

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Nutrición y Bromatología



**TESIS DOCTORAL**

**Mejora de la funcionalidad de okara de soja por tratamiento simultáneo con altas presiones hidrostáticas y enzimas alimentarias**

**Improvement of the functionality soybean okara by simultaneous treatment with high hydrostatic pressure and food-grade enzymes**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**Elena Pérez López**

Directoras

**M<sup>a</sup> Pilar Rupérez Antón  
Inmaculada Mateos-Aparicio**

**Madrid, 2018**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE FARMACIA**

Departamento de Nutrición y Bromatología II. Bromatología



**TESIS DOCTORAL**

**MEJORA DE LA FUNCIONALIDAD DE OKARA DE SOJA POR  
TRATAMIENTO SIMULTÁNEO CON ALTAS PRESIONES HIDROSTÁTICAS Y  
ENZIMAS ALIMENTARIAS**

Memoria para optar al grado de doctor

Presentada por

**Elena Pérez López**

Directores

**M<sup>a</sup> Pilar Rupérez Antón**

**Inmaculada Mateos-Aparicio Cediel**

Madrid, 2017

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Nutrición y Bromatología II. Bromatología



MEJORA DE LA FUNCIONALIDAD DE OKARA DE SOJA POR  
TRATAMIENTO SIMULTÁNEO CON ALTAS PRESIONES HIDROSTÁTICAS Y  
ENZIMAS ALIMENTARIAS

TESIS DOCTORAL EUROPEA

**ELENA PÉREZ LÓPEZ**

Madrid 2017



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Nutrición y Bromatología II. Bromatología



IMPROVEMENT OF THE FUNCTIONALITY OF SOYBEAN OKARA BY  
SIMULTANEOUS TREATMENT WITH HIGH HYDROSTATIC PRESSURE AND  
FOOD-GRADE ENZYMES

EUROPEAN DOCTORAL THESIS

**ELENA PÉREZ LÓPEZ**

Madrid 2017



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Nutrición y Bromatología II. Bromatología



Las Dras. M<sup>a</sup> Pilar Rupérez Antón e Inmaculada Mateos-Aparicio

CERTIFICAN QUE:

Dña. Elena Pérez López ha realizado bajo nuestra dirección el trabajo que lleva por título “MEJORA DE LA FUNCIONALIDAD DE OKARA DE SOJA POR TRATAMIENTO SIMULTÁNEO CON ALTAS PRESIONES HIDROSTÁTICAS Y ENZIMAS ALIMENTARIAS” que constituye su memoria para optar al grado de Doctor Europeo por la Universidad Complutense de Madrid (UCM). Dicho trabajo reúne las condiciones necesarias para su presentación y defensa.

Y para que conste a los efectos oportunos firmamos el presente certificado

Dra. M<sup>a</sup> Pilar Rupérez Antón

Dra. Inmaculada Mateos-Aparicio

Madrid, 12/12/2016.





MINISTERIO  
DE ECONOMÍA  
Y COMPETITIVIDAD



La Dra. M<sup>a</sup> Pilar Rupérez Antón, investigadora científica del Departamento de Metabolismo y Nutrición del Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), certifica que el trabajo de investigación titulado:

“MEJORA DE LA FUNCIONALIDAD DE OKARA DE SOJA POR TRATAMIENTO SIMULTÁNEO CON ALTAS PRESIONES HIDROSTÁTICAS Y ENZIMAS ALIMENTARIAS”

Presentado por Elena Pérez López, para optar al grado de Doctor Europeo por la Universidad Complutense de Madrid, ha sido realizado bajo la dirección de M<sup>a</sup> Pilar Rupérez Antón e Inmaculada Mateos-Aparicio en el Departamento de Metabolismo y Nutrición del ICTAN, perteneciente al CSIC

Y para que conste a los efectos oportunos firmo el presente certificado.

Dra. M<sup>a</sup> Pilar Rupérez Antón

Madrid, 12/12/2016.



Elena Pérez López ha disfrutado de una ayuda del Programa predoctoral, de formación de personal investigador no doctor del Gobierno vasco durante 2014, 2015 y 2016, así como una ayuda para estancias en centros distintos al de aplicación del Programa Predoctoral de Formación de Personal Investigador.

Este trabajo se ha realizado en el Departamento de Metabolismo y Nutrición del Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición, ICTAN, CSIC, en colaboración con el Departamento de Nutrición y Bromatología II, Bromatología, de la Facultad de Farmacia y el Departamento Food & Nutritional Sciences de la Universidad de Reading.

Este trabajo se incluye en el proyecto AGL2016-77056-R del Ministerio de Economía, Industria y Competitividad.

Se agradece a las empresas Toofu-Ya S.L. y Novozymes España, S.A el suministro de Okara de soja y de las enzimas *Ultraflo*<sup>®</sup> L y *Viscozyme*<sup>®</sup> L, respectivamente.



## *Agradecimientos*

### *Agradecimientos*

Bueno, pues ya han pasado cuatro años desde que entré en el ICTAN para hacer el trabajo fin de Máster, parece mentira. Todo este trabajo no hubiese sido posible sin el apoyo de mucha gente.

En primer lugar, gracias a mis directoras, Pilar e Inma. Es una redundancia decir que este trabajo no hubiera sido posible sin vosotras. Muchas gracias por darme la oportunidad de realizar esta tesis, por la dedicación, el interés y la formación que he recibido de vosotras a lo largo de estos años. Por darme la oportunidad de participar activamente en todos los aspectos de este trabajo. Aprovecharé todo lo que he aprendido en estos años durante toda mi carrera, y eso es gracias a vosotras.

Gracias a la gente del ICTAN, a Jara por la ayuda desinteresada durante todos estos años en el laboratorio, a Marta Navarro por los ánimos y las conversaciones en la sala de escritura, a Marta Mesías porque no se puede ser más maja. A Ana María por toda su ayuda prestada con una sonrisa. Por las conversaciones y la doma de ratas. A Marisa y a Isabel, por la ayuda, el interés y por las charlas en el laboratorio. A toda la gente que ha pasado por aquí, Sofía, Ana Belén... A Gema, Sara, Isa y muy especialmente a Rocío, espero que todas estéis bien. A Noe, por las cervezas que no llegan. A Ruth, Joaquín, Tatiana, Helena, Esther... La hora de comer ha sido, muchas veces, lo mejor del día. A Sonia y a Luis, por el interés y los cafés.

A la gente de Reading, por dejarme ser parte de su familia. En especial, por supuesto, gracias a Adele, por su apoyo, su esfuerzo y por sacar tiempo para mí. A Drinalda, te deseo mucha suerte. A Holly, Ivan, Faydi, Andrea, Roberta, Davide, Silvia,

## *Agradecimientos*

Sandra, Manuel, Dominika, Katharina, Mar, Luke, Piero...You are the best. Muchas gracias por todo.

Muchas gracias a mis amigos, que siempre están ahí. En especial, a Ainhoa, por ser más que una amiga desde 2008 y lo que queda. A Luis, a Aintzane (no voy a poner desde cuándo me llevas aguantando...) y Borja. Es un gustazo teneros por amigos. A Sean, Bárbara, Eneko, Edu, Gon, Alain, Alberto, Pablo, Álvaro, Vic.

Muchas gracias a mi familia por aguantarme desde el principio de los tiempos. A mi madre por apoyarme todo este tiempo. A mi hermana por poner las cosas en perspectiva, a Jose, por alimentarme, o al menos intentarlo y por su interés. Muy especialmente, gracias a mi padre por involucrarse en todo este proceso y escucharme siempre. Muchas gracias a Simon por todo.

Seguro que me olvido de mucha gente, así que muchas gracias a todas las personas han contribuido a esta tesis de todas las formas posible. Y si estáis leyendo esto, gracias por mostrar interés por este trabajo.

## *Agradecimientos*

*"En la vida, no hay nada que temer, solo hay que comprender"*

*Marie Sklodowska-Curie*

## *Agradecimientos*

Índice

Agradecimientos.....	11
Índice .....	15
Abreviaturas.....	19
<u>Resumen</u> .....	25
<u>Abstract</u> .....	31
<u>Introducción</u> .....	39
1. Subproductos agroalimentarios .....	41
1.1. Pérdida y desperdicio de alimentos .....	41
1.1.1. Política contra el desperdicio .....	42
1.1.2. ¿Residuo o subproducto? .....	43
1.2. Usos y revalorización de subproductos .....	44
Alimentación animal.....	44
Producción de bioenergía .....	44
Producción de biomateriales .....	45
Recuperación de compuestos funcionales .....	45
1.2.1. Tecnologías para revalorizar subproductos.....	46
1.2.1.1. Tratamientos enzimáticos .....	46
1.2.1.2. Tratamientos químicos .....	47
1.2.1.3. Tratamientos físicos .....	47
Altas presiones hidrostáticas, APH.....	49
2. Fibra y efecto prebiótico.....	53
2.1. Clasificación de la fibra.....	54
2.2. Efecto prebiótico de la fibra .....	56
2.2.1. Microbiota intestinal .....	57
2.2.2. Ácidos grasos de cadena corta .....	59
2.2.3. Nuevos prebióticos.....	64
3. Okara de soja .....	65
3.1. Okara como subproducto .....	65
3.1.1. Subproductos de leguminosas .....	65

## *Índice*

3.1.2. Producción y usos de la soja .....	66
3.1.3. Okara, subproducto de la soja .....	68
3.1.4. Composición de la Okara .....	70
3.1.5. Usos de la Okara .....	72
Alimentación animal.....	72
Medio de cultivo y fertilizante.....	72
Recuperación de compuestos funcionales .....	73
Utilización como ingrediente.....	73
3.2. Propiedades beneficiosas de la Okara .....	75
3.2.1. Efecto prebiótico de la Okara.....	75
3.2.2. Aumento de la absorción de minerales .....	76
3.2.3. Pérdida de peso .....	76
3.2.4. Disminución de los lípidos plasmáticos.....	78
3.2.5. Capacidad antioxidante .....	79
3.2.6. Control de la presión arterial.....	79
3.2.7. Disminución de la glucosa en sangre .....	81
3.3. Revalorización de la Okara .....	81
<u>Objetivos</u> .....	85
<u>Resultados</u> .....	89
<b>Capítulo 1:</b> .....	91
Desarrollo y validación de un método cromatográfico (HPLC - ELSD) que permita monitorizar la liberación de fibra soluble de la Okara cuando se emplea un tratamiento con altas presiones hidrostáticas y enzimas hidrolíticas.....	95
Resumen.....	99
<b>Capítulo 2:</b> .....	103
Tratamiento de la Okara con altas presiones hidrostáticas y enzimas específicas para solubilizar la fibra: optimización del tratamiento y efectos potencialmente funcionales .....	103
Resumen.....	107
Material suplementario 1: Tratamiento combinado con APH y enzimas y su efecto en otras propiedades funcionales de la Okara: Capacidad antioxidante y de inhibición de la enzima convertidora de angiotensina .....	159
Material suplementario 2: Tratamiento combinado con APH y enzimas y posible mecanismo de acción sobre celulosa como sustrato modelo .....	163

## Índice

<b>Capítulo 3:</b> .....	167
Estudio de los efectos beneficiosos en la salud, en especial del efecto prebiótico, de la Okara tratada con altas presiones hidrostáticas y enzimas hidrolíticas mediante modelos experimentales <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> .....	167
Resumen.....	171
<u>Discusión</u> .....	205
1. Desarrollo y validación de un método cromatográfico (HPLC - ELSD) que permita monitorizar la liberación de fibra soluble de la Okara cuando se emplea un tratamiento con altas presiones hidrostáticas y enzimas hidrolíticas .....	207
2. Tratamiento de la Okara con altas presiones hidrostáticas y enzimas específicas para solubilizar la fibra: optimización del tratamiento y efectos potencialmente funcionales .....	213
3. Estudio de los efectos beneficiosos en la salud, en especial del efecto prebiótico, de la Okara tratada con altas presiones hidrostáticas y enzimas hidrolíticas mediante modelos experimentales <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> .....	219
<u>Conclusiones</u> .....	227
<u>Conclusions</u> .....	231
Bibliografía.....	235

## *Índice*

# Abreviaturas

## *Abreviaturas*

### *Abreviaturas*

ABTS	2,20-azino bis (3-ethylbenzothiazoline-6- sulfonate)
AGCC	ácidos grasos de cadena corta
AL	almidón
Ang	angiotensina
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
APH	altas presiones hidrostáticas
ARA	arabinosa
AU	ácidos urónicos
CHO	carbohidratos
ECA	enzima convertidora de angiotensina
EFSA	European Food Safety Authority
ES	estaquiosa
FDA	Food and Drug Administration
FI	fibra insoluble
FISH	fluorescence <i>in situ</i> hybridization
FOS	fructooligosacáridos
FRAP	ferric reducing/antioxidant power
FRU	fructosa
FS	fibra soluble

## *Abreviaturas*

FUC	fucosa
GAL	galactosa
GLU	glucosa
GOS	galactooligosacáridos
HHL	hippuryl-L-histidyl-L-leucine
HHP	high hydrostatic pressure
HPLC-ELSD	cromatografía líquida de alta eficacia - detector evaporativo de luz difusa
HPLC-ELSD	high performance liquid chromatography - evaporative light scattering detector
IDF	insoluble dietary fibre
IN	inulina
IMC	índice de masa corporal
LDL	lipoproteínas de baja densidad
MAN	manosa
MS	monosacáridos
MSR	metodología de superficies de respuesta
OMS	Organización Mundial de la Salud
OS	oligosacáridos

### *Abreviaturas*

PM	peso molecular
PS	peso seco
qPCR	quantitative polymerase chain reaction
RAF	rafinosa
RHA	ramnosa
RID	detector de índice de refracción
RSM	metodología de superficies de respuesta
RSM	response surface methodology
SAC	sacarosa
SCFA	short chain fatty acids
SDF	soluble dietary fibre
SLM	standard litre per minute
UE	Unión Europea
WHO/FAO	World Health Organization / Food and Agriculture Organization of the United Nations
XIL	xilosa

## *Abreviaturas*

# Resumen

## *Resumen*

## **Introducción**

Los subproductos vegetales son una fuente interesante de compuestos bioactivos y fibra. Entre ellos, la Okara es un subproducto de la soja que se obtiene tras extraer la fracción soluble para la producción de bebida de soja o tofu. El contenido en agua de la Okara es muy alto, del 80 %, lo que hace que se deteriore rápidamente y debido a la forma de producción, es muy rica en fibra insoluble, (FI) (50 %). La Okara es fermentable por bacterias beneficiosas, como *Bifidobacterium*, produciendo ácidos grasos de cadena corta (AGCC), por lo que se considera un potencial prebiótico. Además, la Okara tiene una serie de beneficios para la salud, como el aumento de la absorción mineral, la mejora de la salud gastrointestinal, el fomento de la pérdida de peso o la disminución de los lípidos plasmáticos. A pesar de ello, la Okara es pobre en fibra soluble (FS) (5 %), que es la que mayor efecto prebiótico tiene, en especial los oligosacáridos. La Okara podría ser utilizada como un ingrediente rico en fibra, pero se necesita un tratamiento previo que evite su putrefacción y aumente la FS. La aplicación de altas presiones hidrostáticas (APH) es un método novedoso que permite la conservación de los alimentos, sin afectar a las características sensoriales y provocando un aumento del contenido de fibra soluble.

## **Objetivos**

Tratamiento de la Okara de soja por APH en combinación con enzimas específicas de grado alimentario (*Ultraflo*<sup>®</sup> L y *Viscozyme*<sup>®</sup> L) para mejorar su valor nutricional y efecto prebiótico potencial estudiado *in vitro* e *in vivo*.

Para ello se necesita desarrollar y validar un método rápido y eficaz para detectar los carbohidratos solubles mediante cromatografía líquida de alta eficacia asociado a un detector evaporativo de luz difusa (HPLC-ELSD) y optimizar el tratamiento de APH

con enzimas de grado alimentario, *Ultraflo*<sup>®</sup> L y *Viscozyme*<sup>®</sup> L, minimizando los costes del proceso.

## **Resultados**

*Capítulo 1: Desarrollo y validación de un método cromatográfico (HPLC - ELSD) que permita monitorizar la liberación de fibra soluble de la Okara cuando se emplea un tratamiento con APH y enzimas hidrolíticas.*

Los parámetros óptimos del detector según la metodología de superficies de respuesta (MSR) fueron: temperatura del evaporador, 89 °C, la del nebulizador, 78 °C y el caudal de nitrógeno (gas portador), 1,1 L min<sup>-1</sup> (SLM). La mejor fase móvil volátil ha resultado ser el acetato de amonio al 0,01 mol L<sup>-1</sup>. Se ha obtenido una buena linealidad ( $R^2 > 0,998$ ), así como buena sensibilidad y bajos límites de detección y cuantificación. La calibración logarítmica obtenida sirve para cuantificar e identificar carbohidratos de un rango amplio de pesos moleculares.

*Capítulo 2: Tratamiento de la Okara con altas presiones hidrostáticas y enzimas específicas para solubilizar la fibra: optimización del tratamiento y efectos potencialmente funcionales.*

Las condiciones del tratamiento han sido optimizadas para minimizar su coste. Una proporción 1:40 enzima / Okara (v/m) ha sido capaz de hidrolizar la Okara a pH 7, 37 °C y presión atmosférica. Las enzimas utilizadas, *Ultraflo*<sup>®</sup> L y *Viscozyme*<sup>®</sup> L, incrementaron su actividad cuando se sometieron a APH, existiendo una sinergia entre los tratamientos. El tratamiento más efectivo para liberar carbohidratos de la Okara ha resultado ser el de 600 MPa, 30 min, 1:40 *Ultraflo*<sup>®</sup> L / Okara, consiguiendo un aumento de carbohidratos solubles del doble de los valores iniciales y un descenso en su

## Resumen

peso molecular, medido con el método HPLC-ELSD desarrollado previamente. Este tratamiento podría ser utilizado industrialmente para producir un ingrediente de Okara con capacidades nutricionales mejoradas.

*Capítulo 3: Estudio de los efectos beneficiosos en la salud, en especial del efecto prebiótico, de la Okara tratada con altas presiones hidrostáticas y enzimas hidrolíticas mediante modelos experimentales in vitro e in vivo.*

La Okara tratada con APH y *Ultraflo*<sup>®</sup> L ha demostrado tener unas capacidades prebióticas potenciales mayores que la Okara nativa, en términos de mayor crecimiento de bacterias beneficiosas (*Bifidobacterium* y *Lactobacillus*), mayor inhibición de bacterias potencialmente perjudiciales y mayor producción de AGCC, obtenidas en un experimento *in vitro*. El tratamiento con APH y *Ultraflo*<sup>®</sup> L de la Okara ha mejorado sus propiedades funcionales. En un experimento con ratas que siguen una dieta grasa, se observó que la Okara tratada consigue frenar la ganancia en peso, reducir los niveles de triglicéridos en plasma, aumentar la absorción mineral y aumentar la producción de AGCC. Además, la Okara tratada con APH y *Ultraflo*<sup>®</sup> L ha demostrado poseer un efecto protector de la microbiota frente a los cambios perjudiciales causados por una dieta rica en grasa.

## Conclusiones

En resumen, el tratamiento optimizado con APH y enzimas alimentarias consigue aumentar la fibra soluble de la Okara, siendo fácilmente adaptable a nivel industrial. Esto mejora la funcionalidad y capacidades prebióticas de la Okara, que además, frena la ganancia en peso y mejora la salud cardiovascular en ratas. La Okara tratada podría utilizarse como un nuevo ingrediente funcional en alimentos procesados.

## *Resumen*

# Abstract

*Abstract*

## **Introduction**

By-products are an interesting source of bioactive compounds and dietary fibre. Among them, Okara is a soybean by-product, obtained after extracting the soluble fraction for soymilk or tofu production. It has a high moisture content (80 %), making it easily decomposed and is rich in insoluble dietary fibre, IDF (50 %). Okara can be fermented by beneficial bacteria like *Bifidobacterium*, producing short chain fatty acids (SCFA), and consequently, it is considered a potential prebiotic. However, Okara has low soluble dietary fibre (SDF) content (5 %), which is mainly responsible for the prebiotic effect, particularly the oligosaccharides. Okara has some added beneficial effects, like the increase in mineral absorption, improvement of gastrointestinal health, a weight-loss effect and the reduction of blood lipids. It could be used as a high-fibre ingredient, but a previous treatment is needed to avoid putrefaction and increase SDF. High Hydrostatic Pressure (HHP) is a novel treatment for food conservation which does not affect the organoleptic attributes of the products and could increase SDF content.

## **Aims**

To treat Okara by HHP combined with food-grade enzymes (*Ultraflo*<sup>®</sup> L and *Viscozyme*<sup>®</sup> L) in order to improve its nutritional value and potential prebiotic effect using *in vitro* and *in vivo* experiments.

For this purpose, a new and fast HPLC-ELSD method (high performance liquid chromatography - evaporative light scattering detector) for the detection of soluble carbohydrates needs to be developed and calibrated. Also, the treatment with HHP and enzymes (*Ultraflo*<sup>®</sup> L y *Viscozyme*<sup>®</sup> L) needs to be optimized to reduce the industrial cost of the process.

## **Results**

*Chapter 1: Development and validation of a new HPLC-ELSD method to monitor the release of soluble fibre from Okara treated with HHP and hydrolytic enzymes.*

According to the response surface methodology (RSM), optimal parameters for the ELSD were: 89 °C evaporator temperature, 78 °C nebulizer temperature and 1.1 standard litres per minute nitrogen flow rate. The best mobile phase was ammonium acetate, 0.01 mol L<sup>-1</sup>. A good linearity ( $R^2 > 0.998$ ) and sensitivity were obtained, and detection and quantification limits were low. The logarithmic calibration curves allowed the quantification and identification of carbohydrates with a wide range of molecular weight.

*Chapter 2: Treatment of Okara by high hydrostatic pressure and specific enzymes to improve the solubility of the dietary fibre: treatment optimization and potentially functional effects.*

Treatment conditions were optimized to minimize the cost of the process. Thus, a 1:40 enzyme/Okara (v/w) ratio could hydrolyse Okara under simple conditions (pH 7, 37 °C and atmospheric pressure). The enzymes *Ultraflo*<sup>®</sup> L and *Viscozyme*<sup>®</sup> L increased their activity when they were under HHP, so a synergy between treatments was observed. 600 MPa, for 30 min and 1:40 *Ultraflo*<sup>®</sup> L / Okara was the most effective treatment to release carbohydrates from Okara. In these conditions, concentration of soluble carbohydrates was twice higher than initial values, with smaller molecular weight, as measured by the previously optimized HPLC-ELSD method. This suggested treatment could be industrially implemented to produce an Okara ingredient with an improved nutritional value.

## *Abstract*

*Chapter 3: Analysis of the beneficial health and prebiotic effects of the HHP and enzymes treated Okara by in vitro and in vivo experiments.*

Okara treated by HHP and *Ultraflo*<sup>®</sup> L had a higher potential prebiotic effect than non-treated Okara, as it promoted the growth of beneficial bacteria (*Bifidobacterium* and *Lactobacillus*), inhibited potentially harmful bacteria and produced more SCFA in an *in vitro* experiment. Therefore, HHP combined with *Ultraflo*<sup>®</sup> L treatment of Okara improved its functionality. In rats fed a high fat diet, treated Okara was able to reduce weight gain and triglyceride levels in the blood, as well as to increase mineral absorption and improve prebiotic status, as it promoted the production of SCFA. Moreover, Okara had a protective effect preventing the deleterious changes in the microbiota caused by a high-fat diet.

## **Conclusions**

*Development and validation of a new HPLC-ELSD method to monitor the release of soluble fibre from Okara treated with HHP and hydrolytic enzymes.*

1. An ELSD detector can analyse carbohydrates with a wide range of molecular weights (0.15 - 500 kDa), achieving a good sensitivity and precision.
2. The HPLC-ELSD method identifies and quantifies the carbohydrates from Okara and detects changes when the HHP and enzymatic treatment is applied. This method is more sensitive and faster than the official AOAC method for dietary fibre determination.

*Treatment of Okara by high hydrostatic pressure and specific enzymes to improve the solubility of the dietary fibre: treatment optimization and potentially functional effects.*

### *Abstract*

1. Food-grade enzymes *Ultraflo*<sup>®</sup> L and *Viscozyme*<sup>®</sup> L applied in low concentration and conditions for an easy industrial application are able to release soluble carbohydrates from Okara.
2. Simultaneous treatment of Okara with HHP and enzymes (600 MPa, 1:40 enzyme/Okara and 30 min) results in a 2-times higher content of soluble carbohydrates with smaller MW than in the native Okara, which improves its functionality. There is a synergy between the treatments, as the activity of *Ultraflo*<sup>®</sup> L and *Viscozyme*<sup>®</sup> L is higher under HHP; particularly, *Ultraflo*<sup>®</sup> L.

*Analysis of the beneficial health and prebiotic effects of HHP and enzyme treated Okara by in vitro and in vivo experiments.*

1. The increase in soluble dietary fibre after HHP and *Ultraflo*<sup>®</sup> L treatment enhances the potential prebiotic effect of Okara, as it promotes the growth of beneficial bacteria, *Bifidobacterium* and *Lactobacillus*, inhibits potentially harmful bacteria and produces more SCFA than native Okara *in vitro*.
2. The supplementation with 20 % Okara treated by HHP and *Ultraflo*<sup>®</sup> L to rats fed a high-fat diet has weight-loss capacities, decreases blood triglycerides and has a beneficial effect on amino acids metabolism.
3. A prebiotic effect of Okara treated by HHP and *Ultraflo*<sup>®</sup> L has been observed, as it increases calcium and magnesium absorption, stimulates the production of SFCA and protects the microbiota against the deleterious changes caused by a high-fat diet.

### **General conclusion**

### *Abstract*

In summary, the optimized HHP and enzymatic treatment increases the soluble dietary fibre of Okara, and it has an easy industrial adaptability. This treatment enhances the prebiotic effect of Okara, which also has beneficial weight-loss and cardiovascular protective effects in rats. Treated Okara could be used as a novel health-promoting and functional ingredient for processed foods.

*Abstract*

# Introducción

## *Introducción*

## **1. Subproductos agroalimentarios**

### *1.1. Pérdida y desperdicio de alimentos*

En un mundo donde 795 millones de personas (10,9 % del total) padecen desnutrición (1), el desperdicio de alimentos se ha convertido en un problema tanto a nivel económico como ambiental, sin olvidarnos de su contradicción moral.

La pérdida de alimentos se refiere a la disminución de la masa comestible en cualquier parte de la cadena de suministro de alimentos para el consumo humano. En el caso de los productos vegetales, esto puede suceder a distintos niveles: en la producción (cosecha); en la post-cosecha; en el almacenamiento y distribución; en el tratamiento, en el que se incluyen fallos en la cadena de procesado, descarte de alimentos que no son adecuados y pérdidas debidas a la misma técnica de procesado; así como en la distribución y en el consumo (2, 3). Algunos autores también distinguen entre residuos, pérdidas de alimentos y generación de subproductos o coproductos (con escaso o nulo valor comercial) (4), mientras que otros, en cambio, hacen énfasis en la inclusión de los subproductos en la categoría de desperdicio alimentario (5). Esta falta de consenso hace que sea necesario que se unifiquen los criterios sobre lo que se considera la pérdida de alimentos y poder tener unas estadísticas fiables que permitan tomar medidas (6). De hecho, la mayoría de los informes se centran en el desperdicio que sucede en los supermercados, hostelería y hogares, y no en la cadena de producción (3).

Se considera que un tercio de los alimentos comestibles se pierden, lo que supone 1.300 millones de toneladas al año en el mundo (2) y 88 millones en Europa en 2011 (7). Según datos de 2012, el desperdicio de alimentos se produce en los hogares

## *Introducción*

(53 %), seguido del procesamiento (19 %) y de la producción (11 %) (7, 8). Además de la generación de desperdicios, con su consiguiente producción de metano, hay que considerar que al producirlos se han empleado recursos (tierra, agua, energía) y se han producido emisiones de CO<sub>2</sub> (2, 3, 6), por lo que el gasto energético es aún mayor y hace que tomar medidas para frenar este desperdicio sea muy necesario.

### *1.1.1. Política contra el desperdicio*

Se estima que el desperdicio de alimentos se incrementará en el futuro, llegando a las 126 millones de toneladas en 2020 en Europa, lo que resultaría en un aumento del 40 % en las emisiones de CO<sub>2</sub> (6) si no se toman medidas de prevención. Esto estará causado por un aumento de la población y por cambios socioeconómicos, como una mayor oferta de alimentos o un mayor número de hogares unipersonales.

Las medidas para frenar el desperdicio de alimentos se centran en la prevención de la generación de residuos, su reutilización, recuperación y reciclaje. En los residuos restantes, se propone la recuperación de la energía, mediante producción de biocombustibles, compost o calor mediante su incineración, siendo la última opción, la retirada en los vertederos. Esto se resume en la pirámide jerárquica que ha adoptado la Unión Europea (UE) (prevención, reutilización, reciclaje, recuperación de la energía y vertido), aunque recientemente se ha sugerido adoptar un círculo de medidas interrelacionadas (6, 9). El objetivo de todas las políticas adoptadas es reducir el desperdicio de alimentos hasta llegar a una sociedad con “desperdicio cero”, donde los subproductos de unas empresas sirvan como materias primas para otras, estableciéndose una simbiosis industrial (10-12). Esto se ha denominado economía circular o ecología industrial, y considera al sistema industrial como un ecosistema cerrado, que da lugar a

## Introducción

una economía sostenible y sin desperdicios (10). La Unión Europea, dentro de sus políticas de sostenibilidad, ha establecido una serie de medidas y metas para ajustarse a este modelo de economía circular en 2030 (13).

### 1.1.2. ¿Residuo o subproducto?

Como se ha mencionado, en la mayoría de informes no se diferencia entre los subproductos y los residuos alimentarios. Sin embargo, según la ley 22/2011 de 28 de julio de residuos y suelos contaminados, un subproducto se define como:

*“Subproducto: Una sustancia u objeto, resultante de un proceso de producción, cuya finalidad primaria no sea la producción de esa sustancia u objeto.”*

Por lo tanto, para que un subproducto no se considere residuo, es necesario que sea utilizado en un proceso posterior, ya sea directamente o después de un proceso de transformación o valorización (14). Este término se podría definir como:

*“Valorización: cualquier operación cuyo resultado principal sea que el residuo sirva a una finalidad útil al sustituir a otros materiales, que de otro modo se habrían utilizado para cumplir una función particular.”*

De esta forma, un mismo residuo alimentario puede ser considerado como subproducto o desperdicio según vaya a ser utilizado con posterioridad o no. Actualmente, desde la UE se está poniendo mucho interés en estos temas, de hecho el séptimo programa general de acción de la UE en medioambiente hasta 2020 (Horizonte 2020) se llama “Vivir bien, respetando los límites de nuestro planeta” (6, 9, 10).

## *1.2. Usos y revalorización de subproductos*

Los subproductos se pueden reutilizar para dar lugar a nuevos productos o para extraer compuestos funcionales o nutricionalmente interesantes. Aunque existen subproductos animales, como el suero de la leche, de donde se extraen proteínas y lactosa, hay un mayor interés en recuperar y reutilizar los de origen vegetal, debido a su mayor contenido en compuestos funcionales. Además, se genera más cantidad de subproductos vegetales y al desecharlos, pueden provocar un mayor impacto ambiental (15, 16). Se mencionan a continuación algunos usos que se puede dar a los subproductos vegetales.

### *Alimentación animal*

Utilizar subproductos vegetales como pienso para el ganado es beneficioso desde el punto de vista económico, ya que normalmente se trata de productos muy baratos, que solo necesitan un tratamiento previo simple. Además, suelen contener carbohidratos fermentables, azúcar y algunos, como los derivados de soja, tienen un alto contenido en proteína. El problema que suelen presentar los subproductos es la alta prevalencia de antinutrientes, como inhibidores de proteasas, ácido fítico o hemaglutininas, aunque existen técnicas para minimizar su efecto. Asimismo, los rumiantes toleran bien estos compuestos, por lo que se podrían usar para ellos (17).

### *Producción de bioenergía*

Los residuos o subproductos se pueden utilizar para producir energías alternativas a las fósiles. Los residuos vegetales se podrían usar sin que exista un

## *Introducción*

problema de competición entre los cultivos para su uso en biorrefinerías y en alimentación. Los subproductos pueden ser la materia prima para la producción de biocombustibles (mediante transesterificación), bioalcohol (mediante fermentación), biogás (mediante fermentación anaeróbica) o pueden ser quemados para producir energía en forma de calor (4, 10).

### *Producción de biomateriales*

También se pueden usar los subproductos para fabricar biopolímeros que reemplacen a los plásticos. Estos nuevos materiales serían más fácilmente degradables, por lo que tendrían un impacto medioambiental positivo (4, 10).

### *Recuperación de compuestos funcionales*

Los subproductos vegetales pueden ser una fuente de compuestos saludables. Muchos de ellos son ricos en fibra alimentaria, que puede ser soluble o insoluble, además de polifenoles o vitaminas. Se han estudiado subproductos de frutas, como las pieles de naranja, pomelo, lima, pulpa de manzana (subproducto de la producción de sidra), cáscaras de mango y piña. Los subproductos de espárragos, tomates y alcachofas son fuentes de pectinas, fibra, licopeno, flavonoides, etc. Los subproductos de cereales, por otra parte, son una buena fuente de fibra. Los salvados de arroz y de trigo, así como los subproductos de la cebada y la avena han mostrado un efecto beneficioso para la salud intestinal (10, 11, 15, 18, 19).

## *Introducción*

### *1.2.1. Tecnologías para revalorizar subproductos*

Los subproductos suelen necesitar un tratamiento previo a su utilización que los valore. Estos tratamientos permiten, bien reutilizar el subproducto completo como ingrediente o extraer compuestos funcionales entre los que se incluyen los prebióticos y antioxidantes. En general, se distinguen tratamientos químicos, enzimáticos y físicos.

#### *1.2.1.1. Tratamientos enzimáticos*

Tradicionalmente, se han empleado tratamientos enzimáticos para obtener oligosacáridos con potencial efecto prebiótico a partir de los subproductos vegetales (20-22). Además, otro efecto interesante es que permiten convertir la fibra insoluble en soluble, que tiene unos efectos más beneficiosos sobre la salud como se explica en el apartado 2 de esta introducción (23-25). Entre las enzimas que se utilizan, las pectinasas, celulasas o hemicelulasas, pueden hidrolizar la pared celular vegetal de los subproductos y permitir la liberación de polisacáridos u oligosacáridos, así como de otros compuestos interesantes como pigmentos o antioxidantes (26, 27). Concretamente, el tratamiento enzimático se ha utilizado para producir xilooligosacáridos a partir de subproductos de fruta (20), mananos de bajo peso molecular (PM) procedentes de café (28) y pectinas de bajo PM provenientes de bergamota (11, 29, 30). Otros autores han utilizado celulasas de caracol para obtener un producto rico en fibra soluble (FS) a partir de pulpa de zanahoria (31) y celulasas para obtener oligosacáridos a partir de salvado de arroz (32). Los métodos que utilizan enzimas tienen la ventaja de ser rápidos y de no necesitar grandes volúmenes de disolventes, por lo que son considerados métodos ecológicos. Por otra parte, las enzimas suelen ser caras, lo que aumentaría el coste de los procesos industriales que impliquen un gran volumen de sustrato. Además, este

## *Introducción*

escalado industrial puede resultar complicado. Al mismo tiempo, las enzimas disponibles no son capaces de hidrolizar completamente las paredes celulares vegetales, limitando los resultados si se utilizan solamente enzimas en el tratamiento de los subproductos (26, 33). Por ello, estos substratos podrían tratarse mediante procesos combinados de enzimas y tratamientos químicos o físicos (21).

### *1.2.1.2. Tratamientos químicos*

Los tratamientos químicos son fáciles de aplicar en subproductos, por lo que son ampliamente utilizados (26, 34). Por ejemplo, la acetona mezclada con agua se ha usado para extraer antioxidantes (35) y los disolventes orgánicos para extraer compuestos lipofílicos y fenoles (26, 36). La obtención de xilooligosacáridos a partir de subproductos de arroz también es más efectiva si previamente se tratan con acetato de etilo (37). Además, los fragmentos de pectinas obtenidos de los cítricos tras tratamientos químicos y enzimáticos tienen efectos en la prevención del cáncer (38).

### *1.2.1.3. Tratamientos físicos*

En el caso de la reutilización del subproducto completo, se suelen emplear tratamientos térmicos, ya que se pretende prolongar su vida útil. Entre los tratamientos térmicos más utilizados están la pasteurización, la esterilización, el secado o la congelación (15, 39-41). A pesar de ser ampliamente utilizados, estos tratamientos causan cambios no deseables en el contenido nutricional del producto final, como la degradación de vitaminas termolábiles y en las características sensoriales, como cambios de sabor, color y textura. El resultado es un producto que no tiene apariencia de fresco y puede ser rechazado por los consumidores (42). Otros tratamientos físicos,

## *Introducción*

como la radiación ultravioleta, los ultrasonidos y las altas presiones hidrostáticas (APH) permiten la conservación de alimentos y no requieren aplicación de calor (43). Por ejemplo, la radiación ultravioleta aplicada a zumos de frutas inactiva los microorganismos, pero puede conllevar cambios no deseables, como el deterioro de la calidad nutricional y antioxidante del producto (44, 45).

Otras tecnologías permiten la extracción de compuestos interesantes a partir de subproductos, como los pulsos eléctricos de alta intensidad, microondas, ultrasonidos, luz ultravioleta, fluidos supercríticos y APH (27, 46-48). Por ejemplo, los pulsos eléctricos, que generan poros en las membranas celulares, se han empleado para mejorar la extracción de aceites vegetales, incluido el de oliva y soja, así como para extraer polifenoles de subproductos de aceitunas (41). Asimismo, la tecnología microondas ha sido utilizada para la extracción de polisacáridos solubles de cerezas y kiwis, mientras que los ultrasonidos se han empleado en combinación con las APH para recuperar compuestos fenólicos a partir de orujos de uva y aceitunas (26, 49, 50). La aplicación de los fluidos supercríticos, que consiste en aplicar a una sustancia altas presiones y temperatura hasta que se comporta como un híbrido entre líquido y gas, también se ha utilizado en la extracción de compuestos bioactivos, como licopeno a partir de subproductos de tomate (45, 51). También ha aumentado el interés por los procesos autohidrolíticos, en los que se tratan los sustratos con altas temperaturas y presión para producir oligosacáridos a partir de polisacáridos. Esta técnica se ha utilizado para obtener oligosacáridos (mananos) a partir de madera de pino, xilooligosacáridos a partir de racimos de palma y oligosacáridos de la cáscara de arroz (37, 52, 53). No obstante, esta técnica sigue utilizando temperaturas altas, que como se ha indicado, tienen consecuencias indeseables. La micronización es otro tratamiento físico con el que se consigue disminuir el tamaño de las partículas del sustrato, mejorando las capacidades

## *Introducción*

físico-químicas (como capacidad de hinchamiento y la retención de agua), así como las capacidades hipoglicémicas de las fibras insolubles, al aumentar la superficie del sustrato por unidad de masa (54-56). Por ejemplo, en zanahoria micronizada se han visto efectos positivos en los parámetros físico-químicos de la fibra (55, 57). Algunas de las técnicas sirven tanto para conservar alimentos como para extraer compuestos, como las APH, por lo que son muy interesantes para la revalorización de subproductos (27, 48, 58-61).

### *Altas presiones hidrostáticas*

La aplicación de las altas presiones a la industria alimentaria comenzó a partir de la adaptación de un proceso similar usado en la industria cerámica. La técnica se basa en someter al alimento a presiones de entre 100 a 900 MPa (la presión atmosférica es de 0,1 MPa), aunque lo normal es utilizar 400 – 700 MPa. Para ello, el producto a tratar se coloca en una cámara en la que un líquido transmisor, que normalmente es agua, se comprime. La temperatura no varía y la presión se ejerce en todas las direcciones. Por ello, el tratamiento es efectivo sea cual sea el tamaño y forma del alimento (62-64). Las altas presiones hidrostáticas no afectan a las características nutricionales ni sensoriales del alimento, pero inactivan patógenos y enzimas que causan la degradación de los productos (63). Esta es la gran ventaja de las APH frente a otros métodos de conservación, además de ser una técnica respetuosa con el medioambiente.

Los primeros alimentos tratados con APH para prolongar la vida útil que se introdujeron en el mercado fueron gelatinas y salsas en Japón en 1990. Más tarde, se aplicaron las altas presiones a frutas, zumos, calamares, guacamole, ostras y carne (65). La principal desventaja de las altas presiones es la alta inversión inicial, ya que la

## *Introducción*

maquinaria industrial puede costar entre 0,5 y 4 millones de euros (59). No obstante, el coste descenderá con el aumento de la demanda y la mejora de los equipos. Una vez superada esta inversión inicial, el coste energético del proceso es más bajo que el procesado térmico de los alimentos, ya que cuando se alcanza la presión necesaria en el equipo, ésta se mantiene sin necesidad de nuevos aportes de energía (45, 64, 66). El coste de aplicar las altas presiones a los alimentos es de 7 a 46 céntimos de euro por kilo, dependiendo de los parámetros aplicados (65, 67). Por ello, a largo plazo las APH pueden resultar más económicas que los procesados tradicionales. Además, no hay que olvidar el mayor valor añadido de los productos tratados con APH gracias a que las características sensoriales permanecen similares al producto fresco y esto permite obtener una ganancia superior a la de los alimentos tratados térmicamente (59).

La tecnología APH inactiva la población microbiana gracias a los daños que ocasiona en las células, pero mantiene intactos los compuestos de menor tamaño como las vitaminas o aminoácidos (43). Esto sucede porque no rompe los enlaces covalentes, lo que ocurre con el tratamiento térmico, sino los enlaces iónicos, puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas, manteniendo intactas las estructuras primarias de proteínas y ácidos grasos (43, 64). La pared celular de los microorganismos es susceptible de sufrir daños con las APH, siendo las bacterias Gram + más resistentes que las Gram - (68), debido probablemente a la acción protectora de los peptidoglicanos de la pared celular de las Gram +, ya que la acción de las APH se centra en la membrana celular, causando poros que hacen que el citoplasma salga de la célula. Además, los microorganismos resistentes a la presión tienen más insaturaciones en su membrana (64). Por otra parte, se ha comprobado que las esporas, en especial endoesporas de *Clostridium botulinum* y *C. perfringens* son resistentes a las altas presiones, aunque cuando las APH se aplican en forma de ciclos intermitentes, se pueden inactivar, ya que

## *Introducción*

se promueve la germinación de las esporas en los primeros ciclos, eliminándose las bacterias en los siguientes (69, 70). El tratamiento mediante APH también es capaz de inactivar a los virus, aunque algunos son resistentes, como el virus de la Hepatitis A, que requiere presiones superiores a 400 MPa durante 5 minutos para inactivarse (71).

Cuando las enzimas se someten a APH, se pueden obtener diferentes resultados, dependiendo de la enzima, el sustrato, la presión y el tiempo de procesado. Normalmente, las enzimas se inactivan mediante las APH, como las pectinesterasas, que tienen efectos negativos en los zumos de naranja (72). No obstante, algunas enzimas mejoran su actividad, como las polifenoloxidasas, que causan pardeamiento y tienen que ser inactivadas mediante un pretratamiento térmico e incrementando la presión (73). Las hidrolasas, como las  $\alpha$ -y  $\beta$ -amilasas, también incrementan su actividad a 400 - 600 MPa, aunque se inactivan cuando se someten a más de 600 MPa durante 20 min. Las  $\beta$ -glucanasas se estabilizan gracias a las altas presiones, evitándose su inactivación posterior por altas temperaturas (63, 74). Se ha sugerido que este aumento de la actividad enzimática es causada por un cambio conformacional del centro activo de la enzima (62, 75, 76). La presión también podría alterar el mecanismo de acción enzimático, por ejemplo, cambiando la etapa limitante de la reacción o modificando el sustrato de forma que sean accesibles nuevos puntos de corte (67, 73, 77, 78). No obstante, no existe mucha bibliografía sobre este aspecto.

Cuando se usan las APH como método de extracción, se acortan los tiempos de tratamiento y se mejora la eficiencia del proceso (48). Esta tecnología se ha usado para extraer licopeno de un subproducto de tomate (79), catequinas de té verde (80) o antocianinas de piel de uva (61). Además, la tecnología APH está reconocida por la

## *Introducción*

FDA (Food and Drug Administration) como un método de extracción ecológico, ya que como se ha apuntado, no utiliza disolventes (81).

En bebida de soja, se ha comprobado que la tecnología APH es una alternativa viable al tratamiento térmico, que afecta negativamente a los atributos sensoriales y nutricionales. Además, la concentración de isoflavonas aumenta cuando previamente se trata la soja con APH (82). En relación a la proteína de soja y al tofu, las APH mejoran la capacidad de retención de agua y de emulsión, así como la solubilidad a presiones bajas, aunque disminuye al aumentar la presión (66, 83-85). También provocan la desnaturalización de la proteína glicinina de la soja en subunidades (86). A pesar de estos cambios, en general, las propiedades viscoelásticas de la soja se ven más afectadas por la temperatura que por la presión (87). En cuanto a la conservación, se ha comprobado que en tofu, las APH consiguen inactivar los microorganismos y reducir la contaminación secundaria durante el procesamiento de los alimentos, además de maximizar su efecto prebiótico en ratas (88).



Ilustración 1: Equipo de APH industrial (89).

## 2. Fibra y efecto prebiótico

Los subproductos agroalimentarios son una fuente de compuestos funcionales entre los que destaca la fibra alimentaria (15), que conlleva una serie de beneficios para la salud.

Existen numerosas definiciones de lo que se considera fibra. Algunas solo describen su procedencia a partir de las paredes celulares vegetales, mientras que otras incluyen conceptos como la fibra cruda (celulosa, hemicelulosa y lignina) o su carácter indigerible (23). El concepto de fibra también ha evolucionado de forma paralela al desarrollo de la metodología para su análisis.

La definición actual del Codex Alimentarius es (23, 90):

*“Fibra alimentaria: polímeros de carbohidratos con diez o más unidades monoméricas que no son hidrolizados por las enzimas digestivas intestinales y que pueden ser: 1) polímeros de carbohidratos comestibles que se encuentran naturalmente en el alimento; 2) polímeros de carbohidratos obtenidos de alimentos mediante tratamiento físico, enzimático o químico y que han demostrado tener efectos fisiológicos beneficiosos para la salud aceptados por una autoridad competente; 3) polímeros de carbohidratos sintéticos que han demostrado tener efectos fisiológicos beneficiosos para la salud aceptados por una autoridad competente.”*

No obstante, en una actualización posterior se permitió la ampliación a los carbohidratos de entre 3 y 9 monosacáridos para incluir también a los oligosacáridos no digeribles (90).

## Introducción

En Europa, la definición de la fibra aprobada en 2010 por la EFSA (European Food and Safety Authority) es (91):

*“Fibra alimentaria: Carbohidratos no digeribles y lignina. Las clases principales de fibra son los polisacáridos no-almidón, celulosa, hemicelulosa, pectinas, hidrocoloides (gomas y mucílagos), oligosacáridos resistentes, fructooligosacáridos, galactooligosacáridos, almidón resistente y lignina asociada a polisacáridos.”*

### 2.1. Clasificación de la fibra

Actualmente, las clasificaciones de la fibra están desaconsejadas, ya que los límites entre categorías han demostrado ser difusos (92). No obstante, la mayor parte de los autores y las técnicas de cuantificación oficial, como las de la AOAC (Association of Official Analytical Chemists), distinguen entre varios tipos de fibra, debido a sus efectos sobre la salud diferenciados y a que la cuantificación se realiza de acuerdo a esta clasificación. Por ello, en este documento se van a seguir utilizando las clasificaciones tradicionales de la fibra.

La clasificación típica de la fibra se basa en su solubilidad en agua (93). La fibra soluble (FS) se hincha en contacto con el agua, formando soluciones viscosas en las que quedan atrapadas algunos componentes de la dieta. Así, aumenta la sensación de saciedad al aumentar el volumen en el estómago y se evita que parte de los lípidos, incluyendo el colesterol y los ácidos biliares o incluso la glucosa de la dieta se absorban. Además la fermentabilidad de la fibra soluble por las bacterias del colon es mayor que la de la insoluble (94). Por otra parte, la fibra insoluble (FI) aumenta el

## *Introducción*

volumen de las heces, evitando el estreñimiento y acortando el tiempo de contacto del epitelio del colon con los posibles agentes teratogénicos del bolo fecal (93, 95, 96).

Otra clasificación sería la de fibra viscosa o no viscosa, y fermentable o poco fermentable. Normalmente la fibra soluble es viscosa y altamente fermentable, mientras que la insoluble no es viscosa ni muy fermentable. No obstante, hay fibras solubles que no son viscosas, ni tienen un efecto en la disminución del colesterol y aumentan el volumen de las heces, así como fibras insolubles que son fermentadas por las bacterias del colon, como algunos tipos de pectinas insolubles (92, 97).

Por todo ello, otra clasificación incluye el término “fibra funcional” (97):

*“Fibra funcional: carbohidratos no digeribles que tienen un efecto fisiológico beneficioso en los seres humanos.”*

Un ingrediente funcional podría definirse como (98, 99):

*“Ingrediente funcional: un alimento que ha probado tener un efecto beneficioso en las funciones fisiológicas, además de su efecto nutricional, siendo relevantes para mejorar la salud humana.”*

Figura 1: Clasificación de la fibra.

Fibra		
Fibra soluble		Fibra insoluble
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Pectinas</b> Polisacárido intercelular de la pared celular Ácido D-galacturónico enlace <math>\alpha</math>-1, 4 ramificado con ramnosa y arabinosa Fermentable Vegetales, frutas, legumbres</li> <li>• <b>Gomas y mucílagos</b> Polisacáridos secretados por plantas Ramificados, con galactomanano, arabinogalactano y glicoproteínas Forman geles Legumbres, vegetales</li> <li>• <b>Fructooligosacáridos e inulina</b> D-fructosa, enlaces <math>\beta</math>-2, 1 con glucosa terminal 3-5 unidades: fructooligosacárido. Hasta 60: inulina <u>Prebióticos</u>, bifidogénicos Se pueden obtener FOS por transglicosilación de sacarosa o hidrólisis enzimática En achicoria, cebolla, ajo, tomate, plátano</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b><math>\beta</math>-Galactooligosacáridos</b> Galactosa, enlaces <math>\beta</math>-1, 6 y <math>\beta</math>-1, 4 Se pueden producir a partir de lactosa con <math>\beta</math>-galactosidasas <u>Prebióticos</u> En leche fermentada y leche materna</li> <li>• <b><math>\alpha</math>-Galactooligosacáridos</b> Una molécula de sacarosa unida a galactosas Rafinosa, estaquiosa y verbascosa En legumbres, como la soja <u>Prebióticos emergentes</u></li> <li>• <b><math>\beta</math>-Glucanos</b> Glucosa, enlaces <math>\beta</math> glucosídicos Fermentables Avena, cebada</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Celulosa</b> Polisacárido de la pared celular Polisacárido lineal largo de <math>\beta</math>-1, 4-glucosa Vegetales</li> <li>• <b>Hemicelulosa</b> Polisacárido de la pared celular Glucosa, enlaces <math>\beta</math>-1, 4 glucosídicos Ramificado con xilosa, galactosa, manosa, arabinosa, ácido glucurónico Cereales</li> <li>• <b>Almidón resistente</b> Almidón no digerible Glucosa, enlaces <math>\alpha</math>-1, 4, <math>\alpha</math>-1, 6 Amilosa y amilopectina Cereales, legumbres, patatas, arroz</li> <li>• <b>Lignina</b> Polímero de fenilpropano Totalmente resistente Vegetales</li> </ul>

Corzo 2015, Gibson 2004, Gibson 2010 y Rastall 2002 (100-103).

## 2.2. Efecto prebiótico de la fibra

Los primeros en establecer una relación entre la ingesta de fibra y la salud gastrointestinal, incluida la aparición de tumores intestinales, fueron Burkitt *et al.*, en 1974 (104). Desde entonces, se ha vinculado un consumo elevado de fibra con un mejor estado de salud y una menor aparición de las enfermedades típicas de Occidente (93). El efecto prebiótico de la fibra es el responsable de numerosos de estos efectos beneficiosos para la salud. La definición actual de prebiótico es (101):

## Introducción

“Prebiótico: ingrediente selectivamente fermentable que permite que se den cambios específicos en la composición y/o en la actividad de la microbiota gastrointestinal que confiere beneficios sobre el bienestar y salud del hospedador.”

Por lo tanto, para que un alimento sea considerado prebiótico, debe cumplir tres condiciones (102):

- ✓ Resistir la acidez gástrica y la hidrólisis por las enzimas digestivas, así como la absorción en el tracto gastrointestinal
- ✓ Poder ser fermentado por las bacterias intestinales
- ✓ Estimular selectivamente el crecimiento o la actividad de bacterias intestinales asociadas a un efecto saludable y de bienestar

Como se puede observar, en esta definición no se especifica que los compuestos deban ser carbohidratos. De hecho, cualquier compuesto de la dieta que no sea digerible sería un candidato a prebiótico. Esto incluye también a las proteínas o lípidos resistentes. No obstante, los compuestos que pueden ser fermentados selectivamente por bacterias beneficiosas son principalmente carbohidratos, en especial, oligosacáridos (102, 105, 106). Aun así, se ha visto que algunos péptidos y proteínas de la leche y plantas son parcialmente indigeribles y tienen efectos beneficiosos en la absorción de calcio y hierro, así como en el sistema inmunitario (101, 107).

### 2.2.1. Microbiota intestinal

Las bacterias del tracto gastrointestinal cambian a lo largo del mismo. Las paredes del estómago están colonizadas por *Lactobacillus* o *Enterococcus* (106, 108), aunque la bacteria más estudiada es *Helicobacter pylori*, relacionada con problemas

## Introducción

gástricos, gastritis y carcinomas (109). En el intestino delgado, las poblaciones bacterianas son diferentes según su localización: en el duodeno, debido a su ambiente ácido (pH 4-5), hay *Lactobacillus* y *Streptococcus*. Después, el pH neutro del yeyuno e íleon, permite que se incorporen las levaduras y *Staphylococcus*. Debido a este cambio de pH, pueden darse infecciones por *Escherichia coli* o *Salmonella* (108). En el intestino grueso se dan las condiciones para que las bacterias puedan aumentar en número, ya que el tiempo de tránsito aumenta, hay nutrientes no digeribles y el pH es cercano a la neutralidad (pH del colon 5,5-7,5) (110). Por otra parte, la mayor parte de los datos sobre la composición bacteriana intestinal se obtienen a partir de muestras fecales, pero se ha visto que no representan totalmente la composición bacteriana de la mucosa intestinal (111). En las muestras fecales humanas, los grupos principales son los *Clostridium*, entre los que se encuentran *Ruminococcus obeum*, *Eubacterium hallii* y *Faecalibacterium prausnitzii* (112).

Algunas bacterias están asociadas con la formación de toxinas o con la generación de compuestos carcinógenos cuando se convierten en dominantes. Estas bacterias pertenecen a grupos como los *Clostridium* y *Bacteroides*. No obstante, no todas las bacterias de estos géneros son perjudiciales. Éstas, así como las de los géneros *Enterococcus*, *Streptococcus* y *Eubacterium* pueden ser perjudiciales o beneficiosas dependiendo de cada especie (101, 106, 113). Las bacterias dañinas pueden aumentar su número o su actividad gracias a una dieta rica en proteína. Las proteínas y péptidos resistentes presentes en la dieta son fermentados por estas bacterias produciendo metabolitos, como amonio, compuestos fenólicos, indol, ácidos grasos de cadena ramificada y sulfuro de hidrógeno (SH<sub>2</sub>). Todos estos compuestos son perjudiciales para el hospedador (113, 114). Por ejemplo, el amonio estimula el crecimiento de células tumorales (115), mientras que los ácidos grasos ramificados como los ácidos isobutírico

## Introducción

e isovalérico, que se producen por la fermentación de aminoácidos ramificados (valina, isoleucina y leucina), tienen efectos en la absorción de electrolitos y en la resistencia a la insulina (116-121) y el sulfuro de hidrógeno es tan tóxico como el cianuro (122).

Por el contrario, las bacterias beneficiosas fermentan los carbohidratos, la cual es una fermentación energéticamente más favorable que la de las proteínas (123). Estas bacterias pueden inhibir el crecimiento de las perjudiciales, además de producir ácidos grasos de cadena corta (AGCC) y sintetizar vitaminas (101, 106, 113). Muchas de ellas también producen ácido láctico. Las bacterias beneficiosas pertenecen a los géneros *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*. Entre ellas, algunos tipos como *L. acidophilus*, *L. plantarum*, y *B. longum* han demostrado inhibir el desarrollo del cáncer de colon (124). No obstante, se ha propuesto la hipótesis de que mantener una microbiota equilibrada también puede ser la clave para conservar la salud intestinal (106).

### 2.2.2. Ácidos grasos de cadena corta

La microbiota intestinal ha coevolucionado con los hospedadores, que proporcionan un ambiente estable y alimento, mientras que las bacterias producen compuestos beneficiosos, mantienen la funcionalidad del sistema inmunitario, producen nutrientes y vitaminas y ejercen de defensa contra patógenos. Los AGCC producidos por la fermentación de la fibra son los metabolitos responsables de varios de estos efectos beneficiosos en la salud del hospedador (119, 125). Los AGCC principales que se producen por fermentación de la fibra son el ácido acético, propiónico y butírico (107). Los AGCC tienen efectos positivos en la salud, en especial, el ácido butírico, aunque los demás pueden tener efectos similares en menor grado. Los principales efectos de cada AGCC son:

## *Introducción*

- ✓ **Ácido acético:** Se produce a partir de piruvato (126) y es el AGCC más abundante. Se absorbe en el intestino y tiene un efecto reductor del apetito por un mecanismo homeostático a nivel del hipotálamo (127). El ácido acético tiene cierta actividad anticancerígena, aunque no tanta como el ácido butírico (128). Además, cuando se administra ácido acético a ratones, se observa un efecto anti-obesidad y de mejora de la tolerancia a la glucosa (129) y del metabolismo lipídico (130).
- ✓ **Ácido propiónico:** Se produce a partir de succinato, acrilato, fucosa o ramnosa, gracias a diferentes vías metabólicas (119). El ácido propiónico se absorbe y se metaboliza en el hígado, donde puede inhibir la producción de colesterol (97). Al igual que el butírico, este ácido tiene un efecto beneficioso al suprimir la diferenciación de las células dendríticas, evitando los procesos inflamatorios (131). Además, se ha visto que la suplementación de la dieta de mujeres con ácido propiónico, hace que se reduzca la glucosa y aumente la insulina en sangre (132). Por otro lado, al contrario que el butírico, el propiónico disminuye la movilidad del colon, pero aumenta su actividad secretora. Otro efecto beneficioso es que el ácido propiónico es un substrato para la gluconeogénesis hepática (133).
- ✓ **Ácido butírico:** Es el AGCC más estudiado, debido a sus numerosos efectos beneficiosos. Se produce a partir de dos moléculas de acetyl-CoA y posterior reducción, aunque hay bacterias que también pueden usar ácido láctico o incluso proteínas para sintetizarlo (134). El ácido butírico es la fuente de energía preferida por los colonocitos, por lo que se consume en el colon y no llega a absorberse. El ácido butírico ha

## *Introducción*

demostrado tener actividad anticancerígena debido a un efecto epigenético de inhibición de las enzimas que desacetilan las histonas (la acetilación de histonas en la cromatina permite la transcripción de genes) (128). Por ello, el ácido butírico tiene un efecto de prevención del cáncer colorrectal (110, 135-137). Además, beneficia al sistema inmunitario, al regular la diferenciación de linfocitos y suprimir la inflamación y la diferenciación de células dendríticas (tienen un papel en la presentación de los antígenos a los linfocitos T). Esto modula el sistema inmunitario, suprimiéndolo para que no actúe sobre las bacterias beneficiosas del colon (131, 138). Esta modulación también tiene efectos en el síndrome del intestino irritable y en el asma (139-141). Además, el efecto antiinflamatorio también se relaciona con un menor riesgo de cáncer colorrectal, ya que la inflamación crónica es uno de los promotores de este cáncer, además de ser uno de los factores que se relacionan con la obesidad (22, 136, 142, 143). También se ha observado que gracias al butirato, se reduce la permeabilidad intestinal a mediadores inflamatorios, como los lipopolisacáridos bacterianos (22, 144). El butirato afecta al sistema nervioso al aumentar la proporción de sinapsis colinérgicas, lo que hace que se incremente la movilidad intestinal (145). Asimismo, cuando se administra a ratones, tiene un efecto anti-obesidad y termogénico (146).

Todos los AGCC hacen que disminuya el pH del colon, lo que impide el crecimiento de bacterias perjudiciales (147). Además, favorecen el crecimiento de bacterias del género *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, que aunque no producen ácido butírico, promueven el crecimiento de otras bacterias que sí lo sintetizan, como

## *Introducción*

*Eubacterium rectale*, que es la principal productora de ácido butírico en el colon (110), aunque se ha visto que bacterias del género *Ruminococcus* también pueden generarlo (148). Por otra parte, las bifidobacterias son productoras de ácido acético, que también tiene efectos anticancerígenos (128).

Los prebióticos, tienen un efecto beneficioso en la absorción de minerales gracias al aumento de AGCC. En especial, la absorción de calcio aumenta notablemente cuando se agregan los prebióticos de la dieta. Esto produce una mejora en la salud ósea, aumentando la masa de los huesos y evitando la osteoporosis. La deficiencia de calcio asociada a una deficiente mineralización ósea provoca la osteoporosis, que tiene una gran prevalencia, debido al aumento en la esperanza de vida. El aumento de la absorción de calcio puede prevenirla, lo que es muy importante en periodos de crecimiento y en mujeres postmenopáusicas (100). Además del calcio, los prebióticos también mejoran la absorción de otros minerales, como el hierro, magnesio o el zinc (106). Se han propuesto varios mecanismos para explicar este efecto. En primer lugar, los AGCC disminuyen el pH del colon, aumentando la solubilidad del calcio y permitiendo una mayor absorción (149). Los AGCC también pueden influir directamente en la absorción de minerales por la existencia de un mecanismo de intercambio catiónico. También se ha establecido que pueden aumentar la producción de una proteína intracelular transportadora de calcio (calbindina D9K) (150). Además, el ácido butírico promueve el crecimiento celular normal en el intestino, lo cual, unido a un aumento del área de absorción, puede aumentar la incorporación de minerales (105, 106, 151, 152). Por otra parte, el ácido fítico presente en la fibra, en especial en los cereales, contiene grupos fosfóricos que se unen a los cationes e impiden su absorción (96). La microbiota beneficiosa tiene fitasas, que rompen esta unión, permitiendo la fermentación del compuesto y la liberación de los minerales, posibilitando su absorción (105, 153).

## Introducción

Asimismo, aunque los minerales de la dieta se absorben en el intestino delgado, el intestino grueso también tiene esa capacidad. La fibra insoluble puede arrastrar los minerales hasta el intestino grueso, donde al ser parcialmente fermentada, se produciría su liberación, y absorción (105, 141, 154).

No obstante, aunque siempre se han asociado los AGCC con beneficios para la salud, se ha visto que su concentración en las heces de personas obesas se ve aumentada (155). No se conoce si existe una contribución de los AGCC a la obesidad o si solo refleja una alteración en la microbiota debido a la dieta o a la enfermedad (119). Por otra parte, si se produce una ingesta excesiva de prebióticos, se pueden producir molestias intestinales, como diarrea y flatulencias, por lo que es necesario establecer una ingesta adecuada (100).

Tabla 1: Principales prebióticos y sus efectos.

Prebióticos	Efecto	Ref
Inulina	Aumento de <i>Bifidobacterium</i>	(156, 157)
	Descenso de <i>Bacteroides</i> y bacterias Gram +	(158, 159)
	Aumento de la concentración de calcio en los huesos	(160, 161)
	Disminución del peso	(162)
Fructooligosacáridos, FOS	Gran aumento de <i>Bifidobacterium</i> , que prefieren los FOS a la glucosa	(102, 163-165)
	Aumento de <i>Lactobacillus</i>	(166)
	Disminución del número de <i>E. coli</i> y <i>Clostridium</i>	(167)
	Aumento de la concentración de calcio y el volumen de los huesos	(168)
	Frena la ganancia de peso	(169)
Galactooligosacáridos, GOS	Aumento de <i>Bifidobacterium</i> y <i>Lactobacillus</i>	(170)
	Aumento de la concentración de calcio en los huesos	(171)
Lactulosa	Aumento de <i>Bifidobacterium</i> y disminución de <i>Clostridium perfringens</i> , <i>Bacteroides</i> , <i>Streptococcus</i> y <i>Enterobacteriaceae</i>	(172, 173)

## Introducción

### 2.2.3. Nuevos prebióticos

Además de los prebióticos más estudiados (FOS, GOS, inulina), existen otros candidatos a prebióticos, que incluyen: polidextrosa, oligosacáridos de soja, lactosacarosa, isomaltooligosacáridos, glucanos, xilooligosacáridos, mananos, hemicelulosa, almidón resistente, etc. (100, 174).

Asimismo, existe un interés creciente en encontrar ingredientes con propiedades prebióticas o funcionales. Los subproductos de la industria alimentaria, en especial los subproductos vegetales, son una fuente interesante de fibra. Los subproductos, además de ser baratos, pueden ser empleados como ingredientes para conseguir un efecto prebiótico similar al de los prebióticos típicos (FOS, GOS) (21, 22).

Tabla 2: Compuestos candidatos a ser considerados prebióticos y sus efectos.

Candidatos a prebióticos	Efecto	Ref
<u>Oligosacáridos de soja</u>	Rafinosa (trisacárido) y estaquiosa (tetrasacárido) favorecen el crecimiento de <i>Bifidobacterium</i> y <i>Lactobacillus</i>	(175, 176)
	Okara frena la ganancia en peso, disminuye el colesterol, aumenta el ácido butírico y mejora la absorción de calcio	(177)
	Okara frena la ganancia en peso, aumenta la fermentabilidad y la producción de AGCC	(178, 179)
	Okara disminuye el colesterol y triglicéridos	(180)
	Okara tratada enzimáticamente disminuye los triglicéridos y aumenta la producción de AGCC	(181)
$\beta$ -Glucanos	Aumento de <i>Bifidobacterium</i> , aunque también de <i>Clostridium</i>	(182)
Xilooligosacáridos	Aumento de <i>Bifidobacterium</i> y <i>Lactobacillus</i> , disminución de <i>Bacteroides</i>	(183)
	Disminuye la glucosa y el colesterol	(184)
Polidextrosa	Aumento de <i>Bifidobacterium</i>	(185)

### **3. Okara de soja**

#### *3.1. Okara como subproducto*

##### *3.1.1. Subproductos de leguminosas*

Los subproductos vegetales suelen acabar en vertederos, afectando negativamente al medioambiente, ya que sufren una alta biodegradabilidad y emiten gases a la atmósfera (10). Entre los subproductos vegetales, los de las leguminosas son ricos en fibra y proteína. La producción de leguminosas en la Unión Europea ha aumentado en los últimos años, hasta llegar a los 5,3 millones de toneladas en 2014, un 25 % más que en 2013 (8). De lo producido, un 20 % se desperdicia (datos de 2011), aunque en Asia, la pérdida puede llegar al 30 % (2). No obstante, el coste ambiental (huella de carbono) derivado del cultivo de legumbres es bajo, debido a que las plantas son capaces de fijar el nitrógeno del aire, por lo que no necesitan fertilizantes. La fijación del nitrógeno por parte de las leguminosas es esencial para la ecología del planeta y se produce gracias a la simbiosis con rizobios del suelo (186).

Los cultivos de leguminosas más comunes para el consumo humano son las judías, lentejas, guisantes, garbanzos, habas y soja. El procesado industrial de la mayoría solo implica la retirada de la vaina, pero en el caso de la soja, el procesado para producir tofu o bebida de soja es más complejo, dando lugar al subproducto Okara (154, 187).

## Introducción

### 3.1.2. Producción y usos de la soja

La soja, *Glycine max* (L.) Merr., es una legumbre oleaginosa de origen asiático, autógena, que sirve como principal fuente de proteína vegetal a nivel mundial.

En 2014 se produjeron 308 millones de toneladas de soja en el mundo, lo que supone un crecimiento del 27 % desde 2012. El 87,9 % de la producción de soja se realiza en América, principalmente en Estados Unidos, Brasil y Argentina. En la UE, la producción fue de 1,9 millones de toneladas en 2014, con un gran crecimiento (51 %) respecto a 2013. En España, tras caer varios años, la producción de soja ha vuelto a crecer hasta llegar a las 2.700 toneladas en 2014, lo que supone un crecimiento del 90 % respecto a 2013 (8). Sin embargo, en la UE, las importaciones de haba o semilla de soja fueron de 12 millones de toneladas en 2014 (3,5 millones de toneladas en España) y las de harina o torta de soja, de 20 millones de toneladas procedentes, generalmente, de Brasil (188).

En la UE, el cultivo de soja genéticamente modificada no está permitido, aunque su



consumo si lo está. En la práctica, la totalidad de las importaciones de soja en la UE son de variedades modificadas genéticamente, que se utilizan para alimentar al ganado o para obtener aceite de soja para consumo humano (189).

Ilustración 2: Okara de soja fresca.

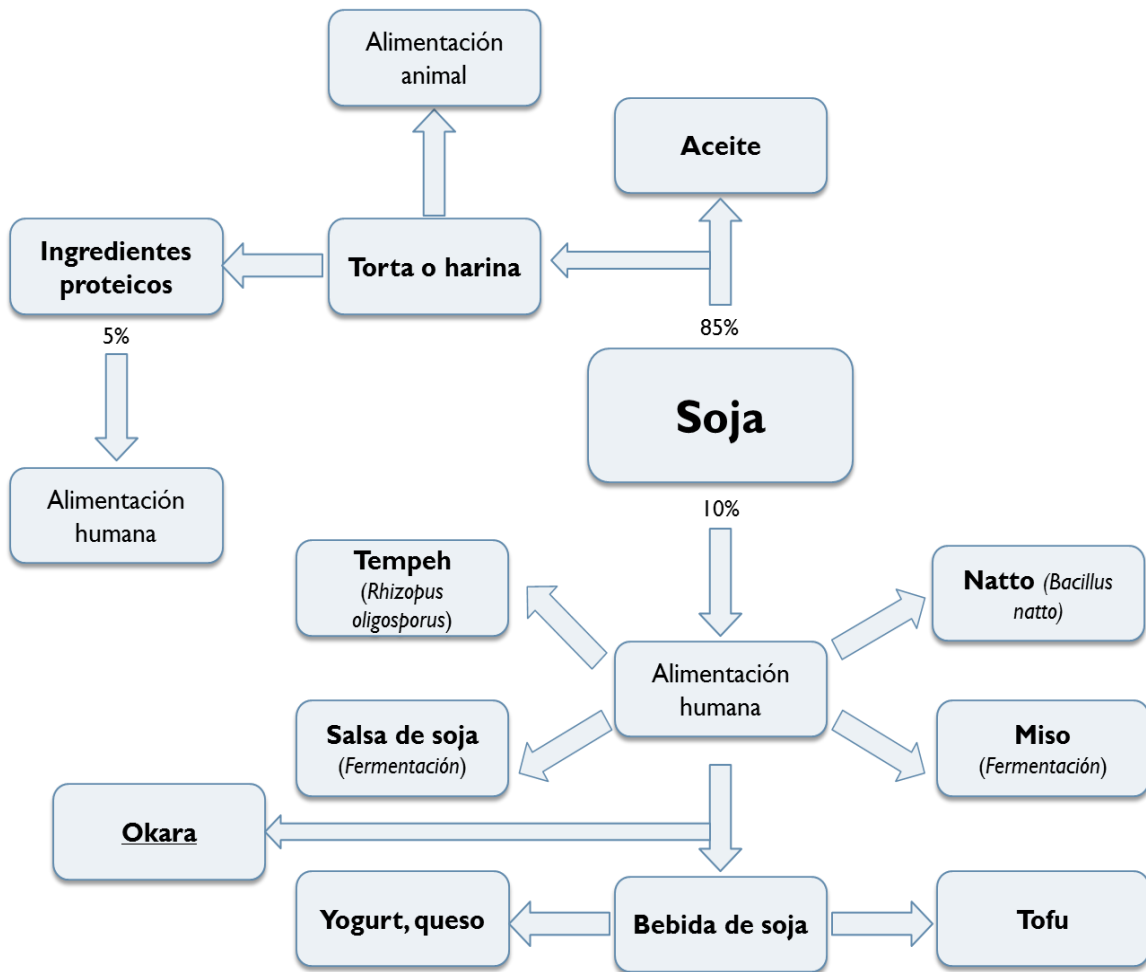
Se considera que el 75 % de la soja que se produce se destina a la alimentación animal, debido a su alto contenido en proteína. Usualmente, el 85 % de las habas de soja

## *Introducción*

se utilizan para extraer el aceite mediante procesos de extracción con hexano o mecánicos, obteniéndose como subproducto, la harina de soja o torta, rica en proteína y que se destina casi exclusivamente a la alimentación animal. El aceite de soja, tras su refinado, se emplea para la alimentación humana, ya sea directamente o como ingrediente en productos de bollería y panadería. Otro uso del aceite de soja es como biocombustible, en jabones, cosmética, etc. Solo el 6 % - 10 % de las habas de soja se destinan al consumo humano, ya sea directamente, o como tofu, bebida de soja, salsa de soja o miso. Adicionalmente, el 4 – 5 % de la harina de soja se destina, tras su transformación, a la fabricación de alimentos (análogos cárnicos, batidos proteicos, barritas energéticas o incluso fórmulas infantiles) (189-192).

Tradicionalmente, en los países asiáticos las habas de soja se han usado para la producción de bebida de soja, tofu o productos fermentados, mientras que en los países occidentales, se solía usar la proteína extraída de soja como ingrediente de otros productos. No obstante, esto está cambiando y en la actualidad, el consumo de soja y alimentos derivados está aumentando en Occidente (178, 191).

Figura 2: Usos de la soja.



Riaz, 2006 (191).

### 3.1.3. Okara, subproducto de la soja

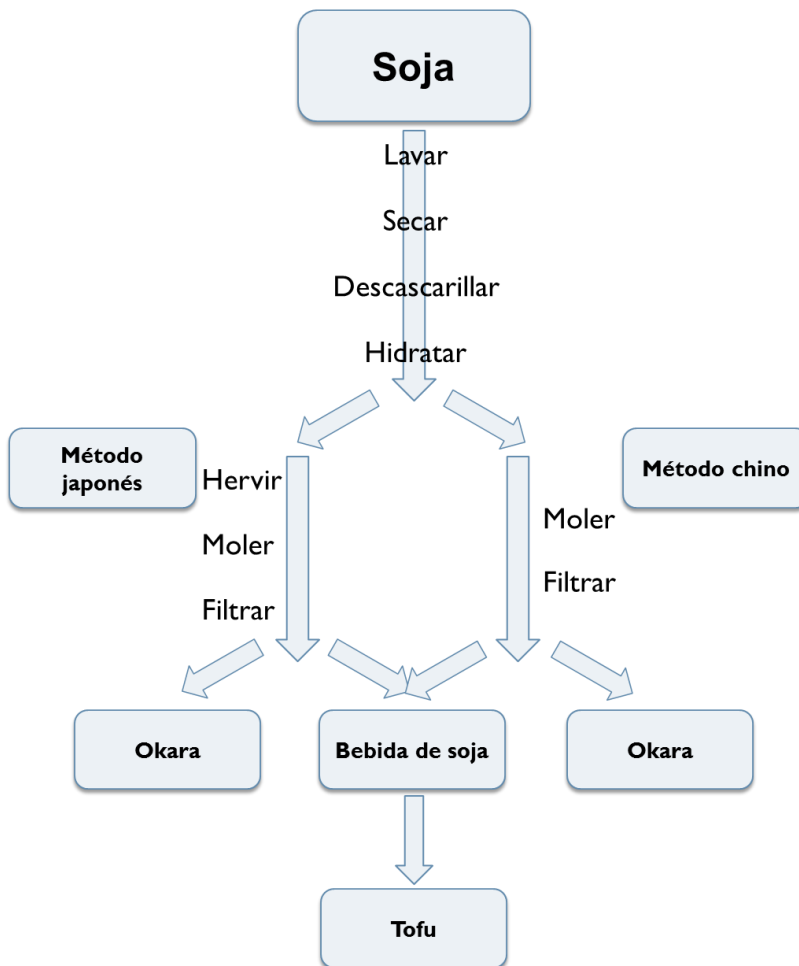
La Okara es el subproducto que queda de las habas de soja tras extraer la fracción soluble para la producción de bebida de soja o tofu. Existen diferentes métodos de producción. En el método chino, la soja se remoja, se muele y se filtra la bebida de soja, mientras que en el japonés, la soja hidratada se cuece antes de moler y filtrar. A partir de ambos métodos, se obtiene una gran cantidad de Okara (193). Existe otro método de producción de la bebida, el “Illinois”, en el cual no se produce Okara, ya que la soja se homogeniza completamente, aunque las características organolépticas

## Introducción

resultantes no son buenas y no se emplea industrialmente (194, 195). La Okara obtenida tiene color crema, un sabor y textura suaves, que posibilitaría su uso como ingrediente de nuevos productos alimentarios o cosméticos.

En peso húmedo, 1-1,8 kg de Okara se producen por cada kg de soja, por lo que se pueden producir varias toneladas de Okara al día en la industria. Se estima que se producen unas 800.000 toneladas de Okara al año en Japón, 2.800.000 en China o 310.000 en Corea (181, 193, 196).

Figura 3: Elaboración de Okara a partir de haba de soja.



Riaz, 2006 (191).

## *Introducción*

### *3.1.4. Composición de la Okara*

La Okara tiene un contenido de agua del 80 % aproximadamente. Al haber extraído los componentes solubles de la soja, que pasan a estar presentes en la bebida de soja o tofu, la Okara es prácticamente insoluble, rica en fibra insoluble, FI (50 %) y pobre en fibra soluble, FS (5 %). En comparación con la composición de la soja, el contenido de carbohidratos, proteína y grasa de la Okara se ve disminuido, pero el contenido en fibra aumenta hasta llegar al doble que el de la soja. Los carbohidratos indigeribles de Okara provienen de su pared celular, habiéndose identificado celulosa, pectina, hemicelulosa, galactano, xilano y xiloglucano (197, 198). La Okara tiene un contenido alto en proteína (en torno al 30 %), con un perfil de aminoácidos completo para el consumo humano y fácilmente digerible, entre las que se encuentran proteínas de almacenamiento (glicinina,  $\beta$ -conglucina y albúmina), enzimas (lipogénica y catalasa), inhibidores enzimáticos, proteínas glicosiladas y otros péptidos (191, 199). Además, contiene un 10 % de grasas insaturadas, principalmente ácido linoleico y alfa-linoleico (187). Por otra parte, la Okara contiene isoflavonas de soja (genisteína, daidzeína y glicitina) en baja concentración, ya que al ser solubles, quedan en la bebida de soja o tofu. No obstante, se ha comprobado que una parte de las isoflavonas queda retenida en la matriz de fibra insoluble de la Okara (82). La Okara también posee minerales, como el potasio, calcio, magnesio, hierro o zinc (179).

Existen numerosos estudios sobre la composición de la Okara. Las diferencias entre los mismos se deben a los distintos métodos de análisis utilizados, a la variedad de la soja o del método de fabricación empleado (método chino o japonés). Un resumen de varios análisis de la Okara se muestra en las siguientes tablas. Cabe destacar que en

## Introducción

algunos análisis, los carbohidratos se refieren al contenido total, sin diferenciar si se trata de fibra o de carbohidratos digeribles.

Tabla 3: Composición de Okara (% peso seco).

Proteína	Grasa	CHO	FT	FS	FI	Cenizas	OS	Ref
33,4±0,3	8,5±0,3		54,3±2,3	4,2±1,8	50,1±2,9	3,7±0,2	3,9±0,2	(187)
			45,73±0,7	2,08±0,3	43,65±0,7			(200)
32,3±0,9	14,7±0,2		41,6±1,5	2,6±0,3	39±1,5	3,2±0,01		(201)
28,5	9,8	2,6	55,5	4,71	50,8	3,6		(202)
29,3	0,8	53,6				4,0		(203)
16,1	2,2	52,6				5,3		(204)
26,2	9,3	4,6	52,8	12,6	40,2	3,0	3,1	(205)
26,8	12,3	52,9				4,5		(206)

CHO: carbohidratos, FT: fibra total, FS: fibra soluble, FI: fibra insoluble, OS: oligosacáridos.

Tabla 4: Carbohidratos de Okara (% peso seco).

In	Es	Raf	Sac	Glu	Gal	Ara	Fru	Total	MS	Al	Ref
0,4±0,1	1,4±0,1		0,6±0,1	0,2±0,0	0,2±0,0	1,0±0,0	0,1±0,0	3,9±0,2		0,5±0,0	(187)
				0,5±0,1	0,3±0,1	0,2±0,1		1,5±0,2			(201)
	0,9	0,4	1,8					3,1	0,7	0,8	(205)

In: inulina, Es: estaquiosa, Raf: rafinosa, Sac: sacarosa, Glu: glucosa, Gal: galactosa, Ara: arabinosa, Fru: fructosa, MS: monosacáridos, Al: almidón.

Tabla 5: Monosacáridos de Okara tras hidrolizar las paredes celulares (% peso seco).

Rha	Fuc	Xil	Man	Glu	Gal	Ara	AU	Ref
0,3±0,1	0,5±0,1	2,7±0,1	1,5±0,1	12±0,4	10±0,2	5,7±0,1	7,3±0,5	(207)
0,3±0,1	0,4±0,1	3,9±0,2	0,8±0,2	12±0,4	8,4±0,1	4,7±0,2	7,4±0,3	(208)

Rha: ramnosa, Fuc: fucosa, Xil: xilosa, Man: manosa, Glu: glucosa, Gal: galactosa, Ara: arabinosa, AU: ácidos urónicos.

## *Introducción*

### *3.1.5. Usos de la Okara*

Debido a su gran contenido en agua (80 %), la Okara es muy perecedera, lo que imposibilita su uso sin un tratamiento previo. Además, actualmente se desecha en vertederos o se quema, lo que puede causar problemas medioambientales debido a posibles plagas o al aumento de CO<sub>2</sub>. La solución hasta ahora era secar la Okara, pero es un procedimiento caro, en especial si tenemos en cuenta los grandes volúmenes que se producen (202, 209). Por ello, es necesario aplicar nuevas tecnologías al tratamiento de la Okara para posibilitar su revalorización y uso industrial como ingrediente. La Okara puede ser utilizada para diferentes propósitos como se describe más abajo.

#### *Alimentación animal*

La Okara se ha empleado como pienso para el ganado, pero al igual que para el consumo humano, debe ser secada o esterilizada previamente. Una ventaja de la Okara obtenida por el método japonés (las semillas de soja se cuecen antes de extraer la parte soluble) es que elimina la mayor parte de los antinutrientes de la soja, principalmente inhibidores de tripsina, lo que mejora la digeribilidad y aprovechamiento de sus proteínas. La Okara se ha utilizado en piensos y no se han observado diferencias en parámetros como la producción de leche o la ganancia en peso de los animales (vacas y cerdos) respecto al pienso habitual (196, 210).

#### *Medio de cultivo y fertilizante*

Asimismo, la Okara puede utilizarse como medio de cultivo para hongos filamentosos (204) o bacterias y como fertilizante para uso agrícola. No obstante, para

## *Introducción*

esto también se necesita un tratamiento previo que prevenga la putrefacción debido a su alto contenido en agua (209).

### *Recuperación de compuestos funcionales*

La Okara puede ser utilizada como fuente de compuestos nutricionalmente interesantes, como la fibra alimentaria o la proteína. Los polisacáridos de la pared celular presentes en la Okara tienen buenas capacidades de retención de agua, que los hacen interesantes para su uso como aditivos alimentarios texturizantes (198). El aceite de la Okara puede tener aplicaciones cosméticas y farmacéuticas (209). Como anécdota, existe un champú que incluye Okara, de la marca Rene Furterer Paris, que alega que la Okara reestructura y repara el pelo debilitado (211). Esto da una idea de la versatilidad del uso de Okara.

Además, la Okara puede ser fermentada por microorganismos para la obtención de polisacáridos, alcohol o metanol. La fermentación por parte de microorganismos mejora la digeribilidad de la Okara y convierte los polisacáridos insolubles en oligosacáridos de bajo PM, que pueden ser usados posteriormente (208, 212).

### *Utilización como ingrediente*

Tras un tratamiento previo, la Okara puede ser utilizada como ingrediente bajo en calorías y rico en fibra. Se ha utilizado Okara en la fabricación de hamburguesas de cerdo bajas en calorías (213), aunque la mayoría de aplicaciones se centran en productos de panadería, repostería o snacks. Para este tipo de productos, la Okara puede sustituir parcialmente a la harina de trigo para disminuir las calorías y aumentar el contenido de proteína, fibra y grasas insaturadas (196). Se ha utilizado Okara para la fabricación de

## *Introducción*

pan, fideos o bollería (196, 214, 215), así como ingrediente funcional en un snack de coco (216). Además, la Okara puede ser utilizada en lugar de las semillas de soja para la producción de otros alimentos fermentados, como el natto y la salsa de soja (196).

Por otra parte, algunos sectores de la población consumen productos orgánicos, son vegetarianos o veganos. En Internet existen numerosos blogs e información sobre productos saludables, entre ellos, la Okara, que ya se conoce y se utiliza. De hecho, en Internet se pueden encontrar recetas para fabricar bebida de soja o tofu en casa, así como recetas cuyo propósito específico es la obtención de la Okara. Hay que resaltar que en este caso en particular, la Okara dejaría de ser un subproducto. Esto proporciona una idea de lo variable que es el término subproducto. Cuando la finalidad del proceso cambia (en este caso, se quiere obtener Okara), lo que es considerado subproducto también varía. Por tanto, que algo sea un subproducto no está indicando una peor calidad o un menor valor nutricional, sino cuál ha sido la finalidad del proceso de fabricación. En los círculos vegetarianos o veganos, los productos derivados de la soja como la Okara son muy útiles como sustitutos de la proteína animal, y hay muchas recetas de cocina disponibles. Por ejemplo, la búsqueda en Google de “okara recetas” obtiene 21.900 resultados (en noviembre de 2016). Entre ellas (217):

- ✓ Okara frita con verduras salteadas
- ✓ Crema de verduras con Okara
- ✓ Galletas, tartas, pan, bollos con Okara
- ✓ Falafel (ya que el sabor es parecido al falafel de garbanzo)
- ✓ Hamburguesas vegetarianas
- ✓ Croquetas de Okara

### *3.2. Propiedades beneficiosas de la Okara*

La Okara tiene un contenido en fibra muy alto (45-55 %), principalmente fibra insoluble, lo cual conlleva una serie de beneficios. La fibra insoluble aumenta el volumen fecal, reduciendo el tiempo de tránsito gastrointestinal (97, 218) y tiene efectos beneficiosos contra el estreñimiento y en el síndrome del intestino irritable (219), además de favorecer la pérdida de peso cuando se sigue una dieta rica en grasa (220). La dosis recomendada por la WHO/FAO de fibra es de >25 g al día, pero debido a los cambios de hábitos dietéticos, con una menor ingesta de hortalizas, frutas, legumbres y cereales de grano entero, estas recomendaciones no se suelen cumplir (221). No existe una recomendación oficial de ingesta de FS, aunque ésta suele ser del 30-35 % de la fibra. En España, el consumo de fibra es de 16 g al día, un valor menor que las recomendaciones, del que el 35 % corresponde a la FS (222). Por ello y debido a su alto contenido en fibra, la Okara podría ayudar a cumplirlas. De hecho, se ha visto que la Okara aumenta el contenido en agua en el ciego y acelera el tránsito intestinal en ratas (177, 178).

#### *3.2.1. Efecto prebiótico de la Okara*

La Okara ha demostrado que es fermentable por microorganismos beneficiosos para la salud intestinal, como *Bifidobacterium bifidum* (201). También se ha visto que es digerida más fácilmente que el salvado de trigo, y que tiene capacidad prebiótica en ratas, al ser fermentada por la microbiota intestinal, produciendo una gran cantidad de AGCC y una disminución del pH (57, 177-179, 181). La Okara es pobre en fibra soluble, que es la que mayor efecto prebiótico tiene, en especial los oligosacáridos (100,

## *Introducción*

223, 224). No obstante, se ha comprobado que algunas fibras insolubles también son parcialmente fermentables por microorganismos beneficiosos como *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* (97, 201, 225).

### *3.2.2. Aumento de la absorción de minerales*

Se ha comprobado que la Okara tiene un efecto beneficioso en la mejora de la absorción de minerales, en especial del calcio, y por tanto, en la salud ósea y contra la osteoporosis. Se ha visto en varios experimentos que una dieta suplementada con Okara mejora el balance mineral (absorción y retención) del calcio y magnesio en ratas (177, 179). Además, la Okara contiene minerales, en especial potasio, pero también se han cuantificado otros macroelementos como el calcio, el magnesio y el sodio, y elementos traza como hierro, cobre, manganeso y zinc (179).

### *3.2.3. Pérdida de peso*

Según la OMS (Organización Mundial de la Salud), el 39 % de la población mundial padece sobrepeso (38 % de los hombres y 40 % de las mujeres) y el 13 % padece obesidad (dato de 2014). Ambas situaciones suponen una epidemia, que ha duplicado su prevalencia desde 1980. Actualmente, vivimos en un mundo de extremos, donde hay personas que sufren desnutrición y otras, sobrepeso. No obstante, en los últimos años, la mortalidad asociada a la obesidad y sobrepeso ha sobrepasado a la mortalidad por desnutrición (226).

En este sentido, se ha visto que la soja puede tener un efecto inhibitor del tejido adiposo, principalmente debido a la genisteína (isoflavona de soja) o a la proteína de soja (144, 227-229). También se ha descubierto que las mujeres que toman

## *Introducción*

habitualmente soja tienen un índice de masa corporal (IMC) menor que las que no la toman (230). En la Okara, el contenido de proteína es alto, y con el mismo perfil de aminoácidos que en la soja, pero el contenido de isoflavonas es bajo, aunque una concentración mínima pueda permanecer recluida en la matriz tridimensional de la Okara. Por lo tanto, estos efectos observados en soja, podrían darse también en la Okara. Además, la Okara es muy rica en fibra, y una dieta rica en fibra suele conducir a una pérdida de peso (231). La fibra hace que disminuya la absorción de algunos compuestos de la dieta, pero manteniendo los nutrientes, lo que se traduce en una dieta menos energética, que conduce a una pérdida de peso. Ésta se produce a expensas de reducir la grasa corporal y además, es proporcional a la dosis de fibra (141, 232-234). Asimismo, la fibra, al ser fermentada en el intestino, produce un polipéptido insulínico dependiente similar al glucagón, que estimula la liberación de insulina e induce la saciedad. La fibra, al hincharse en el estómago, también puede tener efectos saciantes (233). Además, cuando aumenta el contenido en fibra de la dieta, suele ser a expensas de reducir el consumo de carbohidratos simples o de grasa, por lo que el contenido energético disminuye (141). Por otra parte, la pérdida de peso debida al consumo de fibra depende del tipo de dieta que se siga. Si se trata de una dieta con un alto contenido en grasa, se ha comprobado que es más recomendable un aumento del consumo de fibra insoluble (220). También, los ácidos grasos de cadena corta, AGCC, procedentes de la fermentación de la fibra por parte de las bacterias de la microbiota, reducen el estado inflamatorio típico de la obesidad, debido a una reducción de la permeabilidad intestinal a mediadores inflamatorios, como los lipopolisacáridos bacterianos (22, 144). Todo lo anterior influye en el efecto de la Okara en la pérdida de peso, que ha sido confirmado en ratas, y que además, muestra un efecto dependiente de la dosis de Okara suplementada (177-180, 231).

*3.2.4. Disminución de los lípidos plasmáticos*

Las enfermedades cardiovasculares son una de las mayores causas de mortalidad y morbilidad en los países desarrollados. Incluyen la enfermedad coronaria, infartos e hipertensión y su aparición está relacionada con los hábitos de vida, como la dieta, el sedentarismo y el tabaco (141). Se ha relacionado una dieta con un alto contenido en fibra con un menor riesgo de padecer infartos y enfermedad vascular periférica (140, 235). Así, el consumo de fibra soluble tiene un efecto de reducción de los niveles de colesterol LDL (low density lipoprotein) y de la presión arterial sistólica y diastólica, disminuyendo el riesgo de sufrir una enfermedad cardiovascular (140). La fibra (principalmente la fibra soluble, como las pectinas) forma matrices viscosas donde los lípidos quedan incorporados y se excretan con las heces, por lo que el nivel de colesterol y ácidos biliares disminuye (96, 236, 237). Por ello, se recomienda aumentar el consumo de fibra (>25 g al día) (141, 221, 237, 238).

La semilla de soja, tiene efectos en la disminución del nivel de colesterol LDL. Se cree que las isoflavonas y la proteína de soja pueden ser responsables de ello. Además de una reducción del colesterol LDL, también se ha visto una disminución de los triglicéridos cuando se suplementa la dieta con proteína e isoflavonas de soja (229, 238-240). Además, normalmente, cuando se incluye la soja en la dieta es a expensas de reducir el consumo de carne rica en grasas saturadas, así que también hay que tener en cuenta esta sustitución (238). La Okara ha demostrado que puede reducir los niveles de colesterol LDL y triglicéridos del suero e hígado en ratas (57, 177, 180, 181, 231). Además, se ha visto que el efecto en los lípidos del suero depende de la dosis de Okara utilizada y que la excreción de lípidos en las heces aumenta correlativamente (180, 231). También se indica que la proteína de Okara, y no solo la fibra, puede ser

## *Introducción*

parcialmente responsable de estos efectos hipolipidémicos e hipercolesterolémicos, que son interesantes para la protección contra los accidentes cardiovasculares (180).

### *3.2.5. Capacidad antioxidante*

Las especies reactivas de oxígeno o de nitrógeno actúan sobre las células causando daño celular, mutaciones y apoptosis, que pueden dar lugar a la necrosis de tejidos o cáncer (241), por ello, los antioxidantes aportados en la dieta son importantes para ejercer un efecto quelante de los radicales libres y de reducción de especies oxidantes. Existe un gran interés en usar antioxidantes obtenidos a partir de subproductos como ingredientes funcionales o nutraceuticos, ya que suelen ser productos ricos en compuestos bioactivos y muy baratos (242, 243).

La soja tiene actividad antioxidante, gracias a su contenido en isoflavonas, ya que son polifenoles. La genisteína de soja puede quelar los radicales peroxilo y evitar la peroxidación de lípidos que causan la aterosclerosis (229, 244, 245). En cuanto a la Okara, se ha determinado que hidrolizados proteicos y polisacáridos (debido a las pectinas) de la Okara (y de la soja) tienen propiedades antioxidantes gracias a la reducción y quelación de radicales libres (199, 207, 246). En ratas alimentadas con Okara, se ha visto una mejora del estado antioxidante del ciego, lo que puede proteger contra el cáncer de colon (177).

### *3.2.6. Control de la presión arterial*

La hipertensión es un problema mundial que afecta al 30 % de la población adulta (247). Existe un gran interés en encontrar alimentos con componentes vasodilatadores, ya que se podrían emplear en personas con principio de hipertensión

## *Introducción*

que todavía no estén tratadas farmacológicamente (27, 248). El sistema Renina – Angiotensina es un regulador central de la función cardiovascular y renal, y juega un papel importante en la fisiología de varias enfermedades cardíacas y renales. Consiste en una serie de reacciones enzimáticas que llevan a un aumento de presión arterial y del estrés oxidativo celular. En los riñones, la renina es liberada por las células yuxtglomerulares a las arteriolas aferentes, y actúa sobre el angiotensinógeno (sintetizado en el hígado) para generar el decapeptido inactivo Ang I (angiotensina). La acción peptidasa de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) convierte el Ang I en el octapéptido Ang II, que produce la contracción del músculo liso, lo que incrementa la resistencia vascular. Además, el Ang II provoca la reabsorción de sodio en los riñones mediante el estímulo de la secreción de aldosterona y regula el mecanismo de retroalimentación tubulo-glomerular. Por tanto, inhibir la ECA prevendría la hipertensión, enfermedades cardiovasculares, renales y el estrés oxidativo. Se han encontrado distintos compuestos inhibidores de la ECA, como taninos, flavonoides, xantonas, terpenoides y péptidos bioactivos (248-250).

Se ha comprobado que los péptidos inhibidores son de cadena corta, con aminoácidos hidrofóbicos (251) y aminoácidos como la prolina o leucina reemplazando a hidroxiprolina (252). Estos péptidos se han encontrado en gelatina, caseínas, pescado, higos, suero de queso, algas, plasma sanguíneo bovino, atún o sardinas (250, 253). También se ha demostrado que la soja inhibe la ECA, tanto en hidrolizados proteicos de semillas de soja, como en productos derivados de la soja, como el natto, torta o harina de soja y soja fermentada (254-257). En la Okara, se ha descrito que la fracción proteica menor de 1 kDa tras la hidrólisis con pepsina y pancreatina es la que tiene una mayor actividad inhibitoria de la ECA. Además, el péptido se ha identificado como parte de la

## *Introducción*

enzima lipogenasa de soja. Este péptido está compuesto principalmente por aminoácidos hidrofóbicos y una valina terminal (199, 258).

### *3.2.7. Disminución de la glucosa en sangre*

Al igual que la obesidad, la diabetes es un problema creciente en los países desarrollados, que deriva de un descenso de la sensibilidad a la insulina unido a un estado prolongado de hiperglicemia. El índice glucémico de los carbohidratos, el cual determina el estado de glucemia tras su ingesta, es un indicador de la probabilidad de padecer diabetes de tipo II. Así, una dieta con prevalencia de carbohidratos de menor índice glucémico (carbohidratos complejos), conlleva una menor probabilidad de padecer diabetes (141, 259, 260). La fibra es capaz de regular la glucosa en sangre y la liberación de insulina tras la ingesta de alimentos. La viscosidad de la fibra afecta a la absorción de la glucosa, resultando en una menor concentración de glucosa en sangre (94, 261, 262). Se han estudiado los fructooligosacáridos, arabinosilanos y  $\beta$ -glucanos en relación a su efecto en la glucosa postprandial. Los oligosacáridos de soja han demostrado ser capaces de disminuir la glucosa en sangre de ratas alimentadas con una dieta alta en grasa (229). En cambio, este efecto no se ha observado en Okara (177, 178, 180), por lo que puede ser un efecto específico de la fibra soluble de la soja.

### *3.3. Revalorización de la Okara*

La reutilización de la Okara en la cadena alimentaria sería ventajosa desde un punto de vista ecológico, al evitar que acabe en un vertedero y permitir aprovechar el agua y la energía que se ha utilizado para el cultivo de la soja. Además, sería barato, ya

## *Introducción*

que se trata de un subproducto y existen tratamientos económicos que se pueden emplear para alargar su vida útil. La Okara tiene un contenido muy alto en fibra insoluble, pero bajo en fibra soluble, por lo que un tratamiento que pueda aumentar esta proporción (FS/FI), mejorando la funcionalidad de la fibra, es interesante desde un punto de vista saludable, debido a los numerosos beneficios que aporta. Además, los subproductos en general, y la Okara en particular, necesitan tratamientos previos a su consumo para garantizar su seguridad y aumentar su vida útil. En el caso de la Okara, como ya se comentó, su alto contenido de agua hace que se deteriore rápidamente, lo que puede conllevar problemas medioambientales. Por ello, se necesitaría un tratamiento para su revalorización que permita alcanzar estos dos objetivos, el incremento de la FS y alargamiento de la vida útil.

Tradicionalmente, se ha secado la Okara para alargar su vida útil, pero es un procedimiento caro (202, 209). Otros autores han propuesto el secado de Okara en un lecho de partículas inertes (teflón) como un método más económico (40). Aun así, con este método, se producen pérdidas de sustrato al quedar adherido a las paredes de la maquinaria, lo que deriva en un bajo rendimiento y también se usan temperaturas altas, que pueden producir cambios no deseables en el contenido nutricional y en las características sensoriales del producto. A la hora de aumentar el contenido en fibra soluble o de extraer compuestos funcionales, se ha utilizado un tratamiento con álcali para liberar polisacáridos con actividad antioxidante (198, 207). También se ha conseguido extraer oligosacáridos de la Okara con la enzima de grado alimentario Viscozyme<sup>®</sup> L (263, 264) e hidrolizar los polisacáridos indigeribles de su pared celular con celulasa (265). Otra enzima de grado alimentario, Ultraflo<sup>®</sup> L se ha utilizado para maximizar el contenido de fibra soluble de la Okara (208, 266), obteniéndose un producto con potencial efecto prebiótico demostrado en ratas (181). Además, la

### *Introducción*

micronización de la Okara resulta en un producto más fácilmente fermentable por *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* con capacidad de disminuir el nivel de colesterol total y triglicéridos en ratones (57). La aplicación de APH provoca la solubilización de la fibra insoluble de la Okara, en especial cuando se combina con un pretratamiento de autoclave y a una presión de 400 MPa (200, 225, 267).

## *Introducción*

# Objetivos

## *Objetivos*

## Objetivos

La Okara, principal subproducto industrial de la fabricación de bebida de soja y tofu, es muy rica en fibra insoluble y proteínas, pero pobre en fibra soluble y con un gran contenido en agua (>80 %), que hace que sea muy perecedera. Normalmente, la Okara se desecha o se usa como fertilizante o para alimentación animal, pero para ello, se necesita un tratamiento térmico previo, que suele resultar caro. No obstante, en los últimos años ha aumentado el interés por los subproductos alimentarios como fuente de compuestos funcionales con propiedades beneficiosas potenciales para la salud, y además, ayudaría a disminuir el gran desperdicio de alimentos que sucede en la actualidad. Para ello, existen nuevos tratamientos tecnológicos que permiten incrementar el contenido de fibra soluble a la vez que aumentan el tiempo de conservación del subproducto, como las altas presiones hidrostáticas. Esto revalorizaría la Okara y mejoraría sus propiedades nutricionales, pudiendo ser usada como ingrediente funcional.

Por ello, el **objetivo general** de esta tesis es el tratamiento de la Okara de soja por altas presiones hidrostáticas en combinación con enzimas específicas de grado alimentario (*Ultraflo*<sup>®</sup> L y *Viscozyme*<sup>®</sup> L) para mejorar su valor nutricional y potencial efecto prebiótico, entre otras propiedades funcionales.

Con este fin, se plantean los siguientes **objetivos específicos**:

- ✓ Desarrollar y validar un método cromatográfico para detectar la fibra soluble, sensible, rápido y eficaz, que se pueda implementar para monitorizar el proceso de APH.
- ✓ Diseñar un tratamiento de la Okara mediante APH combinado con enzimas hidrolíticas alimentarias.

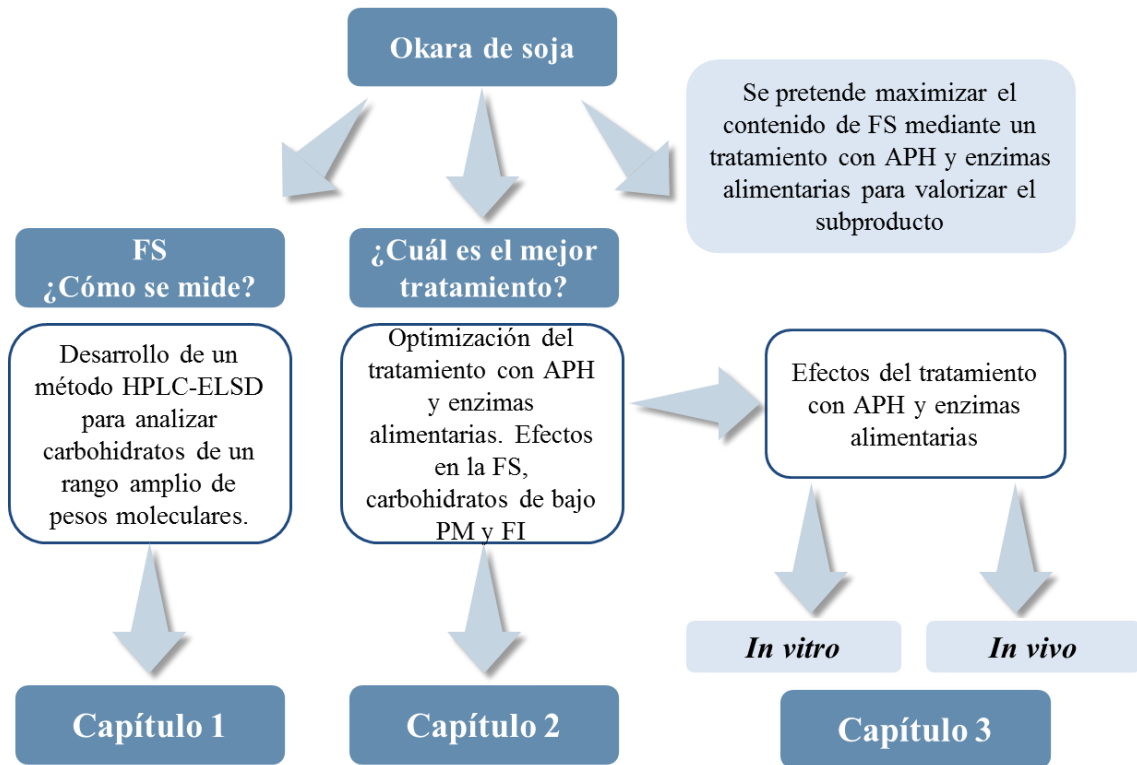
### *Objetivos*

- Optimizar los diferentes parámetros: concentración de enzima (*Ultraflo*<sup>®</sup> L y *Viscozyme*<sup>®</sup> L), de sustrato (Okara), potencia de APH (presión, temperatura), y tiempos de tratamiento, intentando minimizar los costes del proceso.
- Estudiar el efecto del tratamiento de APH combinado con enzimas hidrolíticas en la fibra soluble, insoluble, oligosacáridos y capacidades potencialmente funcionales de la Okara.
- ✓ Estudiar los efectos beneficiosos de la Okara tratada con APH y enzimas sobre la salud, y en especial sobre el efecto prebiótico, en modelos *in vitro* e *in vivo*.

# Resultados

## *Resultados*

Figura 4: Esquema del trabajo experimental.



## *Resultados*

Tabla 6: Resumen de las publicaciones.

Título	Revista	Objetivo	Conclusiones
<i>Capítulo 1: Desarrollo y validación de un método cromatográfico (HPLC - ELSD) que permita monitorizar la liberación de fibra soluble de la Okara cuando se emplea un tratamiento con altas presiones hidrostáticas y enzimas hidrolíticas.</i>			
Improved evaporative light scattering detection for carbohydrate analysis.		Desarrollar un método de HPLC-ELSD que permita analizar carbohidratos de un rango amplio de pesos moleculares.	El método HPLC-ELSD optimizado y validado se propone como una forma rápida y sensible de análisis de carbohidratos.
<i>Capítulo 2: Tratamiento de la Okara con altas presiones hidrostáticas y enzimas específicas para solubilizar la fibra: optimización del tratamiento y efectos potencialmente funcionales.</i>			
Okara treated with high hydrostatic pressure assisted by <i>Ultraflo</i> <sup>®</sup> L: Effect on solubility of dietary fibre.		Maximizar el contenido de FS de Okara. Optimizar un tratamiento simultáneo con APH y <i>Ultraflo</i> <sup>®</sup> L.	El tratamiento con <i>Ultraflo</i> <sup>®</sup> L y APH consigue solubilizar la fibra de Okara en condiciones adaptables a nivel industrial. Hay sinergia entre los tratamientos.
Solubilization of Okara dietary fibre under high hydrostatic pressure aided by <i>Viscozyme</i> <sup>®</sup> L.	 En revisión	Maximizar el contenido de FS de Okara. Optimizar un tratamiento simultáneo con APH y <i>Viscozyme</i> <sup>®</sup> L. Comparar la actividad de ambas enzimas en Okara.	No hay sinergia entre las dos enzimas pero sí entre <i>Viscozyme</i> <sup>®</sup> L y APH. El tratamiento combinado consigue solubilizar la fibra de Okara en condiciones simples.

Determination of the soluble Dietary Fibre content of Okara treated with High Hydrostatic Pressure and enzymes: a comparative evaluation of two methods (AOAC and HPLC-ELSD).



En revisión

Comparar el método HPLC-ELSD con el método oficial de análisis de la fibra (AOAC) en Okara. Aplicar el análisis del método HPLC-ELSD a la fracción soluble de la fibra (AOAC).

El análisis mediante HPLC-ELSD de Okara tratada con enzimas y APH es más sensible que el método de la AOAC.

Low molecular weight carbohydrates released from Okara by enzymatic treatment under high hydrostatic pressure.



Estudiar los efectos en los carbohidratos de bajo peso molecular de Okara del tratamiento con APH y enzimas.

Los carbohidratos de bajo peso molecular de Okara aumentan de concentración y disminuyen su PM con los tratamientos con *Ultraflo*<sup>®</sup> L o *Viscozyme*<sup>®</sup> L y APH.

---

*Capítulo 3: Estudio de los efectos beneficiosos en la salud, en especial del efecto prebiótico, de la Okara tratada con altas presiones hidrostáticas y enzimas hidrolíticas mediante modelos experimentales in vitro e in vivo.*

---

In vitro fermentability and prebiotic potential of soyabean Okara by human faecal microbiota.



Evaluar el efecto prebiótico potencial de Okara nativa y tratada con *Ultraflo*<sup>®</sup> L y APH *in vitro*.

El tratamiento con *Ultraflo*<sup>®</sup> L y APH mejora el efecto prebiótico potencial de la Okara.

Protective effects of a soluble dietary fiber-enriched soybean Okara on gut microbiota in rats fed a high-fat diet.

Enviado

Estudiar los posibles efectos beneficiosos de la Okara tratada con APH y *Ultraflo*<sup>®</sup> L, en especial del efecto prebiótico *in vivo*.

La Okara tratada frena la ganancia en peso, mejora la salud cardiovascular y protege la microbiota normal de ratas alimentadas con una dieta grasa.

**Capítulo 1:**

**Desarrollo y validación de un método cromatográfico (HPLC - ELSD)  
que permita monitorizar la liberación de fibra soluble de la Okara  
cuando se emplea un tratamiento con altas presiones hidrostáticas y  
enzimas hidrolíticas**

## *Resultados*

## *Resultados*

Artículo 1: Condezo-Hoyos, L., Perez-Lopez, E., & Ruperez, P. (2015). Improved evaporative light scattering detection for carbohydrate analysis. *Food Chemistry*, 180, 265–271. DOI: 10.1016/j.foodchem.2015.02.039.

Impact Factor *Food Chemistry* (2016): 4,052

## *Resultados*

*Resumen*

**Introducción:** La cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) es un método rápido y sensible para cuantificar e identificar carbohidratos, que puede ser usado para monitorizar procesos industriales de forma sencilla. No obstante, el detector que se utiliza normalmente es el de índice de refracción, que tiene una sensibilidad más baja que el detector evaporativo de luz difusa (ELSD), que es un detector novedoso y cada vez más utilizado. El ELSD ya se ha usado en alimentos para analizar polisacáridos, oligosacáridos, azúcares etc., pero no se ha desarrollado ningún método que analice a la vez polisacáridos de alto peso molecular, de medio (oligosacáridos) y bajo (azúcares).

**Objetivo:** Desarrollar, optimizar y validar un método cromatográfico con el detector ELSD que permita analizar una mezcla compleja de carbohidratos con un rango amplio de peso molecular y que sea exacto, preciso y con buena sensibilidad.

**Metodología:** Se ha usado la metodología de superficies de respuestas (MSR) (diseño de Box-Behnken) para optimizar los parámetros del detector ELSD, con el fin de analizar carbohidratos de diferente PM. Los parámetros optimizados han sido la temperatura del nebulizador, la temperatura del evaporador y el caudal de nitrógeno como gas portador. También se ha elegido la fase móvil volátil que proporciona la mejor resolución de los picos. Los parámetros del detector elegidos han sido validados usando carbohidratos de distinto PM como patrones y una columna TSK-gel de exclusión molecular. Asimismo, se han estudiado la precisión, sensibilidad, linealidad, y los límites de detección y cuantificación del método optimizado. Se han obtenido curvas logarítmicas de calibrado para la cuantificación e identificación de carbohidratos.

## *Resultados*

**Resultados:** La máxima respuesta del detector ELSD, predicha mediante la metodología de superficies de respuesta, se obtiene cuando la temperatura del evaporador se fija en 88,8 °C, la del nebulizador en 77,9 °C y el caudal de nitrógeno (gas portador) en 1,1 L min<sup>-1</sup> (SLM). La fase móvil usada en los ELSD debe ser volátil, pero se ha visto que añadir un electrolito mejora la resolución. Se ha establecido que una fase móvil de 0,01 mol L<sup>-1</sup> de acetato de amonio mejora la resolución de los picos. Se ha obtenido una buena linealidad de  $R^2 > 0,998$  para concentraciones de carbohidratos de entre 250 a 1000 mg L<sup>-1</sup>, así como una buena sensibilidad y bajos límites de detección y cuantificación. La repetitividad entre- e intra-días ha resultado alta, con una desviación estándar relativa de menos del 1,8-1,5 % para los tiempos de retención y áreas, respectivamente. Para la identificación de los carbohidratos, se han obtenido curvas de calibrado logarítmicas diferentes para polisacáridos de alto PM y oligosacáridos.

**Conclusiones:** Se ha conseguido establecer un método de HPLC-ELSD que permite identificar y cuantificar carbohidratos de pesos moleculares muy diferentes de forma sencilla y con una precisión alta. Además, se ha calibrado el equipo con patrones similares a los que se espera encontrar en la Okara. Este método es un paso previo necesario para poder monitorizar de forma rápida el tratamiento de la Okara con APH y enzimas alimentarias que se pretende realizar a continuación.



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

## Food Chemistry

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/foodchem](http://www.elsevier.com/locate/foodchem)

## Improved evaporative light scattering detection for carbohydrate analysis

Luis Condezo-Hoyos<sup>1</sup>, Elena Pérez-López, Pilar Rupérez\*

Metabolism and Nutrition Department, Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición (ICTAN), Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), José Antonio Novais 10, Ciudad Universitaria, ES-28040 Madrid, Spain

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 21 October 2014

Received in revised form 15 December 2014

Accepted 7 February 2015

Available online 14 February 2015

## Keywords:

ELSD

HPSEC

Carbohydrate

Polysaccharide

Oligosaccharide

RSM

## ABSTRACT

Optimization and validation of evaporative light scattering detector (ELSD), aided by response surface methodology (RSM), has been developed for the liquid chromatography analysis of a wide molecular weight (MW) range of carbohydrates, including polysaccharides and oligosaccharides. Optimal experimental parameters for the ELSD detection were: 88.8 °C evaporator temperature, 77.9 °C nebulizer temperature and 1.1 standard litres per minute nitrogen flow rate. Optimal ELSD detection, used together with high performance size exclusion chromatography (HPSEC) of carbohydrates, gave a linear range from 250 to 1000 mg L<sup>-1</sup> ( $R^2 > 0.998$ ), with limits of detection and quantitation of 4.83–11.67 and 16.11–38.91 mg L<sup>-1</sup>, respectively. Relative standard deviation was lower than 1.8% for intra-day and inter-day repeatability for apple pectin, inulin, verbascone, stachyose and raffinose. Recovery ranged from 103.7% to 118.3% for fructo-oligosaccharides,  $\alpha$ -galacto-oligosaccharides and disaccharides. Optimized and validated ELSD detection is proposed for the analysis of high- to low-MW carbohydrates with high sensitivity, precision and accuracy.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

## *Resultados*

**Capítulo 2:**

**Tratamiento de la Okara con altas presiones hidrostáticas y enzimas específicas para solubilizar la fibra: optimización del tratamiento y efectos potencialmente funcionales**

## *Resultados*

## *Resultados*

Artículo 2: Perez-Lopez, E., Mateos-Aparicio, I., Ruperez, P. (2016). Okara treated with high hydrostatic pressure assisted by *Ultraflo*<sup>®</sup> L: Effect on solubility of dietary fibre. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 33, 32-37. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ifset.2015.12.017>.

Artículo 3: Perez-Lopez, E., Mateos-Aparicio, I., Ruperez, P. (2016). Solubilization of Okara dietary fibre under high hydrostatic pressure aided by *Viscozyme*<sup>®</sup> L. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* (En revisión).

Artículo 4: Perez-Lopez, E., Mateos-Aparicio, I., Ruperez, P. (2016). Determination of the Soluble Dietary Fibre content of Okara treated with High Hydrostatic Pressure and enzymes: a comparative evaluation of two methods (AOAC and HPLC-ELSD). *Journal of Food Science and Technology* (En revisión).

Artículo 5: Perez-Lopez, E., Mateos-Aparicio, I., Ruperez, P. (2016). Low molecular weight carbohydrates released from Okara by enzymatic treatment under high hydrostatic pressure. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 38, Part A, 76-82. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ifset.2016.09.014>.

Impact Factor *Innovative Food Science and Emerging Technologies* (2016): 2,997.

Material suplementario 1: Tratamiento combinado con APH y enzimas y su efecto en otras propiedades funcionales de la Okara: Capacidad antioxidante y de inhibición de la enzima convertidora de angiotensina.

Material suplementario 2: Tratamiento combinado con APH y enzimas y posible mecanismo de acción sobre celulosa como sustrato modelo.

## *Resultados*

*Resumen*

**Introducción:** La Okara es un subproducto barato y con gran contenido en fibra insoluble. Tiene posibles efectos prebióticos y como suplemento en la pérdida de peso, según investigaciones previas. No obstante, se podrían mejorar sus características nutricionales si se aumenta el contenido de fibra soluble. Existen métodos químicos, enzimáticos o físicos que pueden incrementar este contenido. Las APH se han utilizado previamente en la Okara para este propósito, pero no en combinación con enzimas hidrolíticas alimentarias, lo cual constituye un método novedoso que se está empezando a estudiar en alimentos, ya que se ha visto que las APH aumentan la actividad de ciertas enzimas.

**Objetivos:** Desarrollar un tratamiento optimizado de APH en combinación con enzimas hidrolíticas que solubilice la fibra de la Okara y estudiar los efectos de dicho tratamiento en las fracciones de la fibra y en los oligosacáridos, así como en otras propiedades potencialmente funcionales de Okara.

**Metodología:** En un primer lugar, las condiciones del tratamiento (concentración de enzimas y de Okara) se han optimizado a presión atmosférica (0,1 MPa) mediante el empleo de MSR y el estudio de la cinética de ambas enzimas (*Ultraflo*<sup>®</sup> L y *Viscozyme*<sup>®</sup> L) en Okara. Después, se ha tratado la Okara con un tratamiento combinado de enzimas y APH (400 y 600 MPa). El incremento en fibra soluble se ha medido con el método optimizado de HPLC-ELSD con una columna de exclusión molecular (TSK-gel). Además, esta metodología se ha ampliado para su uso con una columna de intercambio iónico (Aminex), lo que ha permitido cuantificar e identificar los oligosacáridos liberados por el tratamiento. Asimismo, se ha estudiado el

## *Resultados*

efecto del tratamiento en la fibra insoluble de Okara mediante una técnica clásica de separación de las fracciones de la fibra (Método enzimático-gravimétrico AOAC 991.43 modificado con diálisis) lo que ha permitido comparar la efectividad de ambos métodos de análisis, el tradicional (AOAC y análisis espectrofotométrico) y el nuevo cromatográfico (HPLC-ELSD).

**Resultados:** Se ha establecido que una proporción 1:40 enzima / Okara (v/m) es capaz de hidrolizar Okara a presión atmosférica en condiciones simples (pH 7, 37 °C). Se ha pretendido minimizar el volumen de enzimas a utilizar para que el proceso sea económicamente viable. Además, se ha comprobado que no hay sinergia ni antagonismo entre las dos enzimas *Ultraflo*<sup>®</sup> L y *Viscozyme*<sup>®</sup> L. Cuando se aplican las APH en combinación con cada una de las enzimas, se observa una sinergia entre ambos tratamientos, siendo el más efectivo el de 600 MPa, 30 min, 1:40 enzima / Okara. Los carbohidratos solubles aumentan de concentración, llegando a suponer un 13,5-15,6 % (con *Viscozyme*<sup>®</sup> L y *Ultraflo*<sup>®</sup> L y APH, respectivamente), el doble de su concentración en la Okara nativa. Se aprecia una ligera mejor actuación de *Ultraflo*<sup>®</sup> L. Cuando se estudian con detalle los polisacáridos y oligosacáridos liberados, se observa un incremento en la concentración de los polisacáridos similares a la inulina, así como un descenso de su peso molecular. El método clásico de análisis de la fibra (AOAC) indica que el aumento de la fibra soluble se debe a una hidrólisis de la insoluble, ya que se observa una disminución en su concentración, aunque este método ha resultado menos preciso que el HPLC-ELSD. En lo referente a las capacidades funcionales de los péptidos de Okara, obtenidos por hidrólisis de la proteína, se puede concluir que la actividad antioxidante y de inhibición de la ECA mejoran ligeramente gracias al tratamiento combinado.

## *Resultados*

**Conclusiones:** Se ha conseguido establecer las condiciones de un tratamiento que combina APH y enzimas de grado alimentario y aumenta el contenido de carbohidratos solubles al doble de su valor inicial a expensas de la fibra insoluble. Este tratamiento permite utilizar directamente la Okara como ingrediente en alimentos funcionales.

## *Resultados*



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

## Innovative Food Science and Emerging Technologies

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/IFSET](http://www.elsevier.com/locate/IFSET)

## Okara treated with high hydrostatic pressure assisted by *Ultraflo*® L: Effect on solubility of dietary fibre

E. Pérez-López<sup>a</sup>, I. Mateos-Aparicio<sup>b</sup>, P. Rupérez<sup>a,\*</sup><sup>a</sup> Metabolism and Nutrition Department, Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición (ICTAN), Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), José Antonio Novais 10, Ciudad Universitaria, E-28040 Madrid, Spain<sup>b</sup> Departamento de Nutrición y Bromatología II, Bromatología, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Ciudad Universitaria, E-28040 Madrid, Spain

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 2 November 2015

Received in revised form 11 December 2015

Accepted 12 December 2015

Available online 30 December 2015

## Keywords:

High hydrostatic pressure

Glucanase

Okara

Dietary fibre

Soybean

Agrofood by-product

## ABSTRACT

Okara is an abundant and inexpensive by-product from soybean, rich in total dietary fibre (>55% dry weight), but poor in soluble dietary fibre (SDF, <5% dw). A combined method of high hydrostatic pressure (HHP) aided by the food grade enzyme *Ultraflo*® L was used for SDF maximization. At atmospheric pressure, incubation time was not a key factor, and a ratio of 1:40 (enzyme:Okara, v/w) was able to saturate the enzyme within 120–150 min. When HHP plus *Ultraflo*® L were applied, a synergy between both treatments was observed. Thus, at 600 MPa, 0.025% *Ultraflo*® L and 30 min treatment, soluble carbohydrate added up to  $15.64 \pm 0.32\%$ , consisting of two peaks ( $9.14 \pm 0.18$  and  $0.57 \pm 0.01$  kDa), determined by HPLC-ELSD. The combination of HHP plus *Ultraflo*® L on Okara improved the solubility of the dietary fibre, making it more suitable to be used in functional foods.

**Industrial relevance:** There is an increasing interest in finding new prebiotics from food industrial waste. Okara has been simultaneously treated with *Ultraflo*® L and HHP, taking into account the industrial costs of the procedure, and adjusting the quantity of enzyme and time of treatment to the minimum, by a Response Surface Methodology and an enzymatic activity assay. Besides, an HPLC-ELSD direct analysis (High Performance Liquid Chromatography with Evaporative Light Scattering Detector) was employed to monitor soluble fibre, as an easy and fast analytical method.

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

## *Resultados*

**Solubilization of Okara dietary fibre under high hydrostatic pressure aided by  
*Viscozyme*<sup>®</sup> L**

E. Pérez-López<sup>1</sup>, I. Mateos-Aparicio<sup>2\*</sup>, P. Rupérez<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Metabolism and Nutrition Department, Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición (ICTAN), Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), José Antonio Novais 10, Ciudad Universitaria, E-28040 Madrid, Spain.

<sup>2</sup>Departamento de Nutrición y Bromatología II, Bromatología, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Ciudad Universitaria, E-28040 Madrid, Spain.

\*Corresponding authors: Phone UCM +34 913941807; fax: +34 913941799; Phone ICTAN-CSIC: +34 915492300; fax: +34 915493627

E-mail addresses: [inmateos@farm.ucm.es](mailto:inmateos@farm.ucm.es) (I. Mateos-Aparicio); [pruperez@ictan.csic.es](mailto:pruperez@ictan.csic.es) (P. Rupérez)

**Abstract**

Okara is a cheap, abundant and valuable by-product from soybean but needs an easy industrial method to maximize its soluble dietary fibre (SDF) content. A novel combination of high hydrostatic pressure (HHP) assisted by the food-grade enzyme *Viscozyme*<sup>®</sup>L was simultaneously used for this purpose. First, the suitability of the enzyme to hydrolyse Okara was proven at atmospheric pressure. Thus, *Viscozyme*<sup>®</sup>L (0.025%) was able to degrade Okara in 120-180 min, and the most effective conditions were found at pH 7 and 37 °C. Synergy between HHP and *Viscozyme*<sup>®</sup>L was observed, in terms of SDF release and molecular weight decrease, as determined by direct High Performance Liquid Chromatography - Evaporative Light Scattering Detector analysis (HPLC-ELSD). In fact, at 600 MPa, 0.025 % *Viscozyme*<sup>®</sup>L and 30 min treatment, SDF content was 2.50-times higher than in native Okara, achieving a concentration of 13.53±0.30%, which improved its nutritional value and applicability in functional foods.

Industrial relevance: HHP is a novel technological process which is useful for increasing the added value of by-products like Okara by solubilizing their dietary fibre. Some enzymes increase their activity when they are under HHP. A simultaneous method with *Viscozyme*<sup>®</sup>L and HHP on Okara has been optimized for reducing the industrial cost of the process.<sup>1</sup>

---

<sup>1</sup> CHO, carbohydrates; FBG, fungal beta glucanase; FOS, fructo-oligosaccharides; GOS, galacto-oligosaccharides; HHP, high hydrostatic pressure; HPLC-ELSD, high performance liquid chromatography - evaporative light scattering detector; IDF, insoluble dietary fibre; MW, molecular weight; PS, polysaccharides; RSM, response surface methodology; SDF, soluble dietary fibre.

## *Resultados*

*Keywords:* High hydrostatic pressure; hydrolases; *Viscozyme*<sup>®</sup> L; Okara; soybean; byproduct

## **1. Introduction**

Okara is a cheap and abundant by-product derived from soybean after extracting the soluble fraction for tofu or soymilk production (Mateos-Aparicio, Redondo-Cuenca, Villanueva, Zapata-Revilla, & Tenorio-Sanz, 2010; O'Toole, 1999). As 1.2 kg of fresh Okara is produced from 1 kg of soybean, tonnes of Okara are produced worldwide, especially in China, Japan and Korea (Li, Qiao, & Lu, 2012). Currently, the production of soybean, and consequently, of Okara, has increased in Western countries (Espinosa-Martos & Ruperez, 2009; Prestamo, Ruperez, Espinosa-Martos, Villanueva, & Lasuncion, 2007). In 2013, the area for soybean crop in the world was more than 111 million Ha (105 million Ha in 2012), and the production, 276 million tonnes (6.99 million tons of seeds), while in Europe, the harvested area was 3.17 million Ha in 2013 (500 Ha in Spain) and the production, 5.94 million tonnes (1400 tonnes in Spain) (FAO, 2015).

Nowadays, Okara is mostly thrown away, but another alternative would be to use it as a valuable source of dietary fibre (Mateos-Aparicio, 2011; Mateos-Aparicio, Redondo-Cuenca, & Villanueva, 2013; Villanueva, Yokoyama, Hong, Barttley, & Ruperez, 2011), as by-products are new interesting sources of bioactive compounds (Gullon et al., 2009; Mateos-Aparicio, 2011; Mateos-Aparicio et al., 2013; Rastall & Gibson, 2015). Okara has a total dietary fibre content up to 54.3-55.5 % (50.1-50.8 % insoluble dietary fibre, IDF and 4.2-4.7 % soluble dietary fibre, SDF) (Mateos-Aparicio, Redondo-Cuenca, Villanueva, et al., 2010), which makes it an interesting potential weight loss and prebiotic supplement (Prestamo et al., 2007; Redondo-Cuenca, Villanueva, & Mateos-Aparicio, 2008; Villanueva et al., 2011).

## *Resultados*

Okara is rich in IDF, but poor in SDF (responsible of the prebiotic and anti-carcinogenic effect), so a simple transformation by the industry to maximize the content of SDF would be most interesting (Courtois, 2009; Charalampopoulos & Rastall, 2012; Mudgil & Barak, 2013; Villanueva, Perez-Cozar, & Redondo-Cuenca, 2013). Different approaches have been used for increasing the content of SDF as chemical, using alkali to release antioxidant polysaccharides (Mateos-Aparicio, Mateos-Peinado, Jimenez-Escrig, & Ruperez, 2010) or enzymatic treatment of Okara with food grade enzymes at atmospheric pressure, as *Ultraflo*<sup>®</sup> L (Kasai, Murata, Inui, Sakamoto, & Kahn, 2004; Villanueva et al., 2013), and also with high hydrostatic pressure (HHP) (Li et al., 2012; Mateos-Aparicio, Mateos-Peinado, & Ruperez, 2010). Thermal treatments could also increase SDF content, but have disadvantages, as they change the organoleptic attributes of substrates (San Martín, Barbosa-Cánovas, & Swanson, 2002). The effect of combined HHP and enzymatic treatment has been reported in some foods, as HHP enhances the activity of some enzymes due to a change in the active site or in substrate specificity (Claeys, Van Loey, & Hendrickx, 2003; Garcia-Mora, Penas, Frias, Gomez, & Martinez-Villaluenga, 2015; San Martín et al., 2002). HHP assisted by *Ultraflo*<sup>®</sup> L (xylanase and cellulase activities) has been previously applied to Okara for soluble carbohydrates maximization (Perez-Lopez, Mateos-Aparicio, & Ruperez, 2016). Also, the food grade enzyme *Viscozyme*<sup>®</sup> L (xylanase, cellulase and hemicellulase activities) has been applied under HHP for the extraction of bioactive molecules in cactus (Kim & Han, 2012) and for the extraction of oligosaccharides from Okara (Pérez-López, Mateos-Aparicio, & Rupérez). However, to the best of our knowledge, the combined effect of HHP and *Viscozyme*<sup>®</sup> L in total carbohydrates of Okara has not been assessed before, the simultaneous treatment has not been optimized for *Viscozyme*<sup>®</sup> L, and neither has a comparison between enzymes (*Ultraflo*<sup>®</sup> L and *Viscozyme*<sup>®</sup> L) on Okara.

## *Resultados*

Therefore, our aim was to design, optimize and analyse a simultaneous HHP and *Viscozyme*<sup>®</sup> L treatment that can be easily applied, in order to maximize the soluble carbohydrate content of Okara and to compare the activity of both enzymes on Okara.

## **2. Materials and Methods**

### *2.1. Materials, reagents, samples and equipment*

A local food processing industry (Toofu-Ya S.L., Arganda del Rey, Madrid, Spain) provided fresh Okara from soybean [*Glycine max* (L.) Merr]. It was freeze-dried (Virtis Bench Top 3 L, Hucoa-Erlöss S.A., Madrid, Spain) and defatted by extraction with ethyl ether in a Soxtec System (Tecator, Höganäs, Sweden). Before any treatment, Okara was hydrated in water or acetate buffer (1-5 %, w/v, pH 5) at room temperature with constant shaking in a rotatory shaker overnight (Heidolph Reax 2, Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Germany). Enzymatic treatments were performed with two commercial food-grade enzymes, *Viscozyme*<sup>®</sup> L a beta-glucanase (endo- $\beta$ -1,3(4)-), with xylanase, cellulase and hemicellulase activities and *Ultraflo*<sup>®</sup> L, another beta-glucanase (endo- $\beta$ -1,3(4)-), with both xylanase and cellulase activities (Novozymes Spain, S.A., Pozuelo de Alarcón, Madrid, Spain).

All other reagents and carbohydrate standards used were of chromatography grade. All solutions, including, dilutions and mobile phases were prepared with ultrapure water (Resistivity 18.2M $\Omega$  cm at 25 °C; Milli-Q Integral 5 Water Purification System from Millipore, Merck KGaA, Darmstadt, Germany).

### *2.2. Optimization of *Viscozyme*<sup>®</sup> L treatment at atmospheric pressure*

Before applying a treatment with HHP plus *Viscozyme*<sup>®</sup> L on Okara, the procedure and enzyme conditions were optimized at atmospheric pressure.

## *Resultados*

### *2.2.1. Enzymatic activity of Viscozyme<sup>®</sup> L on Okara and Cellulose*

Okara or commercial  $\alpha$ -Cellulose samples (5.5 mg mL<sup>-1</sup> in acetate buffer, pH 5) were treated with *Viscozyme<sup>®</sup> L* (concentrations of 0.0125 %, 0.025 % and 0.05 %, enzyme:substrate v/w) at 55 °C for 5, 15, 30 and 45 min. Density (g/mL) of the enzyme was assessed to express the results in Fungal Beta Glucanase (FBG g<sup>-1</sup>). Reducing carbohydrates (neutral sugars and uronic acids) were spectrophotometrically measured by the 3,5-dinitrosalicylic acid assay (DNS) for reducing sugars (Miller, 1959) adapted to microplate by volume adjustment by us.

### *2.2.2. Improvement of the enzymatic treatment of Okara by Response Surface Methodology (RSM)*

Box-Behnken design was used to elucidate and predict the response of the treatment. Independent variables and their ranges included: concentration of Okara (0.75-1.50 % w/v), *Viscozyme<sup>®</sup> L* (0.5-1.5 % v/w) and time (15-90 min). Temperature was fixed at 55 °C, which is the optimum point of the enzyme. Response was measured by HPLC-ELSD (soluble carbohydrates, MW between 5.7 and 1.9 kDa) as in 2.2.3., 2.2.4. and 2.4. and expressed as mg L<sup>-1</sup> (Condezo-Hoyos, Perez-Lopez, & Ruperez, 2015).

Minitab 16 software was used to design the Response Surface experiments (Box-Behnken Design) and to perform the Response Surface Regression and the analysis of Variance ( $P < 0.05$ ) as previously described by our group (Condezo-Hoyos et al., 2015).

### *2.2.3. Enzymatic kinetics of Viscozyme<sup>®</sup> L on Okara as substrate*

A substrate of 1 % of pre-hydrated Okara in acetate buffer (pH 5) was used to study the enzymatic kinetics of *Viscozyme<sup>®</sup> L*. 0.05 %, 0.025 %, 0.01 % and 0.005 % v/w of enzyme were used for the incubation in a water bath at 55 °C with constant shaking, and

## *Resultados*

aliquots were taken at 15, 30, 60, 90, 120, 150 and 180 min. A control was prepared with 0.01 % *Viscozyme*<sup>®</sup> L previously shocked by heat (100 °C for 10 min). All samples were frozen to stop enzyme activity and then defrosted and injected into the HPLC-ELSD, and soluble carbohydrates (MW ≤ 2.7 kDa) were measured as in 2.2.2, 2.2.4. and 2.4, using the same method and standards as described by our group (Condezo-Hoyos et al., 2015).

### *2.2.4. Enzymatic treatment of Okara with Viscozyme<sup>®</sup> L vs Ultraflo<sup>®</sup> L at atmospheric pressure*

To assess the capability of *Viscozyme*<sup>®</sup> L to hydrolyse insoluble fibre of Okara under different conditions of temperature and pH (optimum conditions are 55 °C, pH 5, but are not convenient for an industrial purpose), diverse situations were evaluated, and compared with another food-grade enzyme, *Ultraflo*<sup>®</sup> L. For this objective, pre-hydrated sample of Okara 1 % (w/v) in water or acetate buffer was treated with either *Viscozyme*<sup>®</sup> L or *Ultraflo*<sup>®</sup> L, (concentration of 0.025 % or a mixture of 0.0125 % of each enzyme, v/w) at pH 7 or 5, 37 °C or 55 °C, for 15 or 30 min in a water bath with constant shaking. Then, samples were stored at -20 °C, until HPLC-ELSD analysis, as in 2.2.2., 2.2.3. and 2.4.

### *2.3. HHP treatment of Okara assisted by Viscozyme<sup>®</sup> L*

Pre-hydrated Okara solution 1 % (w/v) in water was treated with high hydrostatic pressure (HHP) (400 and 600 MPa) and *Viscozyme*<sup>®</sup> L (concentration of 0.025 %, v/w), at 40 °C for 15 or 30 min. Pressure build-up and release times were not considered (less than 1.5 min). The treatment was performed in vacuum-sealed plastic bags (Doypack, 110x200x35 mm size, 75 µm film thick, Polyskin XL, Amcor Flexible Hispania, Granollers, Barcelona, Spain) in a Stansted SFP 7100:9/2C equipment, using water as

## *Resultados*

pressure transmitting medium. Subsequent untreated control (0.1 MPa, atmospheric pressure at  $22 \pm 1$  °C) was also performed. After the treatment with HHP and *Viscozyme*<sup>®</sup> L, samples were stored at -20 °C and then filtered for HPLC-ELSD analysis.

### *2.4. Soluble carbohydrate analysis by HPLC-ELSD*

Prior to the HPLC-ELSD analysis, samples were filtered through 0.45 µm syringe filters (cellulose acetate, 25 mm diameter, Análisis Vínicos, Tomelloso, Toledo, Spain) and injected. High Performance Liquid Chromatography with Evaporative Light Scattering Detector (HPLC-ELSD) was used for carbohydrate analysis (Condezo-Hoyos et al., 2015; Perez-Lopez et al., 2016). Soluble extracts of the different samples were injected and soluble carbohydrates released were quantified from area data and their MW estimated from retention times, with different log-calibration curves as in (Condezo-Hoyos et al., 2015). Carbohydrate standards with a wide range of molecular weight were assayed by direct HPLC-ELSD method to compare with the mean retention time (RT, min) of Okara samples: Dextran T-70 (RT:  $11.83 \pm 0.07$  min, 70 kDa), Dextran T-10 (RT:  $13.39 \pm 0.06$  min, 10 kDa), Inulin (RT:  $14.02 \pm 0.04$  min, 5.93 estimated kDa), Stachyose (RT:  $14.65 \pm 0.02$  min, 0.67 kDa), Raffinose (RT:  $14.74 \pm 0.03$  min, 0.52 estimated kDa), D (+)-Glucose (RT:  $15.04 \pm 0.04$  min, 0.18 kDa), and D (+)-xylose (RT:  $15.12 \pm 0.05$  min, 0.150 kDa).

### *2.5. Statistical analysis*

Results were expressed as mean values  $\pm$  standard deviation. At least three different measurements were accomplished for each mean. Comparison of means was performed by one-way analysis of variance (ANOVA) with a significance level of  $P < 0.05$  according to Statgraphic version 5.1.

### **3. Results and discussion**

#### *3.1. Optimization of Viscozyme<sup>®</sup> L treatment at atmospheric pressure*

The suitability of *Viscozyme<sup>®</sup> L* to hydrolyse Okara was assessed at atmospheric pressure (0.1 MPa). This was an important subject, as the conditions for optimal *Viscozyme<sup>®</sup> L* activity, according to the product data information, were 55 °C and pH 5, but these were not suitable for an easy industrial adaptability, as water as solvent and room temperature are the preferred conditions.

##### *3.1.1. Enzymatic activity of Viscozyme<sup>®</sup> L on Okara and Cellulose*

To assess the activity of *Viscozyme<sup>®</sup> L* to hydrolyse Okara under its optimal conditions (pH 5, 55° C), a comparison between Okara and  $\alpha$ -Cellulose as substrates was made. As the results were expressed as FBG, the higher value corresponded with the lower enzyme activity. *Viscozyme<sup>®</sup> L* was 1.5-times more effective on  $\alpha$ -Cellulose than on Okara, as expected due to the great complexity of its cell wall (Espinosa-Martos & Ruperez, 2009; Kasai et al., 2004; Mateos-Aparicio, Redondo-Cuenca, & Villanueva, 2010; Perez-Lopez et al., 2016) (Table 1). However, the activity was lower than the one specified by the product data information and the one achieved by our group using *Ultraflo<sup>®</sup> L* on Okara (Perez-Lopez et al., 2016). Nevertheless, *Viscozyme<sup>®</sup> L* has previously been applied to soybean (Chen, Zeng, Rao, & Lin, 2014; Kyung-Hyung, Min-Ji, & Myung-Ki, 2002; Rosset, Acquaro Junior, & Beleia, 2014) and Okara (Pérez-López et al.; Tseng, Tseng, & Weng, 2013; Wu, Wu, Yang, & Wang, 2012), but its activity on Okara has not been quantified before.

##### *3.1.2. Improvement of the enzymatic treatment of Okara by Response Surface Methodology (RSM)*

## *Resultados*

An RSM analysis was accomplished at atmospheric pressure in order to optimize the treatment of Okara with *Viscozyme*<sup>®</sup> L before applying the combined HHP + enzymatic treatment (Fig. 1.). When Okara is treated with *Viscozyme*<sup>®</sup> L, there are three key factors (enzyme and substrate concentrations and incubation time) that can affect its effectiveness in releasing soluble carbohydrates from the insoluble fibre of Okara. The performance of these three independent variables has been explained in Fig. 1a. and 1b. The analysis of soluble polysaccharides was determined by HPLC-ELSD (MW between 5.7 and 1.9 kDa). When Okara concentration was fixed at 1.125 %, the maximum content of soluble polysaccharides was achieved at 0.125 % *Viscozyme*<sup>®</sup> L and 80-90 min. As the maximum point was obtained at longer incubation times (80-90 min), the saturation of the enzyme was not achieved (Fig. 1A.). When time was maintained at 52.5 min, again, a 1.5 % Okara and 1.125 % enzyme concentration achieved the best result (Fig. 1B.). Apparently, both, time of treatment and substrate concentration were more important variables than enzyme concentration. This result partially agreed with Kasai (Kasai et al., 2004), where a high concentration of cellulose and long incubation time were not needed to digest Okara. However, our group previously demonstrated that substrate concentration was more determinant than enzyme concentration and incubation time when Okara was treated with *Ultraflo*<sup>®</sup> L (Perez-Lopez et al., 2016), so different behaviours for each enzyme have been highlighted. In other research work, *Viscozyme*<sup>®</sup> L treatment was performed on  $\approx 7$  % Okara and 3 % *Viscozyme*<sup>®</sup> L for 150 min to extract oligosaccharides (Wu et al., 2012), which were not appropriate conditions according to our results.

Additionally, Minitab 16 software predicted an optimum treatment condition with 1.5 % Okara, 1.18 % *Viscozyme*<sup>®</sup> L and 90 min. Both, time and substrate concentration were in the upper limit of the range and longer treatments are not convenient for industrial

## Resultados

purposes, consequently more research work was needed in order to clarify the kinetics of *Viscozyme*<sup>®</sup> L on Okara as it is explained in the next subsection (3.1.3.).

### 3.1.3. Enzymatic kinetics of *Viscozyme*<sup>®</sup> L on Okara as substrate

In Fig. 2., the kinetics of *Viscozyme*<sup>®</sup> L on 1 % Okara as substrate can be observed. *Viscozyme*<sup>®</sup> L was capable to hydrolyse Okara in a low concentration of the enzyme, as differences could be observed between the 0.005 % kinetics and the control. Saturation point in 150 min could be detected in the kinetics of 0.05 % *Viscozyme*<sup>®</sup> L (1:20 enzyme/Okara, v/w). However, in the 0.025 % enzyme (1:40 enzyme/Okara, v/w), a saturation point was seen in 120 min with further increase afterwards, suggesting that *Viscozyme*<sup>®</sup> L applied to Okara did not show a simple kinetics, although this was not observed in every treatment. The great structural complexity of Okara cell wall might be causing this behaviour, with primary and secondary cell walls (Kasai et al., 2004), as well as pectins, proteins, cellulose, hemicellulose and xyloglucans (Mateos-Aparicio, Mateos-Peinado, Jimenez-Escrig, et al., 2010; Mateos-Aparicio, Redondo-Cuenca, & Villanueva, 2010). All these results were comparable with a previous work about the kinetics of *Ultraflo*<sup>®</sup> L on Okara, where a 0.025 % enzyme was saturated within 120-180 min (Perez-Lopez et al., 2016). In other studies, 1 % (Chen et al., 2014), or 0.045 % *Viscozyme*<sup>®</sup> L (Rosset et al., 2014) were applied to soybean and 3 % to Okara (Wu et al., 2012), which would be similar to our results.

### 3.1.4. Enzymatic treatment of Okara with *Viscozyme*<sup>®</sup> L vs *Ultraflo*<sup>®</sup> L at atmospheric pressure

A comparison between the activity of either *Viscozyme*<sup>®</sup> L or *Ultraflo*<sup>®</sup> L and a mixture of both food-grade enzymes was accomplished on Okara using different conditions (Table 2). Surprisingly, total carbohydrates and polysaccharides released from Okara (%)

## Resultados

dry sample) under *Viscozyme*<sup>®</sup> L treatment at pH 7 and 37 °C for 30 min were 1.15 and 1.30-times higher than the corresponding treatment with *Viscozyme*<sup>®</sup> L under its optimal conditions (pH 5 and 55 °C). Moreover, they were 1.08 and 1.11-times higher than the combined treatment with *Viscozyme*<sup>®</sup> L (xylanase, cellulase and hemicellulase activities) + *Ultraflo*<sup>®</sup> L (xylanase and cellulase activities), so a synergy between both enzymes could be excluded, probably due to competition for the same binding site.

In other studies, *Viscozyme*<sup>®</sup> L was used at pH 5.2 and 50 °C (Chen et al., 2014), at 50 °C (Kyung-Hyung et al., 2002), at pH 4.5 and 60 °C (Rovaris et al., 2012) on soybean, at pH 3.5 and 45 °C on Okara (Wu et al., 2012), or at 40 °C on cactus (Kim, Park, Yu, Imm, & Suh, 2014), so an experiment to evaluate the behaviour of *Viscozyme*<sup>®</sup> L under different conditions was needed. Remarkably, the treatment of Okara with *Viscozyme*<sup>®</sup> L at pH 7 and 37 °C for 30 min was the most effective one and the most suitable for an easy industrial application. These conditions were used onwards for the rest of experiments.

### 3.2. Soluble carbohydrates in HHP treated Okara assisted by *Viscozyme*<sup>®</sup> L

The results from the direct HPLC-ELSD analyses of the soluble polysaccharides and oligosaccharides are shown in Table 3 and Fig. 3. Peak A ( $23.78 \pm 0.40$  -  $14.26 \pm 1.23$  kDa) and peak B ( $6.17 \pm 0.33$  -  $11.08 \pm 0.87$  kDa) (Table 3) corresponded to a polysaccharide with a greater MW than Inulin, which MW was estimated as 5.94 kDa (Condezo-Hoyos et al., 2015). Peak C, had an average MW of  $0.46 \pm 0.09$  kDa, which was equivalent to the one obtained for the trisaccharide raffinose (0.47 kDa). However, as this was a wide peak (Fig. 3.), the presence of other low MW carbohydrates, as stachyose (0.65 kDa), or even di- or monosaccharides, could also be possible. In fact, in other studies, raffinose and stachyose were found as a single peak, and the presence of

## *Resultados*

arabinans, galactans, arabinogalactans, xylogalactans or glucans was suggested when Okara was treated with *Ultraflo*<sup>®</sup> L at atmospheric pressure (Villanueva et al., 2013). A significant decrease in the MW of the polysaccharides was noticed when the enzyme was added (up to 47 % when 600 MPa was applied for 15 min), suggesting a synergy between HHP and *Viscozyme*<sup>®</sup> L. Synergy between some  $\alpha$ - and  $\beta$ -amylases (hydrolases) and HHP (400-600 MPa) has been previously observed (Gomes, Clark, & Ledward, 1998; San Martín et al., 2002). According to Perez-Lopez et al., 2016, a synergy between *Ultraflo*<sup>®</sup> L and HHP was revealed. This might be due to changes in the three-dimensional structure of enzyme, affecting the active site, and promoting an interaction with the substrate (Claeys et al., 2003; Garcia-Mora et al., 2015) or to a pressure-induced decompartmentalization, enabling a closer contact between the enzyme and substrate (Rastogi, Raghavarao, Balasubramaniam, Niranjana, & Knorr, 2007).

The decrease in polysaccharide MW is important since low molecular weight polysaccharides (Ramnani et al., 2012) and oligosaccharides (fructo-oligosaccharides, FOS and galacto-oligosaccharides, GOS) have potential prebiotic properties (Rastall & Gibson, 2015; Roberfroid et al., 2010; Slavin, 2013). Soybean-derived oligosaccharides and Okara dietary fibre have proven their beneficial effect as potential prebiotics or weight loss supplement (Jimenez-Escrig, Tenorio, Espinosa-Martos, & Ruperez, 2008; Mateos-Aparicio, Mateos-Peinado, Jimenez-Escrig, et al., 2010; Prestamo et al., 2007), although further studies in humans could be necessary (Corzo et al., 2015).

The concentration of polysaccharides (% dry weight) increased according to treatment intensity, except for the concentration of those in peak A (Table 3 and Fig. 3.). The addition of *Viscozyme*<sup>®</sup> L to the HHP treatment improved the release of soluble

## Resultados

carbohydrates, confirming the synergic effect of the combined treatment. In fact, at 600 MPa for 30 min, the concentration of peak B and peak C increased 1.42- and 1.33-fold respectively when *Viscozyme*<sup>®</sup> L was added. Furthermore, synergy can also be perceived comparing the *Viscozyme*<sup>®</sup> L treatment under atmospheric pressure (Table 2), to the combined treatment. The 600 MPa and 30 min treatment is shown in detail in Fig. 3. Comparing the control at 0.1 MPa with the 600 MPa, 0.025 % *Viscozyme*<sup>®</sup> L treatment, total CHO and polysaccharides, were 2.50 and 3.20-times higher, adding up to  $13.53 \pm 0.30$  % and  $4.27 \pm 0.26$  % respectively. Therefore, a treatment with 600 MPa, 0.025 % *Viscozyme*<sup>®</sup> L, 30 min was the ideal one to solubilize SDF of Okara. These results were slightly lower than in Perez-Lopez et al., 2016, where *Ultraflo*<sup>®</sup> L was employed, achieving a  $15.64 \pm 0.32$  % and  $7.35 \pm 0.90$  % of CHO and polysaccharides, respectively, at the same conditions, maybe due to the differences between enzymatic activities. This treatment was performed on 1 % (d.w.) Okara concentration but it could be applied directly on fresh Okara (80 % moisture content). Interestingly from an industrial point of view, the increase in pressure intensity from 400 to 600 MPa was less effective than the addition of *Viscozyme*<sup>®</sup> L to release total CHO and polysaccharides and the effect of longer times was mostly insignificant for all treatments (Table 3). Likewise, results were comparable to those obtained by Mateos-Aparicio et al., 2010, where Okara was first treated in an autoclave and then subjected to further HHP processing. However, with this enzymatic and HHP method, the detrimental changes on the organoleptic attributes of Okara due to thermal treatments were avoided (San Martín et al., 2002).

The preparation of a SDF-enriched Okara, with low molecular weight carbohydrates is interesting due to its potentially healthy properties, as reduction of cholesterol, glycaemic response, cancer risk and prebiotic effect (Charalampopoulos & Rastall,

2012). This methodology has been optimized for economy and could be industrially applied for maximizing the SDF content of Okara and for improving its utilization as a functional ingredient in other foods (Gullon et al., 2009; Li et al., 2012; Mateos-Aparicio, 2011; Mateos-Aparicio et al., 2013; Tseng et al., 2013; Villanueva et al., 2011).

#### **4. Conclusions**

The higher activity of *Viscozyme*<sup>®</sup> L under high pressure and its capacity to hydrolyse Okara has been proven. Both treatments had a synergic response on Okara. This simultaneous treatment required small amounts of enzyme (1:40 enzyme/Okara v/w), and mild conditions (pH 7, 37 °C) for SDF maximization, which can be useful for industrial purposes. When HHP assisted by *Viscozyme*<sup>®</sup> L (0.025 %, 600 MPa, 30 min) was applied, total carbohydrate and polysaccharides increased 2.50 and 3.20-times, amounting to 13.53±0.30 % and 4.27±0.26 %, respectively, as measured by HPLC-ELSD. SDF-enriched Okara improved its nutritional value and could be used as a source of more balanced and prebiotic source of dietary fibre and oligosaccharides.

#### **5. Acknowledgements**

Elena Pérez-López acknowledges the predoctoral training programme of the Education, Language Policy and Culture of the Basque Government (Spain) (Grant N° PRE\_2013\_1\_682) for her work experience contract at the Department of Metabolism and Nutrition of ICTAN-CSIC in Madrid. Thanks are given to Mr. Takazumi from Toofu-Ya S.L. for providing the Okara by-product and to Mr. Martínez-Gutiérrez from Novozymes Spain, S.A. for providing *Viscozyme*<sup>®</sup> L.

## *Resultados*

**Funding:** Author Elena Pérez-López has received a research grant (No. PRE\_2013\_1\_682) from Education, Language Policy and Culture of the Basque Government (Spain).

### **Conflict of Interest**

All authors declare there are no conflicts of interest.

### **Abbreviations**

CHO, carbohydrates; FBG, fungal beta glucanase; FOS, fructo-oligosaccharides; GOS, galacto-oligosaccharides; HHP, high hydrostatic pressure; HPLC-ELSD, high performance liquid chromatography - evaporative light scattering detector; IDF, insoluble dietary fibre; MW, molecular weight; PS, polysaccharides; RSM, response surface methodology; SDF, soluble dietary fibre.

## 6. Bibliography

- Claeys, W. L., Van Loey, I. A. M., & Hendrickx, M. E. (2003). Review: are intrinsic TTIs for thermally processed milk applicable for high-pressure processing assessment? *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 4(1), 1-14. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S1466-8564\(02\)00066-8](http://dx.doi.org/10.1016/S1466-8564(02)00066-8)
- Condezo-Hoyos, L., Perez-Lopez, E., & Ruperez, P. (2015). Improved evaporative light scattering detection for carbohydrate analysis. *Food Chemistry*, 180, 265-271. doi: 10.1016/j.foodchem.2015.02.039
- Corzo, N., Alonso, J. L., Azpiroz, F., Calvo, M. A., Cirici, M., Leis, R., . . . Clemente, A. (2015). Prebiotics: concept, properties and beneficial effects. [Prebiotics: concept, properties and beneficial effects.]. *Nutricion hospitalaria*, 31 Suppl 1, 99-118. doi: 10.3305/nh.2015.31.sup1.8715
- Courtois, J. (2009). Oligosaccharides from land plants and algae: production and applications in therapeutics and biotechnology. *Current Opinion in Microbiology*, 12(3), 261-273. doi: 10.1016/j.mib.2009.04.007
- Charalampopoulos, D., & Rastall, R. A. (2012). Prebiotics in foods. *Current Opinion in Biotechnology*, 23(2), 187-191. doi: 10.1016/j.copbio.2011.12.028
- Chen, N., Zeng, Q., Rao, J., & Lin, Q. (2014). Effect of Preparation Conditions on Bonding Strength of Soy-based Adhesives via Viscozyme L Action on Soy Flour Slurry. *Bioresources*, 9(4), 7444-7453.
- Espinosa-Martos, I., & Ruperez, P. (2009). Indigestible fraction of okara from soybean: composition, physicochemical properties and in vitro fermentability by pure cultures of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum*. *European Food Research and Technology*, 228(5), 685-693. doi: 10.1007/s00217-008-0979-7
- FAO. (2015). <http://faostat3.fao.org/home/E>, retrieved on September 2015.
- Garcia-Mora, P., Penas, E., Frias, J., Gomez, R., & Martinez-Villaluenga, C. (2015). High-pressure improves enzymatic proteolysis and the release of peptides with angiotensin I converting enzyme inhibitory and antioxidant activities from lentil proteins. *Food Chemistry*, 171, 224-232. doi: 10.1016/j.foodchem.2014.08.116
- Gomes, M. R. A., Clark, R., & Ledward, D. A. (1998). Effects of high pressure on amylases and starch in wheat and barley flours. *Food Chemistry*, 63(3), 363-372. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0308-8146\(98\)00014-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0308-8146(98)00014-4)
- Gullon, P., Gullon, B., Moure, A., Alonso, J. L., Dominguez, H., & Parajo, J. C. (2009). Manufacture of Prebiotics from Biomass Sources. In D. Charalampopoulos & R. Rastall (Eds.), *Prebiotics and Probiotics Science and Technology* (pp. 535-589): Springer New York.
- Jimenez-Escrig, A., Tenorio, M. D., Espinosa-Martos, I., & Ruperez, P. (2008). Health-promoting effects of a dietary fiber concentrate from the soybean byproduct okara in rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(16), 7495-7501. doi: 10.1021/jf800792y
- Kasai, N., Murata, A., Inui, H., Sakamoto, T., & Kahn, R. I. (2004). Enzymatic high digestion of soybean milk residue (okara). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(18), 5709-5716. doi: 10.1021/jf035067v
- Kim, D., & Han, G. D. (2012). High hydrostatic pressure treatment combined with enzymes increases the extractability and bioactivity of fermented rice bran. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 16, 191-197. doi: 10.1016/j.ifset.2012.05.014
- Kim, J. H., Park, Y., Yu, K. W., Imm, J. Y., & Suh, H. J. (2014). Enzyme-assisted extraction of cactus bioactive molecules under high hydrostatic pressure. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(5), 850-856. doi: 10.1002/jsfa.6317
- Kyung-Hyung, K., Min-Ji, K., & Myung-Ki, L. (2002). Effects of enzyme treatment on the physical properties of microparticulated soybean powder. *Food Science and Biotechnology*, 11(4), 380-388.

## Resultados

- Li, B., Qiao, M., & Lu, F. (2012). Composition, Nutrition, and Utilization of Okara (Soybean Residue). *Food Reviews International*, 28(3), 231-252. doi: 10.1080/87559129.2011.595023
- Mateos-Aparicio, I. (2011). Beans by-products, potential sources for functional ingredients. In p. E. Popescu and Iv. Golubev (Ed.), *Beans: Nutrition, Consumption and Health*: Nova Science Publishers, Inc.
- Mateos-Aparicio, I., Mateos-Peinado, C., Jimenez-Escrig, A., & Ruperez, P. (2010). Multifunctional antioxidant activity of polysaccharide fractions from the soybean byproduct okara. *Carbohydrates Polymers*, 82(2), 245-250. doi: 10.1016/j.carbpol.2010.04.020
- Mateos-Aparicio, I., Mateos-Peinado, C., & Ruperez, P. (2010). High hydrostatic pressure improves the functionality of dietary fibre in okara by-product from soybean. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 11(3), 445-450. doi: 10.1016/j.ifset.2010.02.003
- Mateos-Aparicio, I., Redondo-Cuenca, A., & Villanueva, M. J. (2010). Isolation and characterisation of cell wall polysaccharides from legume by-products: Okara (soymilk residue), pea pod and broad bean pod. *Food Chemistry*, 122(1), 339-345. doi: 10.1016/j.foodchem.2010.02.042
- Mateos-Aparicio, I., Redondo-Cuenca, A., & Villanueva, M. J. (2013). Dietary Fiber from the Food Industry by-Products. In I. Nova Science Publishers (Ed.), *Dietary Fiber: Sources, Properties and Their Relationship to Health* (pp. 23). New York: Nova Biomedical.
- Mateos-Aparicio, I., Redondo-Cuenca, A., Villanueva, M. J., Zapata-Revilla, M. A., & Tenorio-Sanz, M. D. (2010). Pea pod, broad bean pod and okara, potential sources of functional compounds. *LWT - Food Science and Technology*, 43(9), 1467-1470. doi: 10.1016/j.lwt.2010.05.008
- Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Journal of Analytical Chemistry*, 31(3), 426-428. doi: 10.1021/ac60147a030
- Mudgil, D., & Barak, S. (2013). Composition, properties and health benefits of indigestible carbohydrate polymers as dietary fiber: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 61, 1-6. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2013.06.044
- O'Toole, D. K. (1999). Characteristics and Use of Okara, the Soybean Residue from Soy Milk Productions: A Review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 8.
- Perez-Lopez, E., Mateos-Aparicio, I., & Ruperez, P. (2016). Okara treated with high hydrostatic pressure assisted by Ultraflo (R) L: Effect on solubility of dietary fibre. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 33, 32-37.
- Pérez-López, E., Mateos-Aparicio, I., & Rupérez, P. Low molecular weight carbohydrates released from Okara by enzymatic treatment under high hydrostatic pressure. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ifset.2016.09.014>
- Prestamo, G., Ruperez, P., Espinosa-Martos, I., Villanueva, M. J., & Lasuncion, M. A. (2007). The effects of okara on rat growth, cecal fermentation, and serum lipids. *European Food Research and Technology*, 225(5-6), 925-928. doi: 10.1007/s00217-006-0497-4
- Ramnani, P., Chitarrari, R., Tuohy, K., Grant, J., Hotchkiss, S., Philp, K., . . . Rowland, I. (2012). In vitro fermentation and prebiotic potential of novel low molecular weight polysaccharides derived from agar and alginate seaweeds. *Anaerobe*, 18(1), 1-6. doi: 10.1016/j.anaerobe.2011.08.003
- Rastall, R. A., & Gibson, G. R. (2015). Recent developments in prebiotics to selectively impact beneficial microbes and promote intestinal health. *Current Opinion in Biotechnology*, 32, 42-46. doi: 10.1016/j.copbio.2014.11.002
- Rastogi, N. K., Raghavarao, K., Balasubramaniam, V. M., Niranjana, K., & Knorr, D. (2007). Opportunities and challenges in high pressure processing of foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 47(1), 69-112. doi: 10.1080/10408390600626420

## Resultados

- Redondo-Cuenca, A., Villanueva, M. J., & Mateos-Aparicio, I. (2008). Soybean seeds and its by-product okara as sources of dietary fibre. Measurement by AOAC and Englyst methods. *Food Chemistry*, *108*(3), 1099-1105. doi: 10.1016/j.foodchem.2007.11.061
- Roberfroid, M., Gibson, G. R., Hoyles, L., McCartney, A. L., Rastall, R., Rowland, I., . . . Meheust, A. (2010). Prebiotic effects: metabolic and health benefits. *British Journal of Nutrition*, *104*, S1-S63. doi: 10.1017/s0007114510003363
- Rosset, M., Acquaro Junior, V. R., & Beleia, A. D. P. (2014). Protein Extraction from Defatted Soybean Flour with Viscozyme L Pretreatment. *Journal of Food Processing and Preservation*, *38*(3), 784-790. doi: 10.1111/jfpp.12030
- Rovaris, A. A., Dias, C. O., da Cunha, I. P., Cirra Scaff, R. M., de Francisco, A., Petkowicz, C. L. O., & Amante, E. R. (2012). Chemical composition of solid waste and effect of enzymatic oil extraction on the microstructure of soybean (*Glycine max*). *Industrial Crops and Products*, *36*(1), 405-414. doi: 10.1016/j.indcrop.2011.10.001
- San Martín, M. F., Barbosa-Cánovas, G. V., & Swanson, B. G. (2002). Food Processing by High Hydrostatic Pressure. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *42* (6), 627-645.
- Slavin, J. (2013). Fiber and Prebiotics: Mechanisms and Health Benefits. *Nutrients*, *5*(4), 1417-1435. doi: 10.3390/nu5041417
- Tseng, Y. C., Tseng, H. C., & Weng, Y. M. (2013). Hydrolyzed okara in low-fat pork burgers under pilot scale. In J. Zhao, R. Iranpour, X. Li & B. Jin (Eds.), *Advances in Environmental Technologies, Pts 1-6* (Vol. 726-731, pp. 2908-2916).
- Villanueva, M. J., Perez-Cozar, M. L., & Redondo-Cuenca, A. (2013). Sequential extraction of polysaccharides from enzymatically hydrolyzed okara byproduct: Physicochemical properties and in vitro fermentability. *Food Chemistry*, *141*(2), 1114-1119. doi: 10.1016/j.foodchem.2013.03.066
- Villanueva, M. J., Yokoyama, W. H., Hong, Y. J., Bartley, G. E., & Ruperez, P. (2011). Effect of high-fat diets supplemented with okara soybean by-product on lipid profiles of plasma, liver and faeces in Syrian hamsters. *Food Chemistry*, *124*(1), 72-79. doi: 10.1016/j.foodchem.2010.05.106
- Wu, J., Wu, Y., Yang, C., & Wang, Z. (2012). Enzymatic Preparation and Characterization of Soybean Oligosaccharides from Okara. In L. Zhang (Ed.), *Second Sree Conference on Engineering Modelling and Simulation* (Vol. 37, pp. 186-191).

**Figure captions**

Fig. 1 Optimization by Response Surface Method (RSM) of Okara treated with *Viscozyme*<sup>®</sup> L at atmospheric pressure

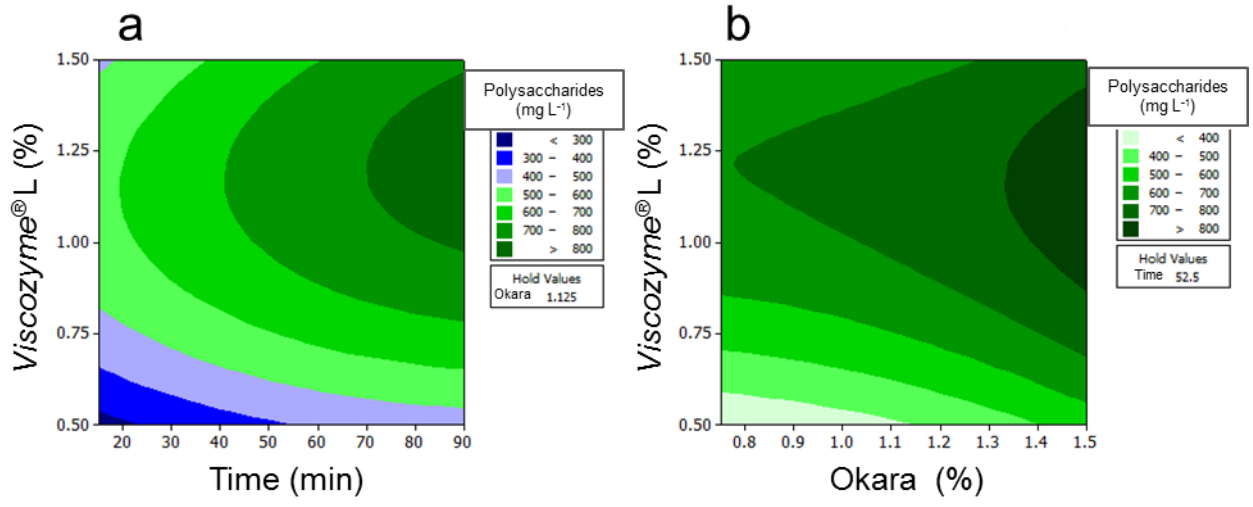
Fig. 1a: *Viscozyme*<sup>®</sup> L concentration *versus* time at a fixed Okara concentration (1.125 % w/v)

Fig. 1b: *Viscozyme*<sup>®</sup> L concentration *versus* Okara concentration at a fixed time (52.5 min)

Fig. 2 Enzymatic kinetics of *Viscozyme*<sup>®</sup> L on Okara as substrate at atmospheric pressure

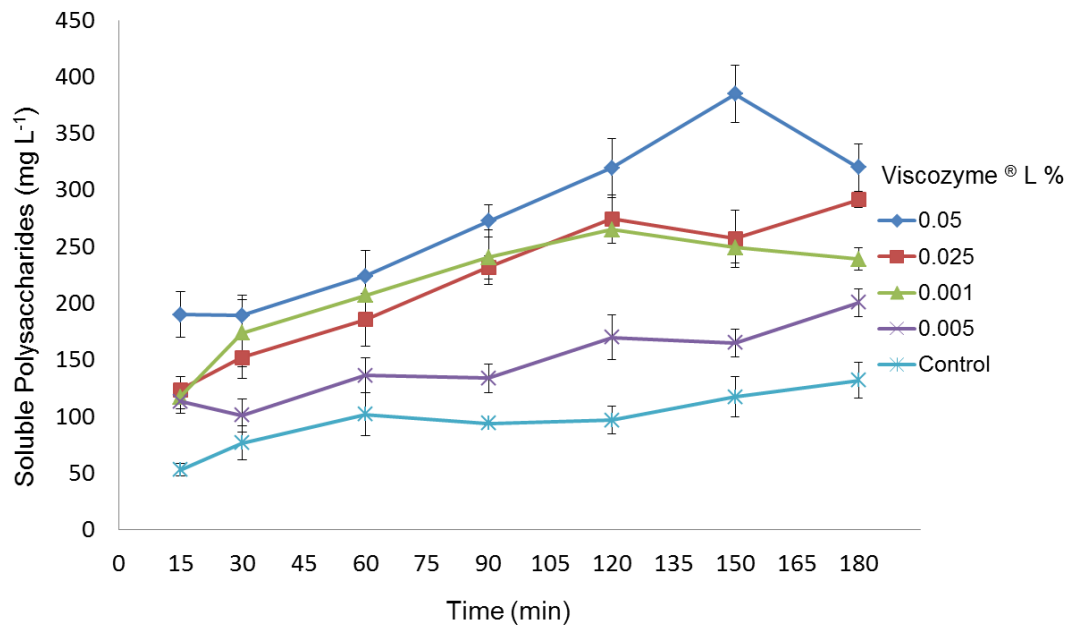
Fig. 3 HPLC-ELSD chromatograms of Okara samples treated with HHP (600 MPa, 30 min) without *Viscozyme*<sup>®</sup> L (A), and with *Viscozyme*<sup>®</sup> L (0.025 %) (B). Retention Time and MW of standards are represented on the chromatograms. mV: millivolts

Fig. 1



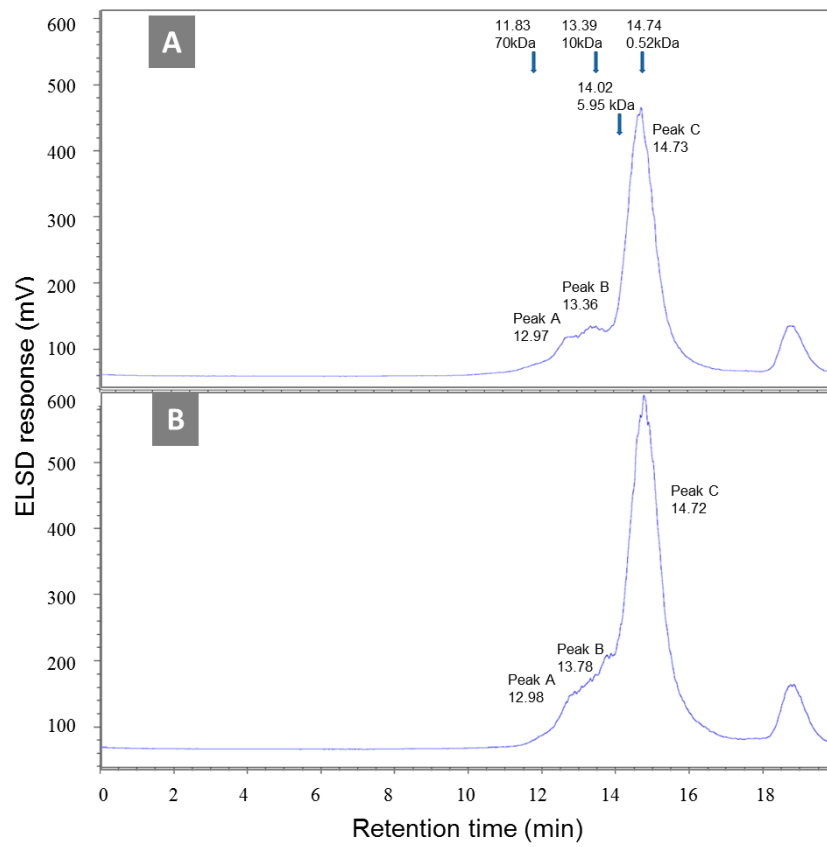
Resultados

Fig. 2



## Resultados

**Fig. 3**



**Table 1**

Enzymatic activity of *Viscozyme*<sup>®</sup> L on Okara and Cellulose

<i>Viscozyme</i> <sup>®</sup> L 0.0125%	FBG/mL	FBG/g
Okara	426±4.50 <sup>a</sup>	339±36 <sup>a</sup>
Cellulose	285±14 <sup>b</sup>	227±12 <sup>b</sup>
Product data information	125	100

FBG: Fungal Beta Glucanase.

Means (n = 3) with different letters in each column differ significantly ( $P < 0.05$ ).

## *Resultados*

Resultados

**Table 2**

Enzymatic activity of *Viscozyme*<sup>®</sup> L and *Ultraflo*<sup>®</sup> L on Okara at atmospheric pressure

Treatment conditions				Peaks in chromatogram						CHO	PS
Enzyme	Enzyme %	pH	min	Peak 1		Peak 2		Peak 3		% d.w.	% d.w.
				% d.w.	MW (kDa)	% d.w.	MW (kDa)	% d.w.	MW (kDa)		
0	0	7	15	0.67±0.06 <sup>a</sup>	23.78±0.40 <sup>c</sup>	0.67±0.08 <sup>a</sup>	10.02±2.40 <sup>de</sup>	4.10±0.36 <sup>a</sup>	0.54±0.04 <sup>c</sup>	5.44±0.50 <sup>a</sup>	1.34±0.16 <sup>a</sup>
U	0.025	7	15	0.94±0.06 <sup>b</sup>	22.03±0.30 <sup>de</sup>	1.14±0.07 <sup>b</sup>	10.41±1.89 <sup>de</sup>	4.89±0.09 <sup>c</sup>	0.48±0.05 <sup>bc</sup>	6.97±0.09 <sup>c</sup>	2.08±0.06 <sup>cd</sup>
			30	1.18±0.15 <sup>c</sup>	16.45±1.78 <sup>a</sup>	1.47±0.19 <sup>d</sup>	8.98±1.35 <sup>cd</sup>	6.36±0.11 <sup>fg</sup>	0.39±0.03 <sup>ab</sup>	9.01±0.41 <sup>fg</sup>	2.65±0.33 <sup>ef</sup>
V	0.025	7	15	0.79±0.04 <sup>a</sup>	23.06±0.88 <sup>c</sup>	0.83±0.07 <sup>a</sup>	10.49±0.37 <sup>de</sup>	4.61±0.07 <sup>bc</sup>	0.42±0.07 <sup>ab</sup>	6.23±0.27 <sup>b</sup>	1.62±0.20 <sup>b</sup>
			30	1.39±0.07 <sup>d</sup>	18.58±1.36 <sup>bc</sup>	1.38±0.09 <sup>d</sup>	7.22±0.64 <sup>bc</sup>	6.55±0.08 <sup>g</sup>	0.36±0.05 <sup>a</sup>	9.32±0.12 <sup>g</sup>	2.77±0.13 <sup>f</sup>
V*	0.025	5	15	Nd	Nd	1.84±0.18 <sup>e</sup>	4.93±0.68 <sup>a</sup>	5.34±0.46 <sup>d</sup>	0.42±0.02 <sup>ab</sup>	7.18±0.44 <sup>c</sup>	1.84±0.18 <sup>bc</sup>
			30			2.13±0.17 <sup>f</sup>	4.91±0.41 <sup>a</sup>	6.06±0.15 <sup>ef</sup>	0.40±0.08 <sup>ab</sup>	8.19±0.19 <sup>d</sup>	2.13±0.31 <sup>c</sup>
U+V	0.025**	7	15	0.79±0.03 <sup>a</sup>	23.12±1.22 <sup>e</sup>	0.73±0.09 <sup>a</sup>	11.14±0.11 <sup>c</sup>	4.31±0.20 <sup>ab</sup>	0.45±0.05 <sup>bc</sup>	5.83±0.26 <sup>b</sup>	1.52±0.15 <sup>b</sup>
			30	1.13±0.09 <sup>c</sup>	17.95±0.93 <sup>ab</sup>	1.36±0.13 <sup>cd</sup>	6.63±0.08 <sup>ab</sup>	6.14±0.20 <sup>f</sup>	0.43±0.05 <sup>ab</sup>	8.63±0.39 <sup>ef</sup>	2.49±0.20 <sup>ef</sup>

U: *Ultraflo*<sup>®</sup> L; V: *Viscozyme*<sup>®</sup> L; U+V: *Ultraflo*<sup>®</sup> L + *Viscozyme*<sup>®</sup> L; \*: Under optimal conditions of *Viscozyme*: pH 5 and 55 °C; \*\*:0.0125 %: each enzyme. Nd: Not detected. CHO: Carbohydrates, PS: Polysaccharides. d.w.: dry weight.

Means (n = 3) with different letters in each column differ significantly ( $P < 0.05$ ).

Resultados

**Table 3**

Direct HPLC-ELSD analysis of soluble fraction released from Okara treated with HHP and assisted by *Viscozyme*<sup>®</sup> L

Treatment conditions			Peaks in chromatogram						Total soluble CHO (Peak A+B+C)	Soluble PS (Peak A+B)	PS/CHO	PS/peak C
HHP (MPa)	min	<i>Viscozyme</i> <sup>®</sup> L %	Peak A		Peak B		Peak C		% d.w.	% dry sample		
			% d.w.	MW (kDa)	% d.w.	MW (kDa)	% d.w.	MW (kDa)				
0.1	15	0	0.67±0.06	23.78±0.40 <sup>f</sup>	0.67±0.08 <sup>a</sup>	10.02±2.40 <sup>b</sup>	4.10±0.36 <sup>a</sup>	0.54±0.04 <sup>d</sup>	5.44±0.50 <sup>a</sup>	1.34±0.16 <sup>a</sup>	0.246	0.246
	15	0	1.62±0.23	20.36±1.49 <sup>e</sup>	1.75±0.12 <sup>b</sup>	11.08±0.87 <sup>bc</sup>	7.03±0.22 <sup>b</sup>	0.51±0.02 <sup>cd</sup>	10.40±0.34 <sup>b</sup>	3.37±0.26 <sup>bc</sup>	0.324	0.324
400		0.025	1.76±0.32	17.57±2.05 <sup>bcd</sup>	2.53±0.37 <sup>c</sup>	6.31±0.79 <sup>a</sup>	8.79±0.19 <sup>c</sup>	0.30±0.06 <sup>a</sup>	13.08±0.52 <sup>c</sup>	4.29±0.49 <sup>c</sup>	0.328	0.328
	30	0	1.75±0.17	20.01±2.14 <sup>de</sup>	1.76±0.12 <sup>b</sup>	10.67±0.30 <sup>b</sup>	7.04±0.15 <sup>b</sup>	0.47±0.04 <sup>bcd</sup>	10.55±0.25 <sup>b</sup>	3.51±0.21 <sup>bc</sup>	0.333	0.333
		0.025	1.95±0.31	16.92±1.02 <sup>bc</sup>	2.40±0.19 <sup>bc</sup>	6.74±0.36 <sup>a</sup>	8.67±0.49 <sup>c</sup>	0.35±0.01 <sup>a</sup>	13.02±0.61 <sup>c</sup>	4.35±0.37 <sup>c</sup>	0.334	0.334
	15	0	1.49±0.17	21.03±2.38 <sup>c</sup>	1.68±0.09 <sup>b</sup>	10.14±2.07 <sup>b</sup>	6.96±0.10 <sup>b</sup>	0.61±0.06 <sup>e</sup>	10.13±0.22 <sup>b</sup>	3.17±0.19 <sup>b</sup>	0.313	0.313
600		0.025	1.89±0.21	14.26±1.23 <sup>a</sup>	2.21±0.37 <sup>bc</sup>	6.17±0.33 <sup>a</sup>	9.12±0.56 <sup>c</sup>	0.43±0.07 <sup>b</sup>	13.22±0.70 <sup>c</sup>	4.10±0.43 <sup>bc</sup>	0.310	0.310
	30	0	1.72±0.23	19.42±1.53 <sup>cde</sup>	1.78±0.32 <sup>b</sup>	12.29±0.79 <sup>c</sup>	6.96±0.22 <sup>b</sup>	0.53±0.02 <sup>d</sup>	10.46±0.45 <sup>b</sup>	3.50±0.40 <sup>bc</sup>	0.335	0.335
		0.025	1.74±0.22	16.77±1.60 <sup>ab</sup>	2.53±0.13 <sup>c</sup>	6.60±0.75 <sup>a</sup>	9.26±0.15 <sup>c</sup>	0.48±0.04 <sup>bcd</sup>	13.53±0.30 <sup>c</sup>	4.27±0.26 <sup>c</sup>	0.316	0.316

Nd: Not detected. CHO: Carbohydrates, PS: Polysaccharides. d.w.: dry weight.

Means (n = 3) with different letters in each column differ significantly ( $P < 0.05$ ).

**Determination of the Soluble Dietary Fibre content of Okara treated with High Hydrostatic Pressure and enzymes: a comparative evaluation of two methods (AOAC and HPLC-ELSD)**

**E. Pérez-López<sup>1</sup>, I. Mateos-Aparicio<sup>2</sup>, P. Rupérez<sup>1\*</sup>**

<sup>1</sup>Departamento de Metabolismo y Nutrición, Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición (ICTAN), Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), José Antonio Novais 10, Ciudad Universitaria, E-28040 Madrid, Spain

<sup>2</sup>Departamento de Nutrición y Bromatología II, Bromatología, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Ciudad Universitaria, E-28040 Madrid, Spain

\*Corresponding author: Pilar Rupérez (pruperez@ictan.csic.es) 0034 915 49 23 00

**Acknowledgements**

Elena Pérez-López acknowledges the predoctoral training programme of the Education, Language Policy and Culture of the Basque Government (Spain) (Grant No. PRE\_2013\_1\_682) for her work experience contract at the Department of Metabolism and Nutrition of ICTAN-CSIC in Madrid. Thanks are given to Mr. Takazumi from Toofu-Ya S.L. for providing the Okara by-product and to Mr. Martínez-Gutiérrez from Novozymes Spain, S.A. for providing the enzymes.

**Highlights**

- AOAC official method detects changes in SDF content of Okara treated with HHP and enzymes
- Enzymatic and HHP treatment of Okara increases SDF due to IDF hydrolysis
- Direct HPLC-ELSD detection method is twice as sensitive than AOAC and faster
- Interferences of the AOAC detection methodology are detected

**Abstract**

Okara is a promising by-product from soybean and a rich source of dietary fibre, chiefly insoluble (IDF). To increase its solubility and functionality, a treatment with high hydrostatic pressure (HHP) assisted by food grade enzymes -*Ultraflo*<sup>®</sup> L or *Viscozyme*<sup>®</sup> L- has been performed. To monitor the effectiveness, an analysis of dietary fibre, mainly the soluble fraction (SDF), was accomplished by the AOAC enzymatic-gravimetric method with dialysis followed by both, spectrophotometric methods and High Performance Liquid Chromatography with Evaporative Light Scattering Detector (HPLC-ELSD) analysis of the soluble fraction. A significant increase in SDF ( $\approx 1.5$ -times) to the expense of a decrease in IDF was shown and chromatograms revealed two peaks of 95 and 22 kDa. Thus, treated Okara possessed a more balanced and convenient ratio of soluble to insoluble dietary fibre, which could have health benefits as prebiotic. Inbuilt interferences of the official AOAC's method for dietary fibre were confirmed and the direct HPLC-ELSD approach was about twice more sensitive than spectrophotometric methods. Consequently, the direct HPLC-ELSD analysis of the supernatant is proposed as a cheaper, faster and reliable method. Combined HHP-treatments plus specific enzymes represent a promising alternative for the valorisation and preservation of agrofood by-products.

Keywords: Okara; Agrofood by-product; HHP; *Ultraflo*<sup>®</sup> L; *Viscozyme*<sup>®</sup> L; SDF analysis

## **1. Introduction**

Nowadays, by-products are promising sources of bioactive compounds and prebiotics (Gullon et al. 2009; Mateos-Aparicio 2011; Mateos-Aparicio et al. 2013; Rastall and Gibson 2015). Among them, Okara from soybean, a by-product of soymilk or tofu industries (Mateos-Aparicio et al. 2010c; O'Toole 1999) is cheap, abundant and a valuable source of dietary fibre (50 % insoluble dietary fibre, IDF and 4.5 % soluble dietary fibre, SDF) (Mateos-Aparicio et al. 2010c), which makes it a potential prebiotic supplement (Jimenez-Escrig et al. 2008; Prestamo et al. 2007; Redondo-Cuenca et al. 2008). However, as Okara is mostly insoluble, different approaches are used to increase its SDF content, which is responsible for the prebiotic and anti-carcinogenic effects (Charalampopoulos and Rastall 2012). These include, chemical (Mateos-Aparicio et al. 2010a), enzymatic treatments with food grade hydrolytic enzymes at atmospheric pressure, such as *Ultraflo*<sup>®</sup> L or *Viscozyme*<sup>®</sup> L (Kasai et al. 2004; Rovaris et al. 2012; Ruperez et al. 2011; Villanueva et al. 2013), as well as high hydrostatic pressure (HHP) treatment (Li et al. 2012; Mateos-Aparicio et al. 2010b) are employed to release soluble carbohydrates from the complex cell wall found in Okara. Moreover, a combination of HHP and enzymatic treatment has been used, since HHP can enhance the activity of some enzymes on Okara's cell wall, achieving up to 3.5-times higher soluble content after *Ultraflo*<sup>®</sup> L hydrolysis under HHP (Perez-Lopez et al. 2016), measured by a direct HPLC-ELSD method. However, SDF and IDF have not been measured by the official AOAC method, and a comparison between both methods is needed. Therefore, the aim of this work is to compare the direct HPLC-ELSD method with the official AOAC method in samples of Okara treated with HHP and enzymes and to develop the application of the optimized HPLC-ELSD method for SDF analysis after AOAC procedure.

## **2. Materials and methods**

### *2.1. Materials, reagents, samples and equipment*

A local food processing industry (Toofu-Ya S.L., Arganda del Rey, Madrid, Spain) provided fresh Okara from soybean [*Glycine max* (L.) Merr]. Once at the laboratory it was freeze-dried (Virtis Bench Top 3 L, Hucoa-Erlöss S.A., Madrid, Spain) and defatted by extraction with ethylic ether in a Soxtec System (Tecator, Höganäs, Sweden). Before any further treatment, Okara was re-hydrated in water (1 % w/v) (Perez-Lopez et al. 2016). Enzymatic treatments were performed with two commercial food-grade endo- $\beta$ -1,3(4)-glucanases: *Ultraflo*<sup>®</sup> L, with both xylanase and cellulase activities, and *Viscozyme*<sup>®</sup> L, with xylanase, cellulase and hemicellulase activities (Novozymes Spain, S.A., Pozuelo de Alarcón, Madrid, Spain).

All other reagents and carbohydrate standards used were of chromatography grade. All solutions, including, dilutions and mobile phases were prepared with ultrapure water (Resistivity 18.2M $\Omega$  cm at 25 °C; Milli-Q Integral 5 Water Purification System from Millipore, Merck KGaA, Darmstadt, Germany).

### *2.2. HHP treatment of Okara assisted by enzyme*

Re-hydrated Okara solution (1 %, w/v) was treated with high hydrostatic pressure (HHP) at 400 and 600 MPa, aided by *Ultraflo*<sup>®</sup> L or *Viscozyme*<sup>®</sup> L (concentration 0.025 % v/w), at 40 °C for 15 or 30 min (Perez-Lopez et al. 2016). HHP treatment was performed in a Stansted SFP 7100:9/2C equipment, using water as pressure transmitting medium. After treatment, samples were freeze-dried (Virtis Bench Top 3 L, Hucoa-Erlöss S.A., Madrid, Spain) for the analysis of dietary fibre by official AOAC method.

### *2.3. Dietary fibre analysis of Okara treated with HHP assisted by enzyme*

## *Resultados*

Soluble and insoluble dietary fibre fractions were determined in HHP + *Ultraflo*<sup>®</sup> L or HHP + *Viscozyme*<sup>®</sup> L treated samples according to the modified AOAC 991.43 (Association of Official Analytical Chemists, 1995) enzymatic–gravimetric method with dialysis (12 kDa MW cut off) (Mañas and Saura-Calixto 1993; Mateos-Aparicio et al. 2010b) to avoid ethanolic precipitation (in AOAC 991.43 and 2011.25 methods) that may cause an underestimation of SDF and overestimation of IDF. An aliquot of SDF fraction was taken for direct HPLC-ELSD analysis.

### *2.3.1. Dietary fibre analysis by spectrophotometric methods*

All the spectrophotometric methods used were previously miniaturized and adapted to microplate by volume adjusting. According to the AOAC method, uronic acids (UA) in SDF fraction were spectrophotometrically quantified by the Scott method (Scott 1979) (200 µL total volume and 50-200 mg L<sup>-1</sup> galacturonic acid detection range, DR), and neutral sugars (NS) were determined by the anthrone method (Loewus 1952) (200 µL total volume and, 25-150 mg L<sup>-1</sup> glucose DR). Moreover, SDF and IDF fractions after AOAC method were hydrolysed with H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1 M) at 105 °C for 1.5 h and reducing sugars were spectrophotometrically measured by dinitrosalicylic acid method (DNS) (Miller 1959) (270 µL total volume and, 250-1500 mg L<sup>-1</sup> glucose DR). Absorbance readings were measured on a Biotek PowerWave XS spectrophotometer. Thus, SDF was calculated either as total neutral sugars plus uronic acids (NS + UA) or as reducing sugars (DNS method). IDF was calculated as reducing sugars (DNS method) and total dietary fibre (TDF) was calculated as SDF plus IDF.

### *2.3.2. Soluble carbohydrate analysis by HPLC-ELSD*

The soluble fraction from the modified AOAC method for dietary fibre was filtered through 0.45 µm (cellulose acetate, 25 mm diameter, Análisis Vínicos, Tomelloso,

## *Resultados*

Toledo, Spain) and directly analysed by High Performance Liquid Chromatography with Evaporative Light Scattering Detector (HPLC-ELSD) on a size-exclusion column, as previously reported for carbohydrate analysis (Condezo-Hoyos et al. 2015; Perez-Lopez et al. 2016). SDF was quantified from area data and MW estimated from retention times, with log-calibration curves (Condezo-Hoyos et al. 2015).

### *2.4. Statistical analysis*

Results were expressed as mean values  $\pm$  standard deviation. At least, three different measurements were accomplished for each mean. Comparison of means was performed by one-way analysis of variance with a significance level of  $P < 0.05$  according to Statgraphic version 5.1. (Statpoint Technologies, Inc. Warrenton, Virginia, US).

## **3. Results and discussion**

Results from the modified AOAC procedure are shown in Tables 1 and 2 and Fig. 1 (1.1, 1.2). This method has been capable of detecting differences between samples, as the direct HPLC-ELSD analysis did (Perez-Lopez et al. 2016). Thus, for each treatment, an increase in SDF was observed and the 600 MPa, at 40 °C for 30 min treatment was the most effective one with both enzymes, as in a previous work. Also, a synergy between the HHP and the enzymatic treatment has been observed, especially in *Ultraflo*<sup>®</sup> L (Table 1), which was comparable with our previous experiments (Perez-Lopez et al. 2016). 2.9, 1.5 and 1.5-times higher SDF content using 0.025% *Ultraflo*<sup>®</sup> L and 1.2, 1.3 and 1.2- times higher using 0.025% *Viscozyme*<sup>®</sup> L were achieved in these conditions compared to the control, by NS+UA, DNS and HPLC-ELSD methods, respectively. However, the direct HPLC-ELSD analysis was more sensible than the AOAC method followed by spectrophotometric methods. Values were correspondingly 3.6- and 3.4-times lower than those reported for soluble polysaccharides measured by

## Resultados

direct HPLC-ELSD method in the supernatant after treatment with 0.025% *Ultraflo*<sup>®</sup> L (Perez-Lopez et al. 2016) or *Viscozyme*<sup>®</sup> L at 600 MPa and 40 °C for 30 min (unpublished results). Furthermore, SDF values were reported to be lower than in previous works on native Okara using an AOAC method (991.42) for dietary fibre without dialysis (Redondo-Cuenca et al. 2008) and in Okara treated with HHP + autoclaving using the same AOAC method as in this study but followed by gas liquid chromatography of monosaccharides (Mateos-Aparicio et al. 2010b). Changes in the IDF profile of Okara caused by the treatment with HHP and hydrolytic enzymes have not been assessed before. Results suggested that SDF increase was due to a hydrolysis of IDF polysaccharides, as this was reported to be 1.4 and 1.6-times lower in *Ultraflo*<sup>®</sup> L and *Viscozyme*<sup>®</sup> L treatment at 600 MPa for 30 min, respectively (Tables 1 and 2). This was attributable to a release of CHO from Okara's intricate cell wall (Kasai et al. 2004; Mateos-Aparicio et al. 2010c; Villanueva et al. 2013). Considerable changes in SDF/TDF ratio were detected (from 0.049 to 0.100 in combined treatments, as in other previous reports (Mateos-Aparicio et al. 2010b; Perez-Lopez et al. 2016).

AOAC official method is normally used followed by spectrophotometric analysis (Mateos-Aparicio et al. 2010b). Here, the use of the HPLC-ELSD method for analysing the SDF fraction has been suggested instead. HPLC-ELSD chromatogram of the SDF fraction after AOAC method revealed the existence of one peak of  $\approx 95$  kDa and a smaller one of  $\approx 22$  kDa, which presented a gradual decrease in its MW upon treatment and it was more noticeable in *Viscozyme*<sup>®</sup> L experiment (Fig. 1.2). These low MW non-digestible carbohydrates could have beneficial prebiotic effects as they are more easily fermentable by specific bacteria than those with high MW (Charalampopoulos and Rastall 2012; Jimenez-Escrig et al. 2008; Mateos-Aparicio et al. 2010a; Mateos-Aparicio et al. 2010b; Prestamo et al. 2007; Villanueva et al. 2011). Direct HPLC-

## Resultados

ELSD analysis of supernatant in Okara after treatment with HHP + *Ultraflo*<sup>®</sup> L (without further AOAC method) showed three peaks of approximately 24, 10 and 0.55 kDa (Perez-Lopez et al. 2016; Pérez-López et al. 2016). The smallest MW peak corresponds to an oligosaccharide with a degree of polymerisation of three. Non-physiological conditions for dietary fibre by AOAC method could release high MW polysaccharides from Okara's cell wall, and small molecules (< 12 kDa MW) were lost during dialysis of SDF (Villanueva et al. 2013). Thus, after modified AOAC method with dialysis only two peaks were detected, with the loss of the smallest peaks. Therefore, direct HPLC-ELSD analysis as reported in Perez-Lopez et al., 2016 was found to be cheaper, less time consuming, more precise and sensitive for monitoring SDF after HHP + enzymes treatment of samples and could directly assess the molecular weight of the carbohydrates released without the inherent interferences of the AOAC methods for dietary fibre analysis.

## 4. Conclusions

The official AOAC enzymatic–gravimetric method for dietary fibre modified with dialysis, followed by spectrophotometric analyses, was able to detect and quantify an increase in SDF ( $\approx 1.5$ -times) and a concomitant decrease in IDF of Okara ( $\approx 1.6$ -times) in samples of Okara treated with HHP and assisted by food-grade enzymes (*Ultraflo*<sup>®</sup> L or *Viscozyme*<sup>®</sup> L). Analysis of the SDF fraction by HPLC-ELSD method was twice more sensitive than the spectrophotometric approaches, and revealed the presence of two carbohydrate peaks ( $\approx 95$  kDa and  $\approx 22$  kDa MW) which could have improved beneficial health effects. Compared to the AOAC method for dietary fibre, direct HPLC-ELSD analysis of the supernatant after HHP + enzymatic treatment of samples

was reported to be faster, cheaper and more precise as small MW carbohydrates can also be detected.

### **Conflict of Interest**

All authors declare there are no conflicts of interest.

### **Bibliography**

- Condezo-Hoyos L, Perez-Lopez E, Ruperez P (2015) Improved evaporative light scattering detection for carbohydrate analysis. *Food Chem* 180:265-271 doi:10.1016/j.foodchem.2015.02.039
- Charalampopoulos D, Rastall RA (2012) Prebiotics in foods. *Curr Opin Biotech* 23:187-191 doi:10.1016/j.copbio.2011.12.028
- Gullon P, Gullon B, Moure A, Alonso JL, Dominguez H, Parajo JC (2009) Manufacture of Prebiotics from Biomass Sources. In: Charalampopoulos D, Rastall R (eds) *Prebiotics and Probiotics Science and Technology*. Springer New York, pp 535-589. doi:10.1007/978-0-387-79058-9\_14
- Jimenez-Escrig A, Tenorio MD, Espinosa-Martos I, Ruperez P (2008) Health-promoting effects of a dietary fiber concentrate from the soybean byproduct okara in rats. *J Agric Food Chem* 56:7495-7501 doi:10.1021/jf800792y
- Kasai N, Murata A, Inui H, Sakamoto T, Kahn RI (2004) Enzymatic high digestion of soybean milk residue (okara). *J Agric Food Chem* 52:5709-5716 doi:10.1021/jf035067v
- Li B, Qiao M, Lu F (2012) Composition, Nutrition, and Utilization of Okara (Soybean Residue). *Food Rev Int* 28:231-252 doi:10.1080/87559129.2011.595023
- Loewus FA (1952) Improvement in anthrone method for determination of carbohydrates. *J Anal Chem* 24:219-219 doi:10.1021/ac60061a050
- Mañas E, Saura-Calixto F (1993) Ethanol precipitation - a source of error in dietary fiber determination. *Food Chem* 47:351-355 doi:10.1016/0308-8146(93)90176-g
- Mateos-Aparicio I (2011) Beans by-products, potential sources for functional ingredients. In: E. Popescu and Iv. Golubev p (ed) *Beans: Nutrition, Consumption and Health*. Nova Science Publishers, Inc.,
- Mateos-Aparicio I, Mateos-Peinado C, Jimenez-Escrig A, Ruperez P (2010a) Multifunctional antioxidant activity of polysaccharide fractions from the soybean byproduct okara. *Carbohydr Polym* 82:245-250 doi:10.1016/j.carbpol.2010.04.020
- Mateos-Aparicio I, Mateos-Peinado C, Ruperez P (2010b) High hydrostatic pressure improves the functionality of dietary fibre in okara by-product from soybean. *Innov Food Sci Emerg Technol* 11:445-450 doi:10.1016/j.ifset.2010.02.003
- Mateos-Aparicio I, Redondo-Cuenca A, Villanueva MJ (2013) Dietary Fiber from the Food Industry by-Products. In: Nova Science Publishers I (ed) *Dietary Fiber: Sources, Properties and Their Relationship to Health*. Nova Biomedical, New York, p 23
- Mateos-Aparicio I, Redondo-Cuenca A, Villanueva MJ, Zapata-Revilla MA, Tenorio-Sanz MD (2010c) Pea pod, broad bean pod and okara, potential sources of functional compounds. *LWT - J Food Sci Tech* 43:1467-1470 doi:10.1016/j.lwt.2010.05.008
- Miller GL (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *J Anal Chem* 31:426-428 doi:10.1021/ac60147a030
- O'Toole DK (1999) Characteristics and Use of Okara, the Soybean Residue from Soy Milk Productions: A Review. *J Agric Food Chem* 47:8

## *Resultados*

- Perez-Lopez E, Mateos-Aparicio I, Ruperez P (2016) Okara treated with high hydrostatic pressure assisted by Ultraflo (R) L: Effect on solubility of dietary fibre. *Innov Food Sci Emerg Technol* 33:32-37
- Pérez-López E, Mateos-Aparicio I, Rupérez P (2016) Low molecular weight carbohydrates released from Okara by enzymatic treatment under high hydrostatic pressure *Innov Food Sci Emerg Technol* doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.ifset.2016.09.014>
- Prestamo G, Ruperez P, Espinosa-Martos I, Villanueva MJ, Lasuncion MA (2007) The effects of okara on rat growth, cecal fermentation, and serum lipids. *Eur Food Res Technol* 225:925-928 doi:10.1007/s00217-006-0497-4
- Rastall RA, Gibson GR (2015) Recent developments in prebiotics to selectively impact beneficial microbes and promote intestinal health. *Curr Opi Biotech* 32:42-46 doi:10.1016/j.copbio.2014.11.002
- Redondo-Cuenca A, Villanueva MJ, Mateos-Aparicio I (2008) Soybean seeds and its by-product okara as sources of dietary fibre. Measurement by AOAC and Englyst methods. *Food Chem* 108:1099-1105 doi:10.1016/j.foodchem.2007.11.061
- Rovaris AA, Dias CO, da Cunha IP, Cirra Scaff RM, de Francisco A, Petkowicz CLO, Amante ER (2012) Chemical composition of solid waste and effect of enzymatic oil extraction on the microstructure of soybean (*Glycine max*). *Ind Crop Prod* 36:405-414 doi:10.1016/j.indcrop.2011.10.001
- Ruperez P, Perez-Cozar ML, Redondo-Cuenca A, Villanueva MJ (2011) Método para la obtención de oligosacáridos vegetales. Novel method to prepare vegetable oligosaccharides.
- Scott RW (1979) Colorimetric determination of hexuronic acids in plant materials. *J Anal Chem* 51:936-941 doi:10.1021/ac50043a036
- Villanueva MJ, Perez-Cozar ML, Redondo-Cuenca A (2013) Sequential extraction of polysaccharides from enzymatically hydrolyzed okara byproduct: Physicochemical properties and in vitro fermentability. *Food Chem* 141:1114-1119 doi:10.1016/j.foodchem.2013.03.066
- Villanueva MJ, Yokoyama WH, Hong YJ, Barttley GE, Ruperez P (2011) Effect of high-fat diets supplemented with okara soybean by-product on lipid profiles of plasma, liver and faeces in Syrian hamsters. *Food Chem* 124:72-79 doi:10.1016/j.foodchem.2010.05.106

## *Resultados*

*Resultados*

Table 1: Analysis of dietary fibre in Okara treated with HHP and assisted by *Ultraflo*<sup>®</sup> L

Treatment conditions			NS+UA		DNS				SDF by HPLC-ELSD				
HHP (MPa)	min	<i>Ultraflo</i> <sup>®</sup> L %	SDF	SDF	IDF	TDF	SDF/TDF	TDF/IDF	Peak 1		Peak 2		Total CHO
			% d.w.	% d.w.	% d.w.	% d.w.			% d.w.	MW (kDa)	% d.w.	MW (kDa)	% d.w.
0.1	0	0	1.20±0.08 <sup>a</sup>	1.57±0.19 <sup>c</sup>	30.27±2.78 <sup>b</sup>	31.84±2.79 <sup>b</sup>	0.049	1.052	1.31±0.09 <sup>a</sup>	94.3±4.36	1.42±0.04 <sup>a</sup>	22.64±1.81	2.73±0.09 <sup>a</sup>
400	15	0	2.33±<0.01 <sup>c</sup>	1.05±<0.01 <sup>b</sup>	36.04±<0.01 <sup>cd</sup>	37.09±0.03 <sup>cd</sup>	0.028	1.029	2.84±0.05 <sup>b</sup>	104.93±2.04	0.79±0.07 <sup>b</sup>	20.51±2.81	3.63±0.12 <sup>bc</sup>
		0.025%	2.33±<0.01 <sup>c</sup>	2.12±<0.01 <sup>d</sup>	33.35±0.06 <sup>c</sup>	35.47±0.06 <sup>c</sup>	0.060	1.064	3.19±0.04 <sup>cde</sup>	99.59±0.91	0.73±0.06 <sup>b</sup>	23.29±0.43	3.92±0.09 <sup>cd</sup>
	30	0	2.21±<0.01 <sup>b</sup>	0.84±<0.01 <sup>a</sup>	37.10±0.02 <sup>d</sup>	37.94±0.02 <sup>cde</sup>	0.022	1.023	2.85±0.18 <sup>b</sup>	105.08±0.84	0.62±0.04 <sup>b</sup>	20.05±0.86	3.47±0.14 <sup>b</sup>
		0.025%	2.22±<0.01 <sup>b</sup>	2.04±<0.01 <sup>d</sup>	33.36±0.22 <sup>c</sup>	35.40±0.22 <sup>c</sup>	0.058	1.061	3.14±0.10 <sup>bcd</sup>	95.14±1.31	0.78±0.13 <sup>b</sup>	22.53±0.74	3.92±0.03 <sup>cd</sup>
600	15	0	2.17±<0.01 <sup>b</sup>	1.57±<0.01 <sup>c</sup>	38.53±0.03 <sup>d</sup>	40.10±0.03 <sup>e</sup>	0.039	1.041	3.14±0.04 <sup>bcd</sup>	98.40±1.67	0.81±0.11 <sup>b</sup>	22.21±2.19	3.95±0.15 <sup>cd</sup>
		0.025%	2.32±<0.01 <sup>c</sup>	2.24±<0.01 <sup>de</sup>	35.89±0.05 <sup>cd</sup>	38.13±0.05 <sup>cde</sup>	0.059	1.062	3.41±0.02 <sup>de</sup>	96.03±1.12	0.75±0.02 <sup>b</sup>	22.47±0.16	4.16±0.04 <sup>d</sup>
	30	0	3.28±<0.01 <sup>d</sup>	1.48±<0.01 <sup>c</sup>	37.09±0.06 <sup>d</sup>	38.56±0.06 <sup>de</sup>	0.038	1.040	3.09±0.15 <sup>bc</sup>	99.59±1.18	0.89±0.14 <sup>b</sup>	23.81±1.87	3.98±0.29 <sup>cd</sup>
		0.025%	3.48±0.01 <sup>e</sup>	2.34±<0.01 <sup>e</sup>	22.16±0.07 <sup>a</sup>	24.50±0.07 <sup>a</sup>	0.095	1.105	3.47±0.08 <sup>c</sup>	100.64±3.17	0.73±0.06 <sup>b</sup>	19.90±0.17	4.19±0.02 <sup>d</sup>

NS+UA: Neutral sugars + Uronic acid; DNS: 3,5-dinitrosalicylic acid; SDF: Soluble Dietary Fibre; IDF: Insoluble Dietary Fibre; TDF: Total Dietary Fibre; d.w.: dry weight; MW: Molecular Weight; CHO: Carbohydrates. Means (n=3) with different letters in each column differ significantly ( $P < 0.05$ ).

*Resultados*

Table 2: Analysis of dietary fibre in Okara treated with HHP and assisted by *Viscozyme*<sup>®</sup> L

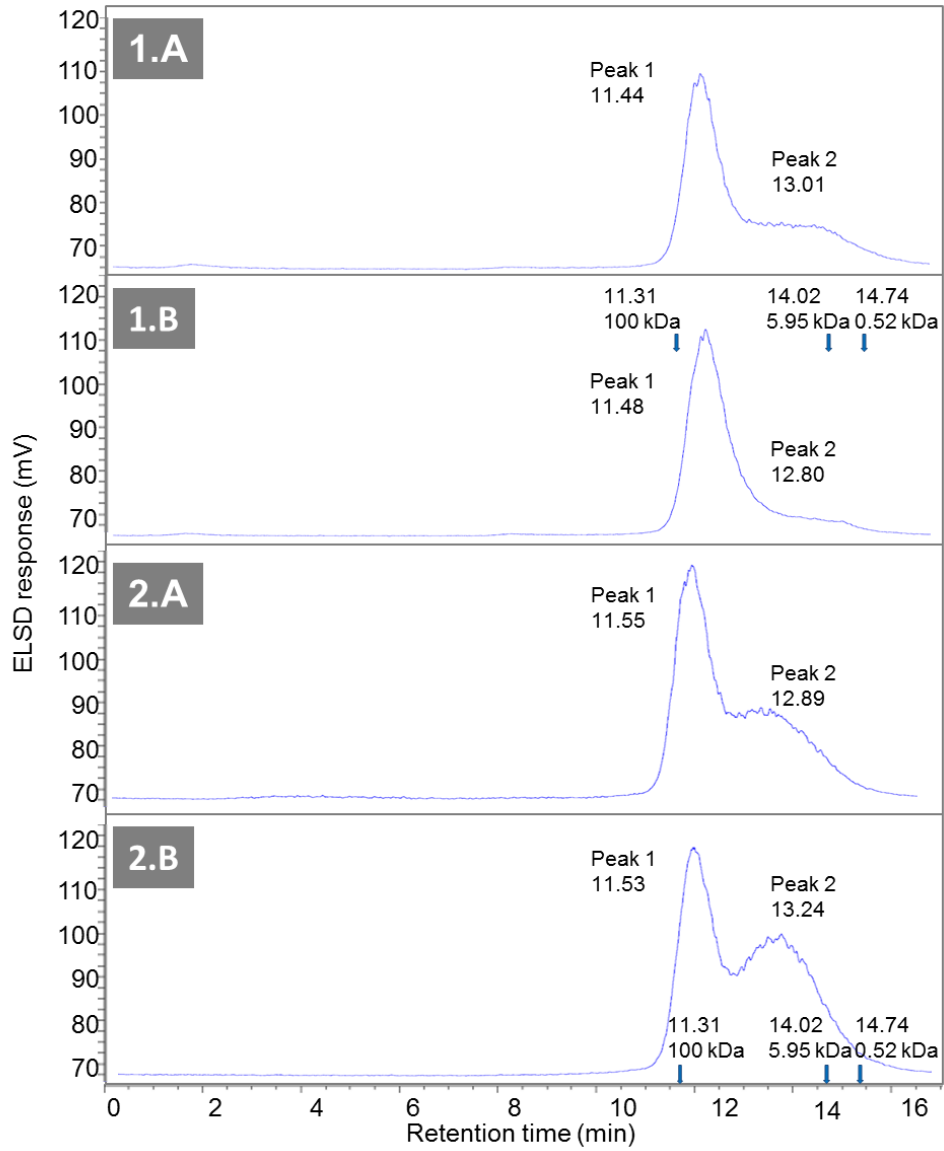
Treatment conditions			NS+UA		DNS				SDF by HPLC-ELSD				
HHP (MPa)	<i>Viscozyme</i> <sup>®</sup> L min	<i>Viscozyme</i> <sup>®</sup> L %	SDF % d.w.	SDF % d.w.	IDF % d.w.	TDF % d.w.	SDF/TDF	TDF/IDF	Peak 1 % d.w.	MW (kDa)	Peak 2 % d.w.	MW (kDa)	Total CHO % d.w.
0.1	0	0	1.20±0.08	1.57±0.19 <sup>a</sup>	30.27±2.78 <sup>cd</sup>	31.84±2.79	0.049	1.052	1.31±0.09 <sup>a</sup>	94.3±4.36	1.42±0.04 <sup>cd</sup>	22.64±1.81 <sup>b</sup>	2.73±0.09
400	15	0	1.23±0.09	1.75±0.1 <sup>a</sup>	33.58±6.46 <sup>d</sup>	35.32±6.46	0.050	1.052	1.4±0.01 <sup>ab</sup>	84.12±6.3	1.34±0.05 <sup>bcd</sup>	13.82±1 <sup>a</sup>	2.74±0.06
		0.025%	1.32±0.18	1.77±0.04 <sup>a</sup>	23.94±2.24 <sup>b</sup>	25.71±2.24	0.069	1.074	1.43±0.01 <sup>ab</sup>	93.18±3.95	1.46±0.01 <sup>de</sup>	15.89±2.18 <sup>a</sup>	2.89±0.01
	30	0	1.27±0.07	1.75±0.17 <sup>a</sup>	23.23±1.82 <sup>b</sup>	24.98±1.82	0.070	1.075	1.65±0 <sup>c</sup>	91.59±4.04	1.19±0.2 <sup>abc</sup>	23.47±4.5 <sup>bc</sup>	2.84±0.2
		0.025%	1.36±0.17	1.73±0.07 <sup>a</sup>	25.52±4.22 <sup>b</sup>	27.25±4.22	0.063	1.068	1.67±0.07 <sup>c</sup>	89.64±6.35	1.16±0.06 <sup>ab</sup>	29.51±6.93 <sup>cd</sup>	2.83±0.09
600	15	0	1.07±0.05	1.74±0.04 <sup>a</sup>	26.14±2.1 <sup>bc</sup>	27.87±2.1	0.062	1.066	1.63±0.26 <sup>bc</sup>	92.19±6.97	1.09±0.18 <sup>a</sup>	31.31±4.38 <sup>d</sup>	2.72±0.32
		0.025%	1.3±0.13	1.67±0.06 <sup>a</sup>	22.65±1.74 <sup>ab</sup>	24.32±1.75	0.069	1.074	1.61±0.04 <sup>bc</sup>	91.26±5.1	1.2±0.08 <sup>abc</sup>	25.36±2.51 <sup>bcd</sup>	2.81±0.09
	30	0	1.18±0.11	1.71±0.1 <sup>a</sup>	23.12±4.19 <sup>b</sup>	24.83±4.19	0.069	1.074	1.4±0.01 <sup>ab</sup>	90.63±0.14	1.19±0.13 <sup>abc</sup>	19.15±1.64 <sup>ab</sup>	2.59±0.13
		0.025%	1.45±0.08	2.11±0.14 <sup>b</sup>	18.83±1.31 <sup>a</sup>	20.93±1.32	0.100	1.111	1.56±0.22 <sup>bc</sup>	91.24±0.72	1.66±0.14 <sup>e</sup>	15.54±2.6 <sup>a</sup>	3.22±0.26

NS+UA: Neutral sugars + Uronic acid; DNS: 3,5-dinitrosalicylic acid; SDF: Soluble Dietary Fibre; IDF: Insoluble Dietary Fibre; TDF: Total Dietary Fibre; d.w.: dry weight; MW: Molecular Weight; CHO: Carbohydrates. Means (n=3) with different letters in each column differ significantly (P < 0.05).

**Figure caption**

**Fig. 1:** HPLC-ELSD chromatograms of soluble fibre after modified AOAC method in Okara treated with HHP, assisted by *Ultraflo*<sup>®</sup> L (1.1) or *Viscozyme*<sup>®</sup> L (1.2). Treatment conditions Okara 1%, 600 MPa for 30 min, A: without enzyme; B: with 0.025% (v/w) enzyme. Retention time and MW of standards are represented on the chromatogram. ELSD response is expressed in millivolts (mV)

Fig. 1





## Low molecular weight carbohydrates released from Okara by enzymatic treatment under high hydrostatic pressure



E. Pérez-López<sup>a</sup>, I. Mateos-Aparicio<sup>b</sup>, P. Rupérez<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Metabolism and Nutrition Department, Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición (ICTAN), Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), José Antonio Novais 10, Ciudad Universitaria, E-28040 Madrid, Spain

<sup>b</sup> Departamento de Nutrición y Bromatología II, Bromatología, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Ciudad Universitaria, E-28040 Madrid, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 5 July 2016  
Received in revised form 31 August 2016  
Accepted 10 September 2016  
Available online 12 September 2016

#### Keywords:

Low molecular weight carbohydrates  
Okara  
Soybean  
By-product  
High hydrostatic pressure  
Hydrolytic enzyme

### ABSTRACT

Okara is an abundant, inexpensive and rich in dietary fibre by-product from soybean with potential prebiotic effect, although an increase in soluble dietary fibre (SDF) and low molecular weight carbohydrates (LMWC) would be desirable. Therefore, a simultaneous treatment with food-grade enzymes (*Ultraflo*® L or *Viscozyme*® L) and high hydrostatic pressure (HHP) was used to improve LMWC profile. Release of LMWC from Okara was monitored and estimated using a newly calibrated and validated HPLC method with an ion-exchange column and evaporative light scattering detection (HPLC-ELSD). Both enzymes improved the effect of the HHP treatment. Treatment at 600 MPa, 40 °C for 30 min achieved a decrease in the average molecular weight of polysaccharides from  $12.74 \pm 3.97$  kDa to  $3.85 \pm 1.33$  or  $1.59 \pm 0.40$  kDa when *Ultraflo*® L or *Viscozyme*® L were used, respectively. *Ultraflo*® L (15 min) and *Viscozyme*® L (30 min) at 600 MPa, were the most effective treatments. **Industrial relevance:** Using industrial by-products as a source of nutraceuticals is interesting from an economical point of view. The content of low molecular weight polysaccharides of Okara has been maximized to increase its value as a prebiotic. An industrial adapted treatment with high hydrostatic pressure assisted by food-grade enzymes has been employed. In addition, a new HPLC-ELSD method has been calibrated for monitorizing the process.

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

## *Resultados*

## Resultados

*Material suplementario 1: Tratamiento combinado con APH y enzimas y su efecto en otras propiedades funcionales de la Okara: Capacidad antioxidante y de inhibición de la enzima convertidora de angiotensina*

**Metodología:** Tras el tratamiento de la Okara con APH y enzimas (*Ultraflo*<sup>®</sup> L y *Viscozyme*<sup>®</sup> L), se ha realizado una hidrólisis enzimática con pepsina a pH 2 (1:20 enzima / Okara, v/m), simulando *in vitro* las condiciones fisiológicas para estudiar el efecto del tratamiento sobre la proteína de Okara y su capacidad bioactiva. La eficacia de la hidrólisis se ha medido mediante el método del TNBS. En el hidrolizado proteico se ha medido la capacidad antioxidante mediante los métodos FRAP (ferric reducing/antioxidant power), que mide la capacidad de reducción y ABTS [2,20-Azino bis (3-ethylbenzothiazoline-6- sulfonate)], que mide la capacidad de captación de radicales libres. Asimismo, se ha estudiado la capacidad de inhibición de la ECA, utilizando como sustrato hippuril-L-histidil-L-leucina (HHL) (199, 258).

**Resultados:** Los resultados revelan una baja capacidad antioxidante en todos los tratamientos, aunque se aprecian diferencias significativas respecto al control cuando se trata la Okara con *Viscozyme*<sup>®</sup> L (FRAP) o con *Ultraflo*<sup>®</sup> L (ABTS), indicando una posible hidrólisis de las proteínas de Okara en péptidos más pequeños, que son los que poseen mayor actividad antioxidante y de inhibición de la ECA. Además, los efectos de las enzimas pueden ser diferentes entre sí (Tabla 6). Respecto a la inhibición de la ECA, no hay diferencias significativas entre tratamientos, aunque a mayor presión, la inhibición aumenta, llegando a inhibir el 87-92 % de la ECA (Tabla 7). En general, aunque se necesitan más estudios sobre estos efectos, se puede indicar que el tratamiento combinado de APH con enzimas hidrolíticas puede mejorar ligeramente la funcionalidad de la Okara. A pesar de que las actividades citadas se suelen asociar a la

## Resultados

presencia de péptidos bioactivos, no se puede descartar la posible implicación de los carbohidratos de la Okara.

Tabla 6: Capacidad antioxidante del hidrolizado proteico de Okara tras el tratamiento con APH y enzimas.

Presión (MPa)	Tiempo (min)	Enzima 1:40	FRAP		ABTS
			μmol/g eq trolox 4 min	μmol/g eq trolox 30 min	μmol/g eq trolox
0,1	0	0	1,43 ± 0,11	1,82 ± 0,07	3,33 ± 0,40
400	15	0	1,27 ± 0,21	1,86 ± 0,15	3,43 ± 0,24
	15	<i>Ultraflo</i> <sup>®</sup> L	1,27 ± 0,11	2,08 ± 0,32	3,18 ± 0,28
	15	<i>Viscozyme</i> <sup>®</sup> L	2,63 ± 0,31*	3,38 ± 0,37*	4,95 ± 0,80*
	30	0	1,41 ± 0,08	1,82 ± 0,12	4,20 ± 0,43
	30	<i>Ultraflo</i> <sup>®</sup> L	1,66 ± 0,13	2,29 ± 0,10	4,67 ± 1,09*
	30	<i>Viscozyme</i> <sup>®</sup> L	1,95 ± 0,39*	2,65 ± 0,54*	3,92 ± 0,22
600	15	0	1,67 ± 0,06	2,19 ± 0,23	3,69 ± 0,17
	15	<i>Ultraflo</i> <sup>®</sup> L	1,43 ± 0,11	2,04 ± 0,12	3,96 ± 1,07
	15	<i>Viscozyme</i> <sup>®</sup> L	3,18 ± 0,30*	4,02 ± 0,42*	3,72 ± 0,76
	30	0	1,41 ± 0,48	1,88 ± 0,53	3,80 ± 0,31
	30	<i>Ultraflo</i> <sup>®</sup> L	1,67 ± 0,11	2,21 ± 0,02	4,80 ± 1,08*
	30	<i>Viscozyme</i> <sup>®</sup> L	2,35 ± 0,36*	3,13 ± 0,28*	4,18 ± 0,16

Los asteriscos dentro de cada columna indican cambios estadísticamente significativos con el tratamiento control P<0,05.

## Resultados

Tabla 7: Capacidad de inhibición de la ECA del hidrolizado proteico de Okara tras el tratamiento con APH y enzimas.

Presión (MPa)	Tiempo (min)	Enzima 1:40	% hidrólisis	% inhibición ECA
0,1	0	0	35 ± 0,69	74 ± 9,22
400	15	0	34 ± 7,24	80 ± 12
	15	<i>Ultraflo</i> <sup>®</sup> L	34 ± 1,11	81 ± 13
	15	<i>Viscozyme</i> <sup>®</sup> L	36 ± 1,00	81 ± 12
	30	0	45 ± 2,67*	74 ± 17
	30	<i>Ultraflo</i> <sup>®</sup> L	35 ± 6,91	86 ± 6,67
	30	<i>Viscozyme</i> <sup>®</sup> L	47 ± 2,45*	80 ± 5,07
600	15	0	33 ± 5,01	84 ± 13
	15	<i>Ultraflo</i> <sup>®</sup> L	30 ± 0,33	84 ± 8,63
	15	<i>Viscozyme</i> <sup>®</sup> L	45 ± 1,34*	82 ± 10
	30	0	41 ± 2,34*	85 ± 7,92
	30	<i>Ultraflo</i> <sup>®</sup> L	31 ± 4,01	87 ± 9,06
	30	<i>Viscozyme</i> <sup>®</sup> L	46 ± 3,23*	92 ± 11

Los asteriscos dentro de cada columna indican cambios estadísticamente significativos con el tratamiento control  $P < 0,05$ .

## *Resultados*

## Resultados

### *Material suplementario 2: Tratamiento combinado con APH y enzimas y posible mecanismo de acción sobre celulosa como sustrato modelo*

**Metodología:** Se ha llevado a cabo un experimento adicional para estudiar con mayor profundidad cómo actúa sobre la matriz de Okara el tratamiento combinado de enzimas hidrolíticas y alta presión hidrostática. Para ello, se han tratado muestras de celulosa en estado cristalino ( $\alpha$ -celulosa, Sigma) y de celulosa (papel de filtro) con las mismas condiciones que han sido optimizadas para la Okara (1:40 enzima / sustrato, v/m), 400 y 600 MPa y 30 minutos de tratamiento. Se han analizado los resultados con el método optimizado HPLC-ELSD equipado con la columna TSK-gel para estudiar los carbohidratos totales y con la columna Aminex para los oligosacáridos.

**Resultados:** Los resultados de las siguientes Tablas (8-11) revelan una baja recuperación en todas las condiciones y métodos empleados y una ausencia del efecto de disminución del PM observado en la Okara. En la mayoría de los casos, solo se solubiliza el 1% de la muestra tratada, y no hay diferencias con el tratamiento control. Esto sugiere que en primer lugar, el tratamiento ha sido optimizado para la Okara, minimizando la concentración de enzima empleada, y ésta puede ser insuficiente para las muestras de celulosa. En segundo, indica que bajo presión se pueden hacer más accesibles para las enzimas puntos de corte dentro de las complejas paredes celulares de la Okara, que no están presentes ni en la estructura microcristalina de la celulosa ni en el papel de filtro. También se aprecia que *Ultraflo*<sup>®</sup> L tiene una ligera mayor actividad que *Viscozyme*<sup>®</sup> L y que los resultados son algo mejores cuando la muestra tratada es la  $\alpha$ -celulosa microcristalina.

## Resultados

Tabla 8: Análisis de los carbohidratos totales por HPLC-ELSD en columna TSK-gel de  $\alpha$ -Celulosa tratada con APH y enzimas.

Presión (MPa)	Enzima	Pico A		Pico B		Pico C		Total
		% PS	PM (kDa)	% PS	PM (kDa)	% PS	PM(kDa)	% PS
0,1	Control	0,44±0,03	7,06±0,66					0,44
400	Control	0,36±0,03	7,27±0,82					0,36
	<i>Ultraflo</i> <sup>®</sup> L			0,17±0,01	0,96±0,03	0,26±0,04	0,18±0,01	0,43
	<i>Viscozyme</i> <sup>®</sup> L			0,09±0,02	1,42±0,34	0,05±0,04	0,18±0,01	0,14
600	Control	0,48±0,02	7,98±0,57					0,48
	<i>Ultraflo</i> <sup>®</sup> L			0,29±0,01	1,58±0,01	0,08±0,01	0,18±0,01	0,37
	<i>Viscozyme</i> <sup>®</sup> L			0,14±0,01	0,96±0,04	0,25±0,06	0,18±0,01	0,39

P.S.: peso seco; PM: peso molecular.

Tabla 9: Análisis de los carbohidratos totales por HPLC-ELSD en columna TSK-gel de papel tratado con APH y enzimas.

Presión (MPa)	Enzima	Pico A		Pico B		Pico C		Total
		% PS	PM (kDa)	% PS	PM (kDa)	% PS	PM(kDa)	% PS
0,1	Control	0,06±0,01	7,65±0,35	0,14±0,01	2,59±0,33			0,2
400	Control	0,11±0,01	8,53±1,48	0,17±0,01	2,14±0,03			0,28
	<i>Ultraflo</i> <sup>®</sup> L	0,16±0,01	2,06±0,32			0,55±0,03	0,18±0,02	0,71
	<i>Viscozyme</i> <sup>®</sup> L			0,11±0,01	2,15±0,33			0,11
600	Control	0,13±0,01	15,07±1,00	0,09±0,02	1,93±0,16			0,22
	<i>Ultraflo</i> <sup>®</sup> L	0,21±0,04	1,76±0,15			1,09±0,05	0,12±0,02	1,3
	<i>Viscozyme</i> <sup>®</sup> L			0,06±0,01	1,28±0,42			0,06

P.S.: peso seco; PM: peso molecular.

*Resultados*

Tabla 10: Análisis de los oligosacáridos por HPLC-ELSD en columna Aminex de  $\alpha$ -Celulosa tratada con APH y enzimas.

Presión (MPa)	Enzima	Pico 1		Pico 2		Pico 3		Pico 4		Pico 5		Pico 6		Total
		% PS	PM (kDa)	% PS	PM (kDa)	% PS	PM (kDa)	% PS	PM (kDa)	% PS	PM (kDa)	% PS	PM (kDa)	% PS
0,1	Control	0,14±0,01	> 10000	0,02±0,01	0,65±0,03	0,03±0,01	0,35±0,01							0,19
400	Control	0,15±0,01	> 10000	0,02±0,01	0,68±0,04	0,02±0,01	0,33±0,01							0,19
	<i>Ultraflo</i> <sup>®</sup> L	0,04±0,01	> 10000	0,04±0,01	0,57±0,02	0,13±0,01	0,36±0,01	0,1±0,01	0,2±0,01					0,34
	<i>Viscozyme</i> <sup>®</sup> L	0,08±0,02	> 10000	0,03±0,01	0,59±0,02	0,06±0,02	0,35±0,01							0,17
600	Control	0,17±0,03	> 10000	0,02±0,01	0,64±0,07	0,03±0,01	0,35±0,02							0,22
	<i>Ultraflo</i> <sup>®</sup> L	0,09±0,01	> 10000	0,03±0,02	0,59±0,03	0,1±0,01	0,35±0,01	0,05±0,01	0,19±0,06					0,27
	<i>Viscozyme</i> <sup>®</sup> L	0,06±0,01	> 10000	0,04±0,01	0,56±0,03	0,1±0,01	0,36±0,01	0,05±0,01	0,19±0,01	0,06±0,01	Ni	0,05±0,01	NI	0,36

P.S.: peso seco; PM: peso molecular; NI: no identificado.

*Resultados*

Tabla 11: Análisis de los oligosacáridos por HPLC-ELSD en columna Aminex de papel tratado con APH y enzimas.

Presión (MPa)	Enzima	Pico 1		Pico 2		Pico 3		Pico 4		Pico 5		Pico 6		Total
		% PS	PM (kDa)	% PS	PM (kDa)	% PS	PM (kDa)	% PS	PM (kDa)	% PS	PM (kDa)	% PS	PM (kDa)	% PS
0,1	Control	0,04±0,01	> 10000									0,08±0,01	NI	0,12
400	Control	0,06±0,01	> 10000									0,09±0,01	NI	0,15
	<i>Ultraflo</i> <sup>®</sup> L	0,07±0,02	> 10000	0,11±0,02	0,53±0	0,53±0,01	0,33±0,01	0,37±0,01	0,18±0			0,03±0	NI	1,11
	<i>Viscozyme</i> <sup>®</sup> L	0,05±0,01	> 10000					0,1±0,001	0,19±0	0,08±0	NI	0,07±0	NI	0,3
600	Control	0,07±0	> 10000									0,02±0	NI	0,09
	<i>Ultraflo</i> <sup>®</sup> L	0,07±0	> 10000	0,15±0,01	0,52±0,02	0,79±0,04	0,33±0,01	0,56±0,03	0,18±0			0,06±0,01	NI	1,63
	<i>Viscozyme</i> <sup>®</sup> L					0,05±0,12	0,35±0	0,21±0,09	0,18±0	0,28±0,2	NI	0,06±0,02	NI	0,6

P.S.: peso seco; PM: peso molecular; NI: no identificado.

**Capítulo 3:**

**Estudio de los efectos beneficiosos en la salud, en especial del efecto prebiótico, de la Okara tratada con altas presiones hidrostáticas y enzimas hidrolíticas mediante modelos experimentales *in vitro* e *in vivo***

## *Resultados*

## *Resultados*

Artículo 6: Perez-Lopez, E., Cela, D., Costabile, A., Mateos-Aparicio, I., Ruperez, P. (2016). *In vitro* fermentability and prebiotic potential of soyabean Okara by human faecal microbiota. *British Journal of Nutrition*, 116, Issue 6, 1116-1124. DOI: 10.1017/s0007114516002816.

Artículo 7: Pérez-López, E., Veses, A.M., Redondo, N., Tenorio-Sanz, M.D., Villanueva, M. J., Redondo-Cuenca, A., Marcos, A., Nova, E., Mateos-Aparicio, I., Rupérez, P. (2016). Protective effects of a soluble dietary fiber-enriched soybean Okara on gut microbiota in rats fed a high-fat diet (Enviado).

Impact Factor *British Journal of Nutrition* (2016): 3,311.

## *Resultados*

*Resumen*

**Introducción:** Muchos de los beneficios para la salud de la fibra son debidos a la fibra soluble, como el efecto anti-obesidad y anticancerígeno. Los prebióticos ejercen un efecto positivo en la salud ya que promueven el aumento de bacterias beneficiosas, la producción de AGCC y una mayor absorción mineral. Los prebióticos reconocidos en la actualidad son principalmente carbohidratos derivados de la inulina (FOS) o galactooligosacáridos (GOS), aunque los subproductos vegetales se consideran una nueva fuente potencial de prebióticos y compuestos funcionales. Entre los subproductos, la Okara nativa ha demostrado tener en ratas un efecto beneficioso en la pérdida de peso, el perfil lipídico en suero, el estado antioxidante y el efecto prebiótico al incrementar la producción de AGCC y mejorar la absorción mineral. El tratamiento de la Okara con APH combinado con enzimas alimentarias permite aumentar el contenido de fibra soluble, por lo que se espera que sus efectos beneficiosos también lo hagan.

**Objetivos:** Estudiar los posibles efectos beneficiosos en la salud, principalmente el efecto prebiótico de la Okara tratada con APH y *Ultraflo*<sup>®</sup> L, mediante modelos experimentales *in vitro* e *in vivo*.

**Metodología:** Se ha comparado el efecto prebiótico potencial de la Okara nativa y la Okara tratada mediante APH y *Ultraflo*<sup>®</sup> L en un modelo *in vitro* de cultivo por lotes o “batch cultures”, que simulan las condiciones fisiológicas del colon humano. Se han estudiado los cambios en la microbiota fecal mediante la técnica FISH (fluorescence *in situ* hybridization) y el análisis cromatográfico de los AGCC. Además, se ha llevado a cabo un experimento en ratas a las que se les ha suministrado durante 4

## Resultados

semanas una dieta rica en grasa y colesterol, suplementada con 20 % de Okara tratada (APH y *Ultraflo*<sup>®</sup> L). Se han analizado los perfiles bioquímicos en el suero, los AGCC en el ciego, la absorción de minerales, así como los cambios en la microbiota mediante qPCR (quantitative polymerase chain reaction).

**Resultados:** En el análisis *in vitro*, se ha observado que las dos muestras de Okara estudiadas, la nativa y la tratada con APH y *Ultraflo*<sup>®</sup> L, fomentan el crecimiento de bacterias beneficiosas (*Lactobacillus* y *Bifidobacterium*). No obstante, la Okara tratada produce una mayor concentración de AGCC y un mayor crecimiento de *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* tras 4 y 48 horas de tratamiento, así como una mayor inhibición de bacterias potencialmente perjudiciales como *Clostridium* y *Bacteroides*. En el experimento *in vivo*, la Okara tratada ha demostrado que frena la ganancia de peso de ratas que siguen una dieta hipergrasa e hipercolesterolémica. Además, es capaz de reducir (1,36 veces) los triglicéridos en suero. La Okara tratada también aumenta ligeramente la producción de ácido butírico, protege a la microbiota de los efectos perjudiciales causados por la dieta rica en grasa y mejora la absorción de los minerales (Ca y Mg).

**Conclusiones:** El tratamiento de Okara con APH y *Ultraflo*<sup>®</sup> L mejora las propiedades funcionales de la Okara. Además, se ha demostrado su potencial efecto prebiótico tanto *in vitro* como *in vivo*, así como su efecto beneficioso en la pérdida de peso y en la protección cardiovascular. La Okara tratada con APH y enzimas se puede emplear como un ingrediente para la elaboración de nuevos alimentos saludables ricos en fibra, en panadería, cereales, alimentos aptos para celíacos, etc.



## *In vitro* fermentability and prebiotic potential of soyabean Okara by human faecal microbiota

E. Pérez-López<sup>1</sup>, D. Cela<sup>2</sup>, A. Costabile<sup>2,3</sup>, I. Mateos-Aparicio<sup>4\*</sup> and P. Rupérez<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Metabolism and Nutrition Department, Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición (ICTAN), Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), José Antonio Novais 10, Ciudad Universitaria, E-28040 Madrid, Spain

<sup>2</sup>Food & Nutritional Sciences Unit, School of Chemistry, Food and Pharmacy, University of Reading, Reading, UK

<sup>3</sup>Life Sciences Department, Health Sciences Research Centre, Whitelands College, University of Roehampton, UK

<sup>4</sup>Departamento de Nutrición y Bromatología II, Bromatología, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Ciudad Universitaria, E-28040 Madrid, Spain

(Submitted 11 May 2016 – Final revision received 16 June 2016 – Accepted 27 June 2016 – First published online 29 July 2016)

### Abstract

At present, there is a huge interest in finding new prebiotics from agrofood industrial waste, such as the soyabean by-product Okara, rich in insoluble dietary fibre. A previous treatment of Okara with high hydrostatic pressure assisted by the food-grade enzyme *Ultraflo*<sup>®</sup> L achieved a 58.2% increment in its soluble dietary fibre (SDF) contents. Therefore, potential prebiotic effect of both treated and native Okara was assayed using 48 h, pH-controlled, anaerobic batch cultures inoculated with human faecal slurries, which simulate the human gut. Changes in faecal microbiota were evaluated using 16S rRNA-based fluorescence *in situ* hybridisation, whereas release of SCFA and lactic acid was assessed by HPLC. Both Okara samples exhibited potential prebiotic effects but Okara treated to maximise its SDF content showed higher SCFA plus lactic acid, better growth promotion of beneficial bacteria, including bifidobacteria after 4 and 48 h and lactobacilli after 4 h of fermentation, and a greater inhibition of potentially harmful bacterial groups such as clostridia and Bacteroides. Differences found between fructo-oligosaccharides and Okara substrates could be attributed to the great complexity of Okara's cell wall, which would need longer times to be fermented than other easily digested molecules, thus allowing an extended potential prebiotic effect. These results support an *in vitro* potential prebiotic effect of Okara.

**Key words:** Okara: Hydrostatic pressure: *Ultraflo*<sup>®</sup> L enzyme: Fermentation: Microbiota: Prebiotics: Food by-products

## *Resultados*

**Protective effects of a soluble dietary fiber-enriched soybean Okara on gut  
microbiota in rats fed a high-fat diet**

**E. Pérez-López<sup>1</sup>, A.M. Veses<sup>1</sup>, N. Redondo<sup>1</sup>, M.D. Tenorio-Sanz<sup>2</sup>, M. J.  
Villanueva<sup>2</sup>, A. Redondo-Cuenca<sup>2</sup>, A. Marcos<sup>1</sup>, E. Nova<sup>1</sup>, I. Mateos-Aparicio<sup>2</sup>, P.  
Rupérez<sup>1\*</sup>**

<sup>1</sup>Metabolism and Nutrition Department, Institute of Food Science, Technology and Nutrition (ICTAN), Spanish National Research Council (CSIC), José Antonio Novais 10, Ciudad Universitaria, E-28040 Madrid, Spain; <sup>2</sup>Departamento de Nutrición y Bromatología II. Bromatología, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Ciudad Universitaria, E-28040 Madrid, Spain

\*Corresponding author. Tel.: +34 915492300; fax: +34 915493627

E-mail address: pruperez@ictan.csic.es (P. Rupérez)

**Abstract**

Okara is a rich in dietary fiber, cheap and abundant by-product from soybean. A high hydrostatic pressure pre-treatment combined with *Ultraflo*<sup>®</sup> L has been performed to prepare a soluble dietary fiber-enriched Okara (SDF-Okara). An *in vivo* feeding experiment on Wistar rats was developed for four weeks, using a high-fat diet (20% SDF-Okara, 20% fat, 1% cholesterol and 0.2% cholic acid) and a control without SDF-Okara. Results showed that SDF-Okara induced a weight-loss effect, reduced plasma triglycerides (1.4-times) and showed beneficial effects on amino-acid metabolism (1.2-times lower urea content). Butyric acid was slightly higher (1.3-times) and Ca and Mg mineral absorption was increased. Quantitative PCR analysis of several bacterial groups showed that SDF-Okara was able to maintain the existing microbiota before the intervention, preventing the decrease in bacterial number caused by the high-fat diet. Therefore, it is suggested that SDF-Okara could be employed as a healthy functional ingredient in processed foods.

*Keywords: soluble dietary fiber, high hydrostatic pressure, gut microbiota, prebiotic, by-products, weight-loss*

## **1. Introduction**

Nowadays, by-products or waste biomass from food industry are considered interesting sources of new functional ingredients such as prebiotics. This would reduce the environmental effect of their decomposition and increase their added value (1, 2). Among them, Okara is a cheap and abundant by-product, obtained during soybean milk or tofu production. Soybean and soybean derived foods are consumed worldwide, particularly in Asian countries, and they are becoming more common in the Western countries (3), which means that tons of Okara are generated and thrown away despite having a good nutritional value (4, 5). Actually, Okara is rich in total dietary fiber (DF), 55% (50% insoluble dietary fiber [IDF], and 5% soluble dietary fiber [SDF]) and protein, 30% (5-8). As a consequence of its high DF content, Okara has proven to be a potential weight loss supplement, with potential prebiotic effect and beneficial properties on the lipid metabolism in rats and Syrian hamsters (4, 5, 9-11).

However, most of the benefits attributed to DF are related to SDF, as the prebiotic effect, regulation of metabolic disorders associated to obesity and reduction of cancer risk (12, 13). In fact, soybean oligosaccharides (SOS), as raffinose and stachyose, are new prebiotic candidates (14). However, as a result of its manufacture procedure, the content in these soluble carbohydrates (CHO) and SDF is low, being mainly an insoluble and indigestible by-product (5). For this reason, a synergic treatment of high hydrostatic pressure (HHP) combined with the food-grade enzyme *Ultraflo*<sup>®</sup> L was performed to increase SDF content in Okara, thus achieving an enriched SDF-Okara product with  $15.64 \pm 0.32\%$  of soluble carbohydrates (15) released from the cell wall (16) and SOS with a small molecular weight (17). SDF-Okara after combined HHP plus *Ultraflo*<sup>®</sup> L processing has been reported to exhibit an *in vitro* potential prebiotic effect

## *Resultados*

(18), with bifidogenic activity and short chain fatty acids (SCFA) production, but this effect has not been assessed *in vivo* before, neither has the effect of treated Okara on the gut microbiota by molecular techniques.

Therefore, this present study aimed to determine the overall beneficial health effect of a SDF-Okara in rats fed a high-fat diet. For this purpose, the effects on body and organs weight, on serum biochemical parameters and the prebiotic effect, including the effect on the microbiota have been studied.

## **2. Materials and Methods**

### *2.1. Materials*

Fresh Okara from soybean [*Glycine max* (L.) Merr] was provided by a local food processing industry (Toofu-Ya S.L., Arganda del Rey, Madrid, Spain). It was frozen until treatment. Enzymatic treatment was performed with *Ultraflo*<sup>®</sup> L (Novozymes Spain, S.A., Pozuelo de Alarcón, Madrid, Spain), a commercial food-grade Beta-glucanase (endo- $\beta$ -1,3 (4)-), with both cellulase and xylanase activities. All solutions, including dilutions were prepared with ultrapure water (Resistivity 18.2 M $\Omega$  cm at 25 °C; Milli-Q Integral 5 Water Purification System from Millipore, Merck KGaA, Darmstadt, Germany).

### *2.2. Diet preparation and animals*

#### *2.2.1. HHP treatment assisted by Ultraflo<sup>®</sup> L of Okara*

Moisture content of fresh Okara was assessed in order to prepare a 20% homogenized Okara (w/v dry weight) with water. Then, it was treated simultaneously with *Ultraflo*<sup>®</sup> L (concentration of 1:40 v/w) and high hydrostatic pressure (600 MPa) for 30 min at 40 °C, without considering the pressure build up and release times (less than 2 min). The

## *Resultados*

treatment was performed in vacuum-sealed plastic bags (Doypack, 110 x 200 x 35 mm size, 75 µm film thick, Polyskin XL, Amcor Flexible Hispania, Granollers, Barcelona, Spain) in a Stansted SFP 7100:9/2C equipment, using water as pressure transmitting medium. After HHP+ *Ultraflo*<sup>®</sup> L treatment, SDF-Okara samples were stored at -80 °C and freeze-dried.

### *2.2.2. Composition of the diets*

High-fat diets (control and supplemented diets) containing 20% corn oil, 1% cholesterol (Panreac) and 0.2% cholic acid (Sigma-Aldrich) were prepared from a Teklad Global 2018 Harlan basal diet. Supplemented diet contained 20% SDF-Okara (w/w dry weight). Diets were stored (maximum 2 days) in a dark and dry place to avoid oxidation.

The composition of native Okara, SDF-Okara, high-fat control diet (20% fat, 1% cholesterol and 0.2% cholic acid) and high-fat SDF-Okara diet (20% SDF-Okara, 20% fat, 1% cholesterol and 0.2% cholic acid) is summarized in Table 1. Carbohydrates were measured by Anthrone method (19), nitrogen content by Leco FP 2000 Instrument (protein was calculated as nitrogen x 6.25), fat was extracted with petroleum ether in a Soxtec system (Tecator, Höganäs, Sweden), ashes were determined by incineration of the samples in a furnace at 500 °C for 16 h and SDF and IDF were analyzed according to the AOAC (Association of Official Analytical Chemists, 1995) enzymatic–gravimetric method with dialysis (12 kDa MW cut off) (20). Calcium and magnesium content was analyzed as in 2.4.2. Energy of the diets (Kcal x 1000 g<sup>-1</sup>) was calculated using the following kcal conversion factors: 4 for protein, 4 for carbohydrate, 9 for fat and 2 for dietary fiber.

### *2.2.3. Animal experimentation*

## *Resultados*

A total of twelve 4-week-old Wistar Hannover male rats were employed in the experiment. Rats were weighed ( $\approx 240$  g) and divided into two groups of six each. Animals were fed a Teklad Global 2018 Harlan diet during one week for acclimatization. Rats were individually housed in cages in a room with controlled light (12 h cycles), temperature (20 °C) and relative humidity (60%) (School of Medicine, University Complutense of Madrid, Spain). The animals were maintained in accordance with the guidelines from the registered laboratory (ES-28079-0000086). Then, they were fed *ad libitum* (water and food) the high-fat control diet or high-fat SDF-Okara diet for 4 weeks. Once a week the rats were individually housed into metabolic cages during 24 h for weight control and the separate collection of urine and feces. After 4 weeks of experiment, rats were anesthetized with carbonic anhydride and killed by blood extraction *via* carotid puncture. Heart, liver, kidneys, spleen, and gastrointestinal tract (including the caecum) were removed, weighed and frozen. Blood samples were collected, coagulated at room temperature and centrifuged at 1000 x g for 15 min, collecting the serum for further use. Minimum number of rats which could provide a good statistical power of 79% and 0.05 significance level according to one-way Anova analysis (SPSS Samplepower v3, IBM) for SCFA results was chosen. This experimental protocol (Ref No. PROEX 303/15) was approved by the Area of Animal Protection of the Environmental Council from Community of Madrid, Spain.

### *2.3. Determination of biochemical parameters in serum and liver*

Glucose, urea, uric acid, creatinine, aminotransferases ALT/GTP (alanine transaminase/glutamate-pyruvate transaminase), AST/GOT (aspartate transaminase/glutamic oxaloacetic), CRP (C-reactive protein), total cholesterol, triglycerides, high-density lipoprotein (HDL), and low-density lipoproteins (LDL) from

## *Resultados*

the plasma were analyzed by the Autoanalyzer Cobas Integra 400 plus (Roche, Basel, Switzerland). All serum analyzes were performed in the center of sanitary analysis of Pharmacy School (University Complutense of Madrid) according to the guidelines of the Spanish Society of Biochemistry and Molecular Pathology. Atherogenic index of plasma (AIP) was calculated as total cholesterol x HDL<sup>-1</sup> (21).

Livers were freeze-dried and fat content was extracted in a Soxtec System HT Tecator with petroleum ether. Reduction power was assessed by the ferric reducing/antioxidant power assay (FRAP) and the radical scavenging activity by ABTS decolorization assay [2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)] (22) on a Biotek PowerWave XS spectrophotometer (Biotek Instruments).

### *2.4. Study of the prebiotic effect and gut health status*

Different approaches have been developed to assess the prebiotic effect and gut health status.

#### *2.4.1. Moisture and antioxidant status of the caecum*

Moisture (%) of the cecal content was assessed and an aliquot was taken, diluted 1:3 (w:v) in distilled water and the pH was measured with a Crison micro pH 2001.

Antioxidant status of the caecum was evaluated by the ferric reducing/antioxidant power assay (FRAP) and the radical scavenging activity by ABTS decolorization assay as in 2.3. after extraction with methanol : water (50% : 50%) followed by acetone : water (70% : 30%) (22).

#### *2.4.2. Analysis of mineral content in feces*

## *Resultados*

Feces collected at the beginning of the experiment (day 1) and at the fourth week (day 28) were freeze-dried and incinerated at a temperature that increased linearly to 550 °C (4 h), then 0.3 mL of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was added and samples were incinerated again at 550 °C (12 h) in a microwave muffle furnace (Milestone MLS-1200 Pyro, Shelton, CT, USA). Diets were also mineralized. Then, ashes were dissolved in 2 mL of 12 M HCl: 14.5 M HNO<sub>3</sub> (1:1, v:v) and diluted to 25 mL with water. Then, samples were further diluted with 2 mL lanthanum oxide solution and 0.1% final concentration samples in distilled water were measured in an atomic absorption spectrometer Perkin Elmer Analyst 200 for calcium and magnesium analysis of the feces and diets.

### *2.4.3. Evaluation of Short Chain Fatty Acid production (SCFA)*

Cecal samples diluted in water (1:3, w:v) were centrifuged (7000 x g for 15 min) and supernatants were analyzed by gas-liquid chromatography with flame ionization detector, using 4-methyl valeric acid as the internal standard. A Hewlett Packard 5890 chromatograph equipped with a Carbowax 20M column (10 m x 0.53 mm) was used with the following conditions: the injector and detector were set at 250 °C and the oven at 120 °C (23). The carrier gas was nitrogen with a flow rate of 15 mL min<sup>-1</sup> and the injection volume was 3 µL.

### *2.4.4. Enumeration of bacterial populations by Quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR) analysis*

Feces collected at the beginning of the experiment (day 1), at the fourth week (day 28) and cecal content were frozen until extracting the DNA using a QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit (QIAGEN GmbH) in combination with a FastPrep<sup>®</sup> homogenizer (MP biomedical). DNA was quantified in a Nanodrop ND-1000 instrument (Thermo Fisher Scientific). For the qPCR, group-specific 16S rRNA gene primers from Isogen Life

## Resultados

Science (Castelldefels, Barcelona, Spain) were used for *Eubacteria* group, *Bifidobacterium* genus, *Lactobacillus* genus, *Bacteroides* genus, *Enterococcus* genus, *Enterobacteriaceae* family, *Blautia coccooides-Eubacterium rectale* group and *Clostridium leptum* group. Sequence of the primers can be found in Table 2. Quantitative PCR samples containing Brilliant III Ultra-Fast SYBR® Green QPCR Master Mix (Agilent Technologies), forward primer, reverse primer, the reference dye ROX (1:500 v/v), conveniently diluted samples (0.25-10 ng) and nuclease-free PCR-grade water were prepared (final volume of 20 µL). For quantification, standard curves with serial dilution of bacterial reference genomic DNA were prepared. Quantitative PCR was performed in a Stratagene Mx3000P (Agilent Technologies). Data analysis was accomplished using MxPro–Mx3000P software according to previous experiments (24). Results were expressed as log<sub>10</sub> cells g<sup>-1</sup> of feces or cecal content. Firmicutes : Bacteroidetes ratio has been obtained by adding bacterial values obtained for *Eubacteria* group, *Lactobacillus* genus, *Enterococcus* genus, *B. coccooides-E. rectale* group and *Clostridium leptum* group subsequently divided by the value of *Bacteroides* genus for each rat. This ratio has been used as an indicator for dysbiosis.

### 2.5. Statistical analysis

Results were expressed as mean values ± standard deviation. At least, three different measurements were accomplished for each mean. Comparison of means was performed by one-way analysis of variance (ANOVA) with a significance level of  $P < 0.05$  with Kruskal-Wallis post-tests. For qPCR, paired *t*-test to assess the significance of results of single pairs of data or independent *t*-test for different samples were performed on Statgraphic version 17.1 (Virginia, US).

## 3. Results and discussion

## *Resultados*

### *3.1. Composition of the diets*

The composition of ingredients and diets used for the feeding experiment is disclosed in Table 1. Treatment with HHP and *Ultraflo*<sup>®</sup> L (0.025% enzyme, 600 MPa 30 min and 40 °C) of Okara resulted in an increase in carbohydrates and SDF and a decrease in IDF. However, the SDF-Okara diet provided less carbohydrates and energy (kcal x1000g<sup>-1</sup>) than the control diet, similar amounts of protein, fat, ashes and minerals and higher IDF and SDF content.

### *3.2. Animal weight and serum parameters*

#### *3.2.1. Body and organ weight*

Evolution of the body weight during the four weeks of feeding experiment can be observed in Fig.1. No differences were detected in the first two weeks, but after that, rats fed the SDF-Okara diet significantly slowed down their growing rate compared to the control group, with a difference of 14.4 and 18.8 g in the third and fourth week of experiment, respectively ( $P < 0.05$ ). In other studies, differences could not be appreciated within three weeks of experiment, but were noticed in the fourth and afterwards, showing a time-dependent weight-loss effect of Okara (4, 9, 10, 25, 26). The diet substitution with 20% SDF-Okara reported an improved weight-loss effect, reducing the growing rate of rats fed a high-fat diet from the third week onwards thus preventing obesity. In this experiment, SDF-Okara diet had a reduced amount of carbohydrates, resulting in a diet with 10% lesser energy content (kcal). This could explain the effect on body weight, and would be useful if SDF-Okara was used as a substitute ingredient. Nevertheless, dietary fiber of Okara might have induced satiety, or prevented the absorption of some dietary compounds (27). Likewise, protein of Okara could have also had some effect, as it has been proven for soybean proteins (28).

## *Resultados*

Livers in rats fed the SDF-Okara diet were significantly smaller (1.1-times) and visually less hypertrophied than the control, which was comparable to other studies in hamsters (10) ( $P < 0.05$ ). No statistically significant changes in other organs or in liver fat content were observed (Table 3).

### *3.2.2. Biochemical markers in serum and liver*

Serum parameters can be observed in Table 4. Urea content was 1.2-times lower in rats fed the supplemented SDF-Okara diet, showing a beneficial effect in amino acid metabolism. Probably, this outcome was due to a change in gene expression of the urea cycle, as it has been reported before for fructooligosaccharides, Raftilose P95<sup>®</sup> (Orafti, Belgium) and Jerusalem artichoke, but never detected in Okara (29-31).

Moreover, triglycerides were 1.4-times lower in rats fed the SDF-Okara diet. This result was a greater effect than in previous reports with rats fed a 10% Okara diet for four weeks (4, 9), but comparable to others with hamsters fed a 20% Okara diet (10, 21) and with mice (40% Okara diet) (26), where differences in total cholesterol and LDL-cholesterol were also found, suggesting a dose-dependent effect. SDF-Okara could be considered a potential and useful supplement to protect against cardiovascular diseases. Dietary fiber from Okara could have avoided the absorption of lipids; generally, soluble fibers form viscous solutions where lipids remain trapped (32, 33), which might also explain the weight-loss effect. In addition, the protein of Okara could also be partially responsible for this effect, as it has been noticed in some studies with soybean (34, 35). No differences were observed for other biochemical parameters in serum, including aminotransferases, CRP (data not shown) or glucose levels, which agreed with other studies on Okara (4, 9, 10).

## *Resultados*

Antioxidant status of the liver, measured as reduction power and radical scavenging capacity did not show positive results (data not shown), indicating that the antioxidants of SDF-Okara are not concentrated enough to avoid the oxidative stress caused by a high-fat diet (9).

### *3.3. Study of the prebiotic effect and gut health status*

Several approaches have been assessed to analyze the effect of the SDF-Okara supplemented diet in the gut health and colonic microbiota.

#### *3.3.1. Moisture, pH and antioxidant status of the caecum*

No differences in the pH (Table 5) or antioxidant status (data not shown) of the caecum have been found. In other studies, minor statistical differences in cecal pH (4, 25) or in the antioxidant status (9) as a result of a modified diet with Okara have been observed. Caeca were significantly bigger (1.25-times) in the treated group, as it has been reported before (4) and has been attributable to the high DF diet. Likewise, cecal moisture and size were significantly greater in rats fed the SDF-Okara diet, which agreed with previous studies (4, 9) ( $P < 0.05$ ).

#### *3.3.2. Analysis of mineral content in feces*

Calcium and magnesium content in feces at days 1 and 28 of experiment are shown in Table 5. Statistically significant differences between treatments were observed for both minerals, resulting in a higher absorption of calcium (since the beginning of the experiment) and magnesium (at the end of the experiment) ( $P < 0.05$ ). Food intake and mineral content of the diets (Table 1) were similar for both groups; therefore SDF-Okara was capable of increasing mineral absorption (2.2- and 1.3-times higher for both Ca and Mg at the end of the experiment, respectively). This beneficial effect of Okara

## *Resultados*

and soybean in mineral absorption has been reported in other studies (9, 25) and is related to the prebiotic effect. The increase in Ca and Mg absorption could have beneficial consequences in bone and cardiovascular health, respectively (36, 37). The improvement of mineral absorption might be due to several causes: 1) the drag of the minerals by the fiber of Okara until they reach the gut and are absorbed, 2) a change in the pH as a result of SCFA production, increasing mineral solubility, 3) the existence of a Ca-exchange mechanism for SCFA incorporation, or 4) an increase in the absorption area of the caecum due to the high fiber content of the diet (25). In fact, a bigger size caecum was observed in rats fed the SDF-Okara in comparison with the control.

### *3.3.3. Evaluation of short chain fatty acid production*

SCFA contents in cecal samples are shown in Table 5. Total SCFA content was 1.1-times higher in rats fed the SDF-Okara diet, which was comparable with previous reports (4, 21). Statistically significant differences ( $P < 0.05$ ) in iso-butyric, iso-valeric, valeric acid, and an unidentified compound were observed, resulting in 1.7-, 2.2-, 1.4- and 2.3-times higher content in rats fed the modified diet, respectively. Other SCFA, as acetic, propionic or butyric acids might have been absorbed by the colonic epithelium before the sacrifice. Although no statistical differences were observed, butyric acid was 1.3-times higher in the treated group of rats. In an *in vitro* fermentation study of SDF-Okara in batch cultures resembling the human colon, comparable results for butyric acid, but also an increase in acetic and propionic acids were obtained (18), which was similar to other *in vivo* experiment with galacto-oligosaccharides supplemented diet (25). In an *in vivo* study with Okara treated by *Ultraflo*<sup>®</sup> L, higher amounts of every SCFA were obtained (21). However, no statistical changes were found on butyric acid in another *in vivo* experiment with 10% Okara diet, showing a dose-dependent

## Resultados

beneficial effect of Okara on SCFA production (9). The effect on butyric acid production could be interesting, as it promotes normal cell differentiation and proliferation, and has important anti-carcinogenic effects (38, 39), as well as an anti-obesity effect in rats (40). The increase observed in the branched chain fatty acids (iso-butyric and iso-valeric), represented only a small amount of total SCFA (5.5% and 1.5%, respectively), and could be produced from the catabolism of resistant protein/peptides in SDF-Okara diet (41). These branched chain acids might contribute to insulin resistance and could have effects in electrolyte absorption (42, 43).

### 3.3.4. Enumeration of bacterial populations by qPCR analysis

The results of the qPCR analysis at days 1 and 28 of experiment in feces as well as in cecal content are shown in Fig.2. The high-fat diet with cholesterol and cholic acid caused a deregulation in the microbiota, significantly decreasing ( $P < 0.05$ ) the number of several bacterial clusters after 4 weeks of experiment, which might be an indication of gut dysbiosis, as it has been noticed before for similar diets (44, 45). Gut dysbiosis is a well-known effect of high-fat diets, which induces inflammation, cell stress and is considered as a risk factor for colon cancer and inflammatory bowel disease (46, 47). Typical Western countries' diet, which is rich in animal protein and fat, but poor in fiber could promote gut dysbiosis (48). High-fat diets have been reported to decrease the number of Bacteroidetes and to increase Firmicutes and *Proteobacteria* groups (45). In this study, *Bacteroides* group significantly decreased as an effect of the high-fat diet, but so did the *Eubacteria*, the *Enterobacteriaceae* group (*Proteobacteria*) and *B. coccoides-E. rectale* groups (Firmicutes) ( $P < 0.05$ ). Therefore, Firmicutes : Bacteroidetes ratio did not change as a result of the high-fat diet.

## Resultados

In this experiment, the SDF-Okara supplemented diet significantly reverted the effect of the high-fat diet, as it prevented the decrease in bacterial number of the microbiota. Firmicutes : Bacteroidetes ratio showed a non-significant drop when SDF-Okara was added to the high-fat diet ( $5.77 \pm 0.21$  and  $5.57 \pm 0.22$  after 28 days for control and SDF-Okara group, respectively). In other study, soybean increased this ratio (49), so a different and more beneficial behavior is observed when SDF-Okara is used. This protective effect was clearly perceived for the *Bacteroides* and *B. coccooides-E. rectale* groups, which maintained the same bacterial numbers than in the first day of experiment in the rats fed the SDF-Okara, while they were significantly decreased in the control group (Fig.2) ( $P < 0.05$ ). Remarkably, SDF-Okara showed a great positive effect on *Bacteroides* group, significantly increasing its population from  $\log_{10}$  cells  $\text{g}^{-1}$   $7.2 \pm 0.5$  to  $8.1 \pm 0.5$  for control and SDF-Okara diet, respectively ( $P < 0.05$ ). Soybean dietary fiber has shown a similar effect on *Bacteroides* before (49). Similarly, SDF-Okara significantly increased the population of *B. coccooides-E. rectale* in feces ( $\log_{10}$  cells  $\text{g}^{-1}$   $9.1 \pm 0.4$  and  $9.7 \pm 0.4$  for control and SDF-Okara diet, respectively). Both, the treated and control groups of rats suffered a significant reduction ( $P < 0.05$ ) in *Bifidobacterium* population after feeding the high-fat diet, but SDF-Okara showed a protective tendency ( $\log_{10}$  cells  $\text{g}^{-1}$  were  $6.2 \pm 0.3$  and  $6.5 \pm 0.4$  in control and SDF-Okara treatment in day 28, respectively), which is similar to a previous experiment (50), where mango fiber avoided the reduction in *Bifidobacterium* caused by a high-fat diet. Fermentability of native Okara by *B. bifidum* has been assessed before (7), and the bifidogenic capacities of SDF-Okara have been proven *in vitro*, supporting the prebiotic effect of Okara (18). This tendency could be also noticed for *Eubacteria* cluster, which showed a significant reduction ( $P < 0.05$ ) due to the high-fat diet, slightly prevented by SDF-Okara ( $\log_{10}$  cells  $\text{g}^{-1}$  were  $8.3 \pm 0.4$  and  $8.7 \pm 0.2$  in control and SDF-Okara diet in day 28,

## Resultados

respectively). On the other hand, no clear effects of the SDF-Okara or the high-fat diet on *Lactobacillus* population have been observed. However, in other studies *Lactobacillus* suffered an important decrease in number as a result of a high-fat diet (11, 44, 51) and soybean fiber also diminished its population (49). In this experiment, no negative effects of Okara on *Lactobacillus* were observed, and in an *in vitro* experiment, SDF-Okara was capable of increasing *Lactobacillus* growth (18), so different and complex behavior have been highlighted for *Lactobacillus* regulation. SDF-Okara has preserved the normal microbiota when a high-fat diet was consumed. Similarly, other compounds, like bitter melon (52), mango pulp (50), agaro-oligosaccharides (46), as well as soybean milk and fiber (49) have shown the same effect.

SDF-Okara supplemented diet also stimulated the growth of numerous bacterial clusters in comparison with the control diet where no decrease for the high-fat diet was detected. Thus, a significant increase in the *Enterobacteriaceae* (cecal content) and *Enterococcus* (faecal and cecal content) groups when SDF-Okara was employed has been observed ( $P < 0.05$ ). *C. leptum* population was also significantly increased in feces ( $\log_{10}$  cells  $\text{g}^{-1}$   $6.2 \pm 0.6$  and  $7.0 \pm 0.4$  for control and SDF-Okara diet, respectively) and in cecal content ( $\log_{10}$  cells  $\text{g}^{-1}$   $5.0 \pm 0.5$  and  $6.3 \pm 0.4$  for control and SDF-Okara diet, respectively) ( $P < 0.05$ ) (Fig. 2). *B. coccoides-E. rectale* and *C. leptum* groups are predominant populations in the gut and produce butyrate, playing a role on immune homeostasis and affecting the intestinal health (53). Therefore, the protective and enhancing effect of SDF-Okara on these bacterial groups could have beneficial health-promoting effects.

The supplementation (20%) with SDF-enriched Okara from soybean has shown several protective effects against a high-fat and hypercholesterolemic diet in Wistar rats. This

## *Resultados*

SDF-Okara ingredient had a weight-loss effect and was capable of reducing the triglycerides content of the serum (1.4-times). SDF-Okara also showed a beneficial effect in amino acid metabolism and in the prebiotic status. In fact, higher SCFA content and higher absorption of Ca and Mg were reported. Moreover, SDF-Okara has preserved the normal microbiota status in feces and cecal content of rats, inhibiting the deleterious effect of the high-fat diet and increasing the number of several bacterial groups. Also, the dosage- and time- dependent beneficial effect of SDF-Okara has been suggested. Okara has proven to be a useful and cheap weight-loss, cardiovascular-protective, prebiotic and microbiota-protective supplement, which could be employed as a healthy ingredient in several functional foods.

### **Abbreviations**

ABTS, 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid); AIP, atherogenic index of plasma; ALT/GTP, alanine transaminase/glutamate-pyruvate transaminase; AOAC, Association of Official Analytical Chemists; AST/GOT, aspartate transaminase/glutamic oxaloacetic; CHO, carbohydrates; CRP, C-reactive protein; DF, dietary fiber; F, forward; FRAP, ferric reducing/antioxidant power assay; HDL, high-density lipoprotein; HHP, high hydrostatic pressure; IDF, insoluble dietary fiber; LDL, low-density lipoprotein; qPCR, Quantitative Polymerase Chain Reaction; R, reverse; SCFA, short chain fatty acids; SDF, soluble dietary fiber; SOS, soybean oligosaccharides

### **Acknowledgements**

Thanks are given to Mr. Takazumi from Toofu-Ya S.L. for providing the Okara by-product and to Mr. Martínez-Gutiérrez from Novozymes Spain, S.A. for providing *Ultraflo*<sup>®</sup> L.

**Funding sources**

Projects Ref. GR3/14 from Universidad Complutense de Madrid-Banco Santander and AGL2016-77056-R from the Spanish MINECO supported this research. E. Pérez-López acknowledges the predoctoral training program of the Education, Language Policy and Culture of the Basque Government (Spain) (Grant No. PRE\_2013\_1\_682) for her work experience contract at the Department of Metabolism and Nutrition of ICTAN-CSIC in Madrid.

**Conflicts of Interest**

None.

## Bibliography

1. Rastall, R. A.; Gibson, G. R., Recent developments in prebiotics to selectively impact beneficial microbes and promote intestinal health. *Curr Opin Biotech* 2015, 32, 42-46.
2. Mateos-Aparicio, I.; Redondo-Cuenca, A.; Villanueva, M. J., Dietary Fiber from the Food Industry by-Products. In *Dietary Fiber: Sources, Properties and Their Relationship to Health*, Nova Science Publishers, I., Ed. Nova Biomedical: New York, 2013; p 23.
3. Li, B.; Qiao, M.; Lu, F., Composition, Nutrition, and Utilization of Okara (Soybean Residue). *Food Rev Int* 2012, 28, 231-252.
4. Prestamo, G.; Ruperez, P.; Espinosa-Martos, I.; Villanueva, M. J.; Lasuncion, M. A., The effects of okara on rat growth, cecal fermentation, and serum lipids. *Eur Food Res Technol* 2007, 225, 925-928.
5. Espinosa-Martos, I.; Ruperez, P., Indigestible fraction of okara from soybean: composition, physicochemical properties and in vitro fermentability by pure cultures of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum*. *Eur Food Res Technol* 2009, 228, 685-693.
6. Mateos-Aparicio, I.; Mateos-Peinado, C.; Ruperez, P., High hydrostatic pressure improves the functionality of dietary fibre in okara by-product from soybean. *Innov Food Sci Emerg Technol* 2010, 11, 445-450.
7. Villanueva, M. J.; Perez-Cozar, M. L.; Redondo-Cuenca, A., Sequential extraction of polysaccharides from enzymatically hydrolyzed okara byproduct: Physicochemical properties and in vitro fermentability. *Food Chem* 2013, 141, 1114-1119.
8. O'Toole, D. K., Characteristics and Use of Okara, the Soybean Residue from Soy Milk Productions: A Review. *J Agric Food Chem* 1999, 47, 8.
9. Jimenez-Escrig, A.; Tenorio, M. D.; Espinosa-Martos, I.; Ruperez, P., Health-promoting effects of a dietary fiber concentrate from the soybean byproduct okara in rats. *J Agric Food Chem* 2008, 56, 7495-501.
10. Villanueva, M. J.; Yokoyama, W. H.; Hong, Y. J.; Bartley, G. E.; Ruperez, P., Effect of high-fat diets supplemented with okara soybean by-product on lipid profiles of plasma, liver and faeces in Syrian hamsters. *Food Chem* 2011, 124, 72-79.
11. Huang, H.; Krishnan, H. B.; Pham, Q.; Yu, L. L.; Wang, T. T. Y., Soy and Gut Microbiota: Interaction and Implication for Human Health. *J. Agric. Food Chem.* 2016.
12. Roberfroid, M.; Gibson, G. R.; Hoyles, L.; McCartney, A. L.; Rastall, R.; Rowland, I.; Wolvers, D.; Watzl, B.; Szajewska, H.; Stahl, B.; Guarner, F.; Respondek, F.; Whelan, K.; Coxam, V.; Davicco, M. J.; Leotoing, L.; Wittrant, Y.; Delzenne, N. M.; Cani, P. D.; Neyrinck, A. M.; Meheust, A., Prebiotic effects: metabolic and health benefits. *Br J Nutr* 2010, 104, S1-S63.
13. Charalampopoulos, D.; Rastall, R. A., Prebiotics in foods. *Curr Opin Biotech* 2012, 23, 187-191.
14. Gibson, G. R.; Scott, K. P.; Rastall, R. A.; Tuohy, K. M.; Hotchkiss, A.; Dubert-Ferrandon, A.; Gareau, M.; Murphy, E. F.; Saulnier, D.; Loh, G.; Macfarlane, S.; Delzenne, N.; Ringel, Y.; Kozianowski, G.; Dickmann, R.; Lenoir-Wijnkoop, I.; Walker, C.; Buddington, R., Dietary prebiotics: current status and new definition. In *Food Science and Technology Bulletin: Functional Foods*, Gibson, G. R., Ed. International Food Information Service (IFIS Publishing): 2010; Vol. 7, pp 1-19.
15. Perez-Lopez, E.; Mateos-Aparicio, I.; Ruperez, P., Okara treated with high hydrostatic pressure assisted by Ultraflo (R) L: Effect on solubility of dietary fibre. *Innov Food Sci Emerg Technol* 2016, 33, 32-37.
16. Mateos-Aparicio, I.; Redondo-Cuenca, A.; Villanueva, M. J., Isolation and characterisation of cell wall polysaccharides from legume by-products: Okara (soymilk residue), pea pod and broad bean pod. *Food Chem* 2010, 122, 339-345.
17. Pérez-López, E.; Mateos-Aparicio, I.; Ruperez, P., Low molecular weight carbohydrates released from Okara by enzymatic treatment under high hydrostatic pressure. *Innov Food Sci Emerg Technol* 2016.

## Resultados

18. Perez-Lopez, E.; Cela, D.; Costabile, A.; Mateos-Aparicio, I.; Ruperez, P., In vitro fermentability and prebiotic potential of soyabean Okara by human faecal microbiota. *Br J Nutr* 2016, 116, 1116-24.
19. Loewus, F. A., Improvement in anthrone method for determination of carbohydrates. *J Anal Chem* 1952, 24, 219-219.
20. Mañas, E.; Saura-Calixto, F., Ethanolic precipitation - a source of error in dietary fiber determination. *Food Chem* 1993, 47, 351-355.
21. Villanueva-Suárez, M.-J.; Pérez-Cózar, M.-L.; Mateos-Aparicio, I.; Redondo-Cuenca, A., Potential fat-lowering and prebiotic effects of enzymatically treated okara in high-cholesterol-fed Wistar rats. *Int J Food Sci Nutr* 2016, 67, 828-833.
22. Jimenez-Escrig, A.; Gomez-Ordóñez, E.; Dolores Tenorio, M.; Ruperez, P., Antioxidant and prebiotic effects of dietary fiber co-travelers from sugar Kombu in healthy rats. *J Appl Phyco* 2013, 25, 503-512.
23. Tortuero, F.; Fernández, E.; Rupérez, P.; Moreno, M., Raffinose and lactic acid bacteria influence caecal fermentation and serum cholesterol in rats. *Nutr Res* 1997, 17, 41-49.
24. Mujico, J. R.; Baccan, G. C.; Gheorghie, A.; Díaz, L. E.; Marcos, A., Changes in gut microbiota due to supplemented fatty acids in diet-induced obese mice. *Br J Nutr* 2013, 110, 10.
25. Tenorio, M. D.; Espinosa-Martos, I.; Prestamo, G.; Ruperez, P., Soybean whey enhance mineral balance and caecal fermentation in rats. *Eur J Nutr* 2010, 49, 155-163.
26. Matsumoto, K.; Watanabe, Y.; Yokoyama, S.-i., Okara, soybean residue, prevents obesity in a diet-induced murine obesity model. *Biosci Biotechnol Biochem* 2007, 71, 720-727.
27. Tucker, L. A.; Thomas, K. S., Increasing Total Fiber Intake Reduces Risk of Weight and Fat Gains in Women. *J Nutr* 2009, 139, 576-581.
28. Torres, N.; Torre-Villalvazo, I.; Tovar, A. R., Regulation of lipid metabolism by diseases mediated soy protein and its implication in by lipid disorders. *J Nutr Biochem* 2006, 17, 365-373.
29. Samal, L.; Chaturvedi, V. B.; Saikumar, G.; Somvanshi, R.; Pattanaik, A. K., Prebiotic potential of Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) in Wistar rats: effects of levels of supplementation on hindgut fermentation, intestinal morphology, blood metabolites and immune response. *J Sci Food Agric* 2015, 95, 1689-1696.
30. Correia-Sa, I.; de-Sousa-Lopes, H.; Martins, M. J.; Azevedo, I.; Moura, E.; Vieira-Coelho, M. A., Effects of raftilose on serum biochemistry and liver morphology in rats fed with normal or high-fat diet. *Mol Nutr Food Res* 2013, 57, 1468-1472.
31. Fukasawa, T.; Kamei, A.; Watanabe, Y.; Koga, J.; Abe, K., Short-Chain Fructooligosaccharide Regulates Hepatic Peroxisome Proliferator-Activated Receptor alpha and Farnesoid X Receptor Target Gene Expression in Rats. *J Agric Food Chem* 2010, 58, 7007-7012.
32. Mudgil, D.; Barak, S., Composition, properties and health benefits of indigestible carbohydrate polymers as dietary fiber: A review. *Int J Biol Macromol* 2013, 61, 1-6.
33. Elleuch, M.; Bedigian, D.; Roiseux, O.; Besbes, S.; Blecker, C.; Attia, H., Dietary fibre and fibre-rich by-products of food processing: Characterisation, technological functionality and commercial applications: A review. *Food Chem* 2011, 124, 411-421.
34. Hermansen, K.; Sondergaard, M.; Hoie, L.; Carstensen, M.; Brock, B., Beneficial effects of a soy-based dietary supplement on lipid levels and cardiovascular risk markers in type 2 diabetic subjects. *Diabetes Care* 2001, 24, 228-233.
35. Merritt, J. C., Metabolic syndrome: Soybean foods and, serum lipids. *J Natl Med Assoc* 2004, 96, 1032-1041.
36. Joris, P. J.; Plat, J.; Bakker, S. J. L.; Mensink, R. P., Long-term magnesium supplementation improves arterial stiffness in overweight and obese adults: results of a randomized, double-blind, placebo-controlled intervention trial. *Am J Clin Nutr* 2016, 103, 1260-1266.
37. Corzo, N.; Alonso, J. L.; Azpiroz, F.; Calvo, M. A.; Cirici, M.; Leis, R.; Lombo, F.; Mateos-Aparicio, I.; Plou, F. J.; Ruas-Madiedo, P.; Ruperez, P.; Redondo-Cuenca, A.; Sanz, M. L.; Clemente, A., Prebiotics: concept, properties and beneficial effects. *Nutrición Hospitalaria* 2015, 31 Suppl 1, 99-118.

## Resultados

38. Encarnacao, J. C.; Abrantes, A. M.; Pires, A. S.; Botelho, M. F., Revisit dietary fiber on colorectal cancer: butyrate and its role on prevention and treatment. *Cancer Metastasis Rev* 2015, 34, 465-478.
39. Scheppach, W.; Bartram, H. P.; Richter, F., Role of short-chain fatty-acids in the prevention of colorectal-cancer. *Eur J Cancer* 1995, 31A, 1077-1080.
40. Gao, Z.; Yin, J.; Zhang, J.; Ward, R. E.; Martin, R. J.; Lefevre, M.; Cefalu, W. T.; Ye, J., Butyrate Improves Insulin Sensitivity and Increases Energy Expenditure in Mice. *Diabetes* 2009, 58, 1509-1517.
41. Henningsson, Å.; Björck, I.; Nyman, M., Short-chain fatty acid formation at fermentation of indigestible carbohydrates. *J Nutr* 2001, 132, 3098-3104.
42. Blachier, F.; Mariotti, F.; Huneau, J. F.; Tome, D., Effects of amino acid-derived luminal metabolites on the colonic epithelium and physiopathological consequences. *Amino Acids* 2007, 33, 547-562.
43. Newgard, C. B.; An, J.; Bain, J. R.; Muehlbauer, M. J.; Stevens, R. D.; Lien, L. F.; Haqq, A. M.; Shah, S. H.; Arlotto, M.; Slentz, C. A.; Rochon, J.; Gallup, D.; Ilkayeva, O.; Wenner, B. R.; Yancy Jr, W. S.; Eisenson, H.; Musante, G.; Surwit, R. S.; Millington, D. S.; Butler, M. D.; Svetkey, L. P., A Branched-Chain Amino Acid-Related Metabolic Signature that Differentiates Obese and Lean Humans and Contributes to Insulin Resistance. *Cell Metab* 2009, 9, 311-326.
44. Lam, Y. Y.; Ha, C. W.; Campbell, C. R.; Mitchell, A. J.; Dinudom, A.; Oscarsson, J.; Cook, D. I.; Hunt, N. H.; Caterson, I. D.; Holmes, A. J.; Storlien, L. H., Increased gut permeability and microbiota change associate with mesenteric fat inflammation and metabolic dysfunction in diet-induced obese mice. *PLoS One* 2012, 7, e34233.
45. Murphy, E. A.; Velazquez, K. T.; Herbert, K. M., Influence of high-fat diet on gut microbiota: a driving force for chronic disease risk. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2015, 18, 515-520.
46. Higashimura, Y.; Naito, Y.; Takagi, T.; Uchiyama, K.; Mizushima, K.; Ushiroda, C.; Ohnogi, H.; Kudo, Y.; Yasui, M.; Inui, S.; Hisada, T.; Honda, A.; Matsuzaki, Y.; Yoshikawa, T., Protective effect of agaro-oligosaccharides on gut dysbiosis and colon tumorigenesis in high-fat diet-fed mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2016, 310, G367-G375.
47. DeGruttola, A. K.; Low, D.; Mizoguchi, A.; Mizoguchi, E., Current Understanding of Dysbiosis in Disease in Human and Animal Models. *Inflamm Bowel Dis* 2016, 22, 1137-1150.
48. Pallister, T.; Spector, T. D., Food: a new form of personalised (gut microbiome) medicine for chronic diseases? *J R Soc Med* 2016, 109, 331-6.
49. Lee, S.-M.; Han, H. W.; Yim, S. Y., Beneficial effects of soy milk and fiber on high cholesterol diet-induced alteration of gut microbiota and inflammatory gene expression in rats. *Food Funct* 2015, 6, 492-500.
50. Ojo, B.; El-Rassi, G. D.; Payton, M. E.; Perkins-Veazie, P.; Clarke, S.; Smith, B. J.; Lucas, E. A., Mango Supplementation Modulates Gut Microbial Dysbiosis and Short-Chain Fatty Acid Production Independent of Body Weight Reduction in C57BL/6 Mice Fed a High-Fat Diet. *J Nutr* 2016, 146, 1483-91.
51. Sun, J.; Qiao, Y.; Qi, C.; Jiang, W.; Xiao, H.; Shi, Y. H.; Le, G. W., High-fat-diet induced obesity is associated with decreased antiinflammatory *Lactobacillus reuteri* sensitive to oxidative stress in mouse Peyer's patches. *Nutrition* 2016, 32, 265-272.
52. Zhu, Y.; Bai, J.; Zhang, Y.; Xiao, X.; Dong, Y., Effects of bitter melon (*Momordica charantia* L.) on the gut microbiota in high fat diet and low dose streptozocin-induced rats. *Int J Food Sci Nutr* 2016, 67, 686-695.
53. Kurakawa, T.; Ogata, K.; Matsuda, K.; Tsuji, H.; Kubota, H.; Takada, T.; Kado, Y.; Asahara, T.; Takahashi, T.; Nomoto, K., Diversity of Intestinal *Clostridium coccoides* Group in the Japanese Population, as Demonstrated by Reverse Transcription-Quantitative PCR. *PLoS One* 2015, 10, e0126226.

**Figure captions**

**Fig. 1**

Body weight evolution of rats fed a high-fat control diet or a high-fat SDF-Okara diet during 4 weeks. Results are reported as means  $\pm$  standard deviations (SD). Points with asterisks differ significantly ( $P < 0.05$ ).

**Fig.2**

Quantitative PCR analysis of feces (day 1 and day 28) and cecal content of rats fed a high-fat control diet (■) or a high-fat SDF-Okara (■). Results are reported as means ( $\log_{10}$  cells  $g^{-1}$ )  $\pm$  standard deviations. Asterisks between time points and between treatments show significant differences by paired and independent  $t$ -tests, respectively ( $P < 0.05$ ).

## Resultados

### Tables

Table 1: Composition (g x 1000 g<sup>-1</sup> dry weight) of ingredients and test diets used in the feeding experiment in rats

Component	Ingredients		Diets	
	Native Okara	SDF-Okara	High-fat control diet	High-fat SDF-Okara diet
CHO	200 ± 11.4	288 ± 7.7	394 ± 4	223 ± 27
Protein	297 ± 2.2	226 ± 9.1	145 ± 0.4	150 ± 4.7
Fat	72 ± 5.3	83 ± 3.9	291 ± 0.8	299 ± 3.4
	Cholesterol		10	10
	Cholic Acid		2	2
Ashes	37 ± 7.6	41 ± 1.3	44 ± 0.9	35 ± 5.6
IDF	303 ± 27	222 ± 0.7	136 ± 25	191 ± 3.4
SDF	12 ± 0.8	35 ± 0.1	24 ± 2.2	26 ± 3
TDF	315 ± 27	257 ± 0.7	159 ± 25.1	216 ± 4.5
Ca			2.9 ± 0.3	3 ± 0.4
Mg			1.6 ± 0.2	1.6 ± 0.1
Total	920	894	1005	941
Energy (kcal x 1000g <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>			5203	4725
KJ x 1000g <sup>-1</sup>			21.8	19.8

CHO: carbohydrates; IDF: insoluble dietary fiber; SDF: soluble dietary fiber; TDF: total dietary fiber; HHP: high hydrostatic pressure. <sup>a</sup> Conversion factors used: 4 for protein, 4 for carbohydrates, 9 for fat and 2 for dietary fiber.

## Resultados

Table 2: Primers used for bacterial quantification by quantitative PCR

Bacterial group	Oligonucleotide sequence
<i>Eubacteria</i>	F 5'CGGTGAATACGTTCCCGG3' R 5'TACGGCTACCTTGTTACGACTT3'
<i>Bifidobacterium</i>	F 5'GATTCTGGCTCAGGATGAACG3' R 5'CTGATAGGACGCGACCCCAT3'
<i>Lactobacilli</i>	F 5'CTTGTACACACCGCCCGTCA3' R 5'CTCAAACTAAACAAAGTTTC3'
Enterobacteriaceae	F 5'CATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGC3' R 5'CTCTACGAGACTCAAGCTTGC3'
<i>Enterococcus</i>	F 5'CCCTTATTGTTAGTTGCCATCATT3' R 5'ACTCGTTGTACTIONTCCCATTGT3'
<i>Bacteroides</i>	F 5'ATAGCCTTTCGAAAGRAAGAT3' R 5'CCAGTATCAACTGCAATTTTA3'
<i>Blautia coccoides-</i>	F 5'AAATGACGGTACCTGACTAA3'
<i>Eubacterium rectale</i>	R 5'CTTTGAGTTTCATTCTTGCGAA3'
<i>Clostridium leptum</i>	F 5'GCACAAGCAGTGGAGT3' R 5'CTTCCTCCGTTTTGTCAA3'

F: forward; R: reverse

## Resultados

Table 3: Effect of the high-fat diets supplemented with Okara on organ size in rats

Parameters	High-fat control diet	High-fat SDF-Okara diet
Organ weight (weight x body weight <sup>-1</sup> x 100)		
Heart	0.31 ± 0.03	0.28 ± 0.01
Liver	5.12 ± 0.23	4.76 ± 0.14*
Liver % fat	41 ± 3.09	42 ± 4.58
Kidneys	0.63 ± 0.05	0.62 ± 0.03
Spleen	0.23 ± 0.07	0.25 ± 0.04
Organ length (length x body weight <sup>-1</sup> x 100)		
Intestine	30 ± 1.63	31 ± 3.07

SDF: soluble dietary fiber. Means with asterisks in each row differ significantly ( $P < 0.05$ ).

## Resultados

Table 4: Effect of the high-fat diets supplemented with Okara on serum parameters in rats

Parameters (mg × dL <sup>-1</sup> )	High-fat control diet	High-fat SDF- Okara diet
Glucose	196 ± 19	207 ± 17
Urea	34 ± 1.34	29 ± 1.86*
Uric acid	2.12 ± 0.65	2.40 ± 0.80
Creatinine	0.27 ± 0.04	0.30 ± 0.06
Cholesterol	110 ± 6.80	107 ± 6.56
HDL	48 ± 4.02	46 ± 6.34
LDL	49 ± 6.38	49 ± 9.71
Triglycerides	79 ± 14	58 ± 6.84*
AIP	2.29	2.33

HDL: high-density lipoprotein; LDL: low-density lipoprotein; AIP: Atherogenic index of plasma, total cholesterol x HDL<sup>-1</sup>. SDF: soluble dietary fiber. Means with asterisks in each row differ significantly ( $P < 0.05$ ).

## Resultados

Table 5: Prebiotic effect of the high-fat diets supplemented with Okara in rats

Cecal parameters	High-fat control diet	High-fat SDF-Okara diet
pH	5.97 ± 0.12	5.95 ± 0.12
Cecal moisture (%)	81 ± 1.67	83 ± 0.69*
Cecal (weight %)	1.74 ± 0.22	2.18 ± 0.39*
SCFA (µmol/g)		
Acetic acid	37 ± 10	38 ± 9.03
Propionic acid	23 ± 4.88	28 ± 6.94
Isobutyric acid	4.64 ± 0.83	7.87 ± 1.89*
Butyric acid	61 ± 15	77 ± 16
Isovaleric acid	Nd	2.16 ± 0.70*
Valeric acid	3.47 ± 0.61	4.73 ± 1.05*
Unidentified	4.84 ± 1.10	11 ± 2.74*
Total SCFA	133 ± 33	169 ± 28
Mineral content in feces (mg/g)		
Ca day 1	17.67 ± 2.56	13.19 ± 1.82*
Ca day 28	29.12 ± 3.98	13.44 ± 1.07*
Mg day 1	6.52 ± 0.4	6.56 ± 0.55
Mg day 28	6.76 ± 0.64	5.33 ± 0.27*

SCFA: short chain fatty acids; SDF: soluble dietary fiber. Nd: not detected. Means with asterisks in each row differ significantly ( $P < 0.05$ ).

Fig.1.

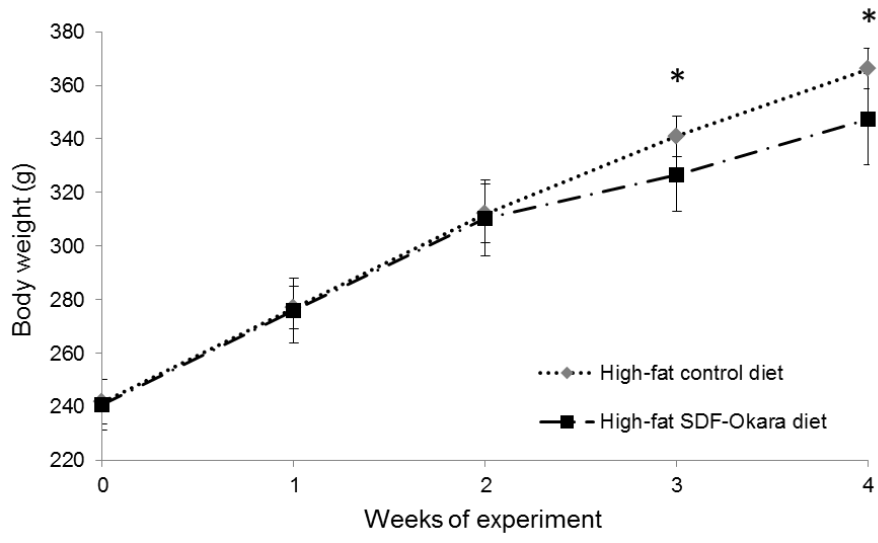
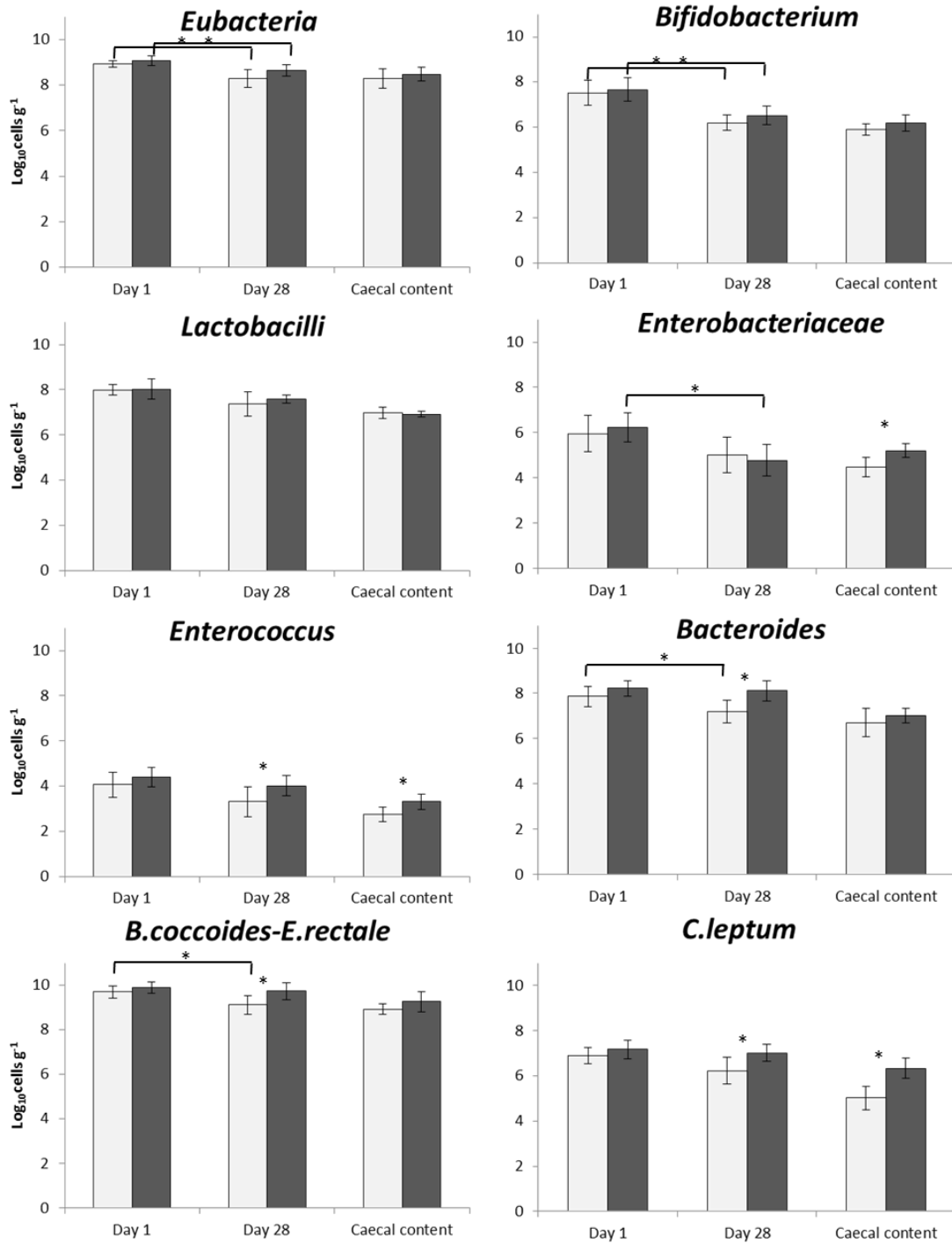
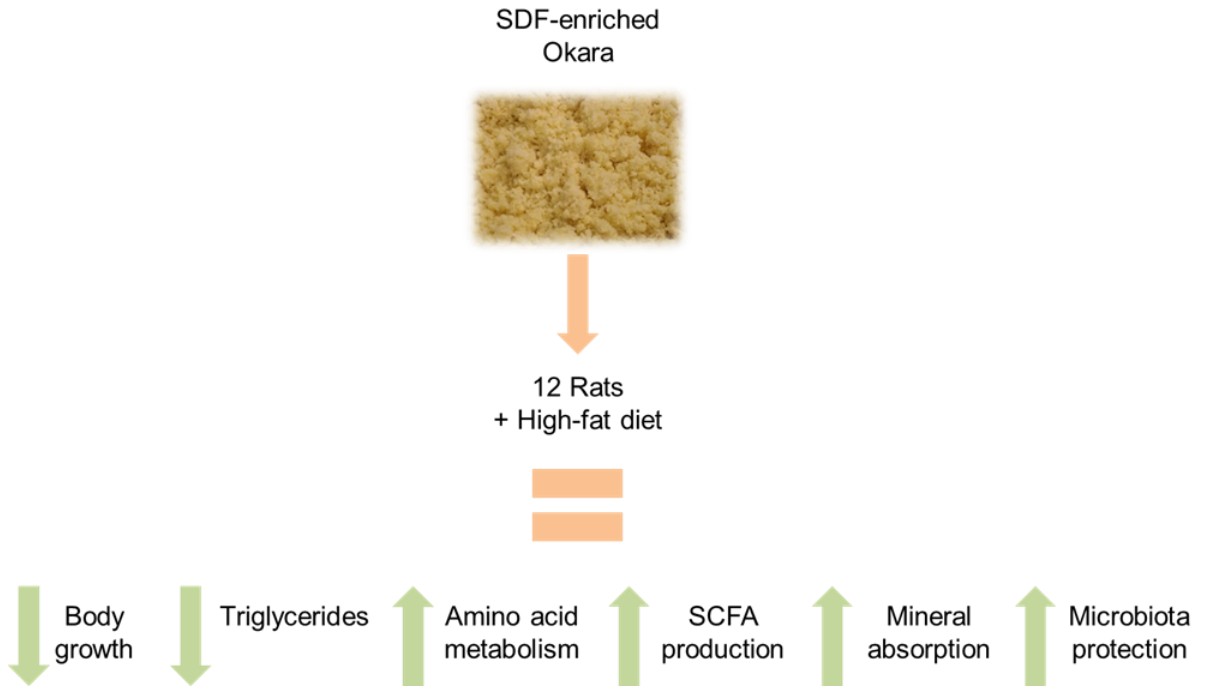


Fig. 2.



Graphic for table of contents



## Discusión

## *Discusión*

*1. Desarrollo y validación de un método cromatográfico (HPLC - ELSD) que permita monitorizar la liberación de fibra soluble de la Okara cuando se emplea un tratamiento con altas presiones hidrostáticas y enzimas hidrolíticas*

Los métodos cromatográficos son rápidos y precisos, pudiendo ser empleados para el análisis de carbohidratos. Por ello, se ha desarrollado un método de HPLC que permite cuantificar e identificar carbohidratos con un amplio rango de pesos moleculares. El detector más utilizado para el análisis de carbohidratos por HPLC es el de índice de refracción (RID) (268-270), aunque ha demostrado tener algunas desventajas con respecto al detector ELSD. Por ejemplo, la sensibilidad relativa del RID es baja, la respuesta depende de la temperatura y del caudal de la fase móvil y no permite utilizar un gradiente de elución, por lo que el uso del detector ELSD está aumentando (271). El ELSD es un detector semi-universal, que detecta las moléculas tras una etapa de nebulización en la que se forman gotas de fase móvil, seguida de una etapa de evaporación, en la que la fase móvil, que debe ser volátil, se evapora. Después, los compuestos provocan una dispersión de la luz en la cámara de detección, permitiendo su identificación y cuantificación. Para que se pueda usar esta técnica, los compuestos a detectar deben ser poco volátiles, como los carbohidratos (268, 271). Los factores que afectan a la respuesta del detector son la temperatura de nebulización, la temperatura de evaporación y el caudal del gas portador (nitrógeno) (268).

Normalmente, los métodos que se han descrito para detectar carbohidratos con el detector ELSD se centran en oligosacáridos o en azúcares, pero no en carbohidratos de pesos moleculares muy diferentes o de muestras muy complejas (271-279). En el caso

## Discusión

de la Okara, se necesita optimizar el método HPLC-ELSD para que sea capaz de analizar la mezcla de carbohidratos que se espera obtener. Las paredes celulares de la Okara son complejas, y se han identificado monómeros de glucosa, xilosa o galactosa, indicando la presencia de polisacáridos y oligosacáridos complejos, como la celulosa, hemicelulosa, xilanos, galactanos, etc. (198, 201, 208, 265). Como se ha determinado en estudios previos, se espera que el tratamiento con APH y enzimas hidrolíticas alimentarias solubilice parte de la fibra insoluble de la Okara, obteniéndose una mezcla de polisacáridos, oligosacáridos y monosacáridos de diferente naturaleza (200).

Para desarrollar el método HPLC-ELSD, se tienen que establecer los parámetros que maximicen la respuesta del detector cuando se usan carbohidratos similares a los que se esperan obtener en la Okara. Se han utilizado carbohidratos de un peso molecular de entre 3,2 a 100 kDa como patrones y la técnica MSR (capítulo 1, artículo 1). De esta manera, se han establecido las condiciones que maximizan la respuesta del detector ELSD: temperatura del nebulizador, 77,9 °C, del evaporador, 88,8 °C (utilizadas como 78 °C y 89 °C respectivamente) y el caudal de nitrógeno, 1,1 L min<sup>-1</sup> (SLM). Otro parámetro optimizado ha sido el tipo de fase móvil utilizada, ya que también influye en la forma de los picos y en el área de detección. Así, se ha determinado que el acetato de amonio en una concentración de 0,01 mol L<sup>-1</sup> es la que mejor resolución de los picos proporciona (capítulo 1, artículo 1).

Después, los parámetros del detector ELSD han sido validados usando patrones de un PM de entre 0,18 a 500 kDa en una columna de exclusión molecular TSK gel. Se han conseguido unas curvas de regresión logarítmicas en concentraciones de entre 250 y 1000 mg L<sup>-1</sup>, con coeficientes de correlación superiores a 0,998, que son similares a los encontrados en otros estudios que se centran en carbohidratos con un rango pequeño de

## Discusión

pesos moleculares (268, 275, 276, 280-282) (capítulo 1, artículo 1). Estas curvas de regresión son las que se han utilizado para cuantificar los carbohidratos solubles liberados de la Okara cuando se aplica el tratamiento con APH y enzimas alimentarias (capítulo 2). Además, se ha visto que la sensibilidad del método de cuantificación es alta, ya que los límites de detección y cuantificación, medidos como la concentración que corresponde a la relación señal/ruido  $\times 3$  y  $\times 10$  respectivamente, son bajos (capítulo 1, artículo 1). Cuando se utiliza el detector RID con la misma columna cromatográfica para el análisis de carbohidratos, estos límites de detección y cuantificación son unas 10 veces mayores, por lo que el método optimizado HPLC-ELSD es significativamente más sensible que el método HPLC-RID (283). Este método también ha demostrado ser preciso, con repetitividades intra- e inter-días altas, tanto para el tiempo de retención como para las áreas de los picos (desviaciones estándares relativas menores del 1,8 % y 1,6 %, respectivamente), que son mayores que en otros trabajos en los que se detectan carbohidratos similares entre sí (272, 275, 276). La calibración para identificar a los carbohidratos a partir del tiempo de retención de los picos se ha realizado con curvas de calibración logarítmicas. Como el rango de pesos moleculares utilizados es muy amplio, se han obtenido dos curvas, una para polisacáridos, como la inulina o pectina y otro para oligosacáridos, como los  $\alpha$ -galactooligosacáridos (capítulo 1, artículo 1).

En el capítulo dos (artículos 2, 3 y 4) se pueden apreciar los resultados que se obtienen cuando se aplica el método HPLC-ELSD a la Okara tratada con APH y enzimas hidrolíticas. El método ha demostrado ser rápido y capaz de detectar pequeños cambios en la concentración y en el peso molecular de los carbohidratos. Los estudios que se habían hecho con Okara establecían una concentración de carbohidratos solubles del 4-5 %, medidos mediante HPLC-RID (198, 205), aunque otros autores determinan

## *Discusión*

valores más bajos (2 %), medidos con cromatografía gas-líquido (201). Con este trabajo, se ha establecido un valor de carbohidratos solubles en la Okara nativa de entre 5-9 %.

El método HPLC-ELSD utilizado con la columna de exclusión molecular TSK gel es capaz de cuantificar los carbohidratos solubles totales de la muestra de la Okara y separarlos en distintos picos con rangos limitados de pesos moleculares. No obstante, se ha observado que varios compuestos quedan agrupados en un único pico, que se corresponde con los compuestos de menor peso molecular, como los  $\alpha$ -galactooligosacáridos (capítulo 2, artículos 2 y 3). Por ello, se ha considerado necesario desarrollar en mayor medida el análisis de estos oligosacáridos, que están presentes en la soja y en la Okara y se consideran prebióticos emergentes (176).

Para ello, el método HPLC-ELSD ha sido ampliado para ser usado con otra columna que permita separar los oligosacáridos (capítulo 2, artículo 5). Se ha utilizado la columna de intercambio iónico Aminex (HPX-87P) y patrones de pesos moleculares de entre 0,15 a 112 kDa. Se han desarrollado curvas de calibración logarítmicas con una buena linealidad, similar a la obtenida con la columna TSK gel, en un rango de concentraciones de 125-750 mg L<sup>-1</sup>. Estos valores son similares a los encontrados en otros trabajos con carbohidratos medidos con el detector ELSD (275, 280-282), aunque esta columna intercambiadora es capaz de cuantificar concentraciones más bajas que la de exclusión molecular. Para la identificación de los PM de los compuestos, se han propuesto tres curvas de calibrado logarítmicas diferentes, una para compuestos de pesos moleculares de 0,18-1 kDa, otra para polisacáridos (1-100 kDa) y otra para xilooligosacáridos. Esta columna cuantifica e identifica el PM de los  $\alpha$ -galactooligosacáridos, los fructooligosacáridos, la inulina y los dextranos con gran

## *Discusión*

exactitud, aunque no es precisa para la maltodextrina o la inulina comercial Raftilina<sup>®</sup>, lo que no ocurre cuando se usa la columna TSK gel (capítulo 1 y capítulo 2, artículo 5).

En las muestras de Okara tratada con APH y enzimas, la columna Aminex proporciona una recuperación menor (5 %) que la TSK gel (5-9 %), probablemente por subestimar los polisacáridos de gran peso molecular, al ser una columna específica de oligosacáridos. A pesar de esto, es capaz de separar los oligosacáridos de la Okara de manera eficaz. Por ello, ambas columnas se complementan para proporcionar una información detallada sobre la composición de carbohidratos solubles de la Okara y sobre el efecto del tratamiento con APH y enzimas. Además, el método optimizado del detector ELSD ha demostrado que es versátil y puede usarse con diferentes columnas cromatográficas (capítulo 1 y capítulo 2, artículo 5).

Por otra parte, la determinación de la fibra dietética se ha realizado tradicionalmente aplicando los métodos oficiales de la AOAC, pero se ha comprobado que en el caso de la Okara pueden causar interferencias en la detección de la fracción de fibra soluble (capítulo 2, artículo 4). Esto es debido a que los métodos de la AOAC conllevan tratamientos enzimáticos a temperaturas de hasta 100 °C que pueden liberar carbohidratos de la pared celular de la Okara. Además, para evitar la precipitación etanólica, que puede causar la subestimación de la FS al no precipitar completamente y la sobrestimación de la fibra total, se ha usado el método enzimático-gravimétrico (991.43) modificado con diálisis (284). Para llevar a cabo esta diálisis se utilizan membranas con un tamaño de poro de 12 kDa, pero este procedimiento también puede subestimar la FS ya que se produce la pérdida de los oligosacáridos de bajo peso molecular de la Okara (< 12 kDa) (200, 284). Tras esto, se suelen cuantificar los carbohidratos presentes en las fracciones soluble e insoluble, tras una hidrólisis ácida,

## *Discusión*

mediante métodos espectrofotométricos, como el de Scott para cuantificar los ácidos urónicos (285), el de la antrona para los azúcares neutros (286) y el del ácido dinitrosalicílico para los azúcares reductores (287). No obstante, cuando la fracción de la fibra soluble obtenida tras el método de la AOAC se inyecta en el HPLC-ELSD, éste proporciona más información y es más sensible que los métodos espectrofotométricos. Además, el método HPLC-ELSD aplicado directamente al sobrenadante de la Okara tras el tratamiento con APH y enzimas, ha resultado ser tres veces más sensible que el método de la AOAC con diálisis y la cuantificación mediante los métodos espectrofotométricos mencionados.

Por todo ello, el método optimizado HPLC-ELSD ha demostrado ser rápido y fiable para el análisis de los carbohidratos de la Okara, versátil, ya que puede utilizarse con diferentes columnas cromatográficas (exclusión molecular e intercambio iónico) para obtener una información precisa sobre la composición de la Okara y más sensible que los métodos oficiales enzimático-gravimétricos de análisis de la fibra. Además, este método se podría utilizar para el estudio de los carbohidratos solubles de PM variables presentes en otros alimentos.

2. *Tratamiento de la Okara con altas presiones hidrostáticas y enzimas específicas para solubilizar la fibra: optimización del tratamiento y efectos potencialmente funcionales*

Se ha llevado a cabo la optimización del tratamiento de la Okara con APH y enzimas con la idea de minimizar los costes del proceso y para que sea más fácilmente aplicable a escala industrial.

La aplicación de APH, a pesar de suponer una inversión inicial importante, es barata, ya que una vez alcanzada la presión deseada, ésta se mantiene sin más aportes energéticos (45, 64, 66). No obstante, los tratamientos enzimáticos son caros, ya que el volumen de sustrato, si se aplica el tratamiento a nivel industrial, es considerable (26). Por ello, se ha minimizado la concentración de enzima necesaria para producir una buena liberación de carbohidratos. Las enzimas hidrolíticas de grado alimentario utilizadas, *Ultraflo*<sup>®</sup> L y *Viscozyme*<sup>®</sup> L, habían sido utilizadas en otros trabajos en diferentes concentraciones y condiciones a presión atmosférica: *Ultraflo*<sup>®</sup> L había sido empleada al 0,05 % en Okara (208), al 1:100 en batata (288) y 1:20 en trigo (289) (enzima:sustrato), mientras que *Viscozyme*<sup>®</sup> L había sido utilizada al 3 % a pH 3,5 y 45 °C en Okara (263) o al 1 % (264) y 0,045 % (290) en soja. Esta variabilidad hace que sea necesario un estudio que establezca cuáles son las mejores condiciones para las enzimas.

Para ello, se ha cuantificado la actividad de las enzimas *Ultraflo*<sup>®</sup> L y *Viscozyme*<sup>®</sup> L en Okara a presión atmosférica, resultando ser más efectiva *Ultraflo*<sup>®</sup> L. Además, gracias al empleo de la MSR, se ha visto que la concentración de las enzimas no es una variable importante, lo que coincide con estudios previos (265). Asimismo, se

## Discusión

ha determinado que para *Ultraflo*<sup>®</sup> L, el tiempo de incubación no es fundamental (265), mientras que para *Viscozyme*<sup>®</sup> L sí lo es, posiblemente por su menor actividad en Okara. Cuando se estudia la cinética enzimática, se aprecia que ambas enzimas son capaces de liberar carbohidratos solubles a partir de la Okara cuando están en una concentración baja, y que se saturan en unos 120-150 minutos cuando están a concentración de 1:40 enzima / Okara (v/m), aunque las cinéticas son complejas, ya que la Okara tiene paredes celulares primarias y secundarias, con pectina residual, proteína, celulosa, hemicelulosa y xiloglucano (198, 207, 265). Las enzimas elegidas han resultado ser eficaces para liberar carbohidratos de la pared de la Okara a presión atmosférica, ya que poseen actividades celulasa y xilanasa (*Ultraflo*<sup>®</sup> L) o celulasa, hemicelulasa y xilanasa (*Viscozyme*<sup>®</sup> L), respectivamente. Cuando se realiza un tratamiento a presión atmosférica con ambas enzimas a la vez, no se detecta sinergia entre ellas, posiblemente debido a que comparten un mismo sitio de unión en el sustrato. Asimismo, se ha determinado que las condiciones que maximizan la hidrólisis enzimática son a pH 7 y a una temperatura de 37 °C, que son fácilmente aplicables a un tratamiento industrial (capítulo 2, artículos 2 y 3).

Para el tratamiento a altas presiones, se ha utilizado la mínima concentración de enzima que produce una liberación considerable de carbohidratos (300-500 mg L<sup>-1</sup>), 1:40 enzima / Okara v/m y Okara al 1 % de concentración (peso seco), aunque podría utilizarse directamente la Okara fresca (> 80 % humedad), si se emplea el método industrialmente. En el capítulo 3, para la preparación de las dietas de las ratas se ha aumentado la concentración de Okara al 20 % (peso seco) para el tratamiento con APH y enzimas, que es la máxima concentración a la que se ha podido manejar. El tratamiento se ha llevado a cabo en tiempos de 15 o 30 min, a 400 o 600 MPa, ya que tratamientos de mayor duración o a una presión más alta pueden inactivar a las enzimas.

## Discusión

Por ejemplo, se ha determinado que a 600 MPa durante más de 20 minutos o a 700 MPa se inactivan algunas enzimas cuya actividad se ve mejorada por las APH a presiones menores (62, 75).

Se han analizado los resultados del tratamiento simultáneo de la Okara con APH y enzimas mediante el método HPLC-ELSD optimizado en el capítulo 1. Se ha determinado una sinergia entre las APH y ambas enzimas, que se traduce en un aumento de la concentración de carbohidratos solubles y una disminución de su peso molecular (capítulo 2). La mejora de actividad de *Viscozyme*<sup>®</sup> L cuando se somete a APH ya se había indicado con anterioridad en ginseng (58) y en cactus (60), pero no así la de *Ultraflo*<sup>®</sup> L. La sinergia entre las  $\alpha$ - y  $\beta$ -amilasas y las APH se ha observado en otros trabajos (62, 75), pudiendo ser causada por cambios en la estructura tridimensional de las enzimas que afectan al sitio activo y facilitan la unión al sustrato (77, 78), o por la descompartimentalización inducida por la presión sobre el sustrato, posibilitando que la enzima acceda con mayor facilidad a más moléculas (63, 73). Esto último tendría sentido en el caso de la Okara, ya que es muy compleja (198, 207, 265) y ya se había comprobado anteriormente que las APH producen una solubilización de su fibra (200). Todo ello favorece que *Ultraflo*<sup>®</sup> L y *Viscozyme*<sup>®</sup> L mejoren su actividad cuando se someten a APH.

Con el método HPLC-ELSD y la columna TSK gel de exclusión molecular se ha comprobado que el tratamiento de la Okara con APH y enzimas tiene un efecto de disminución del peso molecular de los polisacáridos, hasta en un 47 % en el caso del tratamiento de *Viscozyme*<sup>®</sup> L. Con *Ultraflo*<sup>®</sup> L, los polisacáridos de mayor peso molecular no aparecen en los tratamientos combinados de APH y enzima, demostrando que se hidrolizan a polisacáridos más pequeños. Con ambas enzimas se han obtenido

## Discusión

polisacáridos de mayor PM que la inulina y un pico que engloba a los oligosacáridos. De manera que para estudiar en mayor profundidad esos carbohidratos de pesos moleculares menores, se ha utilizado la columna de intercambio iónico Aminex, detectándose ocho compuestos diferentes. El mayor de todos, con un peso molecular de 4-13 kDa (*Ultraflo*<sup>®</sup> L + APH) o 2-13 kDa (*Viscozyme*<sup>®</sup> L + APH), es similar al peso de la inulina y disminuye de tamaño cuando se añade la enzima y aumenta la presión. También se ha identificado un compuesto similar a la estaquiosa (no se descarta que también estén presentes otros  $\alpha$ -galactooligosacáridos), un disacárido, probablemente sacarosa, que se hidroliza a monosacáridos (fructosa y glucosa) con el tratamiento y tres compuestos, posiblemente fructooligosacáridos de diferente peso molecular. Los FOS, han demostrado tener un efecto prebiótico y de reducción de la población de bacterias perjudiciales, como *Clostridium histolyticum/perfringens* (22, 102, 163-165, 167, 291, 292). Los  $\alpha$ -galactooligosacáridos están presentes en la soja y Okara y se consideran prebióticos emergentes (176, 198, 208). La rafinosa, por ejemplo, ha demostrado tener propiedades beneficiosas (106), como el aumento de *Lactobacillus* en un experimento *in vitro* (293). La estaquiosa, la rafinosa y la verbascosa tienen efectos prebióticos y mejoran la salud intestinal al aliviar el estreñimiento en ratas (294). Los oligosacáridos de soja reducen la glucosa y lípidos en sangre y el estrés oxidativo en ratas que siguen una dieta grasa (229). Además, el efecto prebiótico de los oligosacáridos de Okara puede aumentar al disminuir su peso molecular como consecuencia del tratamiento con APH y enzimas, ya que los carbohidratos no digeribles más pequeños, como los oligosacáridos, son más fácilmente fermentables por la microbiota intestinal (101, 179, 292).

Los carbohidratos solubles liberados por el tratamiento con APH aumentan con la intensidad del mismo y con la adición de las enzimas. Así, la concentración de los

## Discusión

carbohidratos totales aumenta de 9 % a 16 % y de 5 % a 14 % (peso seco) cuando se compara el control con el tratamiento a 600 MPa, 1:40 enzima / Okara (v/m) con *Ultraflo*<sup>®</sup> L y *Viscozyme*<sup>®</sup> L, respectivamente, y 30 min (capítulo 2, artículos 2 y 3). Esto supone una concentración 1,8 y 3 veces mayor que en la Okara nativa (198, 201). Para ambas enzimas, el tratamiento con 600 MPa y 30 min ha sido el que mayor solubilización de carbohidratos ha producido. Las pequeñas diferencias entre los blancos y entre los tratamientos sin las enzimas se han atribuido a una ligera modificación del protocolo (en el tratamiento de *Ultraflo*<sup>®</sup> L se liofilizan las muestras tras las APH, se resuspenden e inyectan y en el de *Viscozyme*<sup>®</sup> L, el sobrenadante se inyecta directamente en el HPLC-ELSD). Cuando se cuantifican los carbohidratos con la columna Aminex, se aprecia una redistribución de los picos. Además, se observa una diferente actividad de las enzimas, ya que *Viscozyme*<sup>®</sup> L libera más carbohidratos de pequeño peso molecular a 600 MPa, 1:40 enzima / Okara (v/m) y 30 min, mientras que *Ultraflo*<sup>®</sup> L lo hace con el mismo tratamiento, pero en 15 min. En otros estudios, los carbohidratos de bajo peso molecular de Okara se han cuantificado en un 4 %, un valor menor del obtenido con el método de HPLC-ELSD (187). Por otra parte, los valores de compuestos similares a la inulina, estaquiosa y glucosa conseguidos con este método, son equivalentes a los previamente descritos en Okara (187, 198).

El aumento de los carbohidratos solubles de Okara se había conseguido con anterioridad utilizando APH (200-400 MPa) en combinación con el autoclave y a temperaturas de 30 °C y 60 °C (200). No obstante, el tratamiento térmico puede tener efectos negativos en las características sensoriales o nutricionales de la Okara (62), por lo que el tratamiento con APH y enzimas propuesto puede evitar este problema. En otro trabajo, se ha tratado la Okara con microfluidización a altas presiones y fermentación con bacterias ácido lácticas, obteniéndose un resultado comparable de aumento de fibra

## *Discusión*

soluble (225). También se ha tratado la Okara mediante homogeneización a alta presión o APH para mejorar la solubilidad, siendo más efectivo el tratamiento de homogeneización a alta presión (295). Como resultado del tratamiento de la Okara con APH y enzimas hidrolíticas, se ha conseguido aumentar el contenido de FS a partir de la FI, ya que se ha visto un descenso en la concentración de FI equivalente al aumento de FS (capítulo 2, artículo 4). Esto se ha observado con anterioridad en otros trabajos con Okara en los que se trata con APH, pero sin enzimas (200, 225, 295). El aumento de la proporción FS:FI que se ha conseguido gracias al tratamiento con APH y enzimas hace que la Okara tenga un perfil de fibra más funcional, ya que la FS se relaciona con un mayor efecto prebiótico, al estimular el crecimiento de bacterias beneficiosas y a un menor riesgo de enfermedad cardiovascular y diabetes (94, 140, 141, 235, 237, 238). Además, el perfil de fibra de la Okara tratada sería más comparable a las recomendaciones de ingesta de fibra de > 25 g al día, de los cuales sería deseable que un 30 % fuesen solubles (200, 221).

Esta tesis se ha centrado principalmente en el análisis de los carbohidratos de la Okara, debido a sus posibles efectos prebióticos y beneficiosos para la salud. No obstante, se ha comprobado que las APH tienen también un efecto en las proteínas de los alimentos y en la extracción de moléculas bioactivas (27, 60, 62, 66) y que los péptidos de la Okara y la soja tienen propiedades de inhibición de la ECA, que ayuda a prevenir la hipertensión (199, 254-258). Se ha estudiado el efecto de las APH en dicha actividad y en la capacidad antioxidante de la Okara. Los resultados (capítulo 2) revelan una baja actividad antioxidante y una ligera mayor capacidad de inhibición de la ECA cuando se aplican presiones altas, indicando que puede haber un efecto positivo de las APH y enzimas en la generación de péptidos bioactivos con peso molecular bajo, que son los más activos, aunque se necesitan más estudios al respecto.

3. *Estudio de los efectos beneficiosos en la salud, en especial del efecto prebiótico, de la Okara tratada con altas presiones hidrostáticas y enzimas hidrolíticas mediante modelos experimentales in vitro e in vivo*

El aumento de FS conseguido con el tratamiento de APH y enzimas hidrolíticas (capítulo 2) en la Okara puede mejorar sus propiedades funcionales, en especial, las prebióticas (94, 101, 106, 113, 123, 140). Para comprobarlo, se han analizado las propiedades prebióticas potenciales y efectos beneficiosos en la salud *in vitro e in vivo* de la Okara tratada con APH (600 MPa) y *Ultraflo*<sup>®</sup> L (1:40, enzima / Okara, v/m) durante 30 minutos, ya que es el tratamiento que mayor liberación de carbohidratos solubles produce, llegando al 16 % (capítulo 2, artículo 2).

La fermentabilidad de la Okara nativa y la Okara tratada con APH y *Ultraflo*<sup>®</sup> L ha sido comparada en un experimento *in vitro* con cultivos por lotes (“*batch culture*”), en los que se simulan las condiciones del colon humano, al controlar el pH y temperatura e inocular una muestra fecal humana (capítulo 3, artículo 6). Se ha observado que ambas muestras de Okara incrementan el número de bacterias beneficiosas, como *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* y otras potencialmente beneficiosas, como *Ruminococcus*, *Clostridium coccoides* / *Eubacterium rectale* y *Clostridium* cluster IX (productoras de ácido propiónico). Además, la Okara tratada con APH y *Ultraflo*<sup>®</sup> L tiene una mayor capacidad prebiótica potencial, gracias al aumento de FS, ya que presenta actividad bifidogénica durante más tiempo que la Okara nativa, provoca un mayor crecimiento de *Lactobacillus* y una mayor producción de AGCC (capítulo 3, artículo 6). Además, la Okara tratada inhibe en mayor medida el crecimiento de las

## Discusión

bacterias potencialmente perjudiciales *in vitro*, como los *Bacteroides* y *Clostridium histolyticum*, probablemente por el efecto de la competición con las bacterias beneficiosas. El efecto prebiótico potencial de la Okara y de la soja ya se había indicado con anterioridad. Así, sus oligosacáridos, como la rafinosa y estaquirosa, han demostrado ser promotores del crecimiento de *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* (175, 176). Además, la Okara es capaz de ser fermentada por *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (225) y por *Bifidobacterium bifidus* y *Lactobacillus acidophilus*, tanto en su forma nativa como tras un tratamiento con Ultraflo<sup>®</sup> L (201, 208). Además de la FS, la fibra insoluble de la Okara también puede contribuir al efecto prebiótico ya que es parcialmente fermentable (100, 201, 223-225).

Una vez comparado el efecto de la Okara nativa y tratada *in vitro*, la Okara tratada con APH (600 MPa) y Ultraflo<sup>®</sup> L (1:40, enzima / Okara, v/m) durante 30 minutos ha sido estudiada *in vivo* para determinar sus efectos en la salud. Para ello, se ha alimentado a un grupo de ratas con 20 % de Okara tratada y una dieta rica en grasa (20 % de aceite de maíz, 1 % de colesterol y 0,2 % de ácido cólico). La identificación y cuantificación de la microbiota mediante qPCR revela que la dieta rica en grasa ha causado una disminución de las poblaciones estudiadas (capítulo 3, artículo 7). No obstante, la Okara tratada ha demostrado tener un efecto protector contra este desequilibrio. Concretamente, las poblaciones de *Eubacterium*, *Bifidobacterium*, *Enterobacteriaceae*, *Bacteroides* y *Blautia coccoides-Eubacterium rectale* han sufrido una reducción debido a la dieta grasa (capítulo 3, artículo 7). Se ha observado un efecto protector claro con respecto a *Bacteroides* y *B. coccoides-E. rectale*, ya que en las ratas control, la población disminuye debido a la dieta grasa, mientras que cuando se incluye la Okara tratada, se mantienen los números poblacionales iniciales (incremento de 0,9 y 0,6 log<sub>10</sub> células g<sup>-1</sup> con la Okara respecto al control, respectivamente). Previamente, la

## Discusión

fibra de soja había mostrado un efecto similar en la población de *Bacteroides* (296). Las poblaciones de *Bifidobacterium* y *Eubacterium* también disminuyen y la Okara tiende a recuperarlas, pero no es un cambio significativo (incremento de 0,3 y 0,4 log<sub>10</sub> células g<sup>-1</sup> con la Okara respecto al control, respectivamente) (capítulo 3, artículo 7). En lo referente a *Lactobacillus*, no se ha observado un descenso de la población con la dieta grasa ni cuando se añade la Okara tratada. En otros estudios, sin embargo, *Lactobacillus* ha mostrado una reducción en número cuando se sigue una dieta grasa (297, 298) o cuando se añade fibra de soja (296). En el experimento *in vitro* (capítulo 3, artículo 6), sí hay un crecimiento de *Lactobacillus*, por lo que su comportamiento ha demostrado ser complejo. La Okara tratada también ha promovido el crecimiento de grupos bacterianos que no se han visto afectados por la dieta grasa. Han aumentado las poblaciones de *Enterobacteriaceae* en el ciego y de *Enterococcus* en las heces y el ciego respecto al control. Además, *Clostridium leptum*, ha incrementado su población en las heces y el ciego (incremento de 0,8 y 1,3 log<sub>10</sub> células g<sup>-1</sup> con la Okara respecto al control, respectivamente). *C. leptum* y *B. coccoides-E. rectale* son grupos predominantes de la microbiota, productores de ácido butírico e implicados en la homeostasis inmunológica (299, 300), por lo que el crecimiento y protección de sus poblaciones es beneficioso. La reducción del número de bacterias que forman parte de la microbiota normal como resultado de una dieta grasa se había comprobado con anterioridad (297, 301) y supone un aumento del riesgo de sufrir síndrome del intestino irritable y cáncer de colon (302-305). Otros compuestos, como las proteínas del suero (306), el melón (307), la pulpa de mango (308), los agarooligosacáridos de algas (302), o la bebida y la fibra de soja (296), así como los probióticos (309) han demostrado tener efectos protectores contra este cambio en la microbiota. Con este experimento se ha demostrado que la Okara tratada con APH y *Ultraflo*<sup>®</sup> L ha mejorado la tolerancia de la

## Discusión

microbiota ante una dieta grasa, preservando los números poblacionales normales, lo que tiene un efecto protector contra el cáncer de colon.

Cuando se estudia la producción de AGCC en el tratamiento *in vitro*, se aprecian diferencias entre la Okara nativa y la tratada con APH y *Ultraflo*<sup>®</sup> L en la producción de AGCC, siendo 1,12, 1,36 y 1,55 veces mayor la producción de los ácidos acético, propiónico y butírico en la Okara tratada, respectivamente. En el experimento en ratas (capítulo 3, artículo 7), los AGCC aumentan cuando la dieta contiene la Okara tratada, pero no hay cambios significativos en la producción de ácido acético, propiónico ni butírico. Los ácidos acético y propiónico han podido ser absorbidos en el colon, no siendo detectados en el tratamiento *in vivo*, ya que en el tratamiento *in vitro* sí se aprecia una mayor producción de estos ácidos con la Okara tratada. Estos AGCC tienen efectos en la reducción del apetito (127), de la glucosa en sangre (129, 132), en el metabolismo lipídico (130), en los niveles de colesterol (97) e incluso, cierta capacidad anticancerígena (128). Aunque los cambios detectados tanto *in vitro* como *in vivo* en la producción de ácido butírico no son estadísticamente significativos, con la Okara tratada parece que aumenta ligeramente su producción, lo que puede ser beneficioso para la salud gastrointestinal. Además, dado que el ácido butírico podría haber sido utilizado por los colonocitos, su cuantificación puede haber sido subestimada en el tratamiento *in vivo*. El ácido butírico tiene efectos anticancerígenos (110, 128, 135-137), efectos beneficiosos en el sistema inmunitario (131, 138) y contra la inflamación y obesidad (22, 136, 142, 143). Se ha comprobado que en ratas tiene un efecto anti-obesidad y termogénico (146). Los AGCC se producen en el experimento *in vitro* durante más tiempo cuando se añade la Okara que con el control positivo (FOS). Esto indica que dado que la Okara tiene unos carbohidratos más complejos de fermentar que los FOS (207, 208, 265), la microbiota necesita más tiempo para fermentarlos, prolongándose su

## Discusión

efecto prebiótico. En otros estudios, la Okara ya había demostrado su potencial capacidad prebiótica al producir AGCC (57, 177, 179, 181). Además, se ha observado una mayor producción de ácidos grasos ramificados en el grupo de ratas suplementado con la Okara tratada. Estos están implicados en la resistencia a la insulina y en la absorción de electrolitos (116-121) y se sugiere que se producen debido a que la Okara contiene proteína resistente, que al ser fermentada por la microbiota, produce estos compuestos. Aun así, la concentración que se encontró en el ciego de las ratas fue baja.

La mejora de la absorción mineral es un efecto asociado a los prebióticos (106). En el caso del experimento *in vivo* (capítulo 3, artículo 7), se ha observado un aumento en la absorción de calcio y magnesio en las ratas que consumen Okara tratada, lo que puede mejorar la salud ósea. La absorción de calcio ha sido 2,17 veces mayor en las ratas cuya dieta fue sustituida en un 20 % con Okara tratada. Esta mejora comenzó en las primeras 24 h del experimento. La Okara tratada con APH y *Ultraflo*<sup>®</sup> L podría evitar la deficiencia de calcio, que puede desembocar en el padecimiento futuro de osteoporosis (100). La mejora en la absorción de magnesio se aprecia en la semana 4 del tratamiento, siendo 1,27 veces mayor en las ratas alimentadas con la Okara tratada. El magnesio tiene efectos beneficiosos en la prevención de las enfermedades cardiovasculares y en la mejora de la resistencia a insulina (310-312). Este efecto de la Okara en la mejora de la absorción mineral se había detectado en estudios previos (177, 179). Entre las posibles causas, se incluyen la disminución del pH por efecto de una mayor concentración de AGCC, solubilizando los minerales y posibilitando su absorción (149). Otros mecanismos podrían ser un intercambio catiónico (150) o un aumento del área de absorción (105, 106, 151, 152). Esto último se ha observado en el experimento, ya que los ciegos de las ratas alimentadas con Okara tratada han sufrido un crecimiento como efecto del mayor contenido en fibra y posiblemente, del ácido

## Discusión

butírico al promover la diferenciación celular. La fibra insoluble de la Okara tratada también puede favorecer la absorción de los minerales, al arrastrarlos hasta el intestino grueso, donde al ser parcialmente fermentada, los liberaría y se podrían absorber (105, 141, 154).

Se ha comprobado en el experimento con ratas que la Okara tratada con APH y *Ultraflo*<sup>®</sup> L consigue contrarrestar la ganancia en peso de las ratas que siguen una dieta grasa a partir de la tercera semana de tratamiento. Este efecto anti-obesidad de la Okara se había detectado con anterioridad a partir de la cuarta semana de experimento, indicando que el aumento de la FS de Okara podría ser responsable de que se observe antes. Otros trabajos sugieren que este resultado es directamente dependiente de la dosis de Okara utilizada (141, 177-180, 231). Se podría atribuir este efecto anti-obesidad al menor contenido de carbohidratos disponibles en la dieta suplementada con Okara, o bien a que la FS presente en la Okara pueda inducir la saciedad al formar matrices viscosas (233). No obstante, la FI también puede estar participando, ya que se ha comprobado que promueve una mayor pérdida de peso que la FS cuando se siguen dietas altas en grasa (220). La proteína de la Okara también podría ser responsable de contrarrestar la ganancia en peso (144, 228).

Otro importante efecto beneficioso de la Okara tratada con APH y *Ultraflo*<sup>®</sup> L es la reducción del nivel de triglicéridos en suero (1,4 veces menor) (capítulo 3, artículo 7). La reducción conseguida es similar a la encontrada en otros experimentos con Okara administrada al 20 % y al 40 %, y mayor que la conseguida cuando se administra al 10 % (177, 178, 180, 181, 231), lo que sugiere una dependencia de la dosis de Okara. No se han observado cambios en los niveles de colesterol, lo que concuerda con algunos experimentos con Okara (178, 179), aunque otros autores sí han encontrado una

## Discusión

disminución del colesterol total o LDL en sangre, en especial cuando la dosis de Okara suministrada es alta (177, 180, 231). El efecto en la reducción de los lípidos plasmáticos de la fibra se debe, en parte, a las matrices viscosas que forma la fibra soluble en las que quedan retenidos (96, 236, 237), aunque también se ha indicado que puede estar implicada la regulación génica del metabolismo lipídico (231). Además, la proteína de soja reduce el colesterol y triglicéridos (229, 238-240), por lo que no se puede descartar que la proteína de la Okara pueda ser parcialmente responsable de este efecto beneficioso.

En el tratamiento *in vivo* también se ha determinado que la Okara tratada con APH y *Ultraflo*<sup>®</sup> L tiene un efecto beneficioso en el metabolismo de los aminoácidos, al reducir 1,2 veces el contenido de urea en suero, lo que no se había estudiado hasta ahora. En otros prebióticos o productos con alto contenido en fibra, se ha atribuido este efecto a un cambio en la expresión génica del ciclo de la urea (313-315). No se ha encontrado ningún cambio en la glucosa en suero en el experimento *in vivo*, lo que concuerda con otros estudios en Okara (177, 178, 180). Los oligosacáridos de la soja, sin embargo, sí producen una disminución de la glucosa en sangre (229), pero la Okara no parece tener este efecto. Tampoco se observan cambios en el estado antioxidante del ciego, lo que concuerda con la baja capacidad antioxidante de la Okara tratada (capítulo 2). Esto indica que el poder antioxidante de la Okara tratada no es suficiente para evitar el estrés oxidativo asociado a una dieta grasa (177).

En esta tesis se ha optimizado un tratamiento con APH y enzimas hidrolíticas de grado alimentario, para que resulte lo más barato posible si se aplica industrialmente en Okara de soja. La monitorización del efecto de este tratamiento sobre la fibra soluble de la Okara se puede realizar mediante el método sensible y rápido de HPLC-ELSD

## *Discusión*

desarrollado. La Okara tratada con APH y *Ultraflo*<sup>®</sup> L ha demostrado tener un efecto prebiótico *in vitro* e *in vivo*. Sin embargo, se necesitarían estudios en humanos para que fuese considerada un prebiótico. Este tratamiento ha aumentado el valor añadido del subproducto Okara, dando lugar a un nuevo ingrediente potencialmente prebiótico y con un mayor contenido en fibra soluble. La Okara de soja tratada se podría utilizar como ingrediente funcional en alimentos procesados. Además, este tratamiento y posterior utilización evitaría que la Okara se convierta en un residuo que pueda dar lugar a problemas medioambientales cuando se desecha.

# Conclusiones

## *Conclusiones*

## Conclusiones

A partir de los objetivos y los resultados obtenidos en esta tesis, se pueden extraer las siguientes conclusiones:

**Desarrollo y validación de un método cromatográfico (HPLC - ELSD) que permita monitorizar la liberación de fibra soluble de la Okara cuando se emplea un tratamiento con APH y enzimas hidrolíticas.**

1. El detector ELSD permite analizar rápidamente carbohidratos de pesos moleculares distintos (0,15 - 500 kDa), consiguiendo una alta sensibilidad y precisión.
2. El método HPLC–ELSD es capaz de identificar y cuantificar los carbohidratos de Okara, así como de detectar diferencias debidas al tratamiento con APH y enzimas. Este método aplicado a Okara es más sensible que el método oficial de detección de la fibra dietética de la AOAC.

**Tratamiento de la Okara con altas presiones hidrostáticas y enzimas específicas para solubilizar la fibra: optimización del tratamiento y efectos potencialmente funcionales.**

1. Las enzimas de grado alimentario *Ultraflo*<sup>®</sup> L y *Viscozyme*<sup>®</sup> L a baja concentración y en condiciones fácilmente aplicables a nivel industrial son capaces de liberar carbohidratos solubles de la Okara.
2. El tratamiento simultáneo de Okara mediante APH y enzimas (600 MPa, 1:40 enzima/Okara y 30 min) consigue aumentar la concentración de carbohidratos solubles a más del doble de la inicial y disminuir su peso molecular, mejorando su funcionalidad potencial. Hay una sinergia entre cada una de las enzimas (*Ultraflo*<sup>®</sup> L y *Viscozyme*<sup>®</sup> L) y las APH, siendo ligeramente mayor la actividad de *Ultraflo*<sup>®</sup> L bajo presión.

## Conclusiones

**Estudio de los efectos beneficiosos en la salud, en especial del efecto prebiótico, de la Okara tratada por altas presiones hidrostáticas y enzimas hidrolíticas mediante modelos experimentales *in vitro* e *in vivo*.**

1. El incremento de la fibra soluble conseguido con el tratamiento con APH y *Ultraflo*<sup>®</sup> L mejora la capacidad prebiótica de la Okara al promover el crecimiento de *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*, inhibir en mayor medida a las bacterias potencialmente perjudiciales y producir una mayor cantidad de AGCC que la Okara nativa en un experimento *in vitro*.
2. La Okara tratada con APH y *Ultraflo*<sup>®</sup> L suministrada al 20 % consigue frenar la ganancia en peso en ratas alimentadas con una dieta rica en grasa, reducir los triglicéridos en sangre y tiene un efecto beneficioso en el metabolismo de los aminoácidos.
3. La Okara tratada con APH y *Ultraflo*<sup>®</sup> L tiene efectos prebióticos al aumentar la producción de AGCC, incrementar la absorción del calcio y magnesio y demostrar efectos protectores de la microbiota normal en ratas, al evitar los cambios perjudiciales causados por una dieta rica en grasa.

### Conclusión general

En resumen, el tratamiento optimizado con APH y enzimas alimentarias consigue aumentar la fibra soluble de la Okara, siendo fácilmente adaptable a nivel industrial. Esto mejora la funcionalidad y capacidades prebióticas de la Okara, que además, frena la ganancia en peso y mejora la salud cardiovascular en ratas. La Okara tratada podría utilizarse como un nuevo ingrediente funcional en alimentos procesados.

# Conclusions

## *Conclusions*

## Conclusions

According to the objectives and results achieved in this thesis, the following conclusions can be extracted:

### **Development and validation of a new HPLC-ELSD method to monitor the release of soluble fibre from Okara treated with HHP and hydrolytic enzymes.**

1. An ELSD detector can analyse carbohydrates with a wide range of molecular weights (0.15 - 500 kDa), achieving a good sensitivity and precision.
2. The HPLC–ELSD method identifies and quantifies the carbohydrates from Okara and detects changes when the HHP and enzymatic treatment is applied. This method is more sensitive and faster than the official AOAC method for dietary fibre determination.

### **Treatment of Okara by high hydrostatic pressure and specific enzymes to improve the solubility of the dietary fibre: treatment optimization and potentially functional effects.**

1. Food-grade enzymes *Ultraflo*<sup>®</sup> L and *Viscozyme*<sup>®</sup> L applied in low concentration and conditions for an easy industrial application are able to release soluble carbohydrates from Okara.
2. Simultaneous treatment of Okara with HHP and enzymes (600 MPa, 1:40 enzyme/Okara and 30 min) results in a 2-times higher content of soluble carbohydrates with smaller MW than in the native Okara, which improves its functionality. There is a synergy between the treatments, as the activity of *Ultraflo*<sup>®</sup> L and *Viscozyme*<sup>®</sup> L is higher under HHP; particularly, *Ultraflo*<sup>®</sup> L.

**Analysis of the beneficial health and prebiotic effects of HHP and enzyme treated Okara by in vitro and in vivo experiments.**

1. The increase in soluble dietary fibre after HHP and *Ultraflo*<sup>®</sup> L treatment enhances the potential prebiotic effect of Okara, as it promotes the growth of beneficial bacteria, *Bifidobacterium* and *Lactobacillus*, inhibits potentially harmful bacteria and produces more SCFA than native Okara *in vitro*.
2. The supplementation with 20 % Okara treated by HHP and *Ultraflo*<sup>®</sup> L to rats fed a high-fat diet has weight-loss capacities, decreases blood triglycerides and has a beneficial effect on amino acids metabolism.
3. A prebiotic effect of Okara treated by HHP and *Ultraflo*<sup>®</sup> L has been observed, as it increases calcium and magnesium absorption, stimulates the production of SFCA and protects the microbiota against the deleterious changes caused by a high-fat diet.

**General conclusion**

In summary, the optimized HHP and enzymatic treatment increases the soluble dietary fibre of Okara, and it has an easy industrial adaptability. This treatment enhances the prebiotic effect of Okara, which also has beneficial weight-loss and cardiovascular protective effects in rats. Treated Okara could be used as a novel health-promoting and functional ingredient for processed foods.

# Bibliografía

## *Bibliografía*

## *Bibliografía*

1. FAO. The State of Food Insecurity in the World - Meeting the 2015 international hunger targets: taking stock of uneven progress. Rome2015.
2. FAO. Global food losses and food waste – Extent, causes and prevention. Rome. 2011.
3. Parfitt J, Barthel M, Macnaughton S. Food waste within food supply chains: quantification and potential for change to 2050. *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences*. 2010;365(1554):3065-81.
4. Girotto F, Alibardi L, Cossu R. Food waste generation and industrial uses: A review. *Waste Management*. 2015;45:32-41.
5. Stuart T. *Waste, uncovering the global food scandal*. Co WWN, editor. London, UK: Penguin; 2009. 451 p.
6. Commission E. Preparatory study on food waste across EU 27. [S.l.]: European Commission; 2010.
7. Commission E. FUSIONS-Estimates of European food waste levels 2016.
8. FAOSTAT. <http://faostat3.fao.org/download/FB/CC/E> 2016.
9. Cossu R. From triangles to cycles. *Waste Management*. 2009;29(12):2915-7.
10. Mirabella N, Castellani V, Sala S. Current options for the valorization of food manufacturing waste: a review. *Journal of Cleaner Production*. 2014;65:28-41.
11. Laufenberg G, Kunz B, Nystroem M. Transformation of vegetable waste into value added products: (A) the upgrading concept; (B) practical implementation. *Bioresource Technology*. 2003;87(2):167-98.
12. MAPAMA-Ministerio de Agricultura AyMA. Estrategia “Más alimento, menos desperdicio” Programa para la reducción de las pérdidas y el desperdicio alimentario y la valorización de los alimentos desechados. In: España Gd, editor. Secretaría General Técnica2013.
13. Commission E. Circular Economy Strategy. Closing the loop - An EU action plan for the Circular Economy 2015.
14. BOE. Ley 22/2011, de 28 de julio, de residuos y suelos contaminados. In: Estado Jd, editor. 2011.
15. Mateos-Aparicio I, Redondo-Cuenca A, Villanueva MJ. Dietary Fiber from the Food Industry by-Products. In: Nova Science Publishers I, editor. *Dietary Fiber: Sources, Properties and Their Relationship to Health*. New York: Nova Biomedical; 2013. p. 23.
16. Madureira AR, Tavares T, Gomes AM, Pintado ME, Malcata FX. Invited review: physiological properties of bioactive peptides obtained from whey proteins. *Journal of dairy science*. 2010;93(2):437-55.
17. Ajila CM, Brar SK, Verma M, Tyagi RD, Godbout S, Valero JR. Bio-processing of agro-byproducts to animal feed. *Critical Reviews in Biotechnology*. 2012;32(4):382-400.
18. Sharma SK, Bansal S, Mangal M, Dixit AK, Gupta RK, Mangal AK. Utilization of Food Processing By-products as Dietary, Functional, and Novel Fiber: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2016;56(10):1647-61.

## Bibliografía

19. Larrauri JA. New approaches in the preparation of high dietary fibre powders from fruit by-products. *Trends in Food Science & Technology*. 1999;10(1):3-8.
20. Moure A, Gullón P, Domínguez H, Parajó JC. Advances in the manufacture, purification and applications of xylo-oligosaccharides as food additives and nutraceuticals. *Process Biochemistry*. 2006;41(9):1913-23.
21. Gullon P, Gullon B, Moure A, Alonso JL, Dominguez H, Parajo JC. Manufacture of Prebiotics from Biomass Sources. In: Charalampopoulos D, Rastall RA, editors. *Prebiotics and Probiotics Science and Technology*: Springer New York; 2009. p. 535-89.
22. Rastall RA, Gibson GR. Recent developments in prebiotics to selectively impact beneficial microbes and promote intestinal health. *Curr Opin Biotechnol*. 2015;32:42-6.
23. Macagnan FT, Silva LPd, Hecktheuer LH. Dietary fibre: the scientific search for an ideal definition and methodology of analysis, and its physiological importance as a carrier of bioactive compounds. *Food Research International*. 2016;85:144-54.
24. Vitaglione P, Napolitano A, Fogliano V. Cereal dietary fibre: a natural functional ingredient to deliver phenolic compounds into the gut. *Trends in Food Science & Technology*. 2008;19(9):451-63.
25. Reid J, Novak DJ, Lewandowski DJ. Grain product with increased soluble fiber content and associated methods. United States Patent Application Publication No US 2006/0275536 A12006.
26. Puri M, Sharma D, Barrow CJ. Enzyme-assisted extraction of bioactives from plants. *Trends in biotechnology*. 2012;30(1):37-44.
27. Baiano A. Recovery of Biomolecules from Food Wastes - A Review. *Molecules*. 2014;19(9):14821-42.
28. Sachslehner A, Foidl G, Foidl N, Gubitz G, Haltrich D. Hydrolysis of isolated coffee mannan and coffee extract by mannanases of *Sclerotium rolfsii*. *Journal of biotechnology*. 2000;80(2):127-34.
29. Mandalari G, Bennett RN, Kirby AR, Lo Curto RB, Bisignano G, Waldron KW, et al. Enzymatic hydrolysis of flavonoids and pectic oligosaccharides from bergamot (*Citrus bergamia* Risso) peel. *J Agric Food Chem*. 2006;54(21):8307-13.
30. Zykwincka A, Boiffard MH, Kontkanen H, Buchert J, Thibault JF, Bonnin E. Extraction of green labeled pectins and pectic oligosaccharides from plant byproducts. *J Agric Food Chem*. 2008;56(19):8926-35.
31. Yoon KY, Cha M, Shin SR, Kim KS. Enzymatic production of a soluble-fibre hydrolyzate from carrot pomace and its sugar composition. *Food Chemistry*. 2005;92(1):151-7.
32. Patindol J, Wang L, Wang YJ. Cellulase-assisted extraction of oligosaccharides from defatted rice bran. *Journal of Food Science*. 2007;72(9):C516-21.
33. Meyer AS. Enzyme technology for precision functional food ingredient processes. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2010;1190:126-32.
34. Luthria DL. Influence of experimental conditions on the extraction of phenolic compounds from parsley (*Petroselinum crispum*) flakes using a pressurized liquid extractor. *Food Chemistry*. 2008;107(2):745-52.

## Bibliografía

35. Awika JM, Rooney LW, Wu X, Prior RL, Cisneros-Zevallos L. Screening Methods To Measure Antioxidant Activity of Sorghum (*Sorghum bicolor*) and Sorghum Products. *J Agric Food Chem*. 2003;51(23):6657-62.
36. Murthy PS, Naidu MM. Recovery of Phenolic Antioxidants and Functional Compounds from Coffee Industry By-Products. *Food and Bioprocess Technology*. 2012;5(3):897-903.
37. Vegas R, Alonso JL, Dominguez H, Parajo JC. Processing of rice husk autohydrolysis liquors for obtaining food ingredients. *J Agric Food Chem*. 2004;52(24):7311-7.
38. Glinsky VV, Raz A. Modified citrus pectin anti-metastatic properties: one bullet, multiple targets. *Carbohydrate Research*. 2009;344(14):1788-91.
39. Keenan DF, Brunton N, Butler F, Wouters R, Gormley R. Evaluation of thermal and high hydrostatic pressure processed apple purees enriched with prebiotic inclusions. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 2011;12(3):261-8.
40. Iwan T, Jindal VK. Drying of soy pulp (okara) in a bed of inert particles. *Drying Technology*. 2002;20(4/5):1035-51.
41. Puertolas E, Koubaa M, Barba FJ. An overview of the impact of electrotechnologies for the recovery of oil and high-value compounds from vegetable oil industry: Energy and economic cost implications. *Food Research International*. 2016;80:19-26.
42. Sanchez-Chino X, Jimenez-Martinez C, Davila-Ortiz G, Alvarez-Gonzalez I, Madrigal-Bujaidar E. Nutrient and Nonnutrient Components of Legumes, and Its Chemopreventive Activity: A Review. *Nutrition and Cancer-an International Journal*. 2015;67(3):401-10.
43. Aymerich T, Picouet PA, Monfort JM. Decontamination technologies for meat products. *Meat Science*. 2008;78(1-2):114-29.
44. Gómez-López VM, Koutchma T, Linden K. Ultraviolet and Pulsed Light Processing of Fluid Foods. *Novel Thermal And Non-Thermal Technologies For Fluid Foods 2012*. p. 185-223.
45. Arshadi M, Attard TM, Lukasik RM, Brncic M, da Costa Lopes AM, Finell M, et al. Pre-treatment and extraction techniques for recovery of added value compounds from wastes throughout the agri-food chain. *Green Chemistry*. 2016.
46. Luque-Garcia JL, de Castro L. Ultrasound: a powerful tool for leaching. *Trends in Analytical Chemistry*. 2003;22(1):41-7.
47. Luengo E, Manuel Martinez J, Alvarez I, Raso J. Effects of millisecond and microsecond pulsed electric fields on red beet cell disintegration and extraction of betanines. *Industrial Crops and Products*. 2016;84:28-33.
48. Huang HW, Hsu CP, Yang BB, Wang CY. Advances in the extraction of natural ingredients by high pressure extraction technology. *Trends in Food Science & Technology*. 2013;33(1):54-62.
49. Fan H, Fu F, Mazza G, Hu X, Liao X. Effects of microwave extraction on characteristics of polysaccharides from cherry, kiwi and wolfberry. *Chinese Society of Agricultural Engineering* 2009 25(10):5.

## Bibliografía

50. Paini M, Casazza AA, Aliakbarian B, Perego P, Binello A, Cravotto G. Influence of ethanol/water ratio in ultrasound and high-pressure/high-temperature phenolic compound extraction from agri-food waste. *International Journal of Food Science & Technology*. 2016;51(2):349-58.
51. Machmudah S, Zakaria, Winardi S, Sasaki M, Goto M, Kusumoto N, et al. Lycopene extraction from tomato peel by-product containing tomato seed using supercritical carbon dioxide. *Journal of Food Engineering*. 2012;108(2):290-6.
52. Ho AL, Carvalheiro F, Duarte LC, Roseiro LB, Charalampopoulos D, Rastall RA. Production and purification of xylooligosaccharides from oil palm empty fruit bunch fibre by a non-isothermal process. *Bioresource Technology*. 2014;152:526-9.
53. Rivas S, Gullón B, Gullón P, Alonso JL, Parajó JC. Manufacture and Properties of Bifidogenic Saccharides Derived from Wood Mannan. *J Agric Food Chem*. 2012;60(17):4296-305.
54. Chau CF, Wen YL, Wang YT. Improvement of the functionality of a potential fruit insoluble fibre by micron technology. *International Journal of Food Science & Technology*. 2006;41(9):1054-60.
55. Chau CF, Wu SC, Lee MH. Physicochemical changes upon micronization process positively improve the intestinal health-enhancement ability of carrot insoluble fibre. *Food Chemistry*. 2007;104(4):1569-74.
56. Chen H, Weiss J, Shahidi F. Nanotechnology in nutraceuticals and functional foods. *Food Technology*. 2006;60(3):30-6.
57. Li T, Zhong J-Z, Wan J, Liu C-M, Le B-Y, Liu W, et al. Effects of micronized okara dietary fiber on cecal microbiota, serum cholesterol and lipid levels in BALB/c mice. *International Journal of Food Science & Technology*. 2013;64(8):968-73.
58. Hoon HS, Chong-Tai K, Do-Yeon K, Jin-Soo M, Chang-Won C, Soo-Jeong L. Extraction of ginsenosides from fresh ginseng roots ( *Panax ginseng* C.A. Meyer) using commercial enzymes and high hydrostatic pressure. *Biotechnology Letters*. 2013;35(7):1017-22.
59. Hogan E, Kelly AL, Sun DW. High Pressure Processing of Foods: An Overview. In: W. SD, editor. *Emerging Technologies for Food Processing*. London: Academic Press; 2005. p. 3-32.
60. Kim JH, Park Y, Yu KW, Imm JY, Suh HJ. Enzyme-assisted extraction of cactus bioactive molecules under high hydrostatic pressure. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2014;94(5):850-6.
61. Corrales M, García AF, Butz P, Tauscher B. Extraction of anthocyanins from grape skins assisted by high hydrostatic pressure. *Journal of Food Engineering*. 2009;90(4):415-21.
62. San Martín MF, Barbosa-Cánovas GV, Swanson BG. Food Processing by High Hydrostatic Pressure. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2002;42 (6):627–45.
63. Rastogi NK, Raghavarao K, Balasubramaniam VM, Niranjan K, Knorr D. Opportunities and challenges in high pressure processing of foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2007;47(1):69-112.

## Bibliografía

64. Rendueles E, Omer MK, Alvseike O, C. A-C, Capita R, Prieto M. Microbiological food safety assessment of high hydrostatic pressure processing: A review. *LWT-Food Science and Technology*. 2011;44:1251-60.
65. Terefe NS, Buckow R, Versteeg C. Quality-Related Enzymes in Fruit and Vegetable Products: Effects of Novel Food Processing Technologies, Part 1: High-Pressure Processing. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2014;54(1):24-63.
66. Li H, Zhu K, Zhou H, Peng W. Effects of High Hydrostatic Pressure on Some Functional and Nutritional Properties of Soy Protein Isolate for Infant Formula. *J Agric Food Chem*. 2011;59(22):12028-36.
67. Bermudez-Aguirre D, Barbosa-Canovas GV. An Update on High Hydrostatic Pressure, from the Laboratory to Industrial Applications. *Food Engineering Reviews*. 2011;3(1):44-61.
68. Russell NJ. Bacterial membranes: the effects of chill storage and food processing. An overview. *International journal of food microbiology*. 2002;79(1-2):27-34.
69. Gould GW. Mechanisms of action of food preservation procedures. Barking, Essex: Elsevier Applied Science; 1989.
70. Hayakawa I, Kanno T, Yoshiyama K, Fujio Y. Oscillatory Compared with Continuous High Pressure Sterilization on *Bacillus stearothermophilus* Spores. *Journal of Food Science*. 1994;59(1):164-7.
71. D'Andrea L, Perez-Rodriguez FJ, Costafreda MI, Beguiristain N, Fuentes C, Aymerich T, et al. Molecular basis of the behavior of hepatitis a virus exposed to high hydrostatic pressure. *Appl Environ Microbiol*. 2014;80(20):6499-505.
72. Goodner JK, Braddock RJ, Parish ME, Sims CA. Cloud Stabilization of Orange Juice by High Pressure Processing. *Journal of Food Science*. 1999;64(4):699-700.
73. Eisenmenger MJ, Reyes-De-Corcuera JJ. High pressure enhancement of enzymes: A review. *Enzyme and Microbial Technology*. 2009;45(5):331-47.
74. Buckow R, Heinz V, Knorr D. Effect of High Hydrostatic Pressure-Temperature Combinations on the Activity of  $\beta$ -Glucanase from Barley Malt. *Journal of the Institute of Brewing*. 2005;111(3):282-9.
75. Gomes MRA, Clark R, Ledward DA. Effects of high pressure on amylases and starch in wheat and barley flours. *Food Chemistry*. 1998;63(3):363-72.
76. Gomes MRA, Ledward DA. Effect of high-pressure treatment on the activity of some polyphenoloxidases. *Food Chemistry*. 1996;56(1):1-5.
77. Garcia-Mora P, Penas E, Frias J, Gomez R, Martinez-Villaluenga C. High-pressure improves enzymatic proteolysis and the release of peptides with angiotensin I converting enzyme inhibitory and antioxidant activities from lentil proteins. *Food Chemistry*. 2015;171:224-32.
78. Claeys WL, Van Loey IAM, Hendrickx ME. Review: are intrinsic TTIs for thermally processed milk applicable for high-pressure processing assessment? *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 2003;4(1):1-14.
79. Xi J. Effect of High Pressure Processing on the Extraction of Lycopene in Tomato Paste Waste. *Chemical Engineering & Technology*. 2006;29(6):736-9.

## Bibliografía

80. Jun X, Shuo Z, Bingbing L, Rui Z, Ye L, Deji S, et al. Separation of major catechins from green tea by ultrahigh pressure extraction. *International Journal of Pharmaceutics*. 2010;386(1–2):229-31.
81. N. PKM, Ismail A, Shi J, Jiang YM. High pressure-assisted extraction: method, technique, and application. In: Lebovka N, Vorobiev E, Chemat F, editors. *Enhancing Extraction Processes in the Food Industry* 2011. p. 303-22.
82. Jung S, Murphy PA, Sala I. Isoflavone profiles of soymilk as affected by high-pressure treatments of soymilk and soybeans. *Food Chemistry*. 2008;111(3):592-8.
83. Lakshmanan R, De Lamballerie M, Jung S. Effect of Soybean-to-Water Ratio and pH on Pressurized Soymilk Properties. *Journal of Food Science*. 2006;71(9):E384-E91.
84. Puppo MC, Speroni F, Chapleau N, de Lamballerie M, Anon MC, Anton M. Effect of high-pressure treatment on emulsifying properties of soybean proteins. *Food Hydrocolloids*. 2005;19(2):289-96.
85. Wang XS, Tang CH, Li BS, Yang XQ, Li L, Ma CY. Effects of high-pressure treatment on some physicochemical and functional properties of soy protein isolates. *Food Hydrocolloids*. 2008;22(4):560-7.
86. Zhang H, Li L, Tatsumi E, Kotwal S. Influence of high pressure on conformational changes of soybean glycinin. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 2003;4(3):269-75.
87. Apichartsrangkoon A. Effects of high pressure on rheological properties of soy protein gels. *Food Chemistry*. 2003;80(1):55-60.
88. Arroyo G, Penas E, Pedrazuela A, Prestamo G. Intestinal microbiota in rats fed with tofu (soy curd) treated under high pressure. *European Food Research and Technology*. 2005;220(3-4):395-400.
89. Hiperbaric. <http://www.hiperbaric.com/es>. 2016.
90. Alimentarius C. Report of the 31st session of the codex committee on nutrition and foods for special dietary uses Joint FAO/WHO. Düsseldorf, Germany. 2009.
91. Efsa Panel on Dietetic Products NA, (NDA). Scientific Opinion on Dietary Reference Values for carbohydrates and dietary fibre. *EFSA Journal*. 2010;8(3):77.
92. Slavin J. Impact of the proposed definition of dietary fiber on nutrient databases. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2003;16(3):287-91.
93. Escudero Álvarez E, González Sánchez P. La fibra dietética. *Nutrición Hospitalaria*. 2006;21:61-72.
94. Fuller S, Beck E, Salman H, Tapsell L. New Horizons for the Study of Dietary Fiber and Health: A Review. *Plant Foods for Human Nutrition*. 2016;71(1):1-12.
95. Robertson JA, de Monredon FD, Dysseler P, Guillon F, Amado R, Thibault JF. Hydration properties of dietary fibre and resistant starch: A European collaborative study. *LWT-Food Science and Technology*. 2000;33(2):72-9.
96. Mudgil D, Barak S. Composition, properties and health benefits of indigestible carbohydrate polymers as dietary fiber: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2013;61:1-6.

## Bibliografía

97. Slavin J. Fiber and Prebiotics: Mechanisms and Health Benefits. *Nutrients*. 2013;5(4):1417-35.
98. Howlett J. Functional foods: from science to health and claims: ILSI Europe; 2008.
99. Prosky L. When is dietary fiber considered a functional food? *Biofactors*. 2000;12(1-4):289-97.
100. Corzo N, Alonso JL, Azpiroz F, Calvo MA, Cirici M, Leis R, et al. Prebiotics: concept, properties and beneficial effects. *Nutrición Hospitalaria*. 2015;31 Suppl 1:99-118.
101. Gibson GR, Probert HM, Van Loo J, Rastall RA, Roberfroid MB. Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. *Nutrition Research Reviews*. 2004;17(2):259-75.
102. Gibson GR, Scott KP, Rastall RA, Tuohy KM, Hotchkiss A, Dubert-Ferrandon A, et al. Dietary prebiotics: current status and new definition. In: Gibson GR, editor. *Food Science and Technology Bulletin: Functional Foods. 7: International Food Information Service (IFIS Publishing)*; 2010. p. 1-19.
103. Rastall RA, Maitin V. Prebiotics and synbiotics: towards the next generation. *Curr Opin Biotechnol*. 2002;13(5):490-6.
104. Burkitt DP, Walker AP, Painter NS. Dietary fiber and disease. *Journal of the American Medical Association*. 1974;229(8):1068-74.
105. Manning TS, Gibson GR. Prebiotics. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*. 2004;18(2):287-98.
106. Roberfroid M, Gibson GR, Hoyles L, McCartney AL, Rastall R, Rowland I, et al. Prebiotic effects: metabolic and health benefits. *Br J Nutr*. 2010;104:S1-S63.
107. Cummings JH, Macfarlane GT. The control and consequences of bacterial fermentation in the human colon. *Journal of Applied Bacteriology*. 1991;70(6):443-59.
108. O'May GA, Reynolds N, Smith AR, Kennedy A, Macfarlane GT. Effect of pH and antibiotics on microbial overgrowth in the stomachs and duodena of patients undergoing percutaneous endoscopic gastrostomy feeding. *Journal of Clinical Microbiology*. 2005;43(7):3059-65.
109. Kabir A. Role of age in association between gastric cancer and *Helicobacter pylori* eradication in cases with intestinal metaplasia and dysplasia. *Gastric Cancer*. 2016;19(3):1.
110. Flint HJ, Duncan SH, Scott KP, Louis P. Links between diet, gut microbiota composition and gut metabolism. *Proc Nutr Soc*. 2015;74(1):13-22.
111. Zoetendal EG, von Wright A, Vilpponen-Salmela T, Ben-Amor K, Akkermans ADL, de Vos WM. Mucosa-associated bacteria in the human gastrointestinal tract are uniformly distributed along the colon and differ from the community recovered from feces. *Appl Environ Microbiol*. 2002;68(7):3401-7.
112. Zoetendal EG, Akkermans ADL, Akkermans-van Vliet WM, de Visser JAGM, de Vos WM. The Host Genotype Affects the Bacterial Community in the Human Gastrointestinal Tract. *Microbial Ecology in Health and Disease*. 2011;13(3).

## Bibliografía

113. Topping DL, Clifton PM. Short-chain fatty acids and human colonic function: Roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides. *Physiol Rev.* 2001;81(3):1031-64.
114. Kim E, Coelho D, Blachier F. Review of the association between meat consumption and risk of colorectal cancer. *Nutrition Research.* 2013;33(12):983-94.
115. Visek WJ. Diet and cell-growth modulation by ammonia. *Am J Clin Nutr.* 1978;31(10):S216-S20.
116. Smith EA, Macfarlane GT. Enumeration of amino acid fermenting bacteria in the human large intestine: effects of pH and starch on peptide metabolism and dissimilation of amino acids. *FEMS Microbiology Ecology.* 1998;25(4):355-68.
117. Blachier F, Mariotti F, Huneau JF, Tome D. Effects of amino acid-derived luminal metabolites on the colonic epithelium and physiopathological consequences. *Amino Acids.* 2007;33(4):547-62.
118. Nyangale EP, Mottram DS, Gibson GR. Gut Microbial Activity, Implications for Health and Disease: The Potential Role of Metabolite Analysis. *J Proteome Res.* 2012;11(12):5573-85.
119. Koh A, De Vadder F, Kovatcheva-Datchary P, Backhed F. From Dietary Fiber to Host Physiology: Short-Chain Fatty Acids as Key Bacterial Metabolites. *Cell.* 2016;165(6):1332-45.
120. Sanchez JI, Marzorati M, Grootaert C, Baran M, Van Craeyveld V, Courtin CM, et al. Arabinoxylan-oligosaccharides (AXOS) affect the protein/carbohydrate fermentation balance and microbial population dynamics of the Simulator of Human Intestinal Microbial Ecosystem. *Microbial Biotechnology.* 2009;2(1):101-13.
121. Newgard CB, An J, Bain JR, Muehlbauer MJ, Stevens RD, Lien LF, et al. A Branched-Chain Amino Acid-Related Metabolic Signature that Differentiates Obese and Lean Humans and Contributes to Insulin Resistance. *Cell Metabolism.* 2009;9(4):311-26.
122. Reiffenstein RJ, Hulbert WC, Roth SH. Toxicology of hydrogen-sulfide. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology.* 1992;32:109-34.
123. Macfarlane S, Macfarlane GT. Regulation of short-chain fatty acid production. *Proc Nutr Soc.* 2003;62(1):67-72.
124. Paolillo R, Carratelli CR, Sorrentino S, Mazzola N, Rizzo A. Immunomodulatory effects of *Lactobacillus plantarum* on human colon cancer cells. *International Immunopharmacology.* 2009;9(11):1265-71.
125. Sun Y, O'Riordan MXD. Regulation of Bacterial Pathogenesis by Intestinal Short-Chain Fatty Acids. In: Sariaslani S, Gadd GM, editors. *Advances in Applied Microbiology*, Vol 85. *Advances in Applied Microbiology.* 852013. p. 93-118.
126. Ragsdale SW, Pierce E. Acetogenesis and the Wood-Ljungdahl pathway of CO<sub>2</sub> fixation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics.* 2008;1784(12):1873-98.
127. Frost G, Sleeth ML, Sahuri-Arisoylu M, Lizarbe B, Cerdan S, Brody L, et al. The short-chain fatty acid acetate reduces appetite via a central homeostatic mechanism. *Nature Communications.* 2014;5.

## Bibliografía

128. Johnstone RW. Histone-deacetylase inhibitors: novel drugs for the treatment of cancer. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2002;1(4):287-99.
129. Yamashita H, Fujisawa K, Ito E, Idei S, Kawaguchi N, Kimoto M, et al. Improvement of Obesity and Glucose Tolerance by Acetate in Type 2 Diabetic Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) Rats. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 2007;71(5):1236-43.
130. Kimura I, Ozawa K, Inoue D, Imamura T, Kimura K, Maeda T, et al. The gut microbiota suppresses insulin-mediated fat accumulation via the short-chain fatty acid receptor GPR43. *Nature Communications*. 2013;4:1829.
131. Singh N, Thangaraju M, Prasad PD, Martin PM, Lambert NA, Boettger T, et al. Blockade of Dendritic Cell Development by Bacterial Fermentation Products Butyrate and Propionate through a Transporter (Slc5a8)-dependent Inhibition of Histone Deacetylases. *Journal of Biological Chemistry*. 2010;285(36):27601-8.
132. Venter CS, Vorster HH, Cummings JH. Effects of dietary propionate on carbohydrate and lipid metabolism in healthy volunteers. *American Journal of Gastroenterology*. 1990;85(5):549-53.
133. De Vadder F, Plessier F, Gautier-Stein A, Mithieux G. Vasoactive intestinal peptide is a local mediator in a gut-brain neural axis activating intestinal gluconeogenesis. *Neurogastroenterology & Motility*. 2015;27(3):443-8.
134. Vital M, Howe AC, Tiedje JM. Revealing the Bacterial Butyrate Synthesis Pathways by Analyzing (Meta) genomic Data. *Mbio*. 2014;5(2).
135. Flint HJ, Scott KP, Louis P, Duncan SH. The role of the gut microbiota in nutrition and health. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*. 2012;9(10):577-89.
136. Encarnacao JC, Abrantes AM, Pires AS, Botelho MF. Revisit dietary fiber on colorectal cancer: butyrate and its role on prevention and treatment. *Cancer and Metastasis Reviews*. 2015;34(3):465-78.
137. Scheppach W, Bartram HP, Richter F. Role of short-chain fatty-acids in the prevention of colorectal-cancer. *European Journal of Cancer*. 1995;31A(7-8):1077-80.
138. Chang PV, Hao L, Offermanns S, Medzhitov R. The microbial metabolite butyrate regulates intestinal macrophage function via histone deacetylase inhibition. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2014;111(6):2247-52.
139. Thorburn AN, McKenzie CI, Shen S, Stanley D, Macia L, Mason LJ, et al. Evidence that asthma is a developmental origin disease influenced by maternal diet and bacterial metabolites. *Nature Communications*. 2015;6.
140. Anderson JW, Baird P, Davis RH, Jr., Ferreri S, Knudtson M, Koraym A, et al. Health benefits of dietary fiber. *Nutrition Reviews*. 2009;67(4):188-205.
141. Otles S, Ozgoz S. Health effects of dietary fiber. *Acta scientiarum polonorum Technologia alimentaria*. 2014;13(2):191-202.
142. Bultman SJ. Molecular Pathways: Gene-Environment Interactions Regulating Dietary Fiber Induction of Proliferation and Apoptosis via Butyrate for Cancer Prevention. *Clinical Cancer Research*. 2014;20(4):799-803.

## Bibliografía

143. Maslowski KM, Vieira AT, Ng A, Kranich J, Sierro F, Di Y, et al. Regulation of inflammatory responses by gut microbiota and chemoattractant receptor GPR43. *Nature*. 2009;461(7268):1282-6.
144. Torres N, Torre-Villalvazo I, Tovar AR. Regulation of lipid metabolism by diseases mediated soy protein and its implication in by lipid disorders. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 2006;17(6):365-73.
145. Soret R, Chevalier J, De Coppet P, Poupeau G, Derkinderen P, Segain JP, et al. Short-Chain Fatty Acids Regulate the Enteric Neurons and Control Gastrointestinal Motility in Rats. *Gastroenterology*. 2010;138(5):1772-82.e4.
146. Gao Z, Yin J, Zhang J, Ward RE, Martin RJ, Lefevre M, et al. Butyrate Improves Insulin Sensitivity and Increases Energy Expenditure in Mice. *Diabetes*. 2009;58(7):1509-17.
147. Azpiroz F. From Sensation to Perception. *Chronic Abdominal and Visceral Pain: CRC Press*; 2006. p. 193-203.
148. Shahrul RS, Kolida S, Gibson GR, Rastall RA. In vitro fermentation of commercial alpha-gluco-oligosaccharide by faecal microbiota from lean and obese human subjects. *Br J Nutr*. 2013;109(11):1980-9.
149. Lopez HW, Coudray C, Levrat-Verny MA, Feillet-Coudray C, Demigne C, Remesy C. Fructooligosaccharides enhance mineral apparent absorption and counteract the deleterious effects of phytic acid on mineral homeostasis in rats. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 2000;11(10):500-8.
150. Takasaki M, Inaba H, Ohta A, Motohashi Y, Sakai K, Morris H, et al. Dietary short-chain fructooligosaccharides increase calbindin-D9k levels only in the large intestine in rats independent of dietary calcium deficiency or serum 1,25 dihydroxy vitamin D levels. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*. 2000;70(5):206-13.
151. Raschka L, Daniel H. Mechanisms underlying the effects of inulin-type fructans on calcium absorption in the large intestine of rats. *Bone*. 2005;37(5):728-35.
152. Greger JL. Nondigestible carbohydrates and mineral bioavailability. *Journal of Nutrition*. 1999;129(7):1434S-5S.
153. Sousa V, Santos E, Sgarbieri V. The Importance of Prebiotics in Functional Foods and Clinical Practice. *Food and Nutrition Sciences*. 2011:133-44.
154. Mateos-Aparicio I. Beans by-products, potential sources for functional ingredients. In: E. Popescu and Iv. Golubev p, editor. *Beans: Nutrition, Consumption and Health: Nova Science Publishers, Inc.*; 2011.
155. Schwartz A, Taras D, Schäfer K, Beijer S, Bos NA, Donus C, et al. Microbiota and SCFA in Lean and Overweight Healthy Subjects. *Obesity*. 2010;18(1):190-5.
156. Kleessen B, Sykura B, Zunft HJ, Blaut M. Effects of inulin and lactose on fecal microflora, microbial activity, and bowel habit in elderly constipated persons. *Am J Clin Nutr*. 1997;65(5):1397-402.
157. Kruse HP, Kleessen B, Blaut M. Effects of inulin on faecal bifidobacteria in human subjects. *Br J Nutr*. 1999;82(5):375-82.

## Bibliografía

158. Kleessen B, Schwarz S, Boehm A, Fuhrmann H, Richter A, Henle T, et al. Jerusalem artichoke and chicory inulin in bakery products affect faecal microbiota of healthy volunteers. *Br J Nutr.* 2007;98(3):540-9.
159. Gibson GR, Beatty ER, Wang X, Cummings JH. Selective stimulation of bifidobacteria in the human colon by oligofructose and inulin. *Gastroenterology.* 1995;108.
160. Zafar TA, Weaver CM, Zhao Y, Martin BR, Wastney ME. Nondigestible Oligosaccharides Increase Calcium Absorption and Suppress Bone Resorption in Ovariectomized Rats. *Journal of Nutrition.* 2004;134(2):399-402.
161. Abrams SA, Griffin IJ, Hawthorne KM. Young adolescents who respond to an inulin-type fructan substantially increase total absorbed calcium and daily calcium accretion to the skeleton. *Journal of Nutrition.* 2007;137(11 Suppl):2524s-6s.
162. Zdunczyk Z, Juskiewicz J, Estrella I. Cecal parameters of rats fed diets containing grapefruit polyphenols and inulin as single supplements or in a combination. *Nutrition.* 2006;22(9):898-904.
163. Gibson GR, Wang X. Bifidogenic properties of different types of fructo-oligosaccharides. *Food Microbiology.* 1994;11(6):491-8.
164. Bouhnik Y, Achour L, Paineau D, Riottot M, Attar A, Bornet F. Four-week short chain fructo-oligosaccharides ingestion leads to increasing fecal bifidobacteria and cholesterol excretion in healthy elderly volunteers. *Nutrition Journal.* 2007;6(1):1-7.
165. Bouhnik Y, Raskine L, Simoneau G, Paineau D, Bornet F. The capacity of short-chain fructo-oligosaccharides to stimulate faecal bifidobacteria: a dose-response relationship study in healthy humans. *Nutrition Journal.* 2006;5.
166. Williams CH, Witherly SA, Buddington RK. Influence of Dietary Neosugar on Selected Bacterial Groups of the Human Faecal Microbiota. *Microbial Ecology in Health and Disease.* 1994;7(2):91-7.
167. Wang X, Gibson GR. Effects of the in vitro fermentation of oligofructose and inulin by bacteria growing in the human large intestine. *Journal of Applied Bacteriology.* 1993;75(4):373-80.
168. Takahara S, Morohashi T, Sano T, Ohta A, Yamada S, Sasa R. Fructooligosaccharide consumption enhances femoral bone volume and mineral concentrations in rats. *Journal of Nutrition.* 2000;130(7):1792-5.
169. Daubioul CA, Taper HS, De Wispelaere LD, Delzenne NM. Dietary oligofructose lessens hepatic steatosis, but does not prevent hypertriglyceridemia in obese Zucker rats. *Journal of Nutrition.* 2000;130(5):1314-9.
170. Teuri U, Korpela R, Saxelin M, Montonen L, Salminen S. Increased fecal frequency and gastrointestinal symptoms following ingestion of galacto-oligosaccharide-containing yogurt. *Journal of nutritional science and vitaminology.* 1998;44(3):465-71.
171. Chonan O, Matsumoto K, Watanuki M. Effect of galactooligosaccharides on calcium absorption and preventing bone loss in ovariectomized rats. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry.* 1995;59(2):236-9.

## Bibliografía

172. Terada A, Hara H, Kataoka M, Mitsuoka T. Effect of Lactulose on the Composition and Metabolic Activity of the Human Faecal Flora. *Microbial Ecology in Health and Disease*. 1992;5(1):43-50.
173. Bouhnik Y, Attar A, Joly FA, Riottot M, Dyard F, Flourie B. Lactulose ingestion increases faecal bifidobacterial counts: A randomised double-blind study in healthy humans. *European Journal of Clinical Nutrition*. 2003;58(3):462-6.
174. Drakoularakou A, Rastall RA, Gibson GR. Functional foods for the gut: probiotics, prebiotics and synbiotics. *Woodhead Publ Food Sci Technol Nutr: Woodhead Publ. Food Sci. Technol. Nutr.*; 2011. p. 449-70.
175. Oku T. Special Physiological Functions of Newly Developed Mono-and Oligosaccharides. In: Goldberg I, editor. *Functional Foods: Designer Foods, Pharmafoods, Nutraceuticals*. Boston, MA: Springer US; 1994. p. 202-18.
176. Crittenden R. *Emerging Prebiotic Carbohydrates. Prebiotics: Development & Application: John Wiley & Sons, Ltd*; 2006. p. 111-33.
177. Jimenez-Escrig A, Tenorio MD, Espinosa-Martos I, Ruperez P. Health-promoting effects of a dietary fiber concentrate from the soybean byproduct okara in rats. *J Agric Food Chem*. 2008;56(16):7495-501.
178. Prestamo G, Ruperez P, Espinosa-Martos I, Villanueva MJ, Lasuncion MA. The effects of okara on rat growth, cecal fermentation, and serum lipids. *European Food Research and Technology*. 2007;225(5-6):925-8.
179. Tenorio MD, Espinosa-Martos I, Prestamo G, Ruperez P. Soybean whey enhance mineral balance and caecal fermentation in rats. *European Journal of Nutrition*. 2010;49(3):155-63.
180. Villanueva MJ, Yokoyama WH, Hong YJ, Barttley GE, Ruperez P. Effect of high-fat diets supplemented with okara soybean by-product on lipid profiles of plasma, liver and faeces in Syrian hamsters. *Food Chemistry*. 2011;124(1):72-9.
181. Villanueva MJ, Pérez-Cózar ML, Mateos-Aparicio I, Redondo-Cuenca A. Potential fat-lowering and prebiotic effects of enzymatically treated okara in high-cholesterol-fed Wistar rats. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. 2016;67(7):828-33.
182. Djouzi Z, Andrieux C, Pelenc V, Somarriba S, Popot F, Paul F, et al. Degradation and fermentation of  $\alpha$ -gluco-oligosaccharides by bacterial strains from human colon: in vitro and in vivo studies in gnotobiotic rats. *Journal of Applied Bacteriology*. 1995;79(2):117-27.
183. Campbell JM, Fahey GC, Jr., Wolf BW. Selected indigestible oligosaccharides affect large bowel mass, cecal and fecal short-chain fatty acids, pH and microflora in rats. *Journal of Nutrition*. 1997;127(1):130-6.
184. Sheu WH, Lee IT, Chen W, Chan YC. Effects of xylooligosaccharides in type 2 diabetes mellitus. *Journal of nutritional science and vitaminology*. 2008;54(5):396-401.
185. Ashley C, Johnston WH, Harris CL, Stolz SI, Wampler JL, Berseth CL. Growth and tolerance of infants fed formula supplemented with polydextrose (PDX) and/or galactooligosaccharides (GOS): double-blind, randomized, controlled trial. *Nutrition Journal*. 2012;11:38.

## Bibliografía

186. Barnes S. The Biochemistry, Chemistry and Physiology of the Isoflavones in Soybeans and their Food Products. *Lymphat Res Biol.* 2010;8(1):89-98.
187. Mateos-Aparicio I, Redondo-Cuenca A, Villanueva MJ, Zapata-Revilla MA, Tenorio-Sanz MD. Pea pod, broad bean pod and okara, potential sources of functional compounds. *LWT-Food Science and Technology.* 2010;43(9):1467-70.
188. MAGRAMA. <http://www.mapama.gob.es/es/agricultura/temas/producciones-agricolas/cultivos-herbaceos/leguminosas-y-oleaginosas/> 2016.
189. GMO-Compass. <http://www.gmo-compass.org/eng/database/plants/67.soybean.html> 2016.
190. NCSOY. <http://ncsoy.org/media-resources/uses-of-soybeans/> 2016.
191. Riaz MN. Soy applications in food. 2006. 288pp p.
192. International W. El crecimiento de la soja - impactos y soluciones. Gland, Suiza: 2014.
193. O'Toole DK. Characteristics and Use of Okara, the Soybean Residue from Soy Milk Productions: A Review. *J Agric Food Chem.* 1999;47:8.
194. Kin-Chor K, Niranjan K. Review: effect of thermal processing on soymilk. *International Journal of Food Science & Technology.* 1995;30(3):263-95.
195. Nelson AI, Steinberg MP, Wei LS. Illinois process for preparation of soy-milk. *Journal of Food Science.* 1976;41(1):57-61.
196. Li B, Qiao M, Lu F. Composition, Nutrition, and Utilization of Okara (Soybean Residue). *Food Reviews International.* 2012;28(3):231-52.
197. Li B, Lu F, Nan HJ, Liu Y. Isolation and Structural Characterisation of Okara Polysaccharides. *Molecules.* 2012;17(1):753-61.
198. Mateos-Aparicio I, Redondo-Cuenca A, Villanueva MJ. Isolation and characterisation of cell wall polysaccharides from legume by-products: Okara (soymilk residue), pea pod and broad bean pod. *Food Chemistry.* 2010;122(1):339-45.
199. Jimenez-Escrig A, Alaiz M, Vioque J, Ruperez P. Health-promoting activities of ultra-filtered okara protein hydrolysates released by in vitro gastrointestinal digestion: identification of active peptide from soybean lipoxygenase. *European Food Research and Technology.* 2010;230(4):655-63.
200. Mateos-Aparicio I, Mateos-Peinado C, Ruperez P. High hydrostatic pressure improves the functionality of dietary fibre in okara by-product from soybean. *Innovative Food Science and Emerging Technologies.* 2010;11(3):445-50.
201. Espinosa-Martos I, Ruperez P. Indigestible fraction of okara from soybean: composition, physicochemical properties and in vitro fermentability by pure cultures of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum*. *European Food Research and Technology.* 2009;228(5):685-93.
202. Redondo-Cuenca A, Villanueva MJ, Mateos-Aparicio I. Soybean seeds and its by-product okara as sources of dietary fibre. Measurement by AOAC and Englyst methods. *Food Chemistry.* 2008;108(3):1099-105.
203. Muroyama K, Atsumi R, Andoh A. Effect of Pretreatment on Lactic Acid Fermentation of Bean Curd Refuse with Simultaneous Saccharification. In: Rhee HK, Nam IS, Park JM, editors. *New Development and Application in Chemical Reaction*

## Bibliografía

- Engineering, 4th Asia-Pacific Chemical Reaction Engineering Symposium. Studies in Surface Science and Catalysis. 1592006. p. 133-6.
204. Hsieh C, Yang FC. Reusing soy residue for the solid-state fermentation of *Ganoderma lucidum*. *Bioresource Technology*. 2004;91(1):105-9.
205. Van der Riet WB, Wight AW, L. CJJ, M. DJ. Food Chemical Investigation of Tofu and its Byproduct Okara *Food Chemistry* 1989;34:9.
206. Ma CY, Liu WS, Kwok KC, Kwok F. Isolation and characterization of proteins from soymilk residue (okara)\*. *Food Research International*. 1996;29(8):799-805.
207. Mateos-Aparicio I, Mateos-Peinado C, Jimenez-Escrig A, Ruperez P. Multifunctional antioxidant activity of polysaccharide fractions from the soybean byproduct okara. *Carbohydrate Polymers*. 2010;82(2):245-50.
208. Villanueva MJ, Perez-Cozar ML, Redondo-Cuenca A. Sequential extraction of polysaccharides from enzymatically hydrolyzed okara byproduct: Physicochemical properties and in vitro fermentability. *Food Chemistry*. 2013;141(2):1114-9.
209. Li S, Zhu D, Li K, Yang Y, Lei Z, Zhang Z. Soybean Curd Residue: Composition, Utilization, and Related Limiting Factors. *ISRN Industrial Engineering*. 2013;2013:8.
210. Marty BJ, Chavez ER. Ileal digestibilities and urinary losses of amino-acids in pigs fed heat-processed soybean products. *Livestock Production Science*. 1995;43(1):37-48.
211. Paris RF. <http://www.reniferterer.com/es/es/rituales/resplandor-okara-protect-color> 2016.
212. Min S, Yingnan Y, Di G, Ying Z, Zhenya Z. Bioactivity of the crude polysaccharides from fermented soybean curd residue by *Flammulina velutipes*. *Carbohydrate Polymers*. 2012;89(4):1268-76.
213. Tseng YC, Tseng HC, Weng YM. Hydrolyzed okara in low-fat pork burgers under pilot scale. In: Zhao J, Iranpour R, Li X, Jin B, editors. *Advances in Environmental Technologies, Pts 1-6. Advanced Materials Research*. 726-731 2013. p. 2908-16.
214. L. WG, C. AP. Utilization of okara in bread making *Ceylon Journal of Science*. 2003; Vol. 31:5.
215. Fei L, Zhenkun C, Yang L, Bo L. The effect of okara on the qualities of noodle and steamed bread. *Advance Journal of Food Science & Technology*. 2013;5(7):960-8.
216. Radocaj O, Dimic E. Valorization of Wet Okara, a Value-Added Functional Ingredient, in a Coconut-Based Baked Snack. *Cereal Chemistry*. 2013;90(3):256-62.
217. mytaste. <http://www.mytaste.es/b/con-okara-de-soja.html> 2016.
218. Olson A, Gray GM, Chiu MC. Chemistry and analysis of soluble dietary fiber. *Food Technology*. 1987;41(2):71-80.
219. Bosaeus I. Fibre effects on intestinal functions (diarrhoea, constipation and irritable bowel syndrome). *Clinical Nutrition*. 2004:33-8.
220. Huaidong D, A DLvd, Boshuizen HC, Forouhi NG, Wareham NJ, Halkjaer J, et al. Dietary fiber and subsequent changes in body weight and waist circumference in European men and women. *Am J Clin Nutr*. 2010;91(2):329-36.

## Bibliografía

221. WHO/FAO. Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases. In Report of a Joint WHO/FAO Expert Consultation. . WHO technical Report Series, vol 916 Geneva: World Health Organization. 2003.
222. Ruiz-Roso Calvo de Mora B, Pérez-Olleros Conde L. Avance de resultados sobre consumo de fibra en España y beneficios asociados a la ingesta de fibra insoluble. *Revista Española de Nutrición Comunitaria*. 2010;16(3):147-53.
223. Charalampopoulos D, Rastall RA. Prebiotics in foods. *Curr Opin Biotechnol*. 2012;23(2):187-91.
224. Courtois J. Oligosaccharides from land plants and algae: production and applications in therapeutics and biotechnology. *Current Opinion in Microbiology*. 2009;12(3):261-73.
225. Tu ZC, Chen LL, Wang H, Ruan CY, Zhang L, Kou Y. Effect of fermentation and dynamic high pressure microfluidization on dietary fibre of soybean residue. *Journal of Food Science and Technology (Mysore)*. 2014;51(11):3285-92.
226. Obesity and overweight [press release]. 2016.
227. Hwang JT, Park IJ, Shin JI, Lee YK, Lee SK, Baik HW, et al. Genistein, EGCG, and capsaicin inhibit adipocyte differentiation process via activating AMP-activated protein kinase. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;338(2):694-9.
228. Cope MB, Erdman JW, Allison DB. The potential role of soyfoods in weight and adiposity reduction: an evidence-based review. *Obesity Reviews*. 2008;9(3):219-35.
229. Chen H, Liu L, Zhu J, Xu B, Li R. Effect of soybean oligosaccharides on blood lipid, glucose levels and antioxidant enzymes activity in high fat rats. *Food Chemistry*. 2010;119(4):1633-6.
230. Iritani N, Hosomi H, Fukuda H, Tada K, Ikeda H. Soybean protein suppresses hepatic lipogenic enzyme gene expression in Wistar fatty rats. *Journal of Nutrition*. 1996;126(2):380-8.
231. Matsumoto K, Watanabe Y, Yokoyama S. Okara, soybean residue, prevents obesity in a diet-induced murine obesity model. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 2007;71(3):720-7.
232. Lattimer JM, Haub MD. Effects of dietary fiber and its components on metabolic health. *Nutrients*. 2010;2(12):1266-89.
233. Tucker LA, Thomas KS. Increasing Total Fiber Intake Reduces Risk of Weight and Fat Gains in Women. *Journal of Nutrition*. 2009;139(3):576-81.
234. Koh-Banerjee P, Franz MV, Sampson L, Liu SM, Jacobs DR, Spiegelman D, et al. Changes in whole-grain, bran, and cereal fiber consumption in relation to 8-y weight gain among men. *Am J Clin Nutr*. 2004;80(5):1237-45.
235. Merchant AT, Hu FB, Spiegelman D, Willett WC, Rimm EB, Ascherio A. Dietary fiber reduces peripheral arterial disease risk in men. *Journal of Nutrition*. 2003;133(11):3658-63.
236. Elleuch M, Bedigian D, Roiseux O, Besbes S, Blecker C, Attia H. Dietary fibre and fibre-rich by-products of food processing: Characterisation, technological functionality and commercial applications: A review. *Food Chemistry*. 2011;124(2):411-21.

## Bibliografía

237. Theuwissen E, Mensink RP. Water-soluble dietary fibers and cardiovascular disease. *Physiology & Behavior*. 2008;94(2):285-92.
238. Van Horn L, McCoin M, Kris-Etherton PM, Burke F, Carson JA, Champagne CM, et al. The evidence for dietary prevention and treatment of cardiovascular disease. *Journal of the American Dietetic Association*. 2008;108(2):287-331.
239. Hermansen K, Sondergaard M, Hoie L, Carstensen M, Brock B. Beneficial effects of a soy-based dietary supplement on lipid levels and cardiovascular risk markers in type 2 diabetic subjects. *Diabetes Care*. 2001;24(2):228-33.
240. Merritt JC. Metabolic syndrome: Soybean foods and, serum lipids. *Journal of the National Medical Association*. 2004;96(8):1032-41.
241. Jackson MJ, Elliott RM, Lund E, Papa S, Astley SB. Antioxidants, reactive oxygen and nitrogen species, gene induction and mitochondrial function. *Free Radical Research*. 2002;36:1.
242. Moure A, Cruz JM, Franco D, Dominguez JM, Sineiro J, Dominguez H, et al. Natural antioxidants from residual sources. *Food Chemistry*. 2001;72(2):145-71.
243. Amin I, Mukhrizah O. Antioxidant capacity of methanolic and water extracts prepared from food-processing by-products. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2006;86(5):778-84.
244. Patel RP, Boersma BJ, Crawford JH, Hogg N, Kirk M, Kalyanaraman B, et al. Antioxidant mechanisms of isoflavones in lipid systems: paradoxical effects of peroxy radical scavenging. *Free Radical Biology and Medicine*. 2001;31(12):1570-81.
245. Singh P, Sharma S, Rath SK. Genistein induces deleterious effects during its acute exposure in Swiss mice. *BioMed research international*. 2014;2014:619617-.
246. Yokomizo A, Takenaka Y, Takenaka T. Antioxidative activity of peptides prepared from Okara protein. *Food Science and Technology Research*. 2002;8(4):357-9.
247. Brody A, Janke A, Sharma V, Levy P. Public Health, Hypertension, and the Emergency Department. *Current Hypertension Reports*. 2016;18(6).
248. Zhen-Yu C, Cheng P, Rui J, Yin Mei W, Nan Y, Yu H. Anti-hypertensive nutraceuticals and functional foods. *J Agric Food Chem*. 2009;57(11):4485-99.
249. Oudit GY, Crackower MA, Backx PH, Penninger JM. The role of ACE2 in cardiovascular physiology. *Trends in Cardiovascular Medicine*. 2003;13(3):93-101.
250. Huang WY, Davidge ST, Wu JP. Bioactive Natural Constituents from Food Sources - Potential Use in Hypertension Prevention and Treatment. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2013;53(6):615-30.
251. Lo WMY, Li-Chan ECY. Angiotensin I Converting Enzyme Inhibitory Peptides from In Vitro Pepsin–Pancreatin Digestion of Soy Protein. *J Agric Food Chem*. 2005;53(9):3369-76.
252. Aleman A, Gimenez B, Perez-Santin E, Gomez-Guillen MC, Montero P. Contribution of Leu and Hyp residues to antioxidant and ACE-inhibitory activities of peptide sequences isolated from squid gelatin hydrolysate. *Food Chemistry*. 2011;125(2):334-41.
253. Perez-Lopez E. Péptidos bioactivos de algas marinas: Obtención y Propiedades biológicas. UCM, Facultad de Farmacia 2013.

## Bibliografía

254. Murakami K, Yamanaka N, Ohnishi K, Fukayama M, Yoshino M. Inhibition of angiotensin I converting enzyme by subtilisin NAT (nattokinase) in natto, a Japanese traditional fermented food. *Food & Function*. 2012;3(6):674-8.
255. Li FJ, Yamaki K, Cheng YQ, Fang YY. Assessment and Separation of Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibitory Peptides in Chinese Soypaste. *International Journal of Food Engineering*. 2015;11(2):5.
256. Nguyen Q, Hettiarachchy N, Rayaprolu S, Jayanthi S, Thallapuranam S, Chen PY. Physicochemical Properties and ACE-I Inhibitory Activity of Protein Hydrolysates from a Non-Genetically Modified Soy Cultivar. *Journal of the American Oil Chemists Society*. 2016;93(4):595-606.
257. Lassissi TA, Hettiarachchy NS, Rayaprolu SJ, Kannan A, Davis M. Functional properties and Angiotensin-I converting enzyme inhibitory activity of soy-whey proteins and fractions. *Food Research International*. 2014;64:598-602.
258. Jimenez-Escrig A, Alaiz M, Vioque J, Ruperez P. In vitro inhibitory activity on angiotensin- converting enzyme of okara protein hydrolysates produced with pepsin. In: Nova Science Publishers I, editor. *Soybeans: Cultivation, Uses and Nutrition* 2011.
259. Schulze MB, Liu SM, Rimm EB, Manson JE, Willett WC, Hu FB. Glycemic index, glycemic load, and dietary fiber intake and incidence of type 2 diabetes in younger and middle-aged women. *Am J Clin Nutr*. 2004;80(2):348-56.
260. Meyer KA, Kushi LH, Jacobs DR, Slavin J, Sellers TA, Folsom AR. Carbohydrates, dietary fiber, and incident type 2 diabetes in older women. *Am J Clin Nutr*. 2000;71(4):921-30.
261. Garcia AL, Otto B, Reich SC, Weickert MO, Steiniger J, Machowetz A, et al. Arabinoxylan consumption decreases postprandial serum glucose, serum insulin and plasma total ghrelin response in subjects with impaired glucose tolerance. *European Journal of Clinical Nutrition*. 2007;61(3):334-41.
262. Behall KM, Scholfield DJ, Hallfrisch JG. Barley  $\beta$ -glucan reduces plasma glucose and insulin responses compared with resistant starch in men. *Nutrition Research*. 2006;26(12):644-50.
263. Wu J, Wu Y, Yang C, Wang Z. Enzymatic Preparation and Characterization of Soybean Oligosaccharides from Okara. In: Zhang L, editor. *Second Sree Conference on Engineering Modelling and Simulation*. Procedia Engineering. 372012. p. 186-91.
264. Chen N, Zeng Q, Rao J, Lin Q. Effect of Preparation Conditions on Bonding Strength of Soy-based Adhesives via Viscozyme L Action on Soy Flour Slurry. *Bioresources*. 2014;9(4):7444-53.
265. Kasai N, Murata A, Inui H, Sakamoto T, Kahn RI. Enzymatic high digestion of soybean milk residue (okara). *J Agric Food Chem*. 2004;52(18):5709-16.
266. Ruperez P, Perez-Cozar ML, Redondo-Cuenca A, Villanueva MJ. Método para la obtención de oligosacáridos vegetales. Novel method to prepare vegetable oligosaccharides. In: Application SP, editor. No 2009303752011.
267. Mateos-Aparicio I, Ruperez P, inventors Procedimiento para obtener un producto prebiótico de alto contenido en fibra soluble, dicho producto y sus aplicaciones (pp. 14). [High hydrostatic pressure procedure to prepare a prebiotic vegetable product with a high soluble dietary fibre content, this product and its applications]. Spain 2008.

## Bibliografía

268. Lafosse M, Herbreteau B. Carbohydrate analysis by LC and SFC using evaporative light scattering detection. In: Ziad El R, editor. *Journal of Chromatography Library*. Volume 66: Elsevier; 2002. p. 1101-34.
269. Raessler M. Sample preparation and current applications of liquid chromatography for the determination of non-structural carbohydrates in plants. *Trends in Analytical Chemistry*. 2011;30(11):1833-43.
270. Sabater C, Prodanov M, Olano A, Corzo N, Montilla A. Quantification of prebiotics in commercial infant formulas. *Food Chemistry*. 2016;194:6-11.
271. Nogueira LC, Silva F, Ferreira IMPLVO, Trugo LC. Separation and quantification of beer carbohydrates by high-performance liquid chromatography with evaporative light scattering detection. *Journal of Chromatography A*. 2005;1065(2):207-10.
272. Liu X, Ai N, Zhang H, Lu M, Ji D, Yu F, et al. Quantification of glucose, xylose, arabinose, furfural, and HMF in corncob hydrolysate by HPLC-PDA-ELSD. *Carbohydrate Research*. 2012;353:111-4.
273. Ding H, Li C, Jin P, Yuan L, Yao Y, Chen Y, et al. Simultaneous determination of monosaccharides, disaccharides, oligosaccharides and sugar alcohols in foods by high performance liquid chromatography with evaporative light-scattering detection. *Chinese Journal of Chromatography*. 2013;31(8):804-8.
274. Sun S, Wang H, Xie J, Su Y. Simultaneous determination of rhamnose, xylitol, arabitol, fructose, glucose, inositol, sucrose, maltose in jujube (*Zizyphus jujube* Mill.) extract: comparison of HPLC-ELSD, LC-ESI-MS/MS and GC-MS. *Chemistry Central Journal*. 2016;10.
275. Li J, Chen M, Zhu Y. Separation and determination of carbohydrates in drinks by ion chromatography with a self-regenerating suppressor and an evaporative light-scattering detector. *Journal of Chromatography A*. 2007;1155(1):50-6.
276. Downes K, Terry LA. A new acetonitrile-free mobile phase method for LC-ELSD quantification of fructooligosaccharides in onion (*Allium cepa* L.). *Talanta*. 2010;82(1):118-24.
277. Karkkainen J, Lappalainen K, Joensuu P, Lajunen M. HPLC-ELSD analysis of six starch species heat-dispersed in BMIM Cl ionic liquid. *Carbohydrate Polymers*. 2011;84(1):509-16.
278. Floridi S, Miniati E, Montanari L, Fantozzi P. Carbohydrate determination in wort and beer by HPLC-ELSD. *Monatsschrift Fur Brauwissenschaft*. 2001;54(9-10):209-15.
279. Gyeong-Ha K, Young-Sun H, Kyung-Geun A, Gi-Ppeum K, Min-Ji K, Seung-Beom H, et al. Determination of soluble carbohydrates in soybean seeds using high performance liquid chromatography with evaporative light scattering detection. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*. 2014;43(7):1062-7.
280. Yang Z, Hu J, Zhao M. Isolation and quantitative determination of inulin-type oligosaccharides in roots of *Morinda officinalis*. *Carbohydrate Polymers*. 2011;83(4):1997-2004.

## Bibliografía

281. Li J, Liu X, Zhou B, Zhao J, Li S. Determination of Fructooligosaccharides in Burdock Using HPLC and Microwave-Assisted Extraction. *J Agric Food Chem.* 2013;61(24):5888-92.
282. Ma C, Sun Z, Chen C, Zhang L, Zhu S. Simultaneous separation and determination of fructose, sorbitol, glucose and sucrose in fruits by HPLC-ELSD. *Food Chemistry.* 2014;145:784-8.
283. Gomez-Ordoñez E, Jimenez-Escrig A, Ruperez P. Molecular weight distribution of polysaccharides from edible seaweeds by high-performance size-exclusion chromatography (HPSEC). *Talanta* 2012;93:153– 9.
284. Mañas E, Saura-Calixto F. Ethanollic precipitation - a source of error in dietary fiber determination. *Food Chemistry.* 1993;47(4):351-5.
285. Scott RW. Colorimetric determination of hexuronic acids in plant materials. *Journal of Analytical Chemistry.* 1979;51(7):936-41.
286. Loewus FA. Improvement in anthrone method for determination of carbohydrates. *Journal of Analytical Chemistry.* 1952;24(1):219-.
287. Miller GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Journal of Analytical Chemistry.* 1959;31(3):426-8.
288. Min JY, Kang SM, Park DJ, Kim YD, Jung HN, Yang JK, et al. Enzymatic release of ferulic acid from *Ipomoea batatas* L. (sweet potato) stem. *Biotechnol Bioprocess Eng.* 2006;11(4):372-6.
289. Marcos M, Garcia-Cubero MT, Gonzalez-Benito G, Coca M, Bolado S, Lucas S. Improvement of Enzymatic Hydrolysis of Steam-exploded Wheat Straw by Simultaneous Glucose and Xylose Liberation. *Chem Biochem Eng Q.* 2013;27(4):499-509.
290. Rosset M, Acquaro Junior VR, Beleia ADP. Protein Extraction from Defatted Soybean Flour with Viscozyme L Pretreatment. *Journal of Food Processing and Preservation* 2014;38(3):784-90.
291. Beards E, Tuohy K, Gibson G. Bacterial, SCFA and gas profiles of a range of food ingredients following in vitro fermentation by human colonic microbiota. *Anaerobe.* 2010;16(4):420-5.
292. Probert HM, Apajalahti JHA, Rautonen N, Stowell J, Gibson GR. Polydextrose, lactitol, and fructo-oligosaccharide fermentation by colonic bacteria in a three-stage continuous culture system. *Appl Environ Microbiol.* 2004;70(8):4505-11.
293. Wongputtisin P, Ramaraj R, Unpaprom Y, Kawaree R, Pongtrakul N. Raffinose family oligosaccharides in seed of *Glycine max* cv. Chiang Mai60 and potential source of prebiotic substances. *International Journal of Food Science & Technology.* 2015;50(8):1750-6.
294. Ting L, Xinshan L, Xingbin Y. Stachyose-enriched alpha-galactooligosaccharides regulate gut microbiota and relieve constipation in mice. *J Agric Food Chem.* 2013;61(48):11825-31.
295. Suya H, Yawen H, Bingjun Q, Yanping Z, Zhuang L. Modification of insoluble dietary fiber in okara by high pressure homogenization and high hydrostatic pressure and functional properties of the modified product. *Food Science, China.* 2015;36(15):81-5.

## Bibliografía

296. Lee SM, Han HW, Yim SY. Beneficial effects of soy milk and fiber on high cholesterol diet-induced alteration of gut microbiota and inflammatory gene expression in rats. *Food & Function*. 2015;6(2):492-500.
297. Lam YY, Ha CW, Campbell CR, Mitchell AJ, Dinudom A, Oscarsson J, et al. Increased gut permeability and microbiota change associate with mesenteric fat inflammation and metabolic dysfunction in diet-induced obese mice. *PLoS One*. 2012;7(3):e34233.
298. Sun J, Qiao Y, Qi C, Jiang W, Xiao H, Shi YH, et al. High-fat-diet induced obesity is associated with decreased antiinflammatory *Lactobacillus reuteri* sensitive to oxidative stress in mouse Peyer's patches. *Nutrition*. 2016;32(2):265-72.
299. Kurakawa T, Ogata K, Matsuda K, Tsuji H, Kubota H, Takada T, et al. Diversity of Intestinal *Clostridium coccooides* Group in the Japanese Population, as Demonstrated by Reverse Transcription-Quantitative PCR. *PLoS One*. 2015;10(5):e0126226.
300. Shen J, Zhang B, Wei G, Pang X, Wei H, Li M, et al. Molecular Profiling of the *Clostridium leptum* Subgroup in Human Fecal Microflora by PCR-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis and Clone Library Analysis. *Appl Environ Microbiol*. 2006;72(8):5232-8.
301. Murphy EA, Velazquez KT, Herbert KM. Influence of high-fat diet on gut microbiota: a driving force for chronic disease risk. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*. 2015;18(5):515-20.
302. Higashimura Y, Naito Y, Takagi T, Uchiyama K, Mizushima K, Ushiroda C, et al. Protective effect of agaro-oligosaccharides on gut dysbiosis and colon tumorigenesis in high-fat diet-fed mice. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2016;310(6):G367-G75.
303. Marungruang N, Fak F, Tareke E. Heat-treated high-fat diet modifies gut microbiota and metabolic markers in *apoe*<sup>-/-</sup> mice. *Nutr Metab*. 2016;13:11.
304. Gulhane M, Murray L, Lourie R, Tong H, Sheng YH, Wang R, et al. High Fat Diets Induce Colonic Epithelial Cell Stress and Inflammation that is Reversed by IL-22. *Sci Rep*. 2016;6:17.
305. DeGruttola AK, Low D, Mizoguchi A, Mizoguchi E. Current Understanding of Dysbiosis in Disease in Human and Animal Models. *Inflammatory Bowel Diseases*. 2016;22(5):1137-50.
306. Monteiro NES, Roquette AR, de Pace F, Moura CS, dos Santos A, Yamada AT, et al. Dietary whey proteins shield murine cecal microbiota from extensive disarray caused by a high-fat diet. *Food Research International*. 2016;85:121-30.
307. Zhu Y, Bai J, Zhang Y, Xiao X, Dong Y. Effects of bitter melon (*Momordica charantia* L.) on the gut microbiota in high fat diet and low dose streptozocin-induced rats. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. 2016;67(6):686-95.
308. Ojo B, El-Rassi GD, Payton ME, Perkins-Veazie P, Clarke S, Smith BJ, et al. Mango Supplementation Modulates Gut Microbial Dysbiosis and Short-Chain Fatty Acid Production Independent of Body Weight Reduction in C57BL/6 Mice Fed a High-Fat Diet. *Journal of Nutrition*. 2016;146(8):1483-91.
309. Alard J, Lehrter V, Rhimi M, Mangin I, Peucelle V, Abraham AL, et al. Beneficial metabolic effects of selected probiotics on diet-induced obesity and insulin

## Bibliografía

- resistance in mice are associated with improvement of dysbiotic gut microbiota. *Environmental Microbiology*. 2016;18(5):1484-97.
310. Guerrero-Romero F, Tamez-Perez HE, González-González G, Salinas-Martínez AM, Montes-Villarreal J, Treviño-Ortiz JH, et al. Oral Magnesium supplementation improves insulin sensitivity in non-diabetic subjects with insulin resistance. A double-blind placebo-controlled randomized trial. *Diabetes & Metabolism*. 2004;30(3):253-8.
311. Del Gobbo LC, Imamura F, Wu JHY, de Oliveira Otto MC, Chiuve SE, Mozaffarian D. Circulating and dietary magnesium and risk of cardiovascular disease: a systematic review and meta-analysis of prospective studies. *Am J Clin Nutr*. 2013;98(1):160-73.
312. Joris PJ, Plat J, Bakker SJL, Mensink RP. Long-term magnesium supplementation improves arterial stiffness in overweight and obese adults: results of a randomized, double-blind, placebo-controlled intervention trial. *Am J Clin Nutr*. 2016;103(5):1260-6.
313. Correia-Sa I, de-Sousa-Lopes H, Martins MJ, Azevedo I, Moura E, Vieira-Coelho MA. Effects of raftilose on serum biochemistry and liver morphology in rats fed with normal or high-fat diet. *Mol Nutr Food Res*. 2013;57(8):1468-72.
314. Fukasawa T, Kamei A, Watanabe Y, Koga J, Abe K. Short-Chain Fructooligosaccharide Regulates Hepatic Peroxisome Proliferator-Activated Receptor alpha and Farnesoid X Receptor Target Gene Expression in Rats. *J Agric Food Chem*. 2010;58(11):7007-12.
315. Samal L, Chaturvedi VB, Saikumar G, Somvanshi R, Pattanaik AK. Prebiotic potential of Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) in Wistar rats: effects of levels of supplementation on hindgut fermentation, intestinal morphology, blood metabolites and immune response. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2015;95(8):1689-96.

## *Bibliografía*

**ELENA PÉREZ LÓPEZ**

ele.p\_107@hotmail.com

**DATOS ACADÉMICOS**

<b>Título</b>	<b>Institución</b>	<b>Área</b>	<b>Años</b>
Programa de <b>doctorado</b> en Farmacia UCM	Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición (ICTAN-CSIC)	Mejora de la funcionalidad de Okara de soja por tratamiento simultáneo con altas presiones hidrostáticas y enzimas alimentarias	2014- 2017
<b>Máster</b> en Ciencias Farmacéuticas	Universidad Complutense de Madrid	Especialidad en Alimentación y Salud. TFM: Péptidos bioactivos de algas marinas: Obtención y propiedades biológicas (9,5)	2012-2013
Máster de Biotecnología y Dirección de Empresas Biotecnológicas ( <b>MBA</b> )	Aliter, Escuela Internacional de Negocios	Marketing, finanzas, derecho, etc. Tesis: Biotecnología y redes sociales (8,2)	2010-2011
Licenciatura en <b>Biología</b> , especialidad de <b>Genética</b>	Universidad Complutense de Madrid	Nota media: 2,77/4. 11 matrículas de honor	2005-2010
Investigación académicamente dirigida	Departamento de Genética, Antropología Física y Fisiología Animal (EHU-UPV)	Perfiles de expresión tisular de los genes de la familia E2F	2007-2008

**EXPERIENCIA PROFESIONAL**

<b>Puesto</b>	<b>Empresa</b>	<b>Descripción</b>	<b>Años</b>
Profesora	Particular y en el Instituto Severo Ochoa de Madrid	Tutoría y docencia extraescolar de apoyo a alumnos de la ESO y Bachiller	2007 y 2013
Dep. Marketing y ventas	Vacunek, Spin-off de Neiker Tecnalia	Programa de Formación Complementaria (20h) y Prácticas en Empresas para titulados/as	2012 (3 meses)
<b>Consultora</b> junior, división de Life Sciences	Simon-Kucher and Partners	Análisis de datos, desarrollo de proyectos, gestión y búsqueda de contactos, trato con los clientes, regulación del mercado farmacéutico, acceso de fármacos al mercado y OTC etc.	2011-2012

---

Periodista y analista	Aliter, Periódico digital	Asistencia a eventos del sector biotecnológico, redacción de noticias y realización de entrevistas	2011(6 meses)
-----------------------	---------------------------	--	---------------

---

## PUBLICACIONES

- Condezo-Hoyos L, Perez-Lopez E, Ruperez P. Improved evaporative light scattering detection for carbohydrate analysis. Food Chem. 2015;180:265-71.
- Perez-Lopez E, Mateos-Aparicio I, Ruperez P. Okara treated with high hydrostatic pressure assisted by Ultraflo (R) L: Effect on solubility of dietary fibre. Innov Food Sci Emerg Technol. 2016;33:32-7.
- Perez-Lopez E, Cela D, Costabile A, Mateos-Aparicio I, Ruperez P. In vitro fermentability and prebiotic potential of soyabean Okara by human faecal microbiota. Br J Nutr. 2016;116(6):1116-24.
- Pérez-López E, Mateos-Aparicio I, Rupérez P. Low molecular weight carbohydrates released from Okara by enzymatic treatment under high hydrostatic pressure. Innov Food Sci Emerg Technol. 2016.
- Alberto Hidalgo Román, Elena Pérez López, Dr. Elena Doménech Cruz, Alfredo Villanúa Vega, Dr. Álvaro Berbís de Pedraza. De la Transferencia de Tecnología a la Sociedad del Conocimiento - Estado de la Transferencia de Tecnología y Conocimiento en España 2010 – 2014. Adastra ventures. 2015
- Ainhoa Ogiza, Alessio Gamba, Arrate Pereda, Elena Pérez, Néstor Lázaro, Paola Bettinelli. “La secuenciación de tercera generación”, “Secuenciación de nueva generación”, “Secuenciación del ADN, de la Genómica a la Post-Genómica (I), El comienzo”. Serie Creamoselfuturo, “Fundación Telefónica “, 2010.
- Alberto Hidalgo Román, Néstor Lázaro García, Elena Pérez López. Mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes (MELAS). Poster UCM, 2010.

*Curriculum vitae*