOSSUM, K.: The heat stability of some trypsin inhibitors in meat

- products with special reference to added soybean protein. *Z. Lebensm.-Untersuch. Forsch.*, 154, 1974, s. 144.
10. TURNER, R. H. — LIENER, I. E.: The effect of the selective removal of hemagglutinins on the nutritive value of soybeans. *J. Agr. Food Chem.*, 23, 1975, s. 484—487.
  11. KALBRENNER, J. E. — WARNER, K. — ELDRIDGE, A. C.: Flavors derived from linoleic and linolenic acid hydroperoxides. *Cereal Chem.*, 51, 1974, s. 406—416.
  12. OKUBO, K. — WALDROP, A. B. a spol.: Preparation of low phytate soybean protein isolate and concentrate by ultrafiltration. *Cereal Chem.*, 52, 1975, s. 263—271.
  13. PATCHORNIK, A. — SOKOŁÓWSKY, M.: *J. Amer. Chem. Soc.*, 86, 1964, s. 1860.
  14. BOHAK, Z.: *J. Biol. Chem.*: 239, 1964, s. 2878.
  15. HORN, M. J. — JONIS, D. B. — RINGFI, S. J.: *J. Biol. Chem.*, 138, 1941, s. 141.
  16. ZIEGLER, K. — MFICHERT, I. — BURKEN, C.: *Nature*, 214, 1967, s. 404.
  17. BESANCON, P.: Incidences des traitements technologiques sur valeur nutritionnelle des proteines d'oleagineux. *Rev. Franc. Corps. Gras*, 24, 1977, s. 11—18.
  18. De GROOT, A. P. — SLUMP, P.: Effects severe alkali treatment of proteins on amino acid composition and nutritive value. *J. Nutr.*, 98, 1969, s. 45—56.
  19. WOODARD, J. C. — SHORT, D. D.: Toxicity of alkali-treated soy protein in rats. *J. Nutr.*, 103, 1973, s. 569—574.
  20. WOODARD, J. C. — ALVAREZ, M. R.: Renal lesions in rats fed diets containing alpha protein. *Arch. Pathol.*, 84, 1967, s. 153—162.
  21. VAN BEEK, L. — FERON, V. J. — de GROOT, A. P.: Nutritional effects of alkali-treated soyprotein in rats. *J. Nutr.*, 104, 1974, s. 1630—1636.
  22. WOODARD, J. C. — SHORT, D. D.: Renal toxicity of N<sup>c</sup>-(DL-2-amino-2-carboxyethyl(-L-lysine)lysinoalanine) in rats. *Proc. Fed. Amer. Soc. exp. Biol.*, 34, 1975, s. 929.
  23. De GROOT, A. P. — SLUMP, P. — van BEEK, L. — FERON, V. J.: Severe alkali treatment of protein. Program 35th Ann. Meeting Inst. Food Technol., June 8—12. Abstr. 286, 1975.

Стрмискова, Г. — Дубравицки, Й. — Бартекова, З.

## Калорийные свойства продуктов из белков сои II. Факторы ограничивающие калорийное значение белков сои

### Выводы

В второй части этой статьи касающейся исследования калорийных свойств продуктов из белков сои мы указали на биологическое действие трипсиновых ингибиторов, агглютининов и дальнейших антикалорийных факторов как и на влияния действия щелочной обработки на белки сои.

Strmisková, G. — Dubravický, J. — Barteková, Z.

## Nutritive qualities of products from soya proteins II. Factors limiting nutritive value of soya proteins

### Summary

In the second part of presented study about nutritive qualities of products from soya proteins we have referred to a biological effect of trypsin inhibitors, agglutinins and further antinutritive factors and to influences of alkaline wash action on soya proteins.