

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Nutrición y Bromatología II (Bromatología)



**APROVECHAMIENTO DE SUBPRODUCTOS DE
LEGUMINOSAS PARA LA OBTENCIÓN DE
PRODUCTOS FUNCIONALES.
COMPARACIÓN DE METODOLOGÍAS PARA LA
CARACTERIZACIÓN DE LA FIBRA ALIMENTARIA**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

Inmaculada Mateos-Aparicio Cediel

Bajo la dirección de las doctoras
M^a José Villanueva Suárez
Araceli Redondo Cuenca

Madrid, 2008

- **ISBN: 978-84-692-0124-4**

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA
Departamento de Nutrición y Bromatología II:
Bromatología



TESIS DOCTORAL

Aprovechamiento de subproductos de leguminosas para la obtención de ingredientes funcionales. Comparación de metodologías para la caracterización de la fibra alimentaria

INMACULADA MATEOS-APARICIO CEDIEL

MADRID, 2008

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA**

**Departamento de Nutrición y Bromatología II:
Bromatología**



TESIS DOCTORAL

**Aprovechamiento de subproductos de
leguminosas para la obtención de ingredientes
funcionales. Comparación de metodologías
para la caracterización de la fibra alimentaria**

INMACULADA MATEOS-APARICIO CEDIEL

MADRID, 2008

**Directoras: Dra. M^a José Villanueva Suárez
Dra. Araceli Redondo Cuenca**



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE NUTRICION Y BROMATOLOGIA II
(Bromatología)

**MARIA JOSE VILLANUEVA SUÁREZ Y ARACELI REDONDO CUENCA,
PROFESORAS TITULARES DEL DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN Y
BROMATOLOGÍA II: BROMATOLOGÍA, DE LA FACULTAD DE
FARMACIA DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID.**

CERTIFICAN QUE:

D^a Inmaculada Mateos-Aparicio Cediel, ha realizado bajo nuestra dirección y en este Departamento el trabajo que lleva por título "Aprovechamiento de subproductos de leguminosas para la obtención de ingredientes funcionales. Comparación de metodologías para la caracterización de la fibra alimentaria" que constituye su Memoria de Tesis Doctoral. Dicho trabajo reúne las condiciones necesarias para su presentación y defensa.

Y para que conste a los efectos oportunos firmamos el presente certificado en Madrid, a 2 de Noviembre de 2007.



DEPARTAMENTO
BROMATOLOGIA



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE NUTRICION Y BROMATOLOGIA II
(Bromatología)

**CARMEN DíEZ MARQUÉS, CATEDRÁTICA Y DIRECTORA DEL
DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN Y BROMATOLOGÍA II:
BROMATOLOGÍA DE LA FACULTAD DE FARMACIA DE LA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

CERTIFICA QUE:

El trabajo de investigación titulado **“Aprovechamiento de subproductos de leguminosas para la obtención de ingredientes funcionales. Comparación de metodologías para la caracterización de la fibra alimentaria”** se ha realizado en este Departamento bajo la dirección de las Dras. M^a José Villanueva Suárez y Araceli Redondo Cuenca, y constituye la Memoria que presenta D^a Inmaculada Mateos-Aparicio Cediél para optar al Grado de Doctor.

Y para que conste a los efectos oportunos firmo el presente certificado en Madrid a 2 de noviembre de 2007



DEPARTAMENTO
BROMATOLOGÍA

Agradecimientos

Esta tesis doctoral no hubiese sido posible sin mi participación en los proyectos “Alimentos funcionales. Obtención de prebióticos a partir de productos y subproductos vegetales de la Industria Alimentaria. Caracterización y propiedades. Aplicación en Nutrición y Dietética” (AGL2002-03221) y “Obtención de oligosacáridos y fibra soluble a partir de okara de soja. Aplicación en la elaboración de nuevos alimentos funcionales” (AGL2005-02447/ALI) del Plan Nacional de I+D+I del Ministerio de Educación y Ciencia (España).

Sin duda alguna, la presencia en mi vida de mucha gente ha hecho posible que haya llegado hasta aquí y me gustaría darles las gracias:

En primer lugar a mis directoras, a las Dras. M^a José Villanueva Suárez y Araceli Redondo Cuenca por su dirección en este trabajo, por su colaboración y por supuesto por la formación que he recibido. Pero no sólo por ello, me gustaría añadir que hemos pasado cinco años juntas y que me llevo muchas cosas conmigo, entre ellas que siempre que han podido me han ayudado, agradezco su interés y espero que sigamos colaborando en el futuro. Por último, un especial recuerdo para la Dra. M^a José Villanueva Suárez, de estancia en Estados Unidos, a la que voy a echar mucho en falta cuando presente esta memoria.

A la Dra. M^a Dolores Rodríguez Sevilla por enseñarme a trabajar en el laboratorio, porque me ha acompañado durante la mayor parte del tiempo que ha durado esta tesis y en la última etapa que no ha estado la he echado mucho de menos. Gracias por toda tu atención e inestimable ayuda.

A la Dra. Dolores Tenorio Sanz por su seguimiento durante todos estos años, su amabilidad y por la gran ayuda con la técnica de AAS para los elementos minerales.

A la Dra. M^a Aurora Zapata Revilla que me ha dedicado siempre tiempo para resolver mis dudas con ese idioma que se me da tan mal y por supuesto por todo el tiempo dedicado al análisis del perfil de ácidos grasos.

A la Dra. M^a Pilar Rupérez Antón, directora de los proyectos mencionados, y mi nueva jefa con la que estoy disfrutando muchísimo del trabajo que realizo en el Instituto del Frío (CSIC).

A la Dra. Carmen Díez Marqués, directora del Departamento de Nutrición y Bromatología II: Bromatología, y a todas las profesoras que siempre han tenido interés por mi formación y una sonrisa amable por esos pasillos donde nos hemos cruzado durante todo este periodo.

Al Dr. Hannu Salovaara, a la Dra. Tuula Sontag-Strohm y al resto del Cereal Group con los que realicé mi estancia en University of Helsinki (Finland).

A la Dra. María Díaz-Laviada Marturet, mi jefa durante más de dos años y a mis compañeras de su oficina de farmacia, Conchita, Ana, Marta y Loli. Ha sido genial poder trabajar con vosotras, me habéis enseñado un montón de cosas y nunca os olvidaré.

A Carlos, a May y a Eli, mis cuñaditos, que me han ayudado con esas cosas odiosas de los encabezados, paginados y demás -ados. Gracias por ser tan geniales.

A todos mis amigos/as, los que siempre están ahí, los de cerca y los de lejos, sin vosotros hubiese sido muy difícil seguir, por ello mil gracias. En especial nombrar a mis compañeros de la Facultad de Farmacia de la UCM, Berni, Oscar y mi Anita, gracias por vuestro apoyo cuando flaqueé durante la carrera, y a Yago, Manolo, Pablo S., Pablo M., de nuevo Oscar, Vero y, sobre todo, a mi niña

“suiza” favorita, Ana (cuanto te hecho de menos preciosa) por el mejor año de la carrera y porque siempre disfruto de las mejores noches madrileñas con vosotros. También a los mejores amigos del mundo que encontré en la punta del mismo, mis chicos favoritos, Jon, Roberto, Rafa y Gerard y las más guapas princesas, my three german girls, Mireia, Núria, Sonsoles y Carmen; tuve la enorme suerte de encontraros en Vuolukiventie y siempre nos unirá el amor por el “fin del mundo”. No me quiero olvidar de Álvaro que tanta veces me ha ayudado a seguir adelante y aunque ahora no nos veamos tanto se que jamás cambiará nuestra maravillosa amistad. A todos ellos, que me apoyan, escuchan y aconsejan siempre; no sería lo mismo sin vosotros.

A mi madre, a mi padre y a mi hermano, mi familia, porque sois los mejores y no os cambiaría por nada del mundo, porque aunque a veces la convivencia se haga difícil, ahora que se va a cerrar esa etapa y va empezar una nueva os voy a echar muchísimo de menos. Voy a echar de menos nuestra preciosa casa y todas las cosas geniales que hacemos, las comilonas, “nuestro atleti” los domingos, las peleas del sillón,... Os debo mucho de la persona que soy, os quiero un montón.

A Pepe, mi persona favorita, porque me apoyas y me alientas pero sobre todo por que contigo comparto todas las maravillosas cosas de la vida, los paseos por nuestra Madrid, los conciertos, los libros, nuestras interminables charlas,... y todas las tareas pesadas también, que no lo son tanto cuando estás cerca. Porque siempre estás cuando más te necesito, pero sobre todo, porque eres ese alguien que deseo que esté siempre a mi lado.

Indice

I. Introducción	Pág 3
II. Objetivos	Pág 9
III. Antecedentes	
1. Muestras vegetales estudiadas	Pág 13
1.1. Semillas de soja y Okara	Pág 13
1.1.1. Características botánicas y agronómicas	Pág 15
1.1.2. Procesado de la semilla de soja. Obtención del okara	Pág 17
1.2. Vaina de haba	Pág 20
1.2.1. Características botánicas y agronómicas	Pág 20
1.2.2. Desgranado del haba. Obtención de la vaina de haba	Pág 22
1.3. Vaina de guisante	Pág 23
1.3.1. Características botánicas y agronómicas	Pág 24
1.3.2. Desgranado del guisante. Obtención de la vaina de guisante	Pág 25
2. Fibra alimentaria	Pág 27
2.1. Definición	Pág 27
2.2. Origen y composición de la fibra alimentaria	Pág 32
2.2.1. Origen: Pared celular	Pág 32
2.2.2. Composición química	Pág 35
2.3. Propiedades fisicoquímicas	Pág 44
2.3.1. Tamaño de partícula	Pág 45
2.3.2. Características de la superficie de partícula	Pág 45
2.3.3. Hidratación	Pág 46
2.3.4. Capacidad de intercambio catiónico	Pág 46
2.3.5. Adsorción de compuestos orgánicos	Pág 47
2.3.6. Fermentación	Pág 47
2.4. Efectos fisiológicos y beneficiosos de la fibra alimentaria sobre la salud	Pág 51
2.4.1. Atenuación de la glucosa en sangre	Pág 51
2.4.2. Disminución del colesterol sanguíneo	Pág 52

2.4.3. Regulación de la función colónica	Pág 53
2.4.4. Saciedad y reducción de peso	Pág 54
2.4.5. Prevención contra el cáncer	Pág 56
2.5. Métodos analíticos para la determinación de fibra alimentaria	Pág 57
2.5.1. Métodos químicos	Pág 58
2.5.2. Métodos enzimáticos	Pág 59
2.6. Consumo de fibra alimentaria. Recomendaciones y necesidades de esta fracción	Pág 63
IV. Material y Métodos	
1. Muestras	Pág 69
1.1. Semillas de soja y Okara	Pág 69
1.2. Vainas de haba y guisante	Pág 69
2. Preparación y conservación de las muestras	Pág 69
3. Métodos analíticos	Pág 70
3.1. Grasa	Pág 70
3.1.1. Extracto etéreo	Pág 70
3.1.2. Estudio del perfil de ácidos grasos por cromatografía de gases	Pág 71
3.2. Proteínas	Pág 73
3.3. Elementos minerales	Pág 74
3.3.1. Cenizas totales	Pág 74
3.3.2. Estudio de los macro y microelementos por espectroscopía de absorción atómica	Pág 75
3.3.3. Ensayos realizados	Pág 78
3.4. Determinación de almidón	Pág 80
3.5. Determinación de polifenoles solubles y taninos condensados	Pág 81
3.5.1. Polifenoles solubles	Pág 81
3.5.2. Taninos condensados	Pág 82
3.6. Determinación de carbohidratos de bajo peso molecular por HPLC	Pág 82

3.7. Determinación de la fibra alimentaria	Pág 88
3.7.1. Método enzimático-gravimétrico de la AOAC	Pág 88
3.7.2. Método enzimático-cromatográfico de Englyst	Pág 91
3.7.3. Método enzimático-cromatográfico aplicado a los residuos de la AOAC	Pág 101
3.7.4. Ensayos realizados	Pág 102
3.8. Fraccionamiento de la fibra alimentaria	Pág 102
3.9. Determinación de metanol por cromatografía de gases	Pág 107
3.10. Determinación de lignina	Pág 108
3.11. Estudio de las principales propiedades fisicoquímicas	Pág 109
V. Resultados y Discusión	
1. Planteamiento	Pág 113
2. Caracterización de las muestras estudiadas	Pág 113
2.1. Composición centesimal	Pág 113
2.2. Perfil de ácidos grasos por cromatografía de gases	Pág 122
2.3. Estudio de los macro y microelementos por absorción atómica	Pág 126
2.4. Estudio de polifenoles solubles y taninos condensados	Pág 129
3. Estudio de la fracción de azúcares y oligosacáridos de bajo PM	Pág 131
4. Estudio de la fibra alimentaria	Pág 140
4.1. Análisis de la fibra alimentaria mediante el método de Prosky y col. (1988) adoptado como método oficial por la AOAC	Pág 141
4.2. Análisis de la fibra alimentaria como polisacáridos no-almidón mediante el método de Englyst	Pág 148
4.3. Comparación de los valores de fibra alimentaria obtenidos mediante el método de Englyst y col. (1994) y el método de la AOAC después de hidrólisis y derivatización	Pág 152
5. Estudio de la lignina	Pág 166
6. Fraccionamiento de la fibra alimentaria. Estudio de las características de los polímeros que la integran	Pág 168
6.1. Estudio monomérico de las fracciones obtenidas en los	

subproductos de okara, vaina de haba y vaina de guisante	Pág 170
6.2. Estudio del grado de metilación y la cantidad de calcio de las fracciones obtenidas en los subproducto de este estudio: okara, vaina de haba y vaina de guisante	Pág 183
6.3. Estudio comparativo de los monómeros de la fibra alimentaria procedente de los subproductos considerados en función de las metodologías utilizadas	Pág 191
7. Estudio de las principales propiedades fisicoquímicas	Pág 196
VI. Conclusiones	Pág 203
VII. Resumen/Summary	Pág 209
VIII. Bibliografía	Pág 217

Conforme aumenta la población del planeta se pone de manifiesto la importancia de los limitados y preciados recursos naturales de la Tierra. De manera que la producción adecuada de alimentos se convertirá en una necesidad apremiante para alimentar a esa población cada vez mayor. De esto se deduce la necesidad de conocer los alimentos más habituales pero también conocer e introducir nuevos alimentos que cubran esas necesidades y que aporten algún beneficio para la salud.

Por otra parte, cada día es más difícil mantener unos hábitos saludables. La importancia de una dieta equilibrada es conocida pero el nivel de estrés que genera la actual forma de vida hace difícil cumplir esos hábitos saludables. Los consumidores, en general, están preocupados por su salud, de manera que demandan ingredientes que la promuevan. Además, estos consumidores no tendrían por qué estar forzados a sacrificar la calidad de los alimentos, características sensoriales, etc., en la búsqueda de una mejor salud. Esto hace muy interesante el uso de alimentos funcionales, que son los alimentos que contienen algún componente, sea nutriente o no, con efecto beneficioso para el organismo humano (American Dietetic Association, 2004).

La industria alimentaria genera anualmente una gran cantidad de subproductos que no son aprovechados o se utilizan para alimentación animal u otros fines distintos. Se puede considerar subproducto a todo producto no principal obtenido en un determinado proceso y que tiene o puede tener determinadas aplicaciones o aprovechamientos, de forma que lo que para una industria es un subproducto para otra puede constituir la materia prima, obteniendo a su vez un producto principal (Hermida, 1993).

Algunos de estos subproductos son parte del mismo vegetal que se eliminan con fines meramente comerciales pero cuyo contenido en nutrientes y sustancias de otra índole podrían hacerlos susceptibles de ser considerados

como materia prima de interés para la elaboración o enriquecimiento de otros alimentos. El aprovechamiento de estos subproductos puede servir para obtener un valor añadido de los productos donde podrían incluirse, mejorando sus características sensoriales, equilibrándolos en cuanto a las necesidades nutritivas, así como elaborando alimentos funcionales.

Los subproductos con algún interés funcional más frecuentes en el mercado actual provienen sobre todo de cereales y frutas (Larrauri, 1999), sin embargo apenas se tienen en cuenta los procedentes de legumbres. Las legumbres son pobres en grasa, excepto la semilla de soja y el altramuza, excelentes fuentes de proteínas y fibra alimentaria y con una gran variedad de micronutrientes y fitoquímicos que hacen de ellas una fuente de salud y prevención de enfermedad (Kushi y col., 1999; Messina, 1999; Anderson y Major, 2002; Guillon y Champ, 2002).

La mayor parte de las leguminosas, lentejas, judías, guisantes, garbanzos, habas, etc., son consumidas después de un simple procesado, de manera que se retira la vaina para consumir la semilla en ensaladas, sopas, guisos, etc. Tanto el haba como el guisante pertenecen a cultivos muy extendidos mundialmente y que son consumidas habitualmente. El haba es el segundo cultivo más extendido en la Unión Europea (15) y el cuarto a nivel mundial (FAO, 2003). Según Alonso y col. (2000) el guisante es la leguminosa más consumida. Las vainas, que son eliminadas y no consumidas, son subproductos muy abundantes generando un gran problema en la gestión de su eliminación, y por tanto muy interesante desde el punto de vista de su reutilización por la industria alimentaria. Además, las leguminosas pueden ser procesadas para obtener concentrados de proteínas y almidón, y se pueden utilizar para obtener otros productos finales, como en el caso de la semilla de soja que es procesada para elaborar la bebida de soja, también conocida como leche de soja, y el tofu. Durante ese procesado es eliminado un residuo muy rico en fibra alimentaria, el

okara. Por tanto, los subproductos de leguminosas pueden ser prometedoras fuentes de compuestos funcionales.

Los objetivos de la industria alimentaria, unidos a la necesidad de encontrar una manera de eliminar la elevada proporción de subproductos y efluentes que constituyen un problema debido a su inútil acumulación y un mayor coste en la gestión de su eliminación, abren la posibilidad de la reutilización de estos subproductos en la obtención de alimentos funcionales. Dentro de esos componentes con valor funcional se pueden destacar los polisacáridos que constituyen la fibra alimentaria por su carácter potencialmente prebiótico, es decir favorecedor de la flora intestinal, en particular, favorecedor del desarrollo de las bifidobacterias que tienen un papel dominante sobre las bacterias patógenas (Gibson y Roberfroid, 1995; Crittenden y Playne, 1996; Martínez-Villaluenga y col., 2005), pero también presenta un importante papel en la reducción de los niveles de colesterol en individuos hiperlipidémicos (Anderson y col., 1995; Anderson y col., 1999; Kushi y col., 1999, Lukaczer y col., 2006; Reynolds y col., 2006; Gray, 2006), en determinados individuos diabéticos puede usarse para mejorar la tolerancia a la glucosa (Messina, 1999; Chandalia y col., 2000; Jenkins y col., 2003; Gray, 2006) y además incrementa el peso de la materia fecal y reduce la densidad calórica en algunos alimentos (Liu, 1997; Gray, 2006). La fibra alimentaria, también, parece actuar positivamente en casos de diarrea y estreñimiento, en el tratamiento de la enfermedad de colon irritable (Bosaeus, 2004) y presenta efectos antiinflamatorios y anticarcinógenos en el aparato digestivo (Scheppach y col., 2004; Gray, 2006).

La fibra alimentaria presenta las características necesarias para considerarse un compuesto importante en la formulación de alimentos funcionales, ya que a partir de ella se ha desarrollado un gran mercado de productos enriquecidos. Todas las fuentes de fibra alimentaria deberían estar disponibles para promover

una dieta dentro de un estilo de vida saludable, ya que los ingredientes ricos en esta fibra proporcionan una manera adecuada de formular productos alimenticios con una buena calidad. Existe en la actualidad la tendencia a encontrar nuevas fuentes de fibra alimentaria y este es el caso de los subproductos.

El enriquecimiento de alimentos con fibra alimentaria normalmente se hace mediante la adición de cereales no refinados, sin embargo se están comenzando a usar otras fuentes como son las frutas (Rodríguez y col., 2006). Los residuos de leguminosas que presentan un alto porcentaje de fibra alimentaria podrían utilizarse para añadir a otros alimentos proporcionando al producto final propiedades beneficiosas para la salud.

En resumen, los subproductos de leguminosas a los que se ha hecho referencia anteriormente, okara y vainas de guisante y haba, que son estudiados en profundidad en esta memoria, son ricos en fibra alimentaria, por lo que pueden ser una fuente potencial de gran interés nutricional en la formulación de alimentos destinados al consumo humano por parte de la industria alimentaria.

Objetivos

El **objetivo general** del presente estudio se centra en la caracterización, pero sobre todo en el conocimiento y aplicaciones de la fibra alimentaria de los siguientes subproductos: okara (residuo que queda después de la obtención de la leche de soja), vainas de haba y vainas de guisante. Este estudio forma parte del Proyecto “*Alimentos funcionales. Obtención de prebióticos a partir de productos y subproductos vegetales de la industria alimentaria. Caracterización y propiedades. Aplicación en nutrición y dietética*” (AGL2002-03221/ALI), del Plan Nacional I+D+I (2003-2005), y del más reciente “*Obtención de oligosacáridos y fibra soluble a partir de okara de soja. Aplicación en la elaboración de nuevos alimentos funcionales*” (AGL2005-02447/ALI) del Plan Nacional de I+D+I (2005-2008), en colaboración con el Instituto del Frío, de los cuales forman parte del equipo investigador las directoras de la presente Tesis Doctoral.

El **objetivo general** de este trabajo se concreta en los siguientes **objetivos específicos**:

- Caracterización de las semillas de soja y su subproducto okara, así como de las vainas de haba y guisante.
 - Determinación de la composición de las muestras mencionadas, profundizando más en su contenido en ácidos grasos y en los macro- y microelementos.
- Estudio de la fracción de carbohidratos de bajo peso molecular en okara, vainas de haba y vainas de guisante.
- Caracterización de la fibra alimentaria como fibra soluble e insoluble de gran interés desde el punto de vista nutritivo y fisiológico de la semilla de soja, su subproducto okara y las vainas de haba y de guisante.
 - Comparativa entre los métodos más utilizados en el análisis de fibra: enzimático-gravimétrico de Prosky y col. (1988), adoptado por la AOAC (AOAC, 1995a; AOAC, 1995b) y enzimático-cromatográfico de Englyst y col. (1994)

- Fraccionamiento de los distintos componentes de la fibra alimentaria del okara y las vainas de haba y de guisante, en función de su solubilidad en diferentes reactivos para conocer las características de los polímeros que la integran.
- Estudio de las principales propiedades fisicoquímicas de okara, vaina de haba y vaina de guisante.

Antecedentes

1. MUESTRAS VEGETALES ESTUDIADAS

Se han escogido tres muestras: okara, vaina de haba y vaina de guisante, subproductos industriales de la elaboración de estas leguminosas. Además para algunos análisis se incluyen las semillas de soja. Las leguminosas son una de las mayores fuentes de proteínas y juegan un papel clave en la rotación de cultivos en la mayor parte del mundo, ya que pueden mejorar la fertilidad del suelo y reducir la incidencia de enfermedades y plagas en los diferentes cultivos (Mwanamwenge y col., 1998).

En la Unión Europea (25) existen 1.940.230 Ha destinadas a cultivo de leguminosas de grano, de estas alrededor del 29% corresponde a España (MAPA, 2003). En España, 410.730 Ha de las 17.643.678 Ha totales de tierras destinadas al cultivo son utilizadas para cultivar leguminosas y representa el cuarto cultivo en superficie dentro de los cultivos herbáceos (MAPA, 2005).

1.1. SEMILLA DE SOJA Y OKARA

El okara es un subproducto que proviene del proceso de obtención de la leche de soja. La semilla de soja es originaria de las regiones nororientales de China y Manchuria, hace 4000-5000 años. Las primeras referencias encontradas en la literatura se remontan al año 2838 a.C. en el libro *Materia Medica* escrito por el emperador Sheng Nong, en el que se describían las plantas de China. La semilla de soja era considerada la más importante entre las leguminosas cultivadas y uno de los cinco granos sagrados de China, junto al arroz, trigo, cebada y mijo.

El cultivo de la semilla de soja estuvo limitado a Oriente hasta principios del siglo XX. Aunque la primera referencia en Europa data de 1712 y se debe al botánico alemán Engelbert Kaempfer, que escribió acerca de los diversos

productos alimenticios que los japoneses obtenían de esta planta. Más tarde, el botánico sueco Carl von Linné, le dio el nombre *Glycine max*. Alrededor de 1875, Friedrich Haberlandt recomendó firmemente el consumo de soja tanto en alimentación humana como en alimentación animal, pero su uso no adquirió importancia como alimento hasta aproximadamente 1909. La producción de la semilla de soja ha sido limitada en Europa debido a las condiciones de clima y suelo.

La introducción en Estados Unidos (EEUU) data de mediados del siglo XVIII, y desde la última década del siglo XIX la semilla de soja ha sido intensamente investigada. Primero se introdujo como especie forrajera, pero el éxito como oleaginosa en Europa entre los años 1900-1910 promovió su interés en EEUU, así el primer procesado de semilla de soja cultivada en EEUU tuvo lugar en 1915, aunque en la década entre los 20 y los 30 se siguió cultivando como especie forrajera. La producción de las semillas de soja aumentó a lo largo del siglo XX, de manera que se ha convertido en uno de los cultivos de mayor importancia económica siendo sólo superado por el maíz (Liu 1997; López-Bellido, 2002). En 1983, el Departamento de Agricultura de EEUU autorizó el uso de la soja como sustituto parcial de las proteínas animales en las dietas de algunos escolares. Antes y después de la autorización, hubo muchas investigaciones acerca de sus diferentes beneficios. Sin embargo, sólo alrededor del 2,1% del consumo diario de proteínas de la sociedad norteamericana está basada en soja, mientras que los japoneses ingieren más o menos un 13% de proteína de esta leguminosa (Erdman y Fordyce, 1989).

Hasta principios de los años 80, los países de la Unión Europea mostraron un interés muy limitado por el cultivo de la semilla de soja. Durante los 80, sobre todo en Francia e Italia, se llevaron a cabo muchas investigaciones para fomentar este cultivo, pero sólo estos dos países mantienen una superficie de

producción significativa porque en el conjunto de la Unión Europea es un cultivo de menor importancia que la colza y el girasol.

En España se han llevado a cabo numerosos intentos de fomento del cultivo de la semilla de soja. Tras sucesivas etapas donde se ha alternado la indiferencia y el interés, se llega al momento actual donde la máxima superficie cultivada alcanzada no ha superado las 25000 Ha, siendo las regiones de Andalucía y Extremadura las de mayor importancia. Las elevadas necesidades hídricas del cultivo apuntan como la principal causa de la reducida expansión de la semilla de soja, unidas a los bajos rendimientos de grano para el agricultor español comparadas con otros cultivos como maíz, algodón, remolacha, etc. (López-Bellido, 2002).

1.1.1. CARACTERÍSTICAS BOTÁNICAS Y AGRONÓMICAS



Botánicamente, la soja pertenece al orden Rosaceae, a la familia *Leguminosae* o *Papilionaceae* o *Fabaceae*, subfamilia *Papilionoidae*, y al género *Glycine*. La denominación correcta de la soja cultivada es *Glycine max*. Es una planta herbácea anual de porte rígido y erecto (Liu, 1997; López-Bellido, 2002).

Figura 1: Planta de la soja (*Glycine max*)

El sistema radicular presenta una raíz principal y un gran número de raíces secundarias. Las hojas son alternas y compuestas, excepto las basales que son simples. Las inflorescencias son racimos axilares en número variable. Están constituidas por 2-35 flores, son amariposadas y presentan color blanquecino o

púrpura, según la variedad. Cada inflorescencia puede proporcionar desde una a más de veinte vainas. Los frutos son las vainas dehiscentes por ambas suturas. Son vellosas de color verde virando hacia amarillo paja, amarillo grisáceo o amarillo pardo, incluso negro durante la maduración. Cada vaina, en condiciones normales de cultivo, contiene 2-3 semillas.

Las semillas de soja tienen color, forma y dimensiones muy variables. Generalmente son esféricas, pero pueden presentar forma ovalada, más o menos aplastada. Son de color pajizo, aunque pueden presentarse en verde, gris, pardo, bicolor o variegada (Silveira y Durán 1998; Guerrero, 1999; López-Bellido, 2002).

Existen más de tres mil variedades de semillas de soja, con ciclos vegetativos que oscilan desde los noventa días hasta cerca de los doscientos, y con diferentes exigencias en cuanto a la duración del día.



Figura 2: Distintos tipos de semillas de soja (*Glycine max*)

Las variedades que más se cultivan en España, entre otras, son Akashi, Amsoy, Azzurra, Calland, Canton, Gallarda, Katai y Panter. Estas variedades están englobadas en los grupos 0, I, II y III de latitudes septentrionales, ya que España, exceptuando las Islas Canarias, se encuentra entre los 36 y 45 ° de latitud norte. Estos grupos son los que mejor se adaptan en ciclo y rendimiento a las condiciones mediterráneas. En el centro y sur de España, los grupos más apropiados son II y III (López-Bellido, 2002).

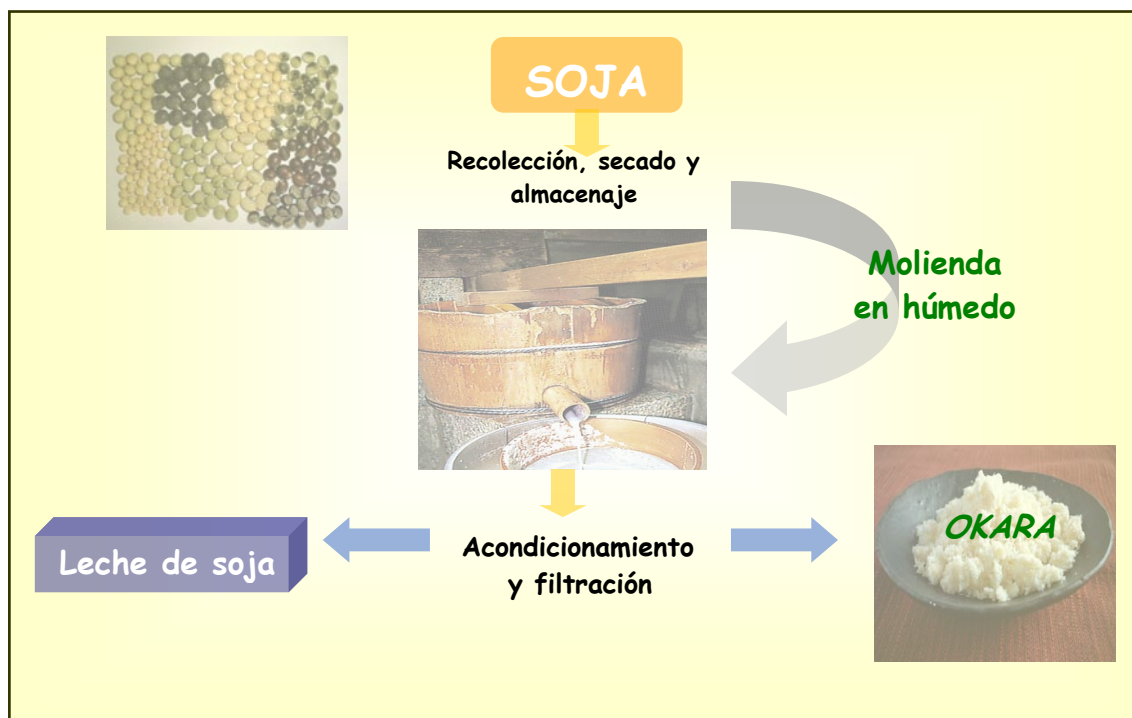
1.1.2. PROCESADO DE LA SEMILLA DE SOJA. OBTENCIÓN DEL OKARA

La semilla de soja se cultiva principalmente para la producción de semillas y la transformación de estas en harina proteica para la elaboración de piensos animales. Aunque el mercado de productos derivados de soja para el consumo humano es mucho menor que el mercado de harinas para piensos y aceite, hay un cierto optimismo respecto a estos productos ya que diferentes investigaciones muestran como determinados alimentos que contienen soja pueden ayudar a prevenir y tratar enfermedades crónicas como la enfermedad cardiovascular o el cáncer.

La producción mundial de semillas de soja está en torno a las 231,03 millones de toneladas (USDA, 2004), de las cuáles la mayoría se procesa para obtener piensos de animales y también, aunque en menor medida, alimentos destinados al consumo humano (Liu, 1997; Guerrero, 1998). Estos alimentos son típicamente agrupados en dos categorías: los alimentos no fermentados (harina de soja, tofu y leche de soja), y los fermentados (tempeh, miso y salsa de soja).

Las dos líneas más importantes del procesado de la semilla de soja para consumo humano son la obtención del aceite y la obtención de la leche de soja y el tofu. La obtención de la leche de soja consiste, básicamente, en una extracción acuosa de las semillas de soja. Antes de iniciar la inmersión en agua, la semilla se debe limpiar perfectamente para retirar cuerpos extraños, polvo y suciedad. La semilla se deja en remojo alrededor de 12 horas, aunque el tiempo requerido para la hidratación adecuada depende del tamaño y la variedad de la semilla de soja utilizada, así como de la temperatura del agua. Posteriormente, se lleva a cabo la molienda en húmedo (método chino). El método japonés somete la lechada a cocción durante aproximadamente 10 minutos a 100-110 °C.

Una vez realizada la extracción con o sin calor, se retira la pulpa u okara, obteniendo la leche de soja. Esto se puede realizar mediante prensa hidráulica, la cuál hace que quede una cantidad de pulpa seca después que se ha extraído el agua. Los procesadores que emplean los métodos de cocción continuos pueden utilizar cribas vibratorias, decantadores centrífugos o cribas de rodamiento. Sin embargo, la mayoría de estos extractores no puede sacar todo el líquido de la pulpa, por lo que el okara presenta mucha humedad. Muchos fabricantes la someten a un segundo proceso de lavado, para así extraer toda la leche de soja residual y usar esta leche ligera en los procesos de molido de cargas posteriores. La leche de soja es un líquido de consistencia cremosa y con un sabor que recuerda a las nueces. Puede sustituir a la leche de la vaca en pacientes intolerantes a la lactosa.



Esquema 1: Procesado de las semillas de soja (*Glycine max*) para la obtención de la leche de soja. Obtención del okara

El okara presenta, aproximadamente, un 80% de humedad. Este alto contenido hace que sea difícil de manejar y su secado por medios convencionales resulte demasiado caro. Por otro lado, el okara es un producto muy nutritivo, con una gran cantidad de proteínas, y obviamente con un alto contenido de fibra alimentaria. Se puede utilizar para elaborar diversos productos secundarios. O bien, se puede añadir al pan o a otros productos de panificación. Sin embargo, la mayoría de las veces, debido a la gran cantidad de okara que se obtiene y lo altamente susceptible que es a la putrefacción, siendo potencialmente un problema medioambiental, acaba siendo usado como alimento para animales (Rinaldi y col., 2000).

Este subproducto contiene mayoritariamente fibra compuesta por celulosa, hemicelulosas y lignina, pero además presenta más de un 20% de proteínas, 10-15% de grasa, alrededor del 10% de isoflavonas y muy poco almidón y carbohidratos simples. Esta composición hace que el okara se pueda utilizar por su fibra alimentaria para el enriquecimiento de distintos alimentos. Así, podría ser un candidato adecuado para enriquecer nutricionalmente a los productos hechos a base de cereales, bizcochos y snacks, ya que reduciría el contenido calórico de estos y aumentaría su contenido en fibra alimentaria (O'Toole, 1999).

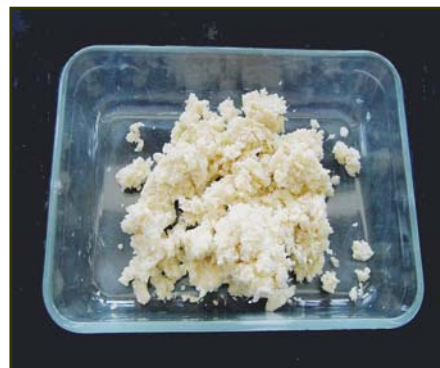


Figura 3: Okara

El descubrimiento de formas convenientes para incorporar el okara en los alimentos podría eliminar una posible fuente de contaminación y añadiría valor económico a productos menos valorados por su perfil nutricional. De manera que su incorporación a diferentes alimentos proporcionaría un aumento de la

fracción proteica y del contenido de fibra alimentaria, además de aportar isoflavonas (Rinaldi y col., 2000).

1.2. VAINA DE HABA

La planta del haba es originaria como cultivo del Oriente Próximo, extendiéndose pronto por toda la cuenca mediterránea, casi desde el mismo comienzo de la agricultura. Los romanos fueron los que seleccionaron el tipo de haba de grano grande y aplanado que es el que actualmente se emplea para consumo en verde, extendiéndose a través de la Ruta de la Seda hasta China, e introducido en América, tras el descubrimiento del Nuevo Mundo.

El haba es el segundo cultivo más extendido en la Unión Europea (15) dentro de las legumbres en grano seco, sin embargo la UE es el cuarto productor mundial (FAO, 2003).

Se pueden utilizar vainas y granos conjuntamente para el consumo en fresco, así como únicamente los granos, dependiendo del estado de desarrollo en que se encuentren, o como materia prima para la industria transformadora, tanto para enlatado como para congelado. En España se han usado tradicionalmente habas para pienso de ganado caballar y de lidia (Guerrero, 1998).

En los últimos años este cultivo ha sufrido un descenso de su superficie cultivada, debido fundamentalmente a la ausencia de variedades mejoradas adaptadas a la mecanización del cultivo y a los ataques de jopo.

1.2.1. CARACTERÍSTICAS BOTÁNICAS Y AGRONÓMICAS

Botánicamente, la planta del haba pertenece al orden Rosaceae, a la familia *Leguminosae* o *Papillonaceae* o *Fabaceae*, subfamilia *Papilionoidae*, y su nombre

científico es *Vicia faba* L. Es una planta anual de porte recto. Su sistema radicular está muy desarrollado.

Los tallos son de coloración verde, fuertes, angulosos y huecos, ramificados, de hasta 1,5 m de altura. Las hojas alternas, compuestas, paripinnadas, con folíolos anchos ovales-redondeados, de color verde y desprovistas de zarcillos.

Las flores son axilares, agrupadas en racimos cortos de 2 a 8 flores, poseyendo



una mancha grande de color negro o violeta en las alas. El fruto es una legumbre de longitud variable, pudiendo alcanzar hasta más de 35 cm. El número de granos oscila entre 2 y 9. El color de la semilla es verde amarillento, aunque las hay de otras coloraciones más oscuras (www.infoagro.es).

Figura 4: Planta de haba (*Vicia faba* L.)

La germinación y crecimiento inicial del cultivo de haba está principalmente relacionado con la temperatura, y más particularmente, con la temperatura de las horas de luz, de manera que el agua no es un factor limitante (Dantuma y Thompson, 1983).

La especie *Vicia faba* L. presenta cuatro tipos botánicos: *major*, *equina*, *minor* y *paucijuga*, que difieren entre sí, principalmente, en el tamaño de la semilla, que está ligado al genotipo (López-Bellido y col., 2005). Además, en los cultivares de la variedad *Major*, las vainas van inclinándose en la medida que avanza el llenado de sus granos. Sin embargo en los cultivares de la variedad *Minor*, las

vainas, debido a su menor tamaño y peso, se mantienen erectas a través de todo su desarrollo. También, en los cultivares de la variedad *Mayor*, que producen semillas más grandes o "habones", las vainas son de menor longitud y obtienen un promedio de tres semillas por vaina. En los cultivares de la variedad *Minor*, en tanto, el promedio alcanza aproximadamente cuatro semillas por vaina. La *Equina*, en España habas caballares, contiene tres o cuatro granos (López-Bellido, 2002).

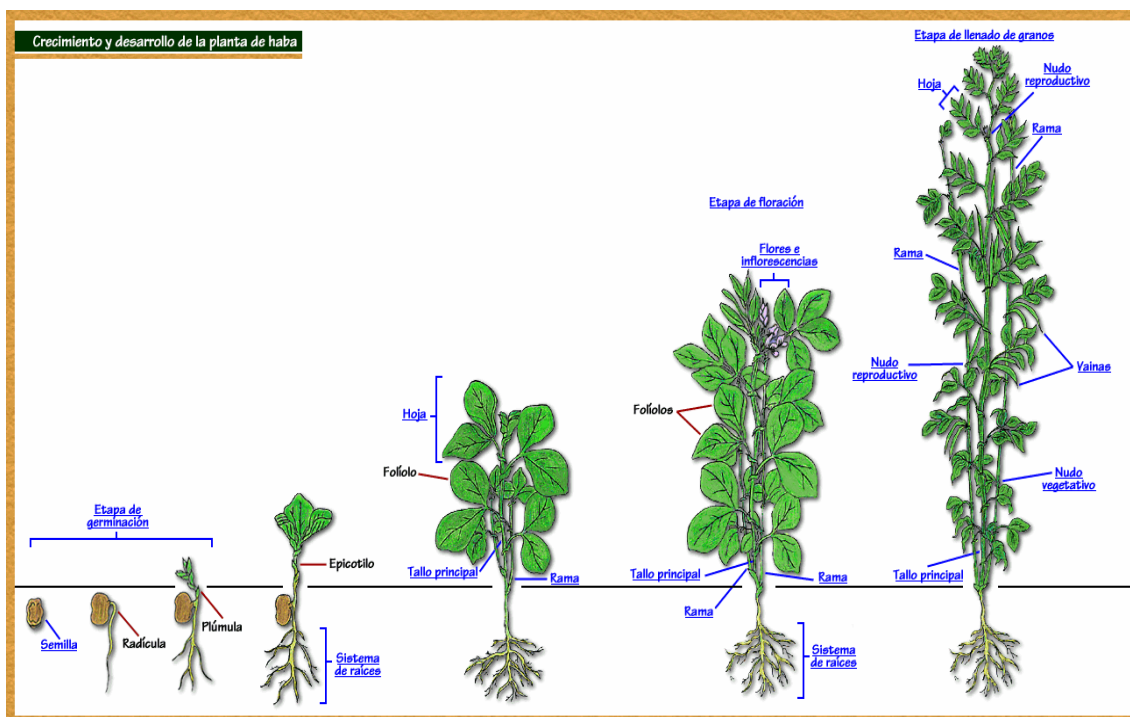


Figura 5: Crecimiento y desarrollo de la planta de haba (*Vicia faba* L.)

1.2.2. DESGRANADO DEL HABA. OBTENCIÓN DE LA VAINA DE HABA

En haba, a diferencia de otras leguminosas de grano, la elongación de las vainas y el crecimiento de los granos se producen de forma simultánea; los granos

inmaduros van incrementando su tamaño hasta alcanzar su madurez óptima para consumo en verde con una humedad de 72 a 74% como promedio.

En ese estado, los granos prácticamente han llenado la cavidad de la vaina. Ocasionalmente, uno o dos granos, abortan o permanecen muy pequeños sin alcanzar un tamaño comercial.

Los granos, una vez que pasan el estado óptimo de madurez para consumo en verde, comienzan un rápido descenso en su contenido de humedad y van tomando un color cada vez más opaco y menos verdoso.

Las vainas, por su parte, también van perdiendo humedad y su color verde se va haciendo gradualmente menos brillante, hasta virar a amarillo y comenzar un proceso de arrugamiento. El interior blanco y aterciopelado de las vainas, una vez alcanzada la madurez para consumo en verde, comienza poco a poco a degradarse, tornándose duro y rígido una vez lograda la madurez fisiológica; las semillas, por su parte, van quedando cada vez más comprimidas al interior. Finalmente, las vainas pierden flexibilidad y adquieren un color negro, presentándose las semillas secas y duras en el interior (López-Bellido, 2002).



Figura 6: Habas (*Vicia faba* L.)

1.3. VAINA DE GUISANTE

El guisante es la semilla de una planta oriunda de Etiopía, del Mediterráneo y de Asia Central. Es conocida y cultivada desde hace muchos años ya que

existen semillas en restos de las edades de Piedra y Bronce. En un principio, se utilizó para el consumo de sus granos secos, y no es hasta el siglo XVI cuando empieza a consumirse frescos (Sobrino-Illescas y Sobrino-Vesperinas, 1992).

1.3.1. CARACTERÍSTICAS BOTÁNICAS Y AGRONÓMICAS

Botánicamente, la planta del guisante pertenece al orden Rosaceae, a la familia



Leguminosae o *Papilionaceae* o *Fabaceae*, subfamilia *Papilionoidae*, tribu *Vicieas* y su nombre científico es *Pisum sativum* L. (Maroto, 1989). Es una planta con tallos trepadores y angulosos y su sistema radicular es poco desarrollado, aunque posee una raíz pivotante que puede llegar a ser muy profunda.

Figura 7: Planta de guisante
(*Pisum sativum* L.)

Las hojas tienen pares de folíolos y terminan en zarcillos. La inflorescencia es racemosa, con brácteas foliáceas, que se inserta por medio de un largo pedúnculo en la axila de las hojas. Cada racimo lleva generalmente una o dos flores, pero también hay casos de tres, e incluso cuatro y cinco, aunque estos últimos son raros. Las flores son de morfología típicamente papilionácea, y poseen simetría zigomorfa, es decir, con un solo plano de simetría. Consta de 5 sépalos, siendo los dos superiores variables, tanto en forma como en dimensiones, lo cual se utiliza como carácter varietal. Las vainas son de forma y color variable, según variedades. El peso medio es de 0,20 gramos por unidad.

Se pueden distinguir cuatro variedades de *Pisum sativum* L. (Namesny, 1999):

- Variedad arvensis, guisante de campo o bisalto, de flores púrpuras, semillas pequeñas y vainas con pergamino.
- Variedad vulgare, o guisante común, de flores blancas, semillas grandes y las vainas apergaminadas.
- Variedad saccharatum, de flores blancas, semillas lisas y vainas casi cilíndricas sin pergamino.
- Variedad macrosperma, de flores púrpuras, vainas aplastadas, sin pergamino y semillas rugosas.

La mayor parte de los guisante consumidos como semillas tiernas pertenecen a la variedad vulgare, mientras que cuando todo el fruto tierno se aprovecha (cometido o tirabeque) los cultivares son generalmente de las variedades macrosperma y saccharatum.

1.3.2. DESGRANADO DEL GUISANTE. OBTENCIÓN DE LA VAINA DE GUISANTE

Las épocas de recolección del guisante están ligadas a las fechas de siembra, a las características climáticas de la zona y a la precocidad de la variedad. El momento de la recolección será cuando las vainas estén llenas pero no dejando que los granos se endurezcan; como síntomas se utilizan el que los tegumentos se desprendan fácilmente al presionar los granos y que tanto éstos como las vainas mantengan exteriormente su color verde característico. Normalmente, en ese momento, la vaina ha alcanzado 2/3 de su tamaño final. En ese momento los granos son tiernos y tienen un contenido alto en azúcares. Al avanzar la madurez fisiológica esos azúcares se convierten en almidón, perdiendo cualidades organolépticas.

Para el consumo directo y sobre todo en el caso de variedades de enrame, la recolección suele realizarse manualmente. Sin embargo, en las plantaciones

destinadas a la industria, la recolección mecanizada resulta imprescindible. La recolección mecanizada se puede realizar con recolectoras-trilladoras o con cosechadoras integrales. En el primer caso, la trilladora recoge en el campo la planta previamente segada e hilerada, esta labor se efectúa por medio de una cadena de dedos levantadores, que pasa recogiendo las fajas de las plantas; éstas han de ser de menor anchura que la cadena levantadora para efectuar una buena labor. Posteriormente las plantas son elevadas al cilindro desgranador mediante un transportador de cadenas. La cosechadora integral funciona sin cortar las plantas, ya que se recogen las vainas por un sistema de peinado que evita la existencia de hojas y tallos en la trilla.



Figura 8: Guisante (*Pisum sativum* L.)

A partir del instante en que las vainas han sido desgranadas (de forma manual o por la propia cosechadora), debe acortarse al máximo el periodo de tiempo que transcurre hasta la entrada a la fábrica, para evitar las transformaciones bioquímicas en las semillas, que incrementan paulatinamente la formación de almidón (Namesny, 1999).

2. FIBRA ALIMENTARIA

La fibra alimentaria es una compleja mezcla de polímeros de carbohidratos que están asociados a otros componentes no-carbohidratos. Consiste en el residuo vegetal no digerible, que incluye los polisacáridos no almidón y la lignina. La fibra alimentaria presenta una serie de propiedades físico-químicas que explican los efectos fisiológicos que se le atribuyen. Pero es difícil encontrar los términos exactos para definir la fibra alimentaria, no sólo por los componentes de esta, sino también porque debe responder a sus propiedades físico-químicas y sus beneficios fisiológicos.

2.1. Definición

El concepto de fibra alimentaria ha cambiado considerablemente en pocos años. Ahora se admite que la fibra está compuesta por algunas sustancias que previamente no se consideraban y que presenta un papel significativo en la salud que es mayor del que se le atribuía. No existe una definición totalmente aceptada a nivel europeo, ni a nivel internacional, sin embargo existe un consenso acerca de que la definición debe incluir el papel fisiológico de la fibra alimentaria.

Se cree que Hipsley, en 1953, fue el primer investigador que aplicó el término fibra alimentaria para describir los constituyentes no digeribles que forman la pared celular vegetal (Mongeau y col., 1999; Jones, 2000; AACCC, 2001; Gray, 2006).

Entre 1972 y 1976, Trowell, Burkitt, Walker y Painter adoptaron el término acuñado por Hipsley y fueron desarrollando una serie de hipótesis acerca de las propiedades saludables de la fibra alimentaria, a la que definieron como los restos de plantas comestibles resistentes a la digestión por enzimas humanas, en

la cuál incluirían como componentes a la celulosa, hemicelulosas, lignina y sustancias minoritarias asociadas, tales como las ceras, cutina, y suberina. Las hipótesis de fibra alimentaria postulaban la relación inversa existente entre su consumo regular y la incidencia de cáncer de colon y enfermedad cardiovascular. En 1976, la definición se revisó para incluir además de los componentes mencionados las gomas, celulosas modificadas, mucílagos y pectinas y oligosacáridos (DeVries y col., 1999; Mongeau y col., 1999; Jones, 2000; AACC 2001; Bach Knudsen, 2001; Gray, 2006).

En el Reino Unido, la fibra alimentaria se define como *polisacáridos no-almidón más lignina* y se utiliza desde 1991 en las tablas de composición de los alimentos. Esta definición está basada en la metodología de Englyst, Cummings y colaboradores (Gray, 2006).

En la actualidad, tanto en las bases de datos como en el etiquetado de los alimentos se manejan cinco conceptos de fibra alimentaria que dependen del método analítico empleado (Charrondiere y col., 2004):

- *Fibra alimentaria total analizada por el método de la AOAC* (basado en la indigestibilidad de los componentes). Este método puede medir casi completamente los polisacáridos no-almidón (PNA), la lignina, almidón resistente y residuos no-específicos. El método de referencia de la AOAC es el método enzimático-gravimétrico de Prosky y col. (1985) y sus modificaciones.
- *Polisacáridos no-almidón (PNA) analizados por el método de Englyst* (Englyst y col., 1994). El valor de PNA no incluye lignina, ceras, cutina y almidón resistente.
- *Fibra alimentaria total por diferencia*: calculada como $100 - (\text{humedad} + \text{proteína} + \text{grasa} + \text{cenizas} + \text{carbohidratos disponibles})$. Este cálculo

incluye bajo el término de FA total al almidón resistente. Este cálculo es raramente utilizado.

- *Fibra alimentaria total analizada por el método de Southgate* (Southgate, 1969). Este método es, actualmente, poco utilizado aunque se puede encontrar en la 5ª edición de las tablas de composición de alimentos británicas y en las tablas de composición de alimentos de Grecia (1992). Consiste en colorimetrías que analizan PNA, lignina y algo de almidón.
- *Fibra bruta analizada por el método de Weende*, es la suma de sustancias resistentes a la hidrólisis con ácido seguida de hidrólisis con álcali. Este método incluye parte de lignina, celulosa y hemicelulosas. Se utiliza en algunas bases de datos de composición de alimentos, pero principalmente en el análisis de alimentos para animales.
- *Fibra neutro detergente (FND) y fibra ácido detergente (FAD)*. El método para medir FAD lo desarrolló Van Soest (1963a,b) y en 1967, Van Soest y Wine propusieron el método para obtener un residuo insoluble (FND). El inconveniente más importante es que no se determina la fracción soluble de la fibra.

Las definiciones más recientes emanan de la American Association of Cereal Chemists, del US Institute of Medicine, de la Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments, del Codex Alimentarius Commission y del Health Council of The Netherlands. Estas definiciones incluyen el efecto fisiológico de la fibra alimentaria, aunque con diverso énfasis (Gray, 2006):

- **American Association of Cereal Chemists (AACC, 2001)**. La fibra alimentaria es la parte o partes comestibles de las plantas o carbohidratos análogos que son resistentes a la digestión y absorción en el intestino delgado y que fermentan completa o parcialmente en el intestino grueso. La fibra alimentaria incluye polisacáridos, oligosacáridos, lignina, y sustancias asociadas. La fibra alimentaria promueve efectos fisiológicos

beneficiosos incluyendo laxación, y/o atenuación del colesterol sanguíneo, y/o atenuación de la glucosa en sangre (DeVries, 1999; Prosky 1999b; Jones, 2000; AACC, 2001). Esta definición la adopta como oficial la Association of Oficial Analytical Chemists Internacional (AOAC) (McCleary, 2003).

- **The US Institute of Medicine (2002).** En sus referencias alimentarias de ingestas de energía, carbohidratos, fibra, grasa, proteínas y aminoácidos, utiliza los siguientes conceptos: “fibra funcional” (carbohidratos no digeribles aislados que tienen efectos fisiológicos beneficiosos en el ser humano), “fibra alimentaria” (carbohidratos no digeribles y lignina que proceden directamente del tejido de los vegetales). Estos conceptos han sido adoptados por la Food and Nutrition Board of the US Institute of Health (McCleary, 2003).
- **Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (AFSSA, 2002).** Según este organismo la fibra alimentaria consiste en:
 - Polímeros de carbohidratos (grado de polimerización ≥ 3) de origen vegetal y lignina u otros componentes no-carbohidratos, como polifenoles, ceras, saponinas, cutina, fitatos, fitoesteroles
 - Polímeros de carbohidratos (grado de polimerización ≥ 3) que han sido procesados física, enzimática o químicamente, o que han sido sintetizados.

La fibra alimentaria, por otra parte, no puede ser digerida ni absorbida en el intestino delgado, y al menos debe tener una de las siguientes propiedades: estimular la fermentación colónica, reducir los niveles de colesterol pre-pandrial o reducir los niveles de glucosa en sangre y/o niveles de insulina post-pandrial.

- **Codex Alimentarius Commission (CAC, 2006).** En su opinión el concepto de fibra alimentaria coincide con lo señalado por el organismo anterior. Añade además que cuando los polisacáridos están en el tejido vegetal, la fibra alimentaria puede incluir fracciones de lignina y/u otros componentes que están asociados a dichos polisacáridos en la pared celular y que de hecho se pueden cuantificar por el método gravimétrico de la AOAC. Las fracciones de lignina y/u otros componentes, es decir, fracciones proteicas, compuestos fenólicos, ceras, saponinas, fitatos, cutina, fitoesteroles están íntimamente asociados a los polisacáridos. En este caso estas sustancias están incluidas en la definición de fibra alimentaria porque pueden proporcionar un efecto beneficioso adicional. Sin embargo, cuando estos compuestos se añaden a un alimento que contiene polisacáridos no digeribles, no pueden ser considerados como fibra porque no se encuentran estrechamente asociados, tal y como se indicaba anteriormente.
- **Health Council of The Netherlands (2006).** La fibra alimentaria es un conjunto de sustancias que no se digieren ni se absorben en el intestino delgado humano, que tienen estructura química de carbohidratos, compuestos análogos a estos y lignina y sustancias relacionadas.

La terminología que diferencia fibra *soluble* e *insoluble* permite una útil y sencilla categorización de la fibra alimentaria con diferentes propiedades fisiológicas. Tradicionalmente se emplea el término fibras solubles porque muchas de ellas forman geles viscosos en el intestino delgado (pectinas y β -glucanos) y afectan principalmente a la absorción de glucosa y grasa. Por otro lado, las fibras con una gran influencia en el funcionamiento del intestino grueso, son las fibras insolubles (celulosa y lignina). Por otra parte, la clasificación en soluble e insoluble también tiene un significado analítico.

2.2. Origen y composición de la fibra alimentaria

El origen fundamental de la fibra alimentaria es la pared celular de los vegetales, que consiste en una serie de polisacáridos, a menudo asociados y/o sustituidos con proteínas y compuestos fenólicos en algunas células, junto con el polímero fenólico lignina. Este origen tiene una importancia evidente, ya que sus componentes serán los constituyentes de la fibra alimentaria, y además las estructuras y enlaces que presenta determinarán los efectos fisiológicos (Selvendran y col., 1990; Bach Knudsen, 2001).

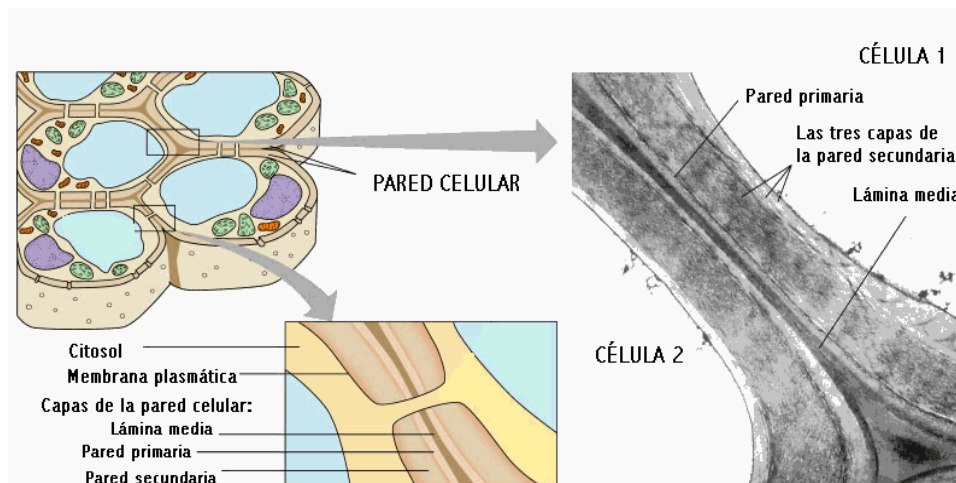


Figura 9: Estructura y partes de la pared celular, origen fundamental de la fibra alimentaria

2.2.1. Origen: Pared Celular

La pared celular de los vegetales presenta una serie de funciones esenciales tales como, conferir rigidez a la célula vegetal, proteger frente al medio ambiente, evitar una posible desecación y aislar y comunicar unas células con otras (Johnson y Southgate, 1994).

La célula viva secreta su pared celular. En esta se pueden distinguir tres partes (Wakabayashi y col., 1989), desde el exterior hacia el interior:

- Lámina media: es la capa más externa. Está formada principalmente por sustancias pécticas y presenta una estructura coloidal, amorfa y ópticamente inactiva.
- Pared primaria: Formada esencialmente por hemicelulosas y algo de celulosa. Es una matriz desordenada donde está embebida la celulosa.
- Pared secundaria: Aparece cuando la célula envejece, de manera que en este momento termina su crecimiento. Está formada por celulosa, hemicelulosas, sustancias pécticas y lignina. Consta de tres capas: S1, S2 y S3.

Según recientes modelos, la pared celular de las dicotiledóneas, como las legumbres, está compuesta por dos redes independientes con interacciones entre ellas. Una red de celulosa/xiloglucano y una red de pectinas, que interaccionan con una tercera red de proteínas estructurales en algunas células (Carpita, 1990; Huisman, 2000):

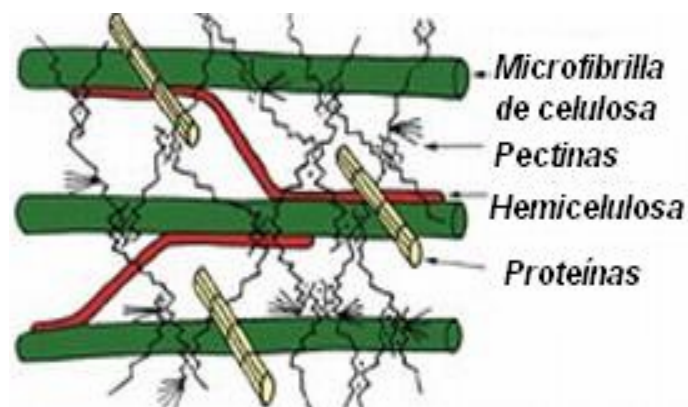


Figura 10: Modelo de pared celular de las dicotiledóneas

- *Red de celulosa/xiloglucano*: La celulosa es el principal componente de esta red. Las cadenas de celulosa se asocian formando microfibrillas que se embeben dentro de una matriz formada por hemicelulosas, principalmente xiloglucanos y arabinoxilanos.
- *Red de pectinas*: Las sustancias pécticas comprenden una familia de polímeros ácidos como homogalacturonanos y ramnogalacturonanos, y unidos a estos polímeros hay otros neutros como arabinanos, galactanos y arabinogalactanos.

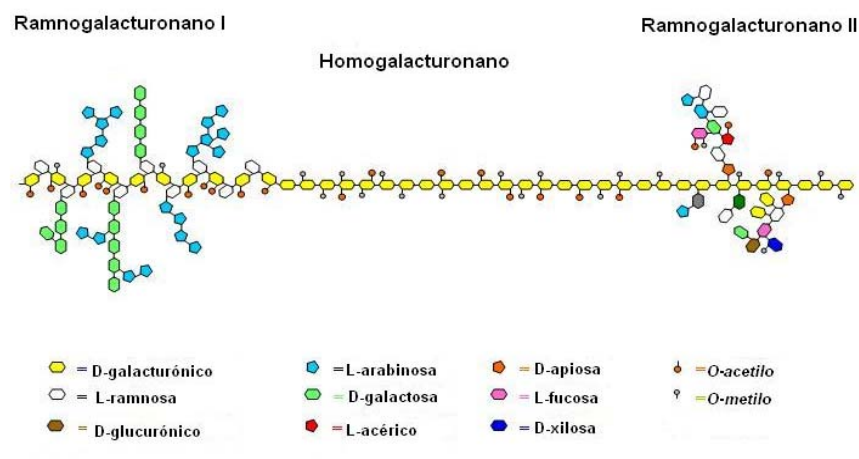


Figura 11: Estructura de las sustancias pécticas en la pared celular

- *Proteínas estructurales*: Las proteínas son también parte significativa de la pared celular. La extensina es una glicoproteína estructural rica en hidroxiprolina y es el principal constituyente de las dicotiledóneas.

Mientras que la naturaleza de la celulosa varía muy poco de una planta a otra, la composición de la matriz que embebe a esa celulosa muestra una considerable variación de un tejido a otro dentro de la misma planta y entre plantas. Por tanto, la composición de la pared celular no sólo dependerá de la especie de la planta, sino también del tipo de tejido y la madurez del órgano del vegetal en el momento de la recolección (Bach Knudsen, 2001).

2.2.2. Composición química

La fibra alimentaria, en el más amplio sentido, incluiría aquellos componentes de los alimentos vegetales que no pueden ser degradados por las enzimas digestivas del hombre y que se encuentran fundamentalmente en la pared celular (AACC, 2001; Mataix y Gassull, 2002; Gray, 2006). Comprende los siguientes componentes:

A. Polisacáridos no-almidón

- **Celulosa:** Polisacárido lineal no ramificado formado por unidades de glucosa unidas por enlace glicosídico β -D-(1,4). Los grupos hidroxilo de las unidades de glucosa favorecen la formación de puentes de hidrógeno intra e intercatenariamente lo que conduce a la formación de microfibrillas que forman una estructura cristalina muy estable. Esta disposición estructural junto a su composición química le confiere un carácter insoluble en agua. Es el componente más abundante de las paredes celulares de las plantas superiores (Lineback, 1999; Mataix y Gassull, 2002).

La celulosa representa cerca de 1/4 de la fibra alimentaria de los granos de cereales y frutas y 1/3 en verduras, hortalizas y frutos secos (Gray, 2006).

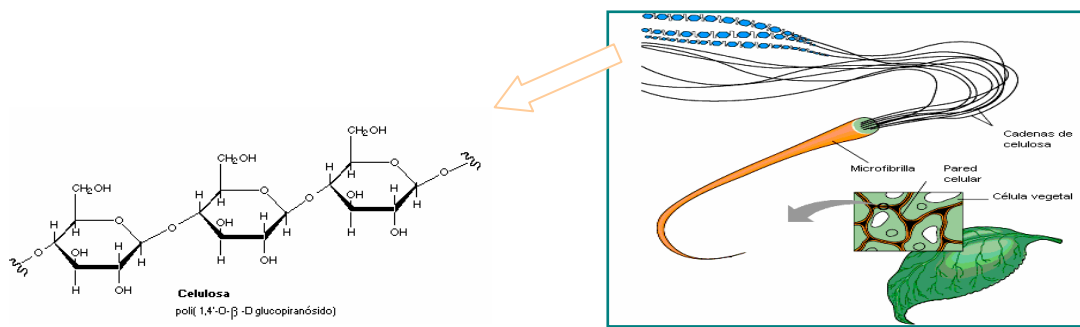


Figura 12: Estructura de la celulosa dentro de la pared celular

- **Polisacáridos no celulósicos:** Son un conjunto de polisacáridos que pueden presentar glucosa en su estructura pero normalmente cobran importancia otros azúcares neutros como arabinosa, xilosa, manosa, ramnosa y galactosa, y azúcares ácidos como los ácidos glucurónico y galacturónico.

* Hemicelulosas: son polisacáridos de estructura compleja y diferente composición química. Aunque su clasificación es difícil, el criterio más generalizado es la denominación dependiendo del residuo monomérico predominante (Lineback, 1999). Incluyen moléculas lineares y ramificadas. Son más pequeñas que la celulosa, normalmente comprenden de 50-200 pentosas o hexosas. Dentro de este grupo tan heterogéneo se presentan, las *hemicelulosas neutras* que incluyen pentosanos de arabinosa y xilosa, y hexosanos de galactosa, manosa y glucosa, y las *hemicelulosas ácidas*, donde aparecen los ácidos galacturónico y glucurónico. Las diferencias en la composición química hacen que presenten diferentes propiedades físicas y químicas, de manera que en este grupo existen componentes solubles y otros insolubles (Lineback, 1999; Mataix y Gassull, 2002; Gray, 2006), pero todas las hemicelulosas tienen unas características estructurales comunes:

- Son polímeros que presentan una cadena principal plana de azúcares con enlaces β -(1,4), de la que puede salir un número variable de ramificaciones laterales cortas.
- No forman agregados cristalinos, y por tanto su estructura es menos rígida que la de la celulosa.

Entre la diversidad de polímeros hemicelulósicos, los más abundantes y ampliamente extendidos son los xilanos, los β -glucanos y los xiloglucanos (Lineback, 1999).

Los xiloglucanos son cadenas de glucosa donde la mitad de los residuos tienen cadenas de xilosa, frecuentemente unidas con otros azúcares como galactosa, fucosa y arabinosa. Los xiloglucanos son los polisacáridos hemicelulósicos más predominantes en la pared celular de la mayoría de las legumbres (Huisman, 2000).

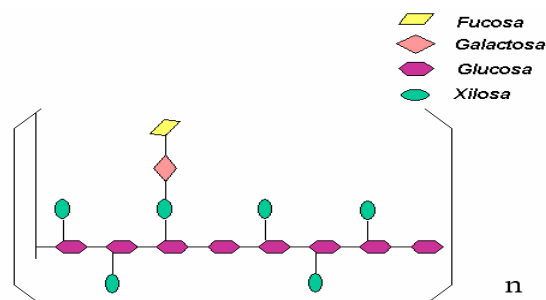


Figura 13: Estructura del xiloglucano

* Sustancias pécticas: son una compleja mezcla de polisacáridos coloidales, cuyo mayor constituyente son los ramnogalacturonanos consistentes en cadenas de α -D-(1,4)-galacturonanos con residuos interpuestos de L-(1,2)-ramnosa (Selvendran, 1985; Lineback, 1999). Estos polímeros pueden aparecer

parcialmente metil esterificados (pectinas) o libres (ácidos pécticos). Sin embargo, la situación es más compleja porque pueden aparecer cadenas laterales consistentes en D-galactosa, L-arabinosa, D-xilosa, D-glucosa y menos frecuentemente con D-manosa, L-fucosa, ácido D-glucurónico, y con algunos extraños azúcares como 2-O-metil-D-xilosa, 2-O-metil-L-fucosa y D-apiosa (Selvendran, 1985). De manera que, los azúcares neutros más comunes, D-galactosa y L-arabinosa, aparecen asociados al polisacárido péctico más frecuente, el ramnogalacturonano, formando cadenas de galactanos, arabinanos y arabinogalactanos (Selvendran, 1985; Lineback, 1999). Los arabinogalactanos se dividen en dos tipos, I y II. En legumbres aparece el tipo I (Choct, 1997).

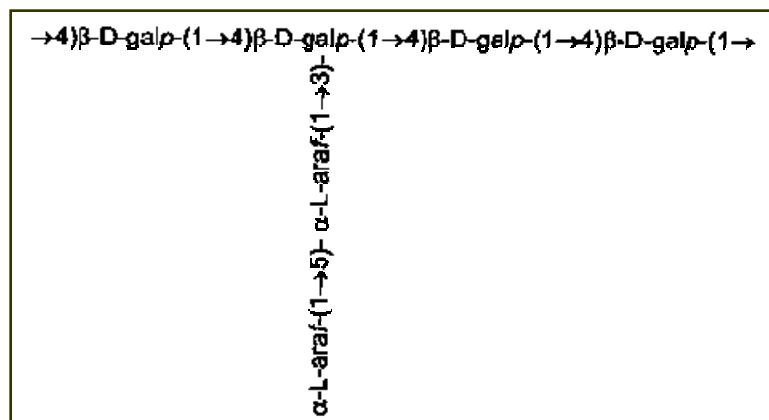


Figura 14: Estructura propuesta del arabinogalactano tipo I (Van de Vis 1994)

Las sustancias pécticas están presentes en las paredes celulares de frutas y verduras y se usan como gelificantes y espesantes en diferentes productos alimenticios. Aunque las frutas contienen la mayor cantidad de estas sustancias, también representan 15-20% de la fibra alimentaria en verduras, legumbres y frutos secos (Gray, 2006).

B. Carbohidratos análogos

Las dextrinas indigestibles, los carbohidratos sintéticos (polidextrosa, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa) y el almidón resistente han sido el centro de la discusión científica durante mucho tiempo. Las celulosas modificadas como la metilcelulosa y la hidroxipropilmetilcelulosa han sido aceptadas como parte de la fibra alimentaria ya que son cuantificadas por el método oficial de la AOAC. Los polímeros sintéticos, como la polidextrosa, han sido estudiados por sus propiedades funcionales y fisiológicas, pero no son valoradas dentro de la cuantificación de los métodos de análisis de fibra (AACC, 2001).

El **almidón resistente** es el almidón que no sufre ataque enzimático en el intestino delgado, siendo fermentado por la microflora del intestino grueso. Existen cuatro clases de almidón resistente: 1) almidón físicamente inaccesible (RS1), 2) gránulos de almidón nativo (RS2), 3) almidón retrogradado (RS3) y 4) almidón químicamente modificado (RS4).

Las legumbres son una de las principales fuentes de RS1 ya que estas presentan paredes celulares anchas que hacen que el almidón sea inaccesible para las enzimas. El cocinado y procesado de los alimentos puede romper las paredes celulares haciendo a este almidón más disponible para la digestión. Ciertos tipos de almidón, tales como el de las patatas crudas y los plátanos inmaduros son muy resistentes a la hidrólisis enzimática (RS2). Sin embargo, este tipo de alimentos se consumen cocinados o procesados, y la mayoría de estos procesos permiten la gelatinización del almidón. Por tanto, la mayor fuente de RS2 en la dieta humana son los plátanos, y la cantidad de RS2 depende del grado de madurez de este. Otra categoría de RS2 son los almidones ricos en amilosa que son frecuentes fuentes de almidón resistente industrial. El cocinado, enfriado y almacenaje de alimentos sin primeramente un secado causa la retrogradación

(recristalización) de almidones gelatinizados: RS3. El RS4 incluye almidones esterificados, almidones de enlaces cruzados y almidones pirodextrinados. Las modificaciones químicas son las razones para reducir la digestibilidad del almidón en el intestino delgado y por tanto la formación de RS4.

El contenido de almidón resistente de los alimentos puede cambiar durante su almacenaje, dependiendo de la temperatura y el contenido de agua, y durante la preparación del alimento. De manera que una cuantificación exacta de almidón resistente en el alimento en el momento de consumirlo es imposible (AACC, 2001; Gray, 2006).

C. Oligosacáridos no-digeribles

Son oligosacáridos que resisten la hidrólisis por enzimas digestivas humanas. Los oligosacáridos no-digeribles (NDO) con un grado de polimerización de 3-10 están presentes de manera natural en los alimentos, principalmente en verduras, hortalizas, cereales y frutas. Estos pueden ser sintetizados químicamente o enzimáticamente desde los mono- o disacáridos, o por hidrólisis enzimática de los polisacáridos (Gray, 2006; Mussatto y Mancilla, 2007). Los NDO han sido considerados durante años como antinutrientes debido a su no digestibilidad y consiguiente fermentación por la microbiota colónica, que provoca efectos no deseables, como la flatulencia. Esa misma resistencia a la digestibilidad y su fermentabilidad hace que los NDO se puedan incluir en la definición de fibra alimentaria, además de por los efectos fisiológicos similares a los polisacáridos no-almidón. Estos oligosacáridos son muy fermentables y presentan lo que se conoce como efecto prebiótico (AACC, 2001; Gray, 2006).

El concepto prebiótico fue acuñado y definido por primera vez por Gibson y Roberfroid en 1995 como “aquellos ingredientes no digeribles de los alimentos, que van a ejercer un efecto beneficioso en el huésped porque estimulan de

manera selectiva el crecimiento y/o actividad de uno o un número limitado de bacterias en el colon, lo que mejora la salud del huésped”.

Según Crittenden (1999), para que un sustrato sea clasificado como prebiótico debe:

- 1) no ser hidrolizado, ni absorbido en estómago o intestino delgado
- 2) ser un sustrato selectivo de bacterias beneficiosas del colon, provocando un aumento de su número o de su metabolismo
- 3) alterar la flora, de forma positiva (saludable), mediante la inducción de efectos beneficiosos a nivel local o sistémico en el huésped.

Los NDO que cumplen las premisas expuestas incluyen (Crittenden y Playne, 1996; Rupérez, 1998; Mataix y Gassull, 2002; Nyman, 2002; Gray, 2006):

Fructanos, que son los prebióticos más conocidos, tales como la inulina y los fructooligosacáridos. Son los únicos NDO que en la actualidad poseen una alegación en salud, concedida por la Comisión Europea (Tuohy y col., 2005), de manera que se permite su comercialización como ingredientes funcionales en Europa.

α -galactósidos: el trisacárido rafinosa, el tetrasacárido estaquiosa y el pentasacárido verbascosa. Se encuentran normalmente en legumbres y están asociados con la flatulencia que produce el consumo de estas (Lineback, 1999). Normalmente son extraídos directamente de las semillas de soja sin ningún tratamiento enzimático, por lo que también son denominados oligosacáridos de la soja.

Debido a su procedencia, los oligosacáridos de la soja, han sido ampliamente estudiados en Japón, donde son considerados “FOSHU” (Foods Specified for Health Use). En Estados Unidos, su seguridad y su capacidad bifidogénica han

sido reconocidas por la FFDCA (Agencia federal de alimentos, drogas y cosméticos) y por la DSHEA (Agencia de educación y suplementación para una dieta saludable) por lo que se emplean como suplementos e ingredientes funcionales (Tuohy y col., 2005). En Europa, los organismos reguladores están considerando incluir los compuestos con actividad prebiótica dentro de la clasificación de alimentos funcionales (Van Loo y col., 1999).

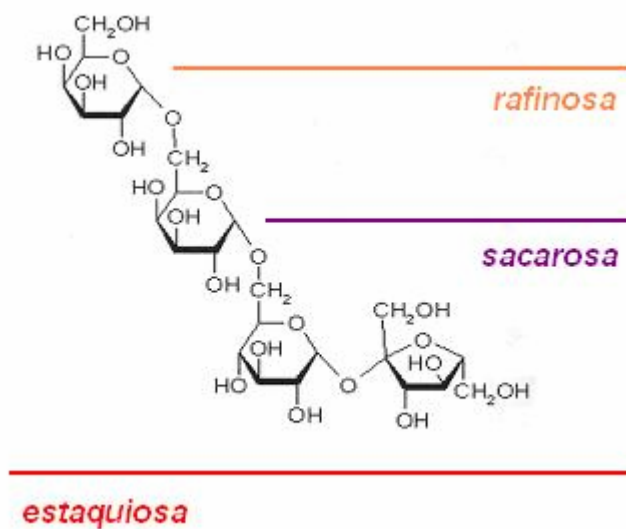


Figura 15: Estructura de los oligosacáridos de la soja. La estaquiosa y la rafinosa se diferencian por el número de moléculas de galactosa unidas por enlace α -1,6 al disacárido sacarosa

Otros como, *galactooligosacáridos*, *Lactulosa* y *lactitol* (derivados sintéticos de la lactosa), *Isomaltooligosacáridos*, que se obtienen a partir del almidón por hidrólisis enzimática, *xilooligosacáridos*, *palatinoooligosacáridos*, *gentioooligosacáridos*, que están formados por 2 a 5 residuos de glucosa unidos por enlaces β -1,6, *ciclodextrinas*.

Todos estos oligosacáridos no son digeridos por enzimas humanas pero son fermentados en el intestino grueso, y se les atribuyen efectos en el ámbito de la

microflora intestinal, tienen reducido valor calórico y se les considera ingrediente funcional (Lineback, 1999).

D. Lignina

La lignina tiene una estructura tridimensional basada en unidades de los alcoholes aromáticos sinapil y coniferil. Es un polímero de alto peso molecular, que se forma por deshidrogenación enzimática y posterior polimerización de los alcoholes antes nombrados. Se encuentra químicamente unida a las hemicelulosas en la pared de la célula vegetal y, como tiene influencia sobre algunos aspectos de la fisiología gastrointestinal, se la incluye dentro de la categoría de fibra alimentaria. Esos efectos fisiológicos que se le atribuyen nunca se han demostrado en el hombre (Mataix y Gassull, 2002).

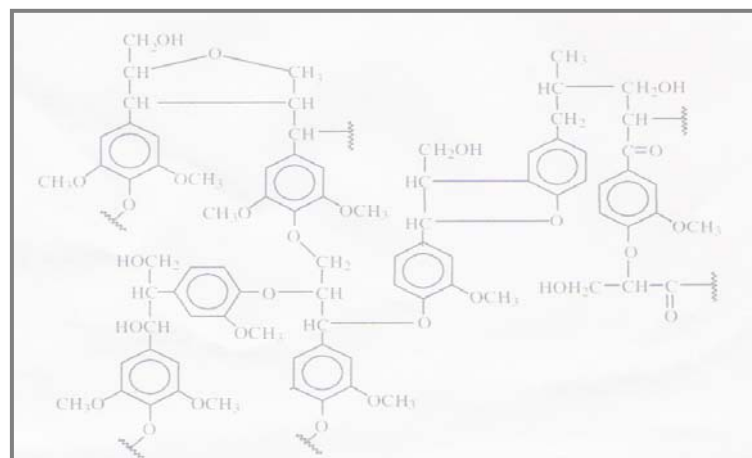


Figura 16: Estructura de lignina propuesta por Adler (1977)

La lignina sólo se deposita en determinados tipos de células, en las cuales constituye junto a las proteínas la fracción mayoritaria de los componentes no polisacáridicos de la pared celular. Su formación sólo se inicia una vez finalizado el crecimiento de la pared secundaria, comienza en la lámina media y se infiltra en la matriz provocando su expansión por todas las capas de la pared.

E. Sustancias asociadas

* Ceras: son mezclas de alcoholes, ácidos grasos y ésteres de ácidos grasos. Se suelen presentar junto a cutina y suberina en las paredes celulares cutinizadas y suberificadas.

* Cutina: Las paredes cutinizadas se suelen presentar en las células externas de los órganos aéreos de los vegetales. La cutina consiste en polímeros de hidroxiácidos con carácter bipolar que le permiten disponerse entre la estructura polisacáridica de la pared celular.

* Suberina: Se suele presentar en tejidos o células especializadas como el súber, las cubiertas seminales y la banda de Caspary de la endodermis de la raíz (Guardiola y García, 1990). Su composición química es semejante a la de la cutina pero presenta un mayor número de ácidos dicarboxílicos y de fenoles.

* Taninos: son componentes minoritarios de la pared. Pueden ser hidrolizables obteniéndose glucosa y ácidos fenólicos como productos de la hidrólisis, o taninos no hidrolizables formados por flavanos.

2.3. Propiedades físico-químicas

El interés actual de la fibra alimentaria se debe en la asociación epidemiológica entre una dieta rica en fibra y una menor incidencia de enfermedades crónicas, como la enfermedad cardiovascular o el cáncer de colon. Las repercusiones fisiológicas atribuidas al consumo de fibra derivan de sus características físico-químicas.

Las principales propiedades físico-químicas de la fibra alimentaria son el tamaño de partícula, las características de la superficie de la partícula, la hidratación, la capacidad de intercambio catiónico, la capacidad de adsorber compuestos orgánicos y la fermentación. Estas propiedades específicas que se conocen estudiando la fibra in vitro, pueden modificarse en función de muchos

factores, entre los que pueden citarse la madurez del alimento vegetal, tipo de cocinado, presencia de otros tipos de fibra, etc. (Guillon y Champ, 2000; Mälkki, 2001; Mataix y Gassull, 2002). Dentro de las propiedades que se han citado, las propiedades de hidratación, capacidad de intercambio catiónico y la adsorción de moléculas orgánicas tienen una mayor importancia desde el punto de vista nutricional (Bach Knudsen, 2001).

2.3.1. Tamaño de partícula

El tamaño de partícula depende del tipo de pared celular y del grado de procesado que presente el alimento vegetal, pero también puede variar durante el tránsito en el tracto digestivo como resultado de la masticación, paso por el estómago y degradación bacteriana en el intestino grueso.

El tamaño de partícula tiene un papel importante en el tiempo de tránsito intestinal, la fermentación y la excreción fecal (Guillon, Champ y Thibault, 2000).

2.3.2. Características de la superficie de partícula

La porosidad y la superficie disponible pueden influir el proceso de fermentación de la fibra alimentaria y las características de la capa superficial juegan un papel en la adsorción o unión de algunas moléculas.

La porosidad y la superficie disponible son propiedades que influyen en otras propiedades físico-químicas, de manera que un mayor número de poros permiten una mayor hidratación de la partícula y una mayor superficie disponible posibilita una unión a cationes y a moléculas orgánicas mayor. Dependen del origen y tratamiento al que se ha sometido al alimento. No se conoce como los constituyentes de la fibra alimentaria controlan la porosidad de la superficie de la partícula, aunque existen algunos autores que afirman que las pectinas tienen un papel dominante (Guillon y Champ, 2000).

2.3.3. Hidratación

La capacidad de hidratación del material de la pared celular ha sido muy estudiada en relación con las hipótesis de la fibra alimentaria. Existen diferentes aspectos en la hidratación de la fibra que se pueden distinguir y que llevan a la necesidad de definirlos por separado (Guillon y Champ, 2000; Bach Knudsen, 2001):

Capacidad de retención del agua → es la cantidad de agua retenida por la fibra alimentaria sin aplicación de una fuerza externa.

Capacidad de unión al agua → es la cantidad de agua que permanece unida a la fibra hidratada tras la aplicación de una fuerza externa.

Hinchamiento → es la primera parte del proceso de solubilización. Consiste en la entrada de agua que expande las macromoléculas hasta que son completamente extendidas y dispersadas, después de lo cuál se solubilizan.

Solubilidad → es una propiedad que tienen profundos efectos en la funcionalidad de la fibra. La solubilización no es posible en el caso de que los polisacáridos adopten estructuras regulares y ordenadas, como la celulosa o los arabinoxilanos lineares, de manera que estas estructuras sólo pueden hincharse.

La mayoría de los polisacáridos dan soluciones viscosas cuando se disuelven en agua (Bach Knudsen, 2001). La viscosidad puede ser descrita como la resistencia al flujo y depende, principalmente, del peso molecular del polímero y de su concentración. Los polisacáridos solubles, como los arabinogalactanos, presentan relativamente una baja viscosidad en solución acuosa (Furuta y Maeda, 1999; Maeda, 2000).

2.3.4. Capacidad de intercambio catiónico

La capacidad de intercambio catiónico es debida a la presencia de grupos ionizables en la estructura química y la capacidad de unión de sustancias asociadas como el ácido fítico. Este último tiene una elevada capacidad de fijar

cationes divalentes y trivalentes, sobre todo al calcio. Los grupos ionizables son los grupos carboxilo o grupos hidroxilo presentes en las pectinas.

La fibra procedente de legumbres tiene una capacidad de intercambio catiónico elevada debido a la gran cantidad de ácidos urónicos que presenta. Esta capacidad puede estar relacionada con ciertos desequilibrios minerales que presenta el organismo debido al consumo de fibra, pero aunque esta capacidad es alta *in vitro*, *in vivo* se produce la fermentación de la fibra soluble, que es la responsable principal de esta capacidad de intercambio catiónico (Guillon y Champ, 2000; Guillon, Champ y Thibault, 2000).

2.3.5. Adsorción de compuestos orgánicos

La capacidad de distintas fibras para secuestrar e incluso unirse químicamente a sustancias orgánicas como ácidos biliares, colesterol y sustancias cancerígenas puede tener un papel importante en determinados efectos fisiológicos que se le atribuyen a la fibra alimentaria.

La capacidad de la fibra para unirse o intercambiar iones puede ser el mecanismo para explicar el mecanismo para secuestrar ácidos biliares por interacciones hidrofóbicas y/o iónicas en las que están implicados los iones calcio y aluminio (Guillon y Champ, 2000). La fibra que contiene ácidos urónicos o ácidos fenólicos pueden incrementar la excreción fecal de ácidos biliares lo cual puede tener un efecto hipocolesterolémico (Guillon, Champ y Thibault, 2000).

2.3.6. Fermentación

Los carbohidratos que son resistentes a la digestión en el intestino delgado, como la fibra alimentaria (incluyendo el almidón resistente que constituye hasta una quinta parte del almidón ingerido), muchos oligosacáridos (excepto aquellos que proceden de los jarabes de glucosa), y una parte de los hidratos de

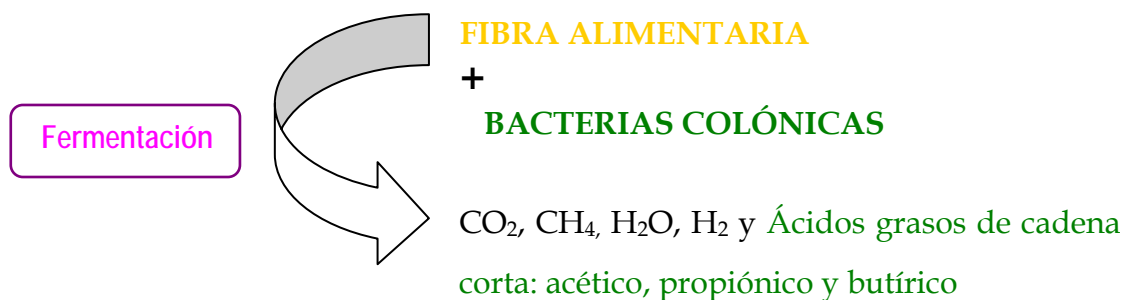
carbono hidrogenados (polioles), pasan al intestino grueso donde la microflora intestinal los fermenta parcial o totalmente. La lactosa también puede escapar a la digestión y absorción del intestino delgado, debido a la baja actividad de la enzima lactasa, y pasar al colon. Se cree que los carbohidratos no digeribles, originalmente considerados sólo como agentes laxantes, tienen efectos fisiológicos importantes como resultado de su fermentación.

La velocidad y el grado de la fermentación de los hidratos de carbono dependen de la solubilidad y la estructura de los polisacáridos y de la accesibilidad de las bacterias a estos polisacáridos. Por ejemplo, la mayoría de los polisacáridos solubles, hidratos de carbono hidrogenados y los oligosacáridos fermentan rápida y completamente, mientras que el almidón resistente fermenta completamente, aunque sólo de forma lenta, y la celulosa y las hemicelulosas son parcialmente resistentes a la fermentación.

El proceso de fermentación (**Esquema 2**) se produce en el colon donde existe la microflora capaz de realizar este proceso. Este proceso es fundamental para el funcionamiento del intestino grueso. La degradación microbiana requiere un grupo de bacterias colónicas que pueden variar de un individuo a otro. Las bacterias utilizan los productos de la fermentación para generar energía y extraer el carbono que es necesario para su crecimiento.

La degradación bacteriana de los carbohidratos no digeribles origina, como productos finales, ácidos grasos de cadena corta y gases. Los ácidos grasos de cadena corta pueden ser absorbidos a través de la mucosa intestinal y presentan funciones importantes en el ámbito del colon como la disminución del pH, efecto trófico, producción de energía, etc., y en el ámbito sistémico influyen sobre el metabolismo de lípidos, la glucemia, etc (Guillon y Champ, 2000; Guillon, Champ y Thibault, 2000; García Peris y col., 2002; Gray, 2003). Uno de los AGCC, el ácido butírico, se considera un nutriente principal para el

crecimiento normal de las células epiteliales del revestimiento de la mucosa colónica y puede jugar un papel decisivo en la prevención de las enfermedades del colon. El proceso de fermentación también tiene efectos en el metabolismo sistémico, ya que algunos AGCC se absorben y metabolizan para proporcionar energía. Se estima que la cantidad de energía producida por la fermentación de los hidratos de carbono es de 2 kcal/g aproximadamente, lo que supone la mitad del valor calórico de los hidratos de carbono digeridos en el intestino delgado (Gray, 2003). Los gases metano, hidrógeno y anhídrido carbónico producidos en la fermentación pueden ser eliminados causando flatulencias (Guillon y Champ, 2000; Guillon, Champ y Thibault, 2000; García Peris y col., 2002) o aparece en la respiración, y otra parte la consumen las bacterias colónicas (Gray, 2003).



Esquema 2: Proceso de fermentación de la fibra alimentaria en el colon.
Producción de los ácidos grasos de cadena corta (SCFA)

La naturaleza de los productos de la fermentación también depende de los carbohidratos específicos, pero los factores que gobiernan la producción preferencial de AGCC individuales no se ha confirmado de manera definitiva.

Se cree que los arabinogalactanos, abundantes en legumbres, son despolimerizados por un grupo relativamente pequeño de bacterias, entre ellas,

Bacteroides y *Bifidobacteria*, ya que estas bacterias tienen actividad β -galactosidasa, que puede romper su estructura (Van Laere, 2000).

Microflora intestinal

La microflora intestinal constituye un ecosistema muy complejo, con más de 200 y en ocasiones hasta 500 especies diferentes de microorganismos aeróbicos y anaeróbicos en un solo individuo. Existe un grado considerable de variación de especies bacterianas entre individuos, lo que puede estar influido por factores como la edad y la dieta, sin embargo, la flora es extraordinariamente estable dentro de cada individuo.

La fibra alimentaria es, cuantitativamente, el segundo sustrato mayoritario de las bacterias colónicas (8-18g/día). Su fermentación está determinada por sus propiedades físicoquímicas, su procesamiento (Dust y col., 2004), su solubilidad en agua (Campbell y col., 1997), el tamaño de partícula y la presencia de otros componentes vegetales capaces de inhibir la actividad enzimática (Bravo y col., 1994). Las principales bacterias que son capaces de hidrolizar los polisacáridos de la fibra son *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Ruminococcus* y algunas especies de *Eubacterium* y *Clostridium* (Guillon, Champ y Thibault, 2000).

El resto de la fracción no digerible y potencialmente fermentable son los oligosacáridos (2-8 g/día), carbohidratos sintéticos (Cummings y Macfarlane, 1991) y otros.

Las bacterias que utilizan selectivamente los carbohidratos no digeribles, en particular los oligosacáridos, modifican la composición bacteriana de la flora dominante al aumentar las bifidobacterias y otras bacterias del ácido láctico. En consecuencia, se han utilizado diferentes tipos de oligosacáridos como aditivos alimentarios prebióticos. Se ha sugerido que este proceso puede ser beneficioso

para el mantenimiento de la salud, pero es necesario que la investigación al respecto continúe hasta alcanzar una conclusión clínica aceptable (Gray, 2003).

2.4. Efectos fisiológicos y beneficiosos de la fibra alimentaria sobre la salud

Hay una extensa literatura acerca de los beneficios que puede ejercer la fibra alimentaria en el organismo, tales como la atenuación de la glucosa e insulina en sangre, la reducción del colesterol, la regularización de la función colónica, la saciedad y la prevención de algunos tipos de cánceres.

2.4.1. Atenuación de la glucosa en sangre

Generalmente se acepta que una dieta rica en fibra alimentaria, particularmente en fibra soluble, es útil en el control de la concentración de glucosa en plasma en individuos diabéticos (Guillon y Champ, 2000; Gray, 2006).

Varios estudios han demostrado que una dieta rica en carbohidratos no digeribles reduce la concentración de glucosa en sangre y disminuye el grado de hiperinsulinemia en los pacientes con diabetes tipo II (Chandalia y col., 2000). La fibra alimentaria puede ser interesante en los individuos con diabetes tipo I debido a que presenta carbohidratos de digestión lenta que regulan las necesidades de insulina porque la absorción intestinal de los nutrientes se produce de manera más lenta, mejorando la tolerancia a la glucosa (Holt y col., 1996; AACC, 2001).

Los mecanismos de mejora del control glicémico durante la ingesta de fibra alimentaria parecen estar relacionados con la absorción lenta de los carbohidratos, de manera que reduce o retrasa su absorción. Los alimentos con índice glicémico bajo, tales como las legumbres, pueden ser potencialmente

útiles en la prevención y tratamiento de la diabetes tipo II (Chandalia y col., 2000; Jenkins y col., 2003a; Gray, 2006), y pueden mejorar la tolerancia a la glucosa, siendo interesante para individuos con diabetes tipo I (Holt y col., 1996; AACC, 2001).

Los ácidos grasos de cadena corta, acetato y propionato, producidos en la fermentación de la fibra alimentaria (NSP y NDO) regulan el metabolismo de la glucosa, ya que disminuyen la glucosa postprandial y la respuesta insulínica (García Peris y col., 2002).

2.4.2. Disminución del colesterol sanguíneo

El efecto reductor del colesterol sanguíneo de distintas fuentes de fibra alimentaria ha sido ampliamente documentado. Algunas investigaciones epidemiológicas tempranas acerca de la fibra alimentaria de cereales y legumbres ya indicaron una relación inversa entre la ingesta de fibra alimentaria y el riesgo de padecer enfermedad cardiovascular.

Las legumbres constituyen una fuente de fibra alimentaria, relativamente rica en fibra soluble, que juega un importante papel en la prevención de la enfermedad cardiovascular (Kushi y col., 1999). Los principales efectos de la fibra soluble, sobre las lipoproteínas séricas aparecen relacionados con la fijación de los ácidos biliares y colesterol en el intestino delgado, y con la disminución de la reabsorción de estos ácidos biliares en el íleon terminal (Anderson y Major, 2002). Por tanto, la cantidad de ácidos biliares que llega al colon para su excreción junto a las heces es mayor, descendiendo la cantidad de estos ácidos que regresa al hígado por circulación enterohepática. Los ácidos biliares reabsorbidos vuelven al hígado por la vena porta y modulan la síntesis de colesterol o su catabolismo a ácidos biliares. El descenso de la reabsorción de estos ácidos hace que aumente su síntesis hepática, aumentando el uso del colesterol del hepatocito y sanguíneo para sintetizar nuevos ácidos biliares.

Además, se produce la disminución en la síntesis de colesterol en el hígado, parcialmente debida a la reducción de las concentraciones de insulina en sangre porque la insulina es responsable de la activación de un enzima clave de la síntesis de colesterol, y por otro lado, este efecto podría ser debido al perfil alterado de los ácidos biliares en el hígado, especialmente la alta concentración de ácido deoxicólico, el cuál es capaz de inhibir la síntesis del colesterol (Mälkki, 2001).

La producción de ácidos grasos de cadena corta por la fermentación de la fibra soluble en el colon contribuye a reducir la síntesis de colesterol hepático (Anderson y Hanna, 1999) ya que están implicados en el metabolismo intermediario hepático y puede regular el metabolismo de la glucosa y los lípidos. El ácido propiónico, uno de estos ácidos de cadena corta, disminuye la síntesis del colesterol hepático por inhibición de la actividad de la hidroximetilglutaril coenzima-A (Guillon, Champ y Thibault, 2000; Delzenne y Kok, 2001; García Peris y col., 2002).

Además algunas cepas de *Lactobacillus acidophilus* asimilan el colesterol presente en el medio, mientras otras parecen inhibir la absorción del colesterol a través de la pared intestinal (Mussatto y Mancilla, 2007).

2.4.3. Regulación de la función colónica

La fibra alimentaria disminuye el tiempo de tránsito intestinal, previene el endurecimiento de las heces y retiene agua (Mongeau y col., 1999; Gray, 2006).

Los efectos fisiológicos de la fibra alimentaria en el colon dependen de los componentes que la constituyen. La fibra insoluble presenta efectos mecánicos que implican el acortamiento del tiempo de tránsito intestinal, mientras que la fibra soluble tiene efectos sistémicos (Bennett y Cerda, 1996).

Los efectos de la fibra alimentaria sobre el peso de las heces dependen aparentemente del tipo de polisacáridos y constituyentes asociados que contribuyen a la estructura de la pared celular vegetal (Mongeau y col., 1999).

La fibra alimentaria puede incrementar el volumen fecal debido a la capacidad de retención de agua de la fracción no fermentada, fundamentalmente polisacáridos insolubles (Johnson, 2000; Mälkki, 2001) y también debido al incremento del número de bacterias resultantes de la extensa fermentación de los oligosacáridos no-digeribles (Mussatto y Mancilha, 2007). La fibra soluble viscosa es metabolizada por las bacterias colónicas en mayor medida que la fibra insoluble, así la viscosidad disminuye y los productos de degradación de la fermentación son usados como nutrientes por la microflora del colon (Mongeau y col. 1999). El aumento de la masa celular microbiana tiene una alta capacidad de retención de agua, causando el ablandamiento de las heces y evitando el estreñimiento (Mälkki, 2001; Gray, 2006; Mussatto y Mancilla, 2007).

La suplementación de la dieta de ratas hembra Wistar Hannover con okara aumenta la excreción fecal y el peso de sus heces por su alto contenido en humedad, atribuible, sobre todo, al contenido en fibra insoluble. Además la fermentación cecal es mayor en el grupo de ratas alimentado con la dieta enriquecida en okara, pudiendo indicar un potencial efecto prebiótico (Préstamo y col., 2007).

La fibra alimentaria actúa positivamente en casos de diarrea y estreñimiento, pero también en el tratamiento de la enfermedad de colon irritable (Bosaeus, 2004). Y parece tener un papel positivo en la diverticulosis y la enfermedad inflamatoria intestinal (Gray, 2006).

2.4.4. Saciedad y reducción de peso

Los alimentos ricos en fibra alimentaria son digeridos más despacio, por tanto la absorción de nutrientes ocurre de una forma lenta (Jenkins y col., 1993). Además, los alimentos ricos en fibra son, normalmente, de densidad calórica menor y de volumen mayor, lo que puede limitar espontáneamente la ingesta (Saris, 2003). Así, este volumen mayor de alimento hace que la ingesta sea lenta y puede producir un efecto de saciedad temprana, aunque esta sensación desaparece pronto (Slavin, 2005).

Los efectos para explicar la saciedad que produce la fibra alimentaria son variados. El primero ocurre a nivel de estómago, donde la fibra se une al agua y se hincha causando distensión (Mälkki, 2001). Además, la viscosidad de la fracción soluble ralentiza el paso al intestino prolongando el tiempo de tránsito en el estómago (Bergmann y col., 1992; Mälkki, 2001). La distensión del estómago unida al mayor tiempo de tránsito estomacal contribuye a la sensación de saciedad. Pero el principal efecto probablemente ocurre a nivel del intestino delgado, cuando la grasa y proteínas o aminoácidos entran en contacto con los receptores intestinales. La unión de estos nutrientes a los receptores intestinales provocan la liberación de la colecistoquinina, la cuál retrasa el vaciamiento gástrico, disminuye la hiperglicemia postprandial y aumenta la saciedad. La fibra alimentaria aumenta la secreción de colecistoquinina. Se cree que esto es causado por la viscosidad de la fibra ya que aumentaría el tiempo de contacto entre la grasa, los aminoácidos y los receptores intestinales (Holt y col., 2001; Mälkki, 2001).

Algunos estudios indican la posibilidad de que la saciedad provocada por la fibra alimentaria podría explicar la reducción de peso en algunas personas (Mälkki, 2001). De todos modos, que la suplementación con fibra ayude en la prevención y control de la obesidad es más controvertido, aunque existen estudios epidemiológicos que han demostrado que la fibra alimentaria es una

importante herramienta en la prevención de la obesidad (Slavin, 2005). En el estudio de Préstamo y col., (2007) obtuvieron una disminución en el peso de las ratas hembra Wistar Hannover que alimentaron con una dieta enriquecida en okara.

2.4.5. Prevención contra el cáncer

Aunque a la fibra alimentaria se le atribuye un papel en la prevención del cáncer colorrectal, el tema provoca algunas controversias.

La fibra alimentaria puede presentar un papel en el cáncer de colon, y también se le atribuye en la reducción del riesgo de otras enfermedades crónicas del aparato digestivo (Kushi y col., 1999; Scheppach y col., 2004; Gray, 2006).

Existen varios mecanismos propuestos para explicar el efecto beneficioso de la fibra contra el cáncer de colon, incluyendo dilución y unión a carcinógenos potenciales, disminución del tiempo de tránsito intestinal, reducción de la producción de ácidos biliares secundarios debido a la fijación de los ácidos biliares primarios y fermentación de la fibra produciendo ácidos grasos de cadena corta (Bingham y col., 2003; Peters y col., 2003; Gray, 2006).

La fibra alimentaria puede incrementar el volumen fecal debido a la capacidad de retención de agua de la fracción no fermentada, fundamentalmente polisacáridos insolubles y reducir el tiempo de tránsito intestinal, por tanto se evita la presencia de material fecal y la infrecuencia de movimientos intestinales que pueden producir una prolongada exposición de las células colónicas a mutágenos fecales. Además, la fibra puede diluir los ácidos biliares produciendo una fase sólida dispersa, la cuál absorbe sales biliares reduciendo su presencia en el agua fecal. Se sospecha que esas sales biliares puedan causar irritación crónica en el colon y estimular la proliferación de la mucosa colónica y actuar así como promotores de tumores (Johnson, 2000).

El consumo de fibra y carbohidratos complejos produce una alta fermentación colónica que resulta en un aumento de ácidos grasos de cadena corta que presentan un papel potencial en la prevención contra el cáncer de colon e infecciones colónicas, ya que inhiben el desarrollo de bacterias de putrefacción y patógenas, respectivamente (Guillon y Champ, 2002).

Entre los ácidos grasos de cadena corta (SCFA), el butirato puede actuar como regulador de la expresión génica que está implicada en la proliferación y diferenciación de las células del colon, de manera que ha sido propuesto como protector contra el cáncer de colon (Edwards y Parrett, 1996; Guillon, Champ y Thibault, 2000; García Peris y col., 2002; Bingham y col. 2003). Además, la producción de los SCFA resulta en una disminución del pH que inhibe el crecimiento de ciertas cepas bacterianas patogénicas y estimula el crecimiento de bifidobacterias y lactobacilos, esto aumentaría la inmunidad celular y se podría traducir en reducción del riesgo de desarrollo de cáncer de colon. Un pH colónico bajo puede, también, ayudar en la excreción de carcinógenos (Mussatto y Mancilla, 2007).

2.5. Métodos analíticos para la determinación de fibra alimentaria

Ningún método analítico es capaz de medir todos los componentes de la fibra en los alimentos. Existe la necesidad de encontrar un método capaz de analizar todos los componentes descritos en la definición de la fibra alimentaria, al mismo tiempo que excluya aquellos que no interesen. Pero la ausencia de un acuerdo internacional para definir y elegir un método adecuado para el análisis de la fibra alimentaria hace que existan diversos métodos para aislar y fraccionar el grupo de sustancias que la conforman.

La metodología de la fibra se puede clasificar en:

- **Métodos químicos** → Consisten en la eliminación por medio de reactivos químicos de distintos componentes de los alimentos, aislando una fracción que corresponde a la parte no digestible de los mismos.
- **Métodos enzimáticos** → En estos se pretende emular la degradación enzimática que sufren los alimentos en el tracto digestivo.

A su vez, los métodos enzimáticos pueden subdividirse en dos grupos:

Enzimático-gravimétricos: el aislamiento de la fibra se efectúa tras una serie de tratamientos químicos y enzimáticos, y se cuantifica gravimétricamente.

Enzimático-químicos-cromatográficos: por medio de tratamientos enzimáticos y químicos, la fibra se fracciona en sus distintos elementos, analizándose instrumentalmente su composición.

2.5.1. MÉTODOS QUÍMICOS

- **Método de fibra bruta**

El primer método para evaluar la fibra alimentaria data de 1806 y se denomina método de Weende (Asp y Johansson, 1984). Consiste en un ataque secuencial con ácido (H_2SO_4 1,25%) y con álcali (NaOH 1,25%) obteniéndose un residuo denominado fibra bruta.

Este método presenta grandes inconvenientes ya que existen pérdidas considerables de distintos componentes de la fibra. Según Van Soest y McQueen (1973), no se cuantifican un 80% de las hemicelulosas, un 60% de la lignina y un 50% de la celulosa.

- ***Métodos detergentes***

Van Soest (1963a y 1963b) desarrolló el método ácido detergente (FAD), en el que emplea un detergente catiónico, bromuro de cetil trimetil amonio, en H₂SO₄ 1N. En 1967, Van Soest y Wine proponen el método neutro detergente, que consiste en la digestión con un detergente aniónico, lauril sulfato sódico, y EDTA en medio neutro obteniéndose un residuo insoluble (FND).

Uno de los inconvenientes más importantes de los métodos detergentes es que no se determina la fracción soluble de la fibra. Mongeau y Brassard (1986) propone una modificación del método FND por la cual cuantifican esta fracción, aunque estiman FI y FS en dos muestras diferentes y con condiciones distintas de solubilización, corriéndose el riesgo de no cuantificar algunos componentes o cuantificarlos dos veces.

2.5.2. MÉTODOS ENZIMÁTICOS

Son los más utilizados en la actualidad. Se basan en la eliminación del almidón y la proteína mediante hidrólisis enzimática. Estos métodos tratan de reproducir las condiciones del tracto gastrointestinal, es decir aplican el concepto fisiológico de FA.

A) Métodos enzimático-gravimétricos

Los primeros métodos enzimáticos desarrollados surgen como modificaciones de los métodos detergentes, se introduce así el tratamiento con α -amilasa para la eliminación del almidón retenido en el residuo (McQueen y Nicholson, 1979). Carré y Brillouet (1989), además de α -amilasa utilizaron una proteasa y Mongeau y Brassard (1986, 1990 y 1993) incluyen también, un análisis paralelo de la fracción de FS por cuantificación gravimétrica tras precipitación con etanol.

Hellendoorn y col. (1975) fueron los pioneros en el empleo de pepsina y pancreatina. Schweizer y Würsh, en 1979, proponen un método basado en el anterior incluyendo además el enzima amiloglucosidasa. El método de Furda (1981), basado también en el de Hellerdoorn, consiste en el aislamiento de FI mediante filtración de la suspensión resultante del tratamiento de la muestra con HCl, amilasa y proteasa. La FS se aísla del filtrado por acidificación y adición de etanol.

El procedimiento de Asp y col. (1983) supone el uso de las enzimas amilasa, pepsina y pancreatina, y permite obtener el valor de FT, si la precipitación con alcohol se realiza inmediatamente después de la incubación con los enzimas, o el de FI y FS por separado. Con este método casi todo el almidón se solubiliza, pero algunas proteínas resisten las condiciones de esta digestión.

- *Método oficial de la AOAC*

En 1984, fruto de un amplio estudio interlaboratorio de alcance internacional, surge el método de Prosky y col. (1984), basado en los métodos de otros autores como Furda y col. (1979), Schweizer y Würsh (1979) y Asp y Johansson (1984). Este método es el oficial de la AOAC (Association of Official Analytical Chemists), de la AACC (American Association of Cereal Chemist) y es el recomendado por la FDA (Food and Drug Administration) y por la USDA (United States Department of Agriculture) para el etiquetado de alimentos (Lee y Prosky, 1994).

Este método determina FT en la muestra (desengrasada o no) por eliminación del almidón con α -amilasa termoestable (denominada Termamyl) y amiloglucosidasa, y de la proteína con proteasa. Una vez finalizada la digestión enzimática, la suspensión se filtra y el filtrado se aparta para la determinación de FS, mientras que el residuo determinará la FI. Los residuos obtenidos tienen la misma composición que los del método de Asp y col. (1983): polisacáridos

no-almidón (PNA), lignina y almidón resistente (AR). El AR sería del tipo AR₃ (amilosa retrogradada), el resto de las fracciones de AR se eliminan (Asp, 1996).

Se encontraron diferentes problemas al aplicar la metodología:

- Dificultad en la filtración.
- Falta de homogeneidad entre los resultados
- Eficacia poco satisfactoria de la hidrólisis enzimática del almidón
- Dificultad en el análisis de alimentos procesados
- Carencia de un patrón de referencia

Después de sucesivos estudios interlaboratorio para conseguir mejorar la eficacia del método, cabe señalar que desde los primeros métodos enzimático-gravimétricos hasta los que actualmente son los métodos oficiales de la AOAC se ha conseguido rebajar sensiblemente el tiempo empleado en el análisis, siendo muy útiles como métodos rutinarios, y en cualquier caso es el método más ampliamente utilizado para el etiquetado de los alimentos (Devries y col., 1999; Prosky, 1999a).

B) Métodos enzimático-químicos

Con estos métodos la fibra se cuantifica como la suma de sus constituyentes: monosacáridos y ácidos urónicos, obtenidos por la hidrólisis ácida de los polisacáridos correspondientes, y lignina según los casos.

Al igual que en los métodos enzimático-gravimétricos, en los últimos años se han desarrollado numerosos métodos de análisis que pueden englobarse en este grupo, entre los que destacan: el método de Uppsala (Theander y col., 1995) y el método de Englyst (Englyst y col., 1994). Estos métodos se fundamentan en el aislamiento del residuo de FA y su posterior hidrólisis de polisacáridos a monosacáridos; después se identifican y cuantifican por cromatografía

mediante la formación de derivados volátiles, y los ácidos urónicos por espectrofotometría.

- **Método de Uppsala**

Se trata de un método (Theander y Åman, 1979; Theander y col., 1990; Theander y col., 1995) conceptualmente similar a los de Prosky (Prosky y col., 1984 y 1988), en tanto que considera el almidón resistente (AR) y la lignina como parte de la FA y semejante en la práctica al de Englyst (Englyst y col., 1994) en lo que se refiere al empleo de hidrólisis, derivatización a acetatos de alditol y determinación de monómeros neutros por cromatografía de gas-líquido (GLC). Analizan FT o FI y FS. Dispersan el almidón con dimetilsulfóxido y su hidrólisis la realizan incorporando enzimas α -amilasa termoestable (Termamyl) y amiloglucosidasa. La hidrólisis de los polisacáridos se realiza con H_2SO_4 , y para la derivatización, originariamente seguían el método de Sawardeker de formación de acetatos de alditol y el de Sweely de formación de trimetilsilano (Theander y Åman, 1979), pero en 1986 incorporaron las modificaciones propuestas por Englyst y Cummings (1984).

La determinación de ácidos urónicos la efectúan por descarboxilación (Theander y col., 1979). Como método alternativo proponen el colorimétrico de Scott (1979).

- **Método de Englyst**

Englyst encabeza un grupo investigador cuyos trabajos parten de los principios establecidos por McCance y Widdowson y más tarde por Southgate (Southgate, 1969).

El procedimiento original de Englyst data de 1981, en el cual utiliza amiloglucosidasa para efectuar la hidrólisis del almidón. En 1982, Englyst y col. recomiendan el empleo de α -amilasa y pululanasa en vez de la enzima anterior.

Para la hidrólisis de los residuos emplean H_2SO_4 12M para solubilizar la celulosa y posteriormente H_2SO_4 1M.

Utilizan dimetilsulfóxido (DMSO) para dispersar el AR. En la derivatización, emplean para la neutralización NH_4OH , adicionan octan-2-ol como agente antiespumante y reducen por tratamiento con una solución de hidróxido amónico 6M que contiene 200mg/mL de tetraborato sódico. A continuación añaden ácido acético glacial y a una parte alícuota de la solución acidificada se le adiciona N-metilimidazol, como catalizador de la reacción, seguido de anhídrido acético. Después se añade etanol y se mezcla, a continuación se adiciona agua, KOH 7,5M, se mezcla y se repite esta última adición. Se deja reposar y se separan dos fases (Englyst y col., 1994).

Desde 1981 hasta las últimas modificaciones que han hecho del método (Englyst y col., 1994) se observa una tendencia a la disminución del tiempo global de análisis mediante una reducción en los tiempos de cada etapa. También destaca la introducción de Termamyl y pancreatina, y la modificación en las condiciones de hidrólisis, además ha habido cambios en los volúmenes de algunos reactivos, al igual que han sido suprimidos otros, como el carbonato de bario.

2.6. Consumo de fibra alimentaria. Recomendaciones y necesidades de esta fracción.

Las estimaciones de consumo de fibra alimentaria (**Cuadro 1**) están influenciadas por la metodología de análisis de la fibra que se haya elegido por los distintos grupos de investigación o instituciones gubernamentales.

Cuadro 1: Estimaciones de ingesta de fibra alimentaria en diferentes países

País	Cantidad g/día
Bélgica (Cho y col.,1999)*	21 (hombre) 19 (mujer)
Dinamarca (Bingham y col., 2003)***	21 (hombre) 20 (mujer)
Francia (Lairon y col.,2003)***	21 (hombre) 17 (mujer)
Alemania (Bingham y col.,2003)***	24 (hombre) 21 (mujer)
Italia (Bingham y col.,2003)***	25 (hombre) 22 (mujer)
Japón (Miller-Jones y col.,2004)***	17
Holanda (Bingham y col.,2002)***	27 (hombre) 23 (mujer)
España (Bingham y col.,2003)***	29 (hombre) 23 (mujer)
Suecia (Bingham y col.,2003)***	21 (hombre) 19 (mujer)
Reino Unido (Hoare y col.,2004)**	15.2 (hombre) 12.6 (mujer)
(Bingham y col.,2003)***	20 (hombre) 20 (mujer)
Estados Unidos (USDA, 2005)***	18 (hombre) (19-70 años)
	14 (mujer) (19-70 años)

*Fibra alimentaria total

** Polisacáridos no-almidón

*** Fibra alimentaria; método no especificado

La media de consumo de fibra alimentaria oscila de los 12 a los 29 g/día en los diferentes países y existen, en general, diferencias de consumo para hombres y mujeres. Las estimaciones para mujeres son menores que para los hombres, aunque esto es lógico ya que la ingesta de alimentos y energía total, normalmente, es menor en mujeres que en hombres.

Existen distintos organismos que establecen las necesidades diarias de fibra alimentaria que debe recibir el organismo. Así, La OMS (2004) estima que deben estar comprendidas entre >20 g/día de polisacáridos no-almidón o >25 g/día de fibra alimentaria. La Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (2001) recomienda 25-30 g/día, German Nutrition Society (2000), 30 g/día,

Health Council of The Netherlands (2006), 30-40 g/día, Nordic Nutrition Recommendations (2004), 25-35 g/día de fibra alimentaria sin especificar. En Reino Unido, Department of Health (1991), recomienda 18 g/día de polisacáridos no-almidón. En Estados Unidos, Institute of Medicine (2002) recomienda 31-38 g/día de fibra total para hombres y 21-25 g/día para mujeres.

También existe un estudio que considera los requerimientos de fibra más recomendables para la población española, 20-30 g (Cervera y col., 1999), y que se encuentran dentro de los intervalos señalados por otros autores.

Cuadro 2: Requerimientos diarios de fibra alimentaria distribuidos por sexo y edades (Slavin, 2003)

GRUPO	HOMBRE (g/día)	MUJER (g/día)
1-3 años	19	19
4-8 años	25	25
9-13 años	31	26
14-18 años	38	26
19-30 años	38	25
31-50 años	38	25
51-70 años	30	21
> 70 años	30	21

Slavin (2003) proporciona una mayor información al distribuir las necesidades diarias de fibra alimentaria en edades y sexos, siendo estas necesidades más altas para el rango de edades comprendidas entre los 14-50 años, con un valor de 38 g/día para el hombre y 25-26 g/día para la mujeres (**Cuadro 2**).

Aunque con reservas, debido a que la toma de datos es diferente según el país, parece que se podría deducir que la ingesta de fibra alimentaria es menor que las recomendaciones vertidas por los diferentes organismos en los países occidentales.

Material y Métodos

1. MUESTRAS

Se han seleccionado los subproductos de las leguminosas: semilla de soja (okara), guisante y haba (vainas) por su potencialidad como fuente de fibra alimentaria y porque su aprovechamiento sería de interés para la industria alimentaria. Además, en algunos análisis se incluyen semillas de soja de distintos tipos de cultivo.

1.1. SEMILLAS DE SOJA Y OKARA

Una de las principales aplicaciones tecnológicas de las semillas de soja es su empleo para la elaboración de leche de soja y tofu, durante este proceso se genera el subproducto okara. Las semillas de soja, de cultivo ecológico y variedad North East (China), y el okara, generado por extracción de estas semillas aplicando calor siguiendo las pautas del método japonés, fueron proporcionadas por la empresa Vegetalia (Castellcir, Castellón). Además, se analizaron semillas de soja de cultivo convencional (China), transgénico (EEUU) y no-transgénico (Brasil).

1.2. VAINAS DE HABA Y GUISANTE

Las vainas de haba y guisante fueron proporcionadas por la empresa Bonduelle (Milagro, Navarra). En el caso del guisante la separación de vaina y semilla se realiza en el propio campo mediante máquinas desgranadoras, mientras que en el haba dicha separación se realiza en la propia industria como paso previo al procesado de las semillas.

2. PREPARACIÓN Y CONSERVACIÓN DE LAS MUESTRAS

• LIOFILIZACIÓN

Las muestras de los subproductos seleccionados se desecaron para su conservación en un liofilizador *Telstar mod. Cryodos*. Mediante este proceso se

reduce la cantidad de agua presente en las muestras con lo que disminuye la actividad de agua y se evita el deterioro de las muestras. Las características técnicas de proceso fueron las siguientes: Temperatura y superficie del condensador: -45°C y $13,6\text{ dm}^2$, respectivamente y presión límite: 25mbar .

- **TRITURACIÓN**

Los subproductos una vez liofilizados se trituraron y posteriormente se pasaron a través de un tamiz de acero inoxidable de 1mm (CISA).

- **CONSERVACIÓN**

Los residuos triturados y tamizados se envasaron en tarros de vidrio herméticamente cerrados y debidamente etiquetados. Se conservaron en lugar seco, fresco y en ausencia de luz.

3. MÉTODOS ANALÍTICOS

En este apartado se describen los métodos de análisis a los que fueron sometidas las muestras de okara y vainas de guisante y haba para su estudio.

Estos métodos van dirigidos a la caracterización de los subproductos seleccionados, pero especialmente a estudiar la fracción de fibra alimentaria mediante un análisis más exhaustivo.

3.1. GRASA

3.1.1. Extracto etéreo

Para la grasa se utiliza el método de determinación del extracto etéreo de James (1995). Por extracto etéreo se entiende al conjunto de sustancias extraídas con éter etílico. Incluye además de los triglicéridos, a los fosfolípidos, las lecitinas,

los esteroides, las ceras, los ácidos grasos libres, los carotenoides, la clorofila y otros pigmentos.

Determinación

Se pesa una cantidad de muestra de 7 gramos que se transfiere a un cartucho de extracción. Este cartucho debe tener una porosidad adecuada para permitir un flujo rápido de éter. El cartucho se coloca en un extractor Soxhlet (*Selecta*) con una velocidad de condensación de gotas por segundo constante hasta la extracción total. Se evapora el éter del matraz y se deseca el residuo en una estufa de aire *Memmert* a 60° C durante toda la noche, se enfría y se pesa.

Cálculos

$$\text{Grasa (\%)} = \frac{P_1 - P_2}{P_0} \times 100$$

donde:

P₀ = Peso de muestra

P₁ = Peso del matraz con la grasa

P₂ = Peso del matraz

3.1.2. Estudio del perfil de ácidos grasos por cromatografía de gases

La grasa de las muestras estudiadas, obtenida como se ha descrito anteriormente, se analiza mediante cromatografía de gases (GLC) para conocer cuali y cuantitativamente los ácidos grasos que la componen. El procedimiento utilizado está basado en la orden PRE/3844/2004 que proviene de la norma UNE-EN ISO 5508:1990.

Determinación

Se pesan 0,5 g de la grasa en pequeños viales de cristal y se derivatizan. La derivatización se realiza mediante la adición de 5 mL de hexano y 1 mL de

potasa metanólica. Se tapa el vial y se agita vigorosamente. Después se espera una hora y se recoge 1 μ l de la parte superior y se inyecta en el cromatógrafo.

Se utiliza un cromatógrafo de gases *Perkin Elmer 8600* (con software incorporado e impresora *Epson LX-800 junior*) que lleva incorporada una columna *Omegawax 320* (30mx0,32mm de diámetro interno, 0,25 μ m de grosor de película) y nitrógeno como gas portador. La temperatura del horno fue 165°C y la del inyector y detector 250°C.

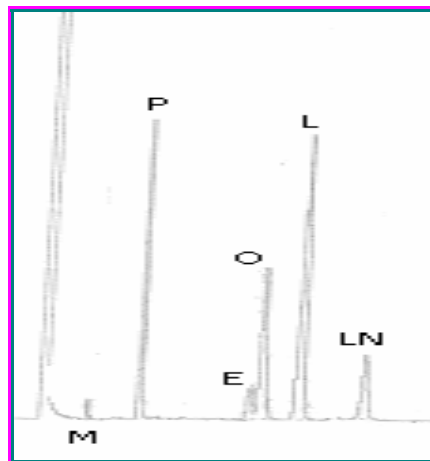


Figura I: Cromatograma con perfil de ácidos grasos de patrones comerciales. M: mirístico. P: palmítico. E: esteárico. O: oleico. L: linoleico. LN: linolénico

Cálculos

La cuantificación de los picos correspondientes a los distintos ácidos grasos se realizó por comparación con las áreas correspondientes a los patrones externos. Estos patrones fueron: mirístico, palmítico, esteárico, oleico, linoleico y linolénico (*Sigma*).

3.2. PROTEÍNAS

La determinación de las proteínas consiste en la cuantificación del nitrógeno total de la muestra que se multiplica por su factor correspondiente, en el caso del okara es de 5,71, y en el de las vainas de guisante y haba 6,25. Para determinar el nitrógeno total se utiliza el método de Kjeldahl (AOAC, 1995b), que consiste en una combustión en medio ácido por la que todo el nitrógeno proteico y no proteico pasa a nitrógeno y este a amoníaco. El amoníaco formado se destila, se recoge sobre una solución ácida y el exceso de ácido se valora con hidróxido sódico.

Determinación

Se toma 0,3 g de muestra en un tubo Kjeldahl, se añaden 10 g de la mezcla catalizadora $K_2SO_4/CuSO_4$, y 25 mL de ácido sulfúrico concentrado. Se coloca el tubo en el quemador (*Büchi Digestor Unit, mod. 425*) para destruir la materia orgánica, hasta que el contenido quede totalmente transparente. Finalizada la digestión de la materia orgánica, se destila en un destilador (*Büchi Distillation Unit, mod. B-316*), recogiendo el amoníaco sobre 25 mL de ácido sulfúrico 0,1 N. El exceso de ácido sulfúrico se valora con hidróxido sódico 0,1 N.

Cálculos

$$\text{Proteínas (\%)} = \frac{(25xf_{H_2SO_4} - axf_{NaOH})x1,4}{10xP} x f_p$$

donde:

$f_{H_2SO_4}$ = Factor de H_2SO_4

a = mL de NaOH gastados en la valoración

f_{NaOH} = Factor de NaOH

P = Peso de muestra

f_p = Factor de conversión de nitrógeno en proteínas

3.3. ELEMENTOS MINERALES

3.3.1. Cenizas totales

Los alimentos contienen elementos minerales formando parte de compuestos orgánicos e inorgánicos. Es muy difícil determinarlos tal y como se presentan en los alimentos. La determinación general que se usa es el método de cenizas totales, destruyendo toda la materia orgánica por incineración (AOAC, 1995c).

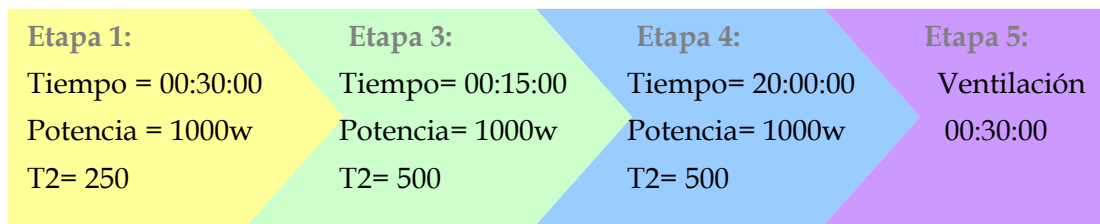
Determinación

Este análisis se realiza con la mineralización de 0,3 g de la muestra en cápsulas previamente lavadas con HNO₃ al 10 % y agua destilada, incineradas y pesadas. La incineración de la muestra consiste en la aplicación de calor en una mufla de microondas *Milestone mod. MLS-1200 Pyro*, a una temperatura de 500°C.

Las muestras de subproductos plantearon la necesidad de establecer una puesta a punto del método de mineralización que asegurara la incineración total de las mismas sin que se produjeran pérdidas de elementos minerales por volatilización. Para ello se optimizó un programa teniendo en cuenta parámetros tales como temperaturas, potencias, tiempos y número de etapas necesarios para optimizar los resultados.

Se variaron las condiciones favoreciendo la subida gradual de temperatura en diferentes etapas siempre sin rebasar la temperatura máxima de 500°C para no perder los iones volátiles. También se ajustó la potencia, economizando en las etapas de rampa de subida de temperatura y se incrementó el tiempo, con lo que se obtuvieron resultados satisfactorios.

El programa seleccionado responde al siguiente esquema:



En algunos casos, este programa se tuvo que aplicar varias veces consecutivas por que no terminaba de producirse la mineralización. Las cápsulas, una vez enfriadas en un desecador, se pesan nuevamente y por diferencia se obtiene la cantidad de cenizas.

Cálculos

$$\% \text{ Cenizas} = \frac{P_3 - P_1}{P_2 - P_1} \times 100$$

donde:

P_1 = Peso de la cápsula vacía

P_2 = Peso de la cápsula con la muestra

P_3 = Peso de la cápsula con la muestra calcinada

3.3.2. Estudio de los macro y microelementos por espectroscopía de absorción atómica

La determinación se realiza en las cenizas totales obtenidas como se ha explicado anteriormente. Se han cuantificado los macroelementos: sodio, potasio, calcio y magnesio, y los microelementos: hierro, cobre, manganeso y zinc. La determinación de elementos minerales se realiza, previa disolución de las sales minerales en medio ácido, siguiendo el método de espectroscopia de absorción atómica (AAS) (Sagardoy, 2002), utilizando un equipo Perkin Elmer AAnalyst 200.

Determinación

Las cenizas obtenidas se redisuelven en 1 mL de HCl al 50 % y 1 mL de HNO₃ al 50 % y se filtran con filtros para análisis gravimétrico Albet nº 240 enrasando a un volumen de 25 mL con agua destilada, transvasando finalmente a frascos de polietileno para su posterior lectura en el equipo de espectroscopía de absorción atómica.

- Macroelementos

- Sodio (Na) y Potasio (K). Para la cuantificación del Na y K la técnica utilizada es la espectroscopía de emisión atómica. Esta emplea la llama como atomizador y como fuente de excitación de los átomos. La radiación que emite la llama pasa por un monocromador con una capacidad de resolución que permite aislar la radiación de interés, la cual es conducida a un detector y procesada mediante un sistema electrónico en un equipo de AAS Perkin Elmer AAnalyst 200.

La lectura de estos elementos se realiza previo tratamiento de la muestra con un modificador de matriz: el cloruro de cesio, necesario para evitar la ionización de estos cationes en la llama.

- Calcio (Ca) y Magnesio (Mg). La cuantificación del calcio y magnesio se realiza siguiendo la técnica de absorción atómica. La lectura de absorción atómica de calcio y magnesio requiere la adición previa de óxido de lantano para evitar la interferencia debida a la presencia de fosfatos, que al no disociarse fácilmente del calcio y magnesio reducirían su atomización provocando una interferencia negativa.

- Microelementos

La lectura de los microelementos se lleva a cabo directamente en el extracto obtenido. Se ha utilizado una lámpara multielementos (Fe, Cu, Mn y Zn) de cátodo hueco como fuente de emisión, y una llama de aire-acetileno como método de obtención de átomos en estado fundamental.

Para todos los elementos analizados se siguen condiciones óptimas de trabajo, de acuerdo con las especificaciones establecidas para su cuantificación (ajuste de longitud de onda de máxima absorción o emisión, rendija, proporción de gases en la llama, tipo de llama, etc.), tal como se aprecia en el **Tabla I**.

Tabla I. Condiciones óptimas de trabajo con el equipo AAS (Perkin Elmer AAnalyst 200)

Elemento	Longitud onda (nm)	Rendija	Sensibilidad (mg/L)
<i>Na</i>	589	0,7	-
<i>K</i>	766,5	1,4-2	-
<i>Ca</i>	422,7	0,7	-
<i>Mg</i>	285	0,7	-
<i>Cu</i>	324,8	0,7	0,032
<i>Fe</i>	271,9	0,7	0,12
<i>Mn</i>	279,5	0,7	0,03
<i>Zn</i>	213,9	0,7	0,015

Para la cuantificación se parte de tres soluciones múltiples, preparadas usando patrones comerciales (*Panreac*): sodio y potasio, calcio y magnesio y los microelementos. A partir de ellas se han establecido las correspondientes curvas de calibración para cada elemento, y mediante las rectas de regresión ha sido posible la cuantificación de las muestras (**Tabla II**).

Tabla II. Ecuaciones de regresión de los macro y microelementos

Elemento	Ecuaciones de la recta
Sodio (Na)	$y=0,0039x + 0,0445$ $R^2= 0,9992$
Potasio (K)	$y= 0,0039x + 0,0069$ $R^2= 0,9982$
Calcio (Ca)	$y= 0,0274x + 0,0087$ $R^2= 0,9974$
Magnesio (Mg)	$y= 0,2966x + 0,0475$ $R^2= 0,9965$
Cobre (Cu)	$y= 0,1343x -0,0074$ $R^2= 0,9956$
Hierro (Fe)	$y= 0,063x - 0,0106$ $R^2= 0,9938$
Manganeso (Mn)	$y= 0,1506x - 0,0109$ $R^2= 0,9966$
Zinc (Zn)	$y= 0,6559x - 0,0214$ $R^2= 0,9982$

3.3.3. Ensayos realizados

Los ensayos de exactitud y precisión que reflejan las condiciones de trabajo se aportan a continuación.

Ensayo de exactitud

Se ha llevado a cabo adicionando a la muestra concentraciones conocidas de los diferentes patrones de minerales, realizando posteriormente las lecturas de las muestras con o sin adición en el equipo de espectroscopia atómica.

Las concentraciones adicionadas (ppm) fueron las siguientes: sodio (5 y 10), potasio (2 y 5), calcio y magnesio (50 y 100) en ambos, y en el caso de los microelementos las mismas en todos (5 y 10). Los porcentajes medios de recuperación se recogen en la **Tabla III**.

Tabla III. Porcentajes de recuperación de minerales

Macroelementos	Recuperación (%)	Microelementos	Recuperación (%)
Sodio	93,5	Hierro	104,5
Potasio	102,8	Cobre	95,0
Calcio	95,2	Manganeso	96,5
Magnesio	96,5	Zinc	94,2

Los resultados manifiestan unas recuperaciones razonables para todos los elementos en torno al 100%

Ensayo de precisión

Se ha llevado a cabo en diferentes días en las mismas condiciones de análisis y sobre la misma muestra. El coeficiente de variación (CV) se refleja en la **Tabla IV**.

Tabla IV. Coeficientes de variación de minerales

Macroelementos	CV (%)	Microelementos	CV (%)
Sodio	4,6	Hierro	3,0
Potasio	7,7	Cobre	2,0
Calcio	3,5	Manganeso	4,2
Magnesio	3,0	Zinc	3,4

Los resultados expresados como coeficientes de variación son en todos los casos inferiores al 5% excepto en el potasio que mostró una variabilidad algo más elevada.

3.4. DETERMINACIÓN DE ALMIDÓN

En residuos libres de azúcares se lleva a cabo la determinación de almidón basada en los métodos descritos por Hurst y col. (1979) y Wills y col. (1980).

La extracción de azúcares se realiza a partir de 1 gramo de muestra con etanol 85%. Esta mezcla se dispone en un baño a 70-80°C en agitación constante durante 30 minutos. Se centrifuga a 3000 g durante 20 minutos en una centrifuga *Universal 16R de Hettich Zentrifugen*. Se recoge el sobrenadante y al residuo se le vuelve añadir etanol 85% repitiendo el proceso antes descrito.

Los residuos libres de azúcares son desecados con acetona a 60°C. Posteriormente, se les adiciona 10 mL de agua destilada y se disponen en tubos tapados en un baño a 100°C en agitación constante durante 15 minutos para gelatinizar el almidón.

Después de la gelatinización, se añaden 0,3 mL de tampón acetato 0,1M (pH 4,5) y 0,1 mL del enzima amilogucosidasa y se dispone en baño a 37°C durante 20 horas. Posteriormente se centrifuga a 5000 g durante 15 minutos y el sobrenadante se concentra a sequedad en rotavapor (Büchi R-114) utilizando un baño (Büchi B-480) a 40°C y una bomba de vacío (Büchi B-169). Se le adicionan 10 mL de agua MilliQ y se pasa por un filtro de Nylon de 0,45 µm (*Teknokroma*) y un cartucho Sep-pack Plus C18 de *Waters* para extracción de fase sólida, previamente activado con metanol.

La determinación cuantitativa del almidón se lleva a cabo en un HPLC *Agilent* 1100 series con bomba cuaternaria y detector de índice de refracción. Se utilizó una columna *Aminex HPX-87P* de *Bio-Rad* y fase móvil agua MilliQ. Los resultados obtenidos en forma de glucosa se expresan como polisacárido después de multiplicar por el factor 0,9. La cuantificación se realiza mediante un patrón externo de glucosa (*Sigma*).

3.5. DETERMINACIÓN DE POLIFENOLES SOLUBLES Y TANINOS CONDENSADOS

3.5.1. Polifenoles solubles

A partir de 1 gramo de muestra pesada en tubos de centrífuga de capacidad 50 mL, los polifenoles solubles fueron extraídos secuencialmente. Primero con 40 mL de la solución de metanol-agua 50:50 (v/v) con HCl 2M para alcanzar un pH 2, a temperatura ambiente durante 60 minutos en agitación constante. Y en segundo lugar con 40 mL de acetona-agua 70:30 (v/v) a temperatura ambiente durante 60 minutos en agitación constante (Bravo y Saura-Calixto, 1998).

Después de cada extracción se centrifuga a 3000 g durante 15 minutos y se guardaron los sobrenadantes. A estos sobrenadantes se les adiciona agua destilada hasta un volumen total de 100 mL.

Los polifenoles se analizan espectrofotométricamente en los extractos usando el reactivo Folin-Ciocalteau (Singleton y col., 1999). De manera que se toman 0,5 mL del extracto y se le adiciona 1 mL del reactivo Folin-Ciocalteau, se agita y se espera 3 minutos. Se le añaden 10 mL de carbonato sódico (75 g/l) y se mezcla. Se lleva a 25 mL con agua destilada y después de 1 hora, la absorbancia se mide a 750 nm y los resultados se expresan en gramos de ácido gálico por 100 gramos de muestra.

Los cálculos se realizan teniendo en cuenta la ecuación de la recta obtenida a partir de diferentes concentraciones (entre 3 y 100 mg/L) de ácido gálico (*Merck*). La ecuación de la recta de calibración y su correspondiente coeficiente de correlación son:

$$y = 0,0064x + 0,0773$$
$$R^2 = 0,998$$

3.5.2. Taninos condensados

En los residuos procedentes de la extracción de polifenoles solubles se determinan los taninos-proantocianidinas condensadas según el método de Reed y col., (1982).

Estos residuos se disponen en matraces de fondo redondo y son tratados con 10 mL de HCl-butanol al 5%. Se prepara también un blanco que contiene únicamente la solución reactivo. Los matraces se llevan a ebullición lenta con refrigerante durante 3 horas en una placa calefactora (*Selecta*). Pasado este tiempo se enfrían rápidamente y el líquido se transfiere por filtración a matraces de 10 mL, enrasando con la solución reactivo. La absorbancia se mide a 550 nm y los resultados se expresan en gramos de catequina por 100 gramos de muestra.

Los cálculos se realizan teniendo en cuenta la recta y ecuación de regresión preparada con soluciones entre 1 y 7 mg/L de catequina (*Merck*) en 10 mL de solución HCl-butanol (*Merck*) al 5%. La ecuación de la recta de calibración y su correspondiente coeficiente de correlación son:

$$y = 1,142x - 0,02705$$
$$R^2 = 0,998$$

3.6. DETERMINACIÓN DE CARBOHIDRATOS DE BAJO PESO MOLECULAR POR HPLC

El análisis de los carbohidratos de bajo PM en las muestras seleccionadas se realiza, previa extracción de los mismos, por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) según en el método descrito en Rodríguez y col. (1999).

- **Extracción de azúcares solubles.** Se pesa 1 g de la muestra liofilizada, se añaden 40 mL de etanol al 85% y se dispone en un baño a 70-80°C en agitación constante durante 30 minutos. Se centrifuga a 3000 g durante 20 minutos en una centrifuga *Universal 16R de Hettich Zentrifugen*. Se recoge el sobrenadante y al residuo se le vuelve añadir etanol 85°C repitiendo el proceso antes descrito.

- **Preparación del extracto y análisis por cromatografía líquida (HPLC).** El extracto alcohólico obtenido anteriormente se concentra en el rotavapor (Büchi R-114) utilizando un baño (Büchi B-480) a una temperatura de 40°C y una bomba de vacío (Büchi B-169) hasta sequedad y se redisuelve en 10 mL de la fase móvil. El líquido así obtenido se pasa por un filtro de Nylon de 0,45 µm (*Teknokroma*) y un cartucho Sep-pack Plus C18 de *Waters* para extracción de fase sólida, de esta manera la muestra queda preparada para ser inyectada en el HPLC.

El HPLC utilizado es *Agilent 1100 series* y consta de inyector manual, bomba cuaternaria, horno donde se dispone la columna y detector de índice de refracción. El tratamiento de datos se realiza con un software ChemStation *Agilent* para sistemas LC (**Figura IV**).

Se utilizan dos columnas distintas para analizar los polisacáridos de bajo PM (*Aminex HPX-87P Bio-Rad* y *Carbohydrate Analysis WAT084038 de Waters*) y por tanto distintas condiciones que se exponen a continuación:

- 1) Columna *Aminex HPX-87P* (300 x 7,8 mm) de *Bio-Rad*. Resina iónica de plomo y cuya estructura es un co-polímero de benceno-estireno divinil sulfonatado con un tamaño de partícula de 9 µm.
 - Precolumna NH₂ de *Teknokroma*
 - Temperatura del horno 85°C
 - Fase móvil agua MilliQ desgasificada a flujo 0,5 mL/min

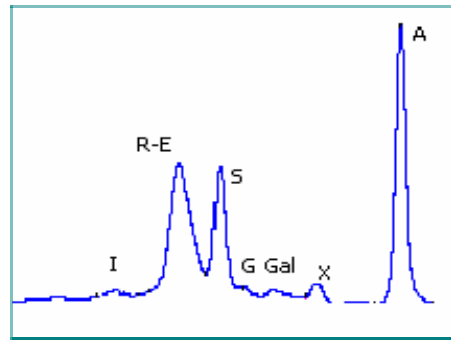


Figura II: Apariencia de un cromatograma de okara en la columna HPX-87P. I: inulina. R-E: rafinosa-estaquirosa S: sacarosa. G: glucosa. Gal: galactosa. X: xilosa. A: arabinosa

2) Columna Carbohydrate Analysis (300x3,9 mm) de *Waters*. μ Bondapack NH_2 , con un tamaño de partícula de sílice irregular de 10 μm y un tamaño de poro del relleno de 125 Å.

- Precolumna NH_2 de *Teknokroma*
- Temperatura del horno 40°C
- Fase móvil acetonitrilo-agua MilliQ (8:2) desgasificada a flujo 2 mL/min

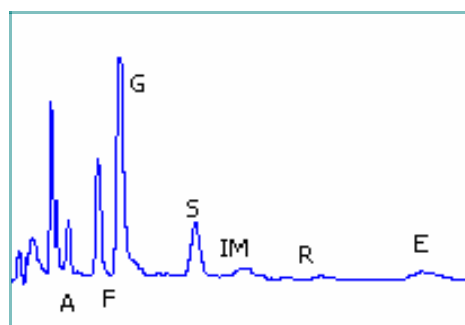


Figura III: Apariencia de un cromatograma de vaina de haba en la columna Carbohydrate Analysis. A: arabinosa. F: fructosa. G: glucosa. S: sacarosa. D: desconocido. R: rafinosa. E: estaquirosa

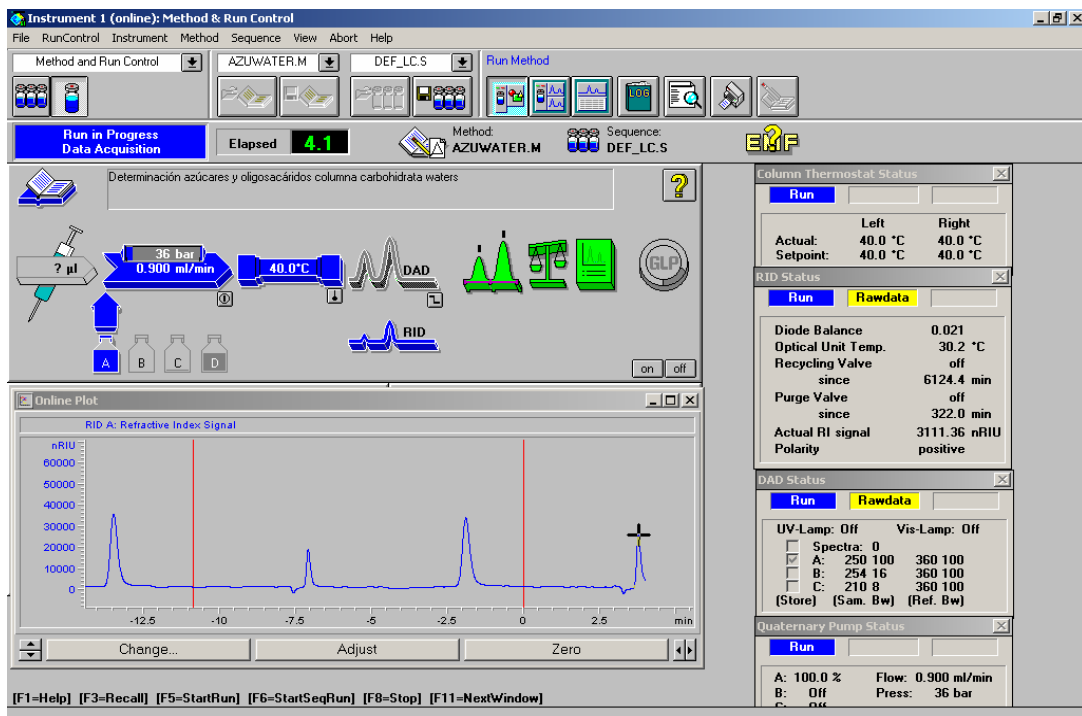


Figura IV: ChemStation Agilent para sistemas LC. Elementos integrados en el HPLC Agilent 1100 series: inyector, solvente, bomba cuaternaria, horno y RID

Cálculos

Los carbohidratos de bajo PM se identifican y cuantifican por medio de las rectas de calibración de los patrones comerciales de inulina, estaquiosa, rafinosa, sacarosa, glucosa, galactosa, arabinosa, fructosa (*Sigma*), isomaltosa (*Fluka*) y xilosa (*Merck*).

$$\text{Azúcar (g/100g)} = \frac{C_x f \times 100}{M}$$

donde:

C= concentración (mg/mL)

f= factor de dilución

M= peso de muestra (g)

Tabla V. Ecuaciones de regresión de los azúcares xilosa, arabinosa, fructosa, glucosa, galactosa, sacarosa, rafinosa y estaquiosa para la columna Carbohydrate Analysis (Waters)

Azúcar	Ecuaciones de la recta
Xilosa	$y=1,823x + 0,0,667$ $R^2= 0,9964$
Arabinosa	$y = 1,814 - 0,924$ $R^2= 0,9953$
Fructosa	$y = 3,255x - 0,4517$ $R^2= 0,9918$
Glucosa	$y = 0,2,342x + 0,063$ $R^2= 0,9930$
Galactosa	$y= 1,225x + 0,305$ $R^2= 0,9999$
Sacarosa	$y= 2,637x - 0,012$ $R^2= 0,9925$
Rafinosa	$y= 2,854x +0,005$ $R^2= 0,9881$
Estaquiosa	$y= 1,329x - 0,412$ $R^2= 0,9825$

Tabla VI. Ecuaciones de regresión de los azúcares inulina, estaquiosa, rafinosa, sacarosa, maltosa, glucosa, xilosa, galactosa, arabinosa y fructosa para la columna HPX-87P (Bio-Rad)

Azúcar	Ecuaciones de la recta
Inulina	$y=3,497x + 0,175$ $R^2= 0,9972$
Estaquiosa	$y= 3,499x - 0,2113$ $R^2= 0,9996$
Rafinosa	$y= 1,012x - 0,023$ $R^2= 0,9996$
Sacarosa	$y= 3,757x + 0,4191$ $R^2= 0,9992$
Glucosa	$y= 3,7416x + 0,1348$ $R^2= 0,9996$
Xilosa	$y= 3,211x - 0,61$ $R^2= 0,9999$
Galactosa	$y= 3,646x +0,165$ $R^2= 0,9998$
Arabinosa	$y= 3,463x + 0,205$ $R^2= 0,9987$
Fructosa	$y= 3,201x - 5,5013$ $R^2= 0,9999$

- Ensayos realizadosEnsayo de exactitud

Se efectúa para conocer las condiciones metodológicas de trabajo y se realiza mediante la adición de cantidades conocidas de cada uno de los patrones de azúcares cuantificados en la muestra (10 y 20 mg). Los resultados de estas pruebas efectuadas en ambas columnas cromatográficas HPX-87P (Bio-Rad) y Carbohydrate Analysis (Waters) se incluyen en la **Tabla VII**.

Tabla VII. Porcentajes de recuperación de azúcares y oligosacáridos bajo PM

Columna HPX-87P		Columna Carbohydrate Analysis	
Azúcar	Recuperación (%)	Azúcar	Recuperación (%)
Inulina	96,4	Inulina	-
Raf+Estaq	-	Rafinosa	105,6
Sacarosa	97,6	Estaquirosa	110,8
Glucosa	95,2	Sacarosa	97,2
Galactosa	94,1	Glucosa	92,3
Arabinosa	93,6	Arabinosa	-
Fructosa	94,5	Fructosa	95,7

Ensayo de precisión

La precisión se evalúa mediante el análisis de la misma muestra en días sucesivos (**Tabla VIII**).

Tabla VIII. Coeficientes de variación de azúcares y oligosacáridos bajo PM

Columna HPX-87P		Columna Carbohydrate Analysis	
Azúcar	CV (%)	Azúcar	CV (%)
Inulina	3,4	Inulina	-
Raf+Estaq	-	Rafinosa	5,2
Sacarosa	4,0	Estaquirosa	7,4
Glucosa	4,9	Sacarosa	4,1
Galactosa	4,5	Glucosa	4,6
Arabinosa	4,3	Arabinosa	-
Fructosa	5,4	Fructosa	3,2

3.7. DETERMINACIÓN DE LA FIBRA ALIMENTARIA

El objetivo fundamental de este trabajo es conocer el contenido de fibra alimentaria (FA) de las muestras seleccionadas. Existen distintos métodos de análisis de fibra como se indicó en el apartado 3.5 (Antecedentes), pero los dos más ampliamente utilizados son el método enzimático-gravimétrico de Prosky adoptado como método oficial por la AOAC (AOAC, 1995a; AOAC, 1995b) y el método enzimático-cromatográfico de Englyst (Englyst y col., 1994; Quigley y Englyst, 1994) para medir los polisacáridos no-almidón de la pared celular (PNA).

3.7.1. Método enzimático-gravimétrico de la AOAC

Se lleva a cabo según el método de Prosky (Prosky y col., 1984; Prosky y col., 1988). Se trata de un método enzimático-gravimétrico de determinación de FA, que se fundamenta en la digestión de las muestras con α -amilasa, proteasa y amiloglucosidasa para eliminar la proteína y el almidón presentes. Este método ha sido adoptado oficialmente por la AOAC y permite determinar por separado FI y FS: Método 991.42 (AOAC, 1995a) y Método 993.19 (AOAC, 1995b).

- Aislamiento del residuo de fibra alimentaria

Se pesa una cantidad conocida de muestra en un erlenmeyer de 500 mL (x6), se añaden 50 mL de tampón fosfato pH 6, se mide el pH en pHmetro *Crison* micro pH 2000 y se ajusta, si es necesario.

A continuación se añaden 0,1 mL de α -amilasa, se agita, se cubre el erlenmeyer con papel de aluminio y se introduce en un baño Unitronic 320 OR (*Selecta*) de agua a ebullición durante 30 minutos con agitación constante. Se enfría a temperatura ambiente y se añade NaOH 0,275 M para ajustar el pH a $7,5 \pm 0,1$.

Se adiciona a continuación 5 mg de proteasa. Se agita, se cubre el erlenmeyer con papel aluminio y se incuba a 60°C 30 minutos con agitación constante. Se deja enfriar a temperatura ambiente y se añaden 10 mL de HCl 0,325 M. Se mide el pH, que debe oscilar entre $4,5 \pm 0,2$.

Se añaden ahora 0,1 mL de amilogucosidasa, se agita, se cubre con papel aluminio y se incuba de nuevo a 60°C, 30 minutos con agitación constante.

- Determinación de fibra insoluble (FI)

El líquido anterior se filtra sobre un crisol de vidrio de placa filtrante (porosidad nº 2), al que se han adicionado 0,5 g de celite y que se ha incinerado previamente. Inmediatamente antes de la filtración se añade agua destilada al crisol y se aplica vacío para humedecer y redistribuir la capa de celite. Una vez efectuada la filtración, se lava el residuo con 2 porciones de 10 mL de agua destilada; el líquido filtrado y los lavados de agua se reservan para la determinación de la fibra soluble.

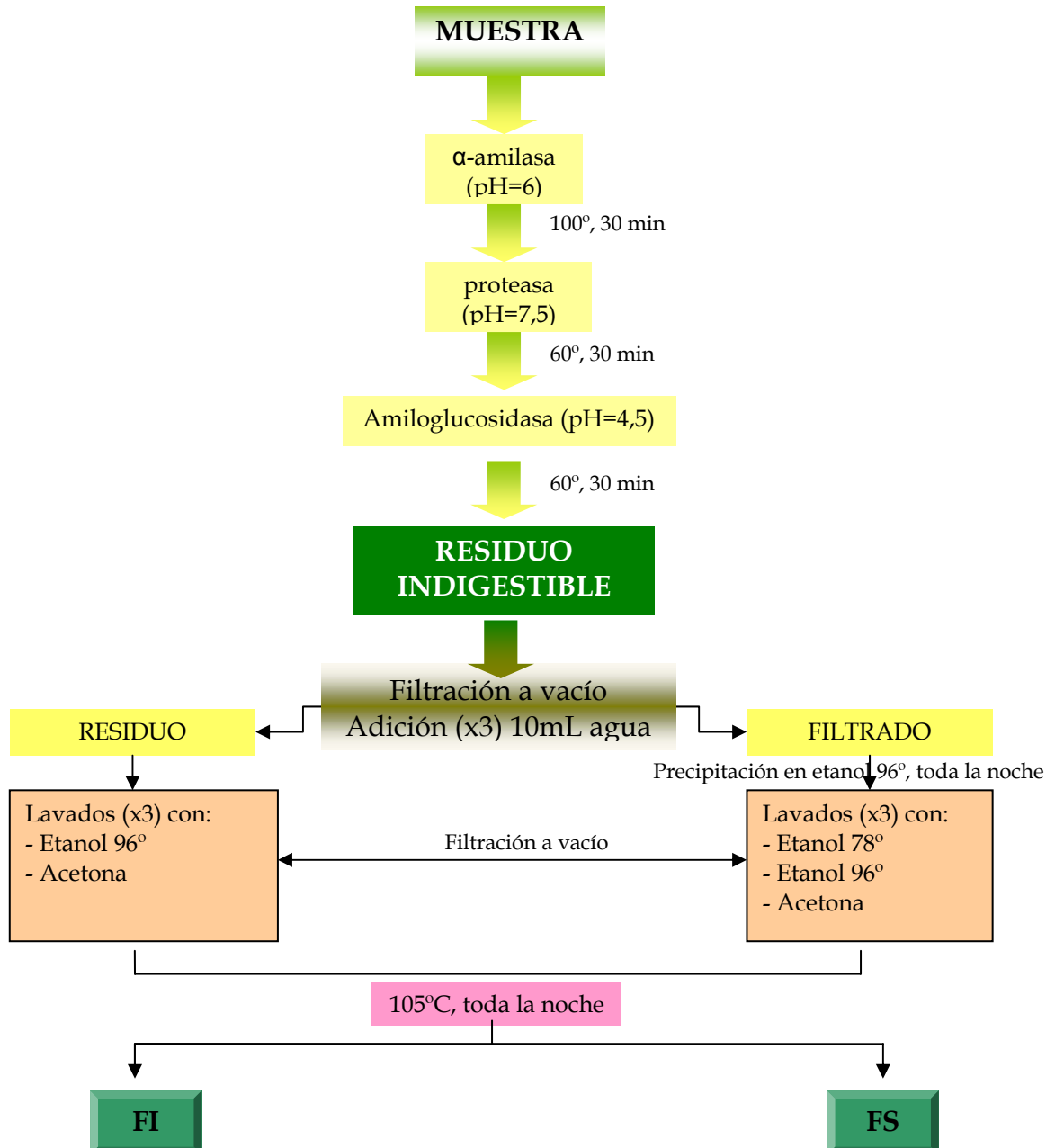
El residuo se lava con 2 porciones de 10 mL de etanol al 95-96% y con otras 2 de 10 mL de acetona. Los crisoles se secan en estufa *Memmert* a 105°C durante toda la noche. Se enfrían en desecador y se pesan.

- Determinación de fibra soluble (FS)

Los líquidos de filtrado se trasvasan a un erlenmeyer de 500 mL y se añade una cantidad de etanol al 95-96%, previamente calentado, igual a 4 veces el volumen del filtrado. Se deja en reposo durante toda la noche.

A continuación los líquidos así obtenidos se filtran en un crisol (porosidad nº 2) con celite (0,5g) previamente pesado e incinerado. Antes de la filtración se redistribuye la capa de celite con etanol al 78%, aplicando vacío para secarla y homogeneizarla.

El residuo obtenido tras la filtración se lava con tres porciones de 20 mL de etanol al 78%, dos porciones de 10 mL de etanol al 95% y dos de 10 mL de acetona. El crisol se deseca en estufa a 105°C durante toda la noche, se enfría en desecador y se pesa.



Esquema I: Aislamiento de un residuo de fibra alimentaria. Separación de FI y FS mediante el método de la AOAC

En los residuos insoluble y soluble se determinan proteínas (AOAC, 1995c), en un quemador *Büchi* Digestor Unit, mod. 425 y finalizada la digestión se destila en un destilador *Büchi* Distillation Unit, mod. B-316, y cenizas (AOAC, 1995d) en mufla *Carbolite* CSF 1100 a 550 °C.

Cálculos

$$FI (\%) = \frac{RI - P - C}{M} \times 100$$

donde:

RI = residuo insoluble (g)

P = proteínas (g)

C = cenizas (g)

M = peso de la muestra (g)

$$FS (\%) = \frac{RS - P - C}{M} \times 100$$

donde:

RS = residuo soluble (g)

P = proteínas (g)

C = cenizas (g)

M = peso de la muestra (g)

3.7.2. Método enzimático-cromatográfico de Englyst

Este método (Englyst y col., 1994; Quigley y Englyst, 1994) consiste en el tratamiento del alimento con enzimas simulando el proceso de digestión en el tracto gastrointestinal humano para conseguir un residuo en el que sólo está la parte no digerible por las enzimas digestivas humanas, es decir la fibra alimentaria. Posteriormente, el residuo se somete a una hidrólisis para obtener los monómeros que forman la fibra alimentaria, después son transformados en

derivados acetilados muy volátiles mediante un proceso de derivatización antes de proceder a su análisis por cromatografía de gases.

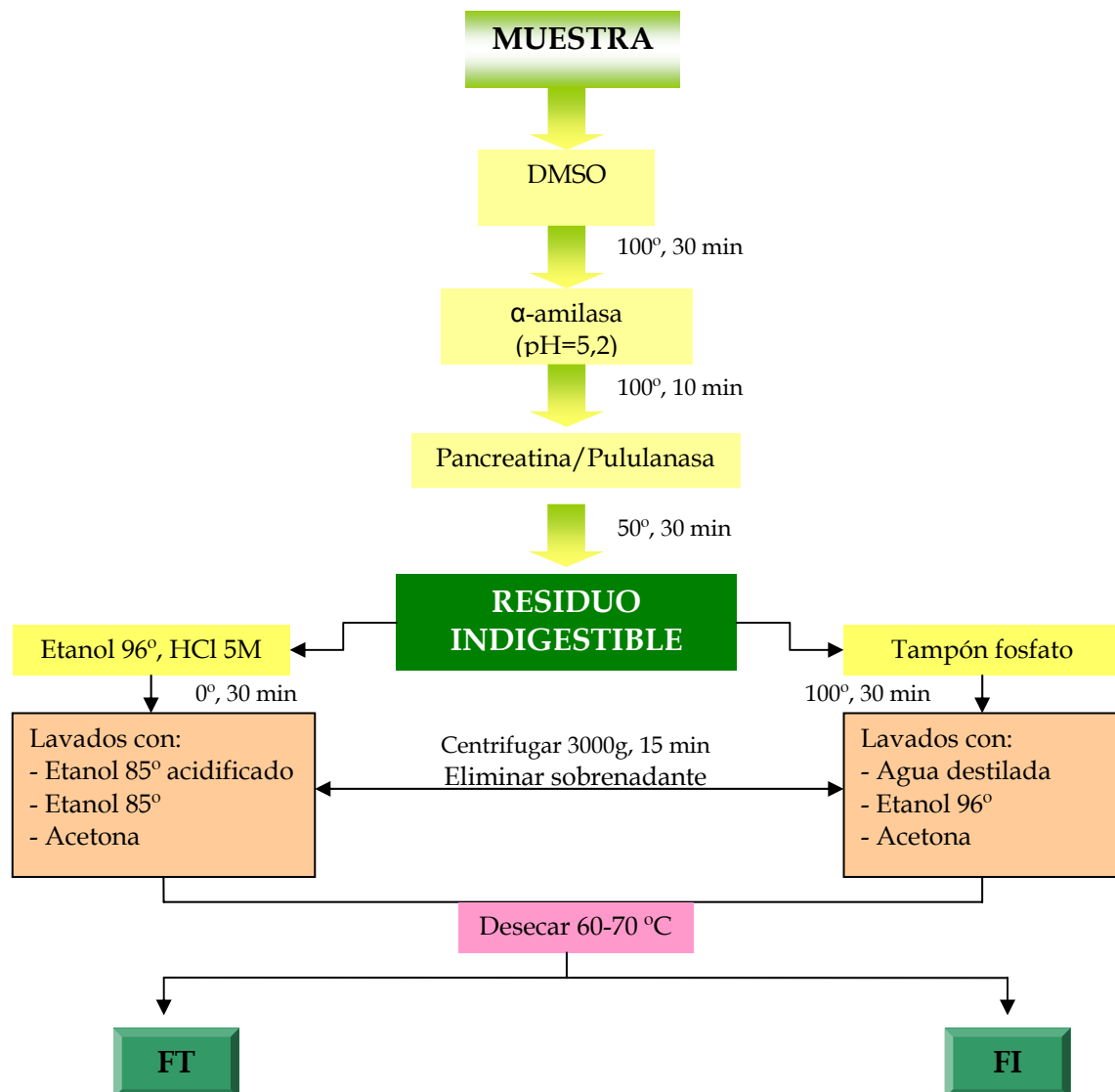
Las muestras reciben como preparación previa un desengrasado debido a que el okara presenta un alto contenido de grasa que dificulta la determinación de fibra, de manera que se decide aplicar el mismo desengrasado a todos los subproductos estudiados en esta memoria. Para ello, a los tubos con la muestra se les adicionan 15 mL de acetona. Se tapan y se agitan constantemente durante 30 minutos. Posteriormente, se centrifugan a 3000 g durante 15 minutos en una centrifuga Universal 16R de *Hettich Zentrifugen* obteniendo un sobrenadante que se retira por aspiración. El residuo se agita vigorosamente en un vortex para dispersarlo en el tubo. Después se disponen los tubos sin tapar en un baño de agua entre 60-75 °C, y se mantienen en agitación continua hasta evaporación total de la acetona.

- Tratamiento enzimático

El aislamiento del residuo de fibra se realiza por un tratamiento enzimático destinado a la eliminación del almidón y las proteínas. En un tubo de 50-60 mL, se pesa la cantidad adecuada de muestra liofilizada (y desengrasada en el caso del okara) y se añade dimetilsulfóxido (DMSO) agitando para evitar que la muestra quede adherida a las paredes del tubo. El ensayo se realiza por cuadruplicado. Este análisis se repitió tres veces para ver la reproducibilidad.

A continuación la muestra se introduce en un baño de agua hirviendo con agitador magnético para conseguir una agitación constante durante 30 minutos. Finalizado el tiempo de calentamiento se añaden 8 mL de una solución del enzima Termamyl (α -amilasa termoestable) en tampón acetato sódico de pH=5,2 (solución enzimática I). Se colocan los tubos en un baño de agua a 100°C durante 10 minutos.

Posteriormente los tubos se trasladan a un baño de agua a 50°C durante 3 minutos. Se sacan del baño y se les adiciona 0,5 mL de una solución de pancreatina y pululanasa (solución enzimática II). Los tubos se introducen en un baño de agua a 50°C, donde se mantienen 30 minutos, y posteriormente se llevan a un baño de agua a 100°C durante 10 minutos.



Esquema II: Aislamiento de un residuo de fibra alimentaria. Separación de FT y FI mediante el método de Englyst

Una vez concluido el tratamiento enzimático, se procede a la eliminación del sobrenadante y al lavado del residuo obtenido. A partir de aquí, dos tubos se destinan al análisis de fibra insoluble y los otros dos para fibra total.

- Análisis de fibra total

A los dos tubos elegidos para este análisis, se les añade 0,15 mL de HCl 5M y, posteriormente, 40 mL de etanol absoluto acidificado. Se mezcla por inversión y se introducen en un baño de hielo, donde se dejan en reposo durante 30 minutos. Posteriormente, se centrifugan a 3000g durante 15 minutos. El sobrenadante se elimina por aspiración con pipeta Pasteur utilizando vacío. El residuo resultante se lava con etanol al 85% acidificado, etanol absoluto y finalmente con acetona, siguiendo el mismo procedimiento de lavado, centrifugación y aspiración con vacío en cada paso.

El tubo con el residuo obtenido después del lavado con acetona se introduce en un baño con agitación constante a 60°C para la evaporación de la acetona restante y el consiguiente desecado total del residuo.

- Análisis de fibra insoluble

A los tubos destinados al análisis de fibra insoluble se les añaden 40 mL de tampón fosfato sódico y se llevan a un baño de agua hirviente, con agitación constante durante 30 minutos.

Los tubos se retiran del baño y se espera a que alcancen la temperatura ambiente. Se centrifugan a 3000g durante 15 minutos y se retira el sobrenadante por aspiración a vacío.

Posteriormente se les añade unos 10mL de agua y se mezcla en el vortex para la dispersión total del residuo. A continuación se diluyen hasta aproximadamente 50 mL de agua, se mezcla y se centrifugan a 3000g durante 15 minutos. Esta

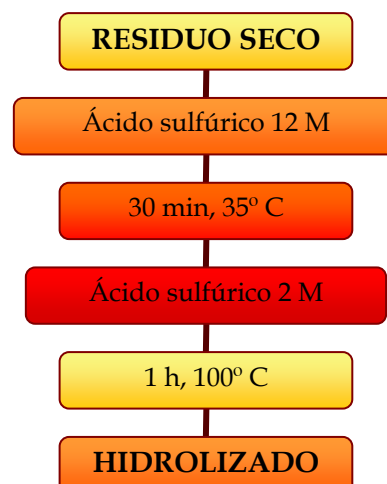
etapa se repite con etanol absoluto y finalmente con acetona. El residuo obtenido después del lavado con acetona se introduce en un baño a 60°C sometido a agitación magnética constante y agitación en vortex cada 5-10 minutos para conseguir el desecado total del residuo insoluble.

Con este procedimiento se obtienen dos residuos uno para fibra total y otro para fibra insoluble.

- Hidrólisis de los polisacáridos

Esta etapa del proceso consiste en dos hidrólisis, la primaria con ácido sulfúrico concentrado seguida de la secundaria con el mismo ácido diluido.

La hidrólisis se realiza mediante la adición de 5 mL de ácido sulfúrico 12 M a los residuos obtenidos en la etapa del aislamiento de fibra (FT y FI). Se agitan en el vortex y se introducen en un baño de agua con placa agitadora a 35°C durante 30 minutos. Después se añaden 25 mL de agua destilada a los tubos y se mantienen en un baño de agua hirviente durante una hora.



Esquema III: Hidrólisis de los polisacáridos de los residuos de FT y FI aislados mediante el tratamiento enzimático

El hidrolizado se deja enfriar hasta temperatura ambiente. En esta etapa el proceso podría ser interrumpido, conservando el hidrolizado a 4°C durante un máximo de 48 horas.

- Separación y cuantificación de los monosacáridos por GLC

a) Preparación de los derivados de alditol

De los hidrolizados obtenidos se toma un volumen conocido, al cuál se le añade la β -D-alosa (1mg/1mL) como patrón interno. A continuación se adiciona NH_4OH 12 M, se mezcla en el vortex y se comprueba la alcalinidad del medio. Se añaden 0,5 μl de octan-2-ol y 0,1 mL de una solución de hidróxido amónico 6M que contiene 200 mg/mL de tetraborato sódico, la cuál se prepara en el momento de ser utilizada. Se mezcla en el vortex y se introducen en un baño a 40°C. Después se adiciona ácido acético glacial y se mezcla de nuevo.

Se transfiere un volumen determinado de esta solución a tubos de cristal y se añade 1-metil imidazol y anhídrido acético. Se procede a la mezcla inmediata de los tubos en el vortex, y se deja en reposo durante 10 minutos para que la reacción se lleve a cabo. A continuación se añade etanol absoluto, se mezcla y se deja en reposo durante 5 minutos. Se añade agua destilada, se mezcla y de nuevo se deja en reposo durante 5 minutos. Posteriormente, se adiciona solución de azul de bromofenol y se mezcla.

Los tubos se disponen en un baño de hielo y se añaden 5 mL de KOH 7,5 M, se deja unos minutos en reposo para volver a añadir otros 5 mL de KOH 7,5 M. Los tubos se tapan y se mezclan bien por inversión. Se dejan nuevamente en reposo hasta que la separación en dos fases es completa. La fase formada en la parte superior es transferida mediante pipeta automática a un vial de vidrio. Los viales de vidrio se almacenan conservándolos en nevera a 4-5°C para su posterior inyección en el cromatógrafo de gases.



Esquema IV: Separación y cuantificación de los monosacáridos hidrolizados por GLC

b) Identificación y cuantificación de los monosacáridos

El análisis de la fibra alimentaria se ha realizado en un cromatógrafo de gases *Perkin-Elmer* modelo *Autosystem*, dotado con un ordenador *PE Nelson* modelo 1020 para el registro de datos y una impresora *Epson LX-400* para la impresión de los cromatogramas. La columna utilizada ha sido SP-2330 (longitud 30m, diámetro interno 0,25mm y espesor 0,25 μ) y como gas portador nitrógeno. Las condiciones de temperatura usadas en el cromatógrafo son: para el inyector 275°C, para el horno 240°C y para el detector 275°C.

El integrador utilizado mide áreas que se transforman en concentraciones aplicando un factor de respuesta calculado durante la calibración del equipo. Para la calibración se usa una mezcla de azúcares patrón y el patrón interno β -D-alosa.

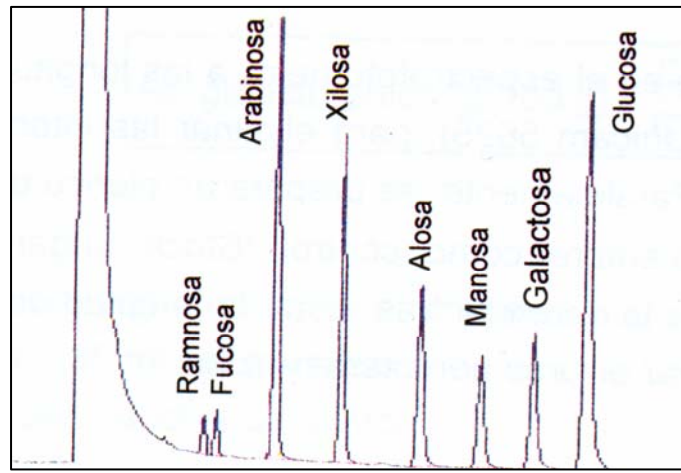


Figura V. Cromatograma (GLC) de los azúcares neutros de la fibra alimentaria

La cantidad de azúcares individuales (expresada como gramos de monosacárido por 100 g de muestra) se calcula de la siguiente forma:

$$\text{Monosacáridos (g/100 g)} = \frac{C \times f}{P} \times 100$$

donde:

C = Concentración del monosacárido (mg/mL)

f = factor de dilución

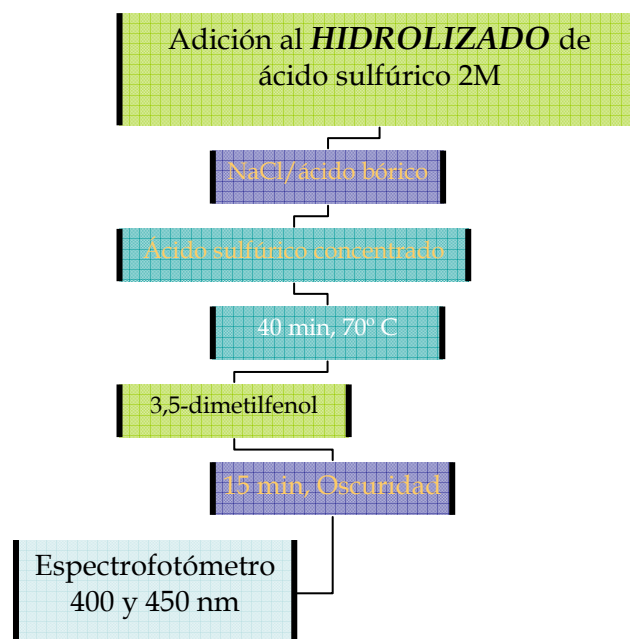
P = peso de la muestra (g)

- Cuantificación de ácidos urónicos

Para la determinación de ácidos urónicos se utiliza el método de Scott (1979), modificado por Rodríguez y col. (1992). El método se fundamenta en la formación de un complejo coloreado debido a la reacción que se produce entre el 3,5-dimetilfenol y los ácidos urónicos. El color desarrollado se mide con un espectrofotómetro a dos longitudes de onda diferentes: 450 nm y 400 nm.

En tubos separados se disponen la solución blanco (ácido sulfúrico 2M), la solución del punto 100 y la dilución prevista del hidrolizado de los residuos de

fibra. Se añaden 0,3 mL de la solución de NaCl/ácido bórico, y sucesivamente se adicionan 5 mL de ácido sulfúrico concentrado procediendo a su agitación en vortex inmediatamente. Los tubos se introducen en un baño de agua a 70°C y se mantienen así durante 40 minutos. Pasados este tiempo, los tubos se retiran y se enfrían hasta temperatura ambiente. Después se añaden 2 mL del reactivo 3,5-dimetilfenol a cada tubo y se agita en vortex inmediatamente.



Esquema V: Cuantificación de los ácidos urónicos a partir del hidrolizado de los polisacáridos aislados mediante el tratamiento enzimático

Los tubos se llevan a oscuridad durante 15 minutos. El color desarrollado se determina a las longitudes de onda de 400 y 450 nm en un espectrofotómetro (*Pharmacia LKB-Ultrospec Plus Spectrophotometer*) frente a la solución blanco. La absorbancia considerada es la obtenida de restar a la absorbancia de la longitud de onda de 450 nm, la absorbancia a 400 nm, lo que permite eliminar errores por interferencias.

La cantidad de ácidos urónicos (expresada como gramos por 100 g de muestra) se calcula como:

$$\text{Ácidos urónicos (g/100 g)} = \frac{A_m \times C_p \times 30 \times f}{A_p \times P} \times 100$$

donde:

A_m = Absorbancia de la muestra (A450 - A400)

C_p = Concentración del patrón (0,1 mg/mL)

30 = Volumen total de la solución de la muestra

f = Factor de dilución

A_p = Absorbancia del patrón (A450 - A400)

P = Peso de la muestra (mg)

Previamente al análisis de los ácidos urónicos de la muestra se procede a la calibración. El patrón es ácido galacturónico (*Sigma*) a una concentración de 500 $\mu\text{g/mL}$.

Se preparan diferentes diluciones para realizar la calibración, tomando distintos volúmenes de la solución patrón en tubos separados, a los que se lleva hasta 10 mL con ácido sulfúrico 2M para dar las soluciones diluidas del ácido galacturónico entre 20 y 120 $\mu\text{g/mL}$. La solución con concentración de 100 $\mu\text{g/mL}$ (punto 100) es la que se utiliza para los análisis de rutina porque da la absorbancia más parecida a la de las muestras. La ecuación de la recta de calibración y su correspondiente coeficiente de correlación son:

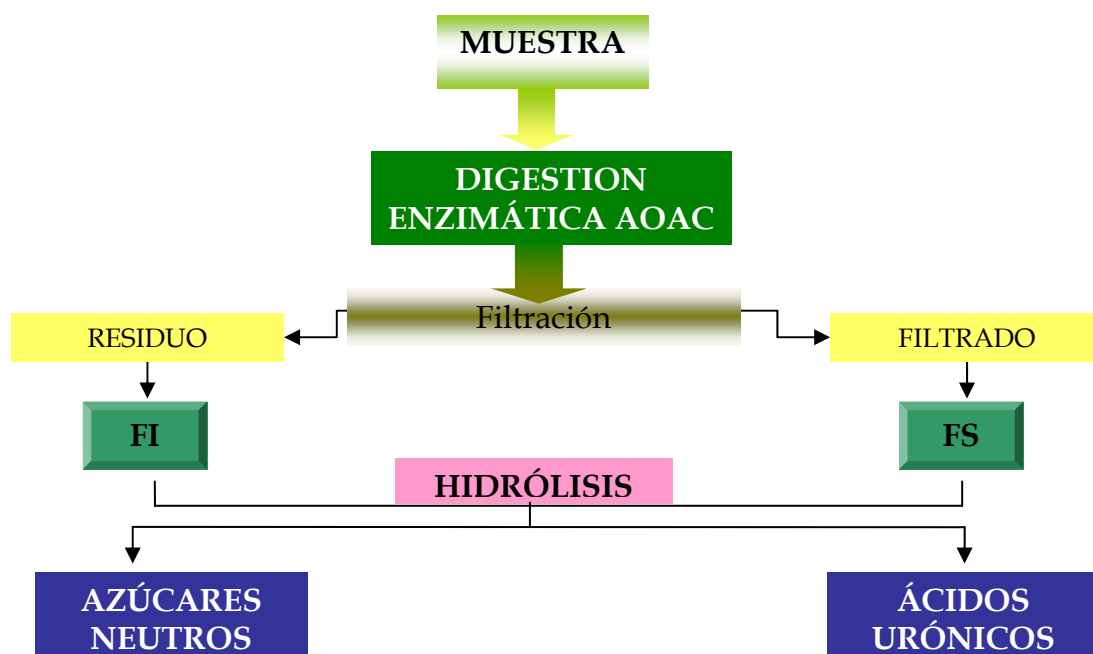
$$y = 0,0062x + 0,0213$$

$$R^2 = 0,999$$

3.7.3. Método enzimático-cromatográfico aplicado a los residuos de la AOAC

En los residuos procedentes de la aplicación del método enzimático-gravimétrico de la AOAC (FI y FS) se lleva a cabo un estudio pormenorizado por medio de la hidrólisis de los polisacáridos presentes en esos residuos con ácido sulfúrico 12M (35°C, 30 minutos) y después se añade agua destilada hasta 2M (100°C, 60 minutos). De los monómeros resultantes se realiza un estudio cromatográfico según describe el método de Englyst y col. (1994) y espectrofotométrico para los ácidos urónicos (Scott, 1979; Rodríguez y col., 1992).

Para realizar este método se partió de muestra desengrasada previamente para poder comparar los monómeros con los obtenidos en el método de Englyst y con los del fraccionamiento explicado en el apartado 3.8 (Material y Métodos).



Esquema VI: Aislamiento de un residuo de fibra alimentaria. Separación de FT y FI mediante el método de Englyst

3.7.4. Ensayos realizados

A continuación se detallan los ensayos realizados para la calibración y estudio de la precisión de los métodos cromatográficos.

Calibración

Para efectuar la calibración del cromatógrafo se emplea la solución líquida estándar Stock Sugar Mixture (*Sigma*) constituida por una mezcla de los patrones ramnosa, fucosa, arabinosa, xilosa, manosa, galactosa y glucosa.

Se realiza el proceso de derivatización para formar los derivados acetilados correspondientes, posteriormente se inyectan en el cromatógrafo de gases y se calibra según el tiempo de retención característico de cada patrón.

Ensayo de precisión

La precisión se evalúa mediante el análisis de la misma muestra en días sucesivos (**Tabla IX**).

Tabla IX. Coeficientes de variación de azúcares y oligosacáridos bajo PM

Azúcar	CV (%)
Ramnosa	5,37
Fucosa	6,22
Arabinosa	4,29
Xilosa	6,33
Manosa	2,91
Galactosa	2,34
Glucosa	3,49

3.8. FRACCIONAMIENTO DE LA FIBRA ALIMENTARIA

Además del estudio de la cantidad de fibra que presentan las muestras seleccionadas se ha querido profundizar en el conocimiento de las estructuras

que la integran. Para ello se ha realizado un fraccionamiento secuencial, basado en los métodos que describen Weightman y col. (1994) y Huisman (2000), con diferentes extractantes que separan los distintos polímeros dependiendo de su solubilidad o no en ellos.

- Aislamiento de la fibra alimentaria

Dadas las características de las muestras el aislamiento y posterior fraccionamiento de la fibra alimentaria requiere las siguientes etapas previas:

Desengrasado. Únicamente en el caso del okara, las muestras son desengrasadas utilizando éter etílico en un extractor Soxhlet Selecta (James, 1995).

Desproteínizado. Una cantidad conocida de muestra se introduce en tubos de plástico de capacidad 50-60 mL. A esa cantidad se le añaden 20 mL de solución lauril sulfato sódico 1,5% + 10mM 1,4-ditioeritritol y se mantiene en agitación constante durante 3 horas a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifuga a 3000g durante 20 minutos en una centrifuga Universal 16R de Hettich Zentrifugen. Se recoge el sobrenadante. Al residuo se le adicionan 30 mL de agua y se agita en el vortex, después se centrifuga a 3000g durante 15min. Se recoge el sobrenadante y el residuo. Los sobrenadantes se analizan por el método de Scott (1979), modificado por Rodríguez y col. (1992) para la determinación de ácidos urónicos. Esta prueba se realiza para saber si se extrajeron sustancias pécticas.

Extracción de azúcares solubles. Al residuo desengrasado y desproteínizado se le añaden 40 mL de etanol al 85% y se lleva a un baño a una temperatura de 60-70°C durante 20 minutos en agitación constante. Después se centrifuga a 3000g durante 15 minutos en una centrifuga Universal 16R de Hettich Zentrifugen. Se recoge el sobrenadante y se vuelve a repetir la operación en las mismas condiciones, unificando posteriormente dichos sobrenadantes. Al residuo se le añaden 40 mL

de acetona, se agita en el vortex y se centrifuga a 3000g un tiempo de 15 minutos. Se retira el sobrenadante y se dispone en un baño a 60-70°C con agitación constante para desecarlo, obteniendo así el residuo insoluble en alcohol (RIA). Este RIA está además desengrasado y desproteinizado, por lo que es un residuo rico en fibra alimentaria. Los sobrenadantes alcohólicos se someten a la determinación de ácidos urónicos (Scott, 1979; Rodríguez y col., 1992) para saber si se extrajeron sustancias pécticas.

- Separación secuencial de los polisacáridos del residuo rico en fibra alimentaria (RIA)

El RIA se extrae secuencialmente. De esta manera se separan los distintos componentes de la fibra dependiendo de su solubilidad en el extractante elegido. El método de fraccionamiento utilizado consiste en:

✧ Adición a las muestras de CDTA 0,05 M y NH₄-oxalato 0,05 M en tampón acetato sódico 0,05 M (pH 4,8-5,2). A continuación se llevan a un baño de 70°C con agitación constante durante 1 hora. Posteriormente se centrifugan a 4500g durante 30 minutos y se filtran por papel GF/A (Whatman) a vacío. Así se obtienen un extracto y un residuo. El residuo se somete a una segunda extracción con los mismos reactivos y a un lavado con agua destilada. Los extractos y el lavado se unen en lo que se denominan *Extracto-CDTA*.

✧ Al residuo de la extracción anterior se le añade NaOH 0,05M y se dispone en un baño a 2°C durante 1 hora en agitación constante. Se centrifuga a 4500g durante 30 minutos y se filtra por papel GF/A (Whatman) a vacío. Se obtiene un extracto y un residuo. Esta extracción se repite una vez más y a continuación se lleva a cabo un lavado con agua destilada. Los extractos y el lavado se unen en *Extracto-NaOH*.

✧ Extracción del residuo que queda del paso anterior con KOH 1M durante 2 horas en agitación constante y temperatura ambiente. Se centrifuga a 4500g durante 30 minutos y se filtra por papel GF/A (Whatman) a vacío. El residuo se somete a una segunda extracción en las mismas condiciones y a un lavado con agua destilada. Los extractos y el lavado se unen en lo que se denomina *Extracto-KOH 1M*.

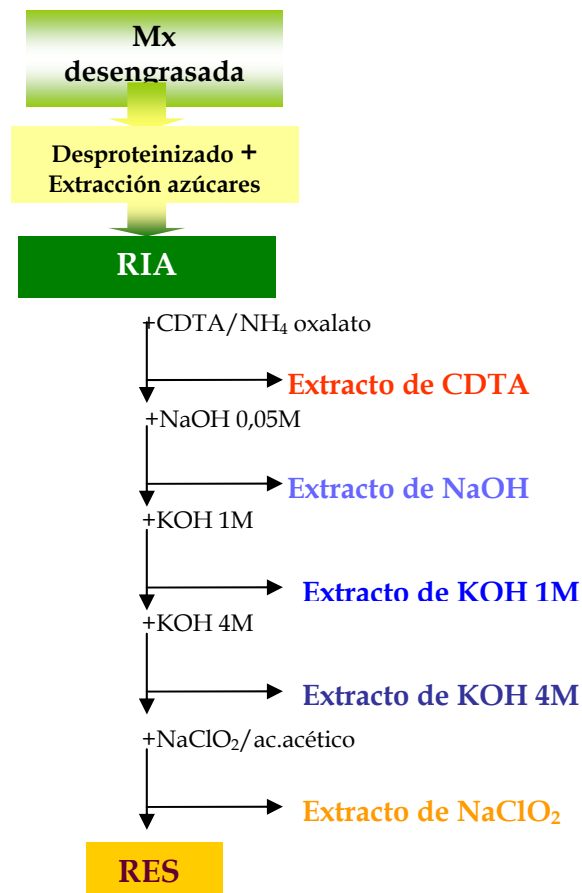
✧ Extracción del residuo anterior con KOH 4M durante 2 horas en agitación constante y temperatura ambiente. Se centrifuga a 4500g durante 30 minutos y se filtra por papel GF/A (Whatman) a vacío. El residuo se somete a una segunda extracción con los mismos reactivos y a un lavado con agua destilada. La suma de extractos y líquido de lavado se denomina *Extracto-KOH 4M*.

✧ Al residuo que queda del paso anterior se le añade NaClO₂ 0,3% a pH 4,2-4,7 (ácido acético 0,12%) y se dispone en un baño a 75°C durante 2 horas en agitación constante. Se centrifuga a 4500g durante 30 minutos y se filtra por papel GF/A (Whatman) a vacío. El residuo se somete a una segunda extracción con los mismos reactivos y a un lavado con agua destilada. Los extractos y el lavado constituyen el *Extracto-NaClO₂*.

✧ El residuo restante se suspende en 40 mL de agua destilada, se agita en vortex. Este residuo está constituido fundamentalmente por polisacáridos celulósicos y se denomina *RES*.

Todos los extractos y el RES se llevan a pH 5±0,2 con ácido acético glacial. Se concentran en rotavapor (Büchi R-114) utilizando un baño (Büchi B-480) a una temperatura de 50°C y una bomba de vacío (Büchi B-169) hasta un volumen de 100 mL. Posteriormente, se sometieron a diálisis contra H₂O destilada. Para la diálisis se utilizaron membranas con un poro de 2,4 nm aproximadamente (12-14 KDa) de Medicell Internacional Ltd. Se dispusieron volúmenes de unos 100 mL de extracto

en 5 L de H₂O destilada durante cuatro días a una temperatura de 4°C con cambio de agua cada 24 horas. Después se liofilizan de forma extremadamente cuidadosa debido a las características de los extractos y del liofilizado posterior.



Esquema VII: Fraccionamiento de la fibra alimentaria.

- **Estudio de las fracciones: análisis, identificación y cuantificación de los monómeros presentes en los extractos y en el residuo.**

El fraccionamiento secuencial de la fibra alimentaria se realiza cinco veces por triplicado. Los liofilizados obtenidos se recogen en tubos de plástico y se someten a hidrólisis y posterior derivatización para medir los monómeros que conforman los polisacáridos por cromatografía de gases (Englyst y col., 1994). En estos hidrolizados se cuantifican también ácidos urónicos (Scott, 1979, Rodríguez y col., 1992). En una alícuota del liofilizado procedente de cada uno

de los extractos se determina el Ca por absorción atómica (Sagardoy, 2002) y el metanol por HPLC (Ng y col, 1998).

3.9. DETERMINACION DE METANOL POR CROMATOGRAFIA DE GASES

En los liofilizados procedentes de cada una de las fracciones obtenidas anteriormente se determina el grado de metilesterificación (Ng y col., 1998).

Determinación

A una cantidad de liofilizado (≈ 15 mg) se le añaden 2 mL de agua. Se agita en vortex hasta su total dispersión y se introduce en baño de ultrasonidos Ultrasons-H de *Selecta* durante 10 minutos. Se añaden 0,8 mL de NaOH 2M y se dispone en un baño a 20°C durante 1 hora en agitación constante. Se agita a intervalos regulares de 10 minutos en vortex para favorecer la desesterificación de la muestra.

Después, para neutralizar, se añaden 0,8 mL de HCl 2M y se lleva a un baño a 25°C con agitación constante durante 15 minutos. El líquido neutralizado se filtra por filtros Millex 0,45 μm . Este filtrado se dispone en viales y se congela para posterior análisis en el cromatógrafo de gases (Perkin-Elmer modelo Autosystem) equipado con la columna SP-2330 de 30m x 0,25mm y 0,25 μm de espesor, utilizando nitrógeno como gas portador. Las condiciones de temperatura usadas son: para el inyector 250°C, para el horno 140°C y para el detector 200°C.

El integrador utilizado mide áreas que se transforman en concentraciones (mL/100mL) aplicando un factor de respuesta calculado durante la calibración del equipo. Para la calibración se usa como patrón externo metanol en distintas concentraciones con un intervalo entre 0,1% y 0,00625%.

Cálculos

$$\text{Metanol (mg/100g)} = \frac{Cxdx100}{Mx}$$

donde:

C = Concentración

d (densidad del metanol)= 0,791

Mx = Peso de la muestra

$$\text{GM} = \frac{M}{AU} \times 100$$

donde:

GM= Grado de metilación

M= Cantidad de metanol (g/100g)

AU= Cantidad de ácidos urónicos (g/100g)

3.10. DETERMINACIÓN DE LIGNINA

Esta determinación está basada en el método de lignina Klason (Theander y Westerlund, 1986) y consiste en dos hidrólisis, la primaria con ácido sulfúrico concentrado seguida de la secundaria con el mismo ácido diluido. La hidrólisis primaria se lleva a cabo mediante la adición de 5 mL de ácido sulfúrico 12 M a la muestra, se agita y se introduce en un baño con placa agitadora a 35°C durante 30 minutos. Para la hidrólisis secundaria, se añaden 25 mL de agua destilada y se disponen en un baño de agua hirviente una hora.

El hidrolizado se filtra por un crisol (porosidad nº 2) con celite (0,5 g) previamente pesado e incinerado. Antes de la filtración se redistribuye la capa de celite con etanol al 78%, aplicando vacío para secarla y homogeneizarla. El residuo obtenido tras la filtración se lava con tres porciones de 20 mL de etanol al 78%, dos porciones de 10 mL de etanol al 95% y dos de 10 mL de acetona. El

crisol se deseca en estufa a 105°C durante toda la noche, se enfría en desecador y se pesa.

3.11. ESTUDIO DE LAS PRINCIPALES PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS

En este apartado se estudian tres propiedades: el hinchamiento (SC), la capacidad de retención de agua (WRC) y la capacidad de retención de grasa (ORC) (Robertson y col., 2000).

a) Hinchamiento

Se pesan 500 mg de muestra en tubos graduados de 25±0,1 mL. Se añaden 10 mL de agua y se agita suavemente. Se dispone en una superficie nivelada a temperatura ambiente durante 18 horas. Pasado este tiempo se mide el volumen ocupado por la muestra. La capacidad de hinchamiento se expresa en mL/g de peso seco.

b) Capacidad de retención de agua

En tubos de centrifuga de 50 mL se pesan 500 mg de muestra, a la que se le añaden 30 mL de agua destilada y se agita. La muestra se deja en reposo a temperatura ambiente durante 18 horas y se centrifuga a 3000g durante 20 minutos, se separa el sobrenadante y se pesa el residuo. Los residuos se disponen en estufa Memmert con ventilación a 40°C hasta sequedad y se vuelven a pesar. La capacidad de retención de agua se expresa en g de agua/g peso seco.

c) Capacidad de retención de grasa

Se siguió el protocolo anterior sustituyendo el agua por aceite de oliva virgen extra comercial (0,7° de acidez). La capacidad de retención de grasa se expresa en g de aceite/g peso seco.

Resultados y Discusión

1. PLANTEAMIENTO

Existen muchas referencias del papel beneficioso que supone la ingesta de legumbres. Por otro lado, la industria alimentaria genera anualmente una gran cantidad de subproductos que no son aprovechados o se utilizan para alimentación animal u otros fines distintos. Además estos subproductos pueden ser ricos en ingredientes funcionales, de ahí la necesidad de caracterizarlos y potenciar su posible uso en alimentación humana.

Esta tesis ha pretendido el conocimiento de tres subproductos de leguminosas potencialmente interesantes desde el punto de vista de los alimentos funcionales, pero también ha profundizado en la fracción de fibra alimentaria analizándola por distintos métodos para comprender mejor e intentar dilucidar las estructuras que la conforman.

2. CARACTERIZACIÓN DE LAS MUESTRAS ESTUDIADAS

En este apartado se va a comentar la composición química de los subproductos elegidos para este estudio de una manera general y en segundo lugar de una forma más detallada para algunos componentes.

2.1. COMPOSICIÓN CENTESIMAL

La *fibra alimentaria* es el objetivo central de este estudio y los subproductos elegidos, okara, vaina de haba y vaina de guisante tienen en común que esta fibra es una de las fracciones más importantes, aunque claramente mayor en vaina de guisante y okara, $58,58 \pm 1,21$ g/100g y $55,48 \pm 0,34$ g/100g, respectivamente, que en vaina de haba, $40,11 \pm 0,69$ g/100g. Estos valores de fibra total provienen de la suma de la fibra insoluble y de la fibra soluble obtenidos mediante la aplicación del método de la AOAC (1995a,b) (**Tabla 1**).

Tabla 1: Caracterización de los subproductos de leguminosas: okara, vaina de haba y vaina de guisante (g/100g m.s)

	OKARA	V. HABA	V. GUISANTE
<i>Grasa</i>	8,47±0,21	1,34±0,46	1,33±0,02
<i>Proteínas</i>	36,36±0,32	13,59±0,17	10,78±0,28
<i>Cenizas</i>	3,67±0,04	6,29±0,09	6,64±0,46
<i>Almidón</i>	0,46±0,04	11,73±0,16	3,71±0,08
<i>Azúcares solubles</i>	3,69±0,18	26,54±0,36	22,50±0,13
<i>Fibra alimentaria</i>	55,48±0,34	40,11±0,69	58,58±1,21

Valor promedio ± desviación estándar.

La composición del subproducto okara va a depender sobre todo del procedimiento que se emplee en la obtención de la leche de soja (Erdman y col., 2004). El okara es un alimento muy nutritivo, con una gran cantidad de proteínas (36,36±0,32 g/100g), y obviamente con un alto contenido de fibra alimentaria (55,48±0,34 g/100g) (**Tabla 1**). El valor de fibra para la semilla de soja es de 24,37 g/100g, próximo a los publicados por van der Riet y col., (1989), lo que supone la mitad del contenido del subproducto (**Gráfico 1**).

Las vainas de las leguminosas, como las del haba y las del guisante, suelen desecharse de manera que la industria alimentaria se encuentra con un problema de gestión de residuos. En las vainas estudiadas se establece una comparación con su correspondiente semilla. A diferencia del okara, que procede de la misma semilla, las vainas y las semillas que contienen son partes distintas en el fruto y por lo tanto su composición química es diferente.

La fracción más importante en las dos vainas es la fibra alimentaria, el valor en el guisante (58,58±1,21 g/100) es mayor que en haba (40,11±0,69 g/100g) (**Tabla 1**). El guisante crudo presenta un contenido de fibra (NDF) de 14,6 g/100g según Fernandes Abreu y Martins Bruno-Soares (1998), de 14,9g/100g

(polisacáridos no-almidón) según Alonso y col., (2000) y de 8,9-10,4 g/100g (fibra bruta) según de Almeida Costa y col., (2004), por lo que el mayor valor de la vaina indica que es una mejor fuente de fibra. Wadhwa y col., (2006) proporcionan un dato de fibra para vaina de guisante de 57%, determinada por el método neutro detergente. La semilla de haba presenta un valor de fibra (NDF) de 20,2 g/100g según Fernandes Abreu y Martins Bruno-Soares (1998).

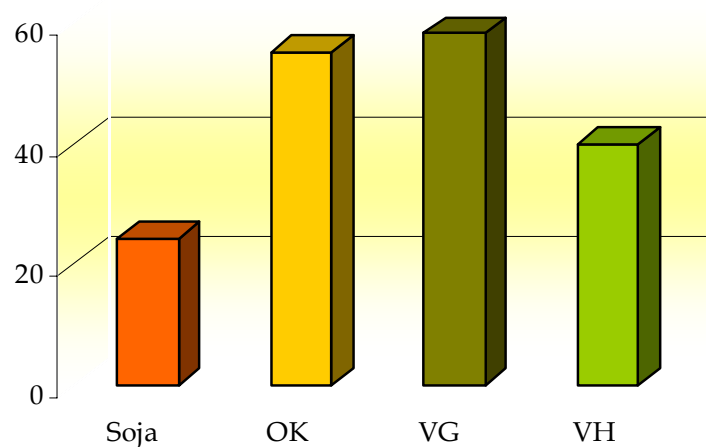


Gráfico 1: Valores de fibra alimentaria de semilla de soja, okara, vaina de guisante y vaina de haba (g/100g m.s.). OK: okara. VG: vaina de guisante. VH: vaina de haba

La *proteína* de la semilla de soja contiene todos los aminoácidos esenciales que requiere la alimentación humana, aunque hay que señalar también la presencia de otros componentes, entre los que están los inhibidores de proteasas, como los inhibidores de tripsina, ácidos fenólicos y ácido fítico, que reducen la calidad de la proteína (Liu, 1997). La semilla de soja presenta un valor de $38,9 \pm 0,67$ g/100g (cultivo transgénico), $39,5 \pm 0,53$ g/100g (cultivo no-transgénico), $40,4 \pm 1,82$ g/100g (cultivo convencional) y $41,8 \pm 0,78$ g/100g (cultivo ecológico) (Redondo y col., 2007). Los valores obtenidos en este trabajo

se encuentran dentro del rango comprendido entre 35 y 42 g/100g, proporcionado por van der Riet y col., (1989), Liu, (1997), Guillon y Champ, (2002) y Kumar y col., (2006). Las cantidades obtenidas para semilla de soja son mayores que el valor del okara ($36,36 \pm 0,32$ g/100g) (**Tabla 1, Gráfico 2**). Van der Riet y col., (1989) determinan un porcentaje de proteína en okara de 26,66 g/100g inferior al analizado en las muestras de este estudio.

El resto de legumbres presentan un intervalo de valores comprendido entre 20-25% (Liu, 1997), de manera que la semilla de soja es una fuente de proteína considerable y aunque en menor medida también el okara. El hecho de que la semilla de soja presente un valor más alto de proteína que el okara puede ser debido a su localización en la legumbre y al procesado ya que la mayor parte de la proteína pasa a formar parte de la leche de soja.

Los valores de proteína para las vainas son menores que los obtenidos para la semilla de soja y okara. Las proteínas en la vaina de haba presentan un valor de $13,59 \pm 0,17$ g/100g, que es mayor que el de vaina de guisante $10,78 \pm 0,28$ g/100g.

Fernandes Abreu y Martins Bruno-Soares (1998) dan un valor de 23,7 g/100g para semilla de haba, mientras que el guisante crudo presenta un valor de proteínas de 21 g/100g según Fernandes Abreu y Martins Bruno-Soares (1998), 19,3g/100g, según Alonso y col., 2000, y de 21,9-23,7 g/100g, según de Almeida y col., 2004. Los valores de proteínas en las semillas son mayores que en sus vainas correspondientes.

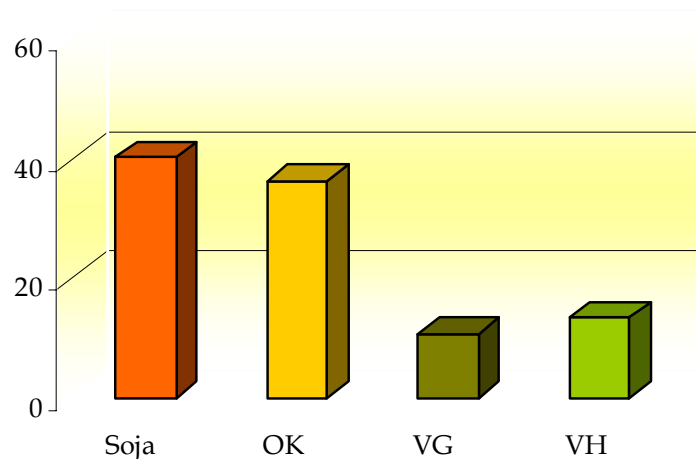


Gráfico 2: Valores de proteínas de semilla de soja, okara, vaina de guisante y vaina de haba (g/100g m.s). OK: okara. VG: vaina de guisante. VH: vaina de haba

Además del gran porcentaje de fibra y proteínas, el okara presenta una cantidad no despreciable de *grasa* ($8,47 \pm 0,21$ g/100g) (**Tabla 1**). En el caso de la semilla de soja el contenido que se obtuvo fue $18,56 \pm 0,35$ g/100g (cultivo convencional), $19,22 \pm 0,37$ g/100g (cultivo ecológico), $20,74 \pm 0,61$ g/100g (cultivo transgénico) y $21,66 \pm 0,37$ g/100g (cultivo no-transgénico) (Redondo y col., 2007). Según algunos autores el valor está comprendido entre un 18 y un 22% (van der Riet y col., 1989; Souci y col., 1994; Liu, 1997; Guillon y Champ, 2002; Kumar y col., 2006), que coincide con los resultados de este estudio. Las muestras de okara analizadas presentan un valor de grasa menor y también un menor porcentaje que el dado por van der Riet y col., (1989), $9,93$ g/100g (**Gráfico 3**).

Los valores de grasa en las vainas son muy bajos y parecidos entre sí. De manera que la vaina de haba presenta un valor de $1,34 \pm 0,46$ g/100g y la vaina de guisante $1,33 \pm 0,02$ g/100g (**Tabla 1, Gráfico 3**). Fernandes Abreu y Martins Bruno-Soares (1998) dan un valor de grasa (extracto etéreo) para semilla de

haba de 1,4 g/100g, y para guisante crudo de 1,7 g/100g. Según de Almeida y col., 2004, la grasa en guisante crudo es de 2,34-2,65 g/100g.

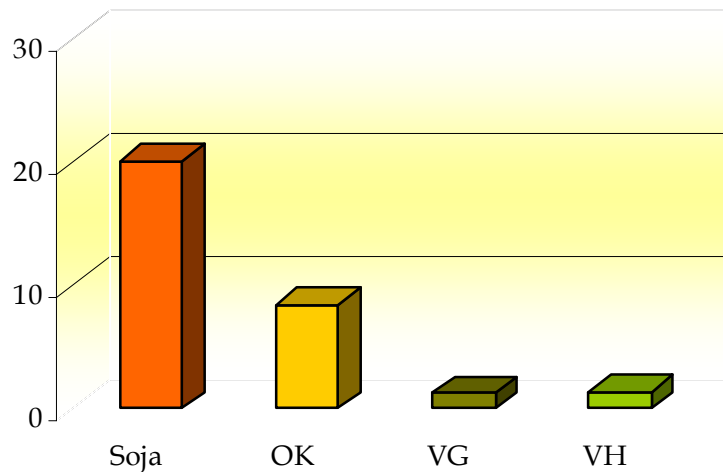


Gráfico 3: Valores de grasa de semilla de soja, okara, vaina de guisante y vaina de haba. (g/100g m.s). OK: okara. VG: vaina de guisante. VH: vaina de haba

La fracción de *carbohidratos* se puede clasificar en no-disponibles (fibra alimentaria) y disponibles, (azúcares solubles y almidón). Los almidones de legumbres contienen una mayor cantidad de amilosa que la mayoría de los cereales o almidones de tubérculos. Esto confiere una baja disponibilidad, lo que puede considerarse beneficioso para la salud, especialmente en la prevención de enfermedades relacionadas con la resistencia insulínica, ya que presentan un bajo índice glicémico (Guillon y Champ, 2002). Además, esa baja accesibilidad puede provocar que el almidón se retrograde, así pueden ser ricas en RS1 y RS3, que son susceptibles de fermentación colónica.

Los azúcares solubles o carbohidratos de bajo peso molecular en el okara presentan un valor de $3,69 \pm 0,18$ g/100g (**Tabla 1**). En el caso de la semilla de soja, se supone que los carbohidratos de bajo peso molecular están formados

por sacarosa con cantidades comprendidas entre 2,5-8,2%, rafinosa 0,1-1,3%, estaquiosa 1,4-4,9%, verbascosa 0,0-0,3%, fructosa 0,6% y trazas de glucosa y arabinosa (Sosulski y col., 1982; Liu, 1997; Huisman, 2000; Guillon y Champ 2002).

El almidón es un polisacárido disponible cuya presencia en los cotiledones de la semilla de soja es predominante cuando comienza la maduración. En ésta, como en otras leguminosas el almidón puede alcanzar valores del 13-50% del total de carbohidratos (Macrae y col., 1993), siendo el valor total del 35% (Liu, 1997). Sin embargo, en la semilla de soja madura estos gránulos de almidón decrecen hasta presentarse en un porcentaje menor al 1% (Huisman y col., 1998; Huisman, 2000). El okara presentó una cantidad de $0,46 \pm 0,04$ g/100g (**Tabla 1**), menor que el rango dado por van der Riet y col., (1989) de 0,59-0,79 g/100g, según el cultivar.

La cantidad de azúcares solubles y almidón en la semilla de soja fue calculada por diferencia, obteniéndose unos valores de $8,92 \pm 0,98$ g/100g (cultivo ecológico), $9,94 \pm 1,94$ g/100g (cultivo convencional), $11,90 \pm 0,74$ g/100g (cultivo no-transgénico) y $13,30 \pm 0,50$ g/100g (cultivo transgénico) (Redondo y col., 2007). El valor de monosacáridos, oligosacáridos y almidón que proporciona van der Riet y col., (1989) es de 19 g/100g en semilla de soja, mayor que el obtenido. Si se suman los valores de azúcares solubles ($3,69 \pm 0,18$ g/100g) y almidón ($0,46 \pm 0,04$ g/100g) del okara obtenidos en este estudio el valor de 4,15 g/100g es inferior al valor de van der Riet y col., (1989), 5,3 g/100g (**Gráfico 4**).

Las fracciones mayoritarias en vaina de haba y vaina de guisante, después de la fibra alimentaria son los azúcares solubles, así vaina de haba presenta un contenido de $26,54 \pm 0,36$ g/100g mayor que el de vaina de guisante $22,50 \pm 0,13$ g/100g (**Tabla 1, Gráfico 4**). Alonso y col., (2000) da un valor de azúcares libres totales (englobando a la sacarosa, rafinosa, estaquiosa y verbascosa) en guisante

crudo de 8,3g/100g. Wadhwa y col., (2006) dan una cantidad de azúcares totales solubles en agua para vaina de guisante de 4,8%.

El valor de almidón para vaina de haba ($11,73 \pm 0,16$ g/100g) es elevado. De manera que sería considerable su posible uso como fuente de almidón e, incluso, después de un adecuado procesado se podría convertir en almidón retrogrado fermentable en el colon. En vaina de guisante, el almidón ($3,71 \pm 0,08$ g/100g) es una fracción minoritaria (**Tabla 1**). La semilla de haba presenta una cantidad de almidón de 40 g/100g (Fernandes Abreu y Martins Bruno-Soares, 1998). En guisante crudo, el almidón asciende a 45,3 g/100g, según Fernandes Abreu y Martins Bruno-Soares, (1998) ó 49,3g/100g, según Alonso y col., (2000).

La fracción de carbohidratos disponibles en vaina de haba (38,27 g/100g) y vaina de guisante (26,21 g/100g) presenta valores mucho más altos que en semilla de soja o en okara (**Gráfico 4**).

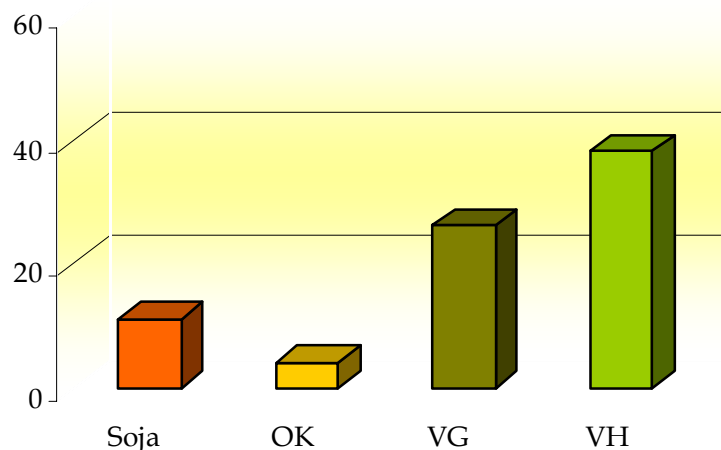


Gráfico 4: Valores de carbohidratos disponibles de semilla de soja, okara, vaina de guisante y vaina de haba (g/100g m.s). OK: okara. VG: vaina de guisante. VH: vaina de haba

El valor de *cenizas totales* de okara obtenido es de $3,67 \pm 0,04$ g/100g (**Tabla 1**). Para la semilla de soja se obtuvo una cantidad algo mayor, $4,81 \pm 0,15$ (cultivo convencional y no transgénico), $4,72 \pm 0,07$ g/100g (cultivo ecológico) y $5,28 \pm 0,15$ g/100g (cultivo transgénico) (Redondo y col., 2007). Van der Riet y col., (1989) obtienen un valor total de minerales para semilla de soja de 5,2%, Souci y col., (1994) dan un valor de 4,70%, Liu (1997) presenta una cantidad de cenizas del 5,0%. La cantidad de cenizas totales en okara es semejante a la obtenida por van der Riet y col. (1989): 3,3g/100g (**Gráfico 5**).

El valor de cenizas es parecido en vaina de guisante ($6,64 \pm 0,46$ g/100g) y en vaina de haba ($6,29 \pm 0,09$ g/100g) (**Tabla 1, Gráfico 5**). Fernandes Abreu y Martins Bruno-Soares (1998) dan un valor de 3,3 g/100g, Alonso y col. (2000) de 2,7g/100g, y de Almeida Costa y col. (2004) de 3-3,46 g/100g para semilla de guisante. Fernandes Abreu y Martins Bruno-Soares (1998) dan un valor de 3,8 g/100g para semilla de haba. Wadhwa y col., 2006 dan un valor de 8,5% de cenizas para vaina de guisante mayor que el obtenido en este estudio.

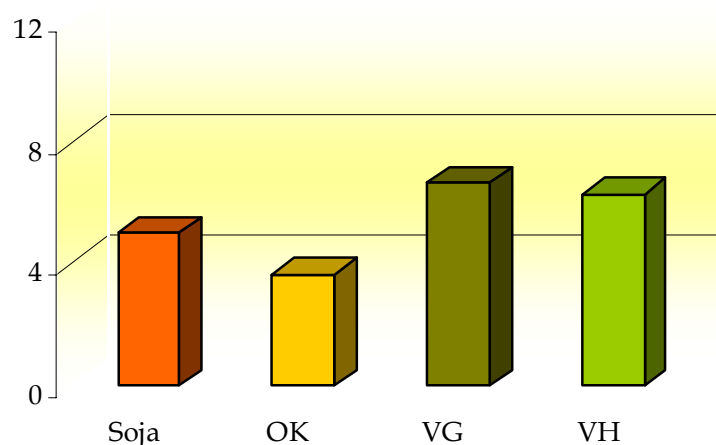


Gráfico 5: Valores de cenizas totales de semilla de soja, okara, vaina de guisante y vaina de haba (g/100g m.s). OK: okara. VG: vaina de guisante. VH: vaina de haba

La semilla de soja puede considerarse un alimento único debido a su contenido en nutrientes, ya que representa una excelente fuente de proteína de alta calidad, contiene grasa, oligosacáridos, fibra alimentaria, fitoquímicos (especialmente las isoflavonas) y minerales (Liu, 1997; Anderson y col., 1999; Messina, 1999).

Esta riqueza nutricional es semejante en el okara, aunque lo más llamativo es que presenta el doble de cantidad de fibra que la semilla de soja. De manera que el subproducto okara se puede utilizar para elaborar diversos productos secundarios. O bien, se puede añadir al pan o a otros productos de panificación. Sin embargo, la mayoría de las veces, debido a la gran cantidad de okara que se obtiene y a lo altamente susceptible que es a la putrefacción, acaba siendo usado como alimento para animales (Rinaldi y col., 2000).

Las vainas estudiadas presentan un perfil interesante, sobre todo por su alta cantidad en fibra alimentaria, pudiendo ser una fuente interesante de este nutriente, lo que hace que estos subproductos sean susceptibles de reutilización en enriquecimiento de diversos alimentos.

2.2. PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS POR CROMATOGRAFÍA DE GASES

La fracción grasa es importante en el okara, mientras que es minoritaria en la vaina de haba y de guisante. Esto es lógico, ya que el okara es un subproducto que proviene de las semillas de la soja, y ésta es rica en grasa: 18-22% (Liu, 1997; Redondo y col., 2007).

La mayoría de las legumbres son muy pobres en grasa, pero la semilla de soja es una excepción ya que su contenido es el mayor entre ellas, presentando hasta un 47% de energía en forma de fracción grasa (Messina, 1999). Esto se debe a

que en las primeras fases del desarrollo de semillas y frutos oleaginosos los carbohidratos, principalmente la sacarosa, se utilizan para sintetizar lípidos, que actúan como reserva (Guardiola y García, 1990).

La fracción grasa del okara está caracterizada por su contenido en ácidos grasos poliinsaturados, como son el ácido linoleico (C18:2) y el ácido linolénico (C18:3). También contiene cantidades considerables de ácido oleico (C18:1) y moderadas de ácidos grasos saturados, como el ácido palmítico (C16:0) y el ácido esteárico (C18:0).

El ácido graso predominante es el ácido linoleico, el cuál comprende aproximadamente el 54% del contenido de ácidos grasos totales (Tabla 2). Estos valores coinciden con los expuestos por Souci y col., (1994) y Liu, (1997). Kumar y col., (2006) aportan datos de ácidos grasos en distintos cultivares de semillas de soja que se encuentran en una proporción similar a los del okara estudiado.

Tabla 2: Perfil de ácidos grasos de los subproductos de leguminosas: okara, vaina de haba y vaina de guisante (% m.s)

	OKARA	V. HABA	V. GUISANTE
C14:0	nd	2,60±0,01	1,05±0,02
C16:0	12,31±0,19	20,56±0,31	23,94±0,51
C18:0	4,68±0,08	2,99±0,10	4,54±0,16
C18:1	20,38±0,14	10,58±0,18	21,80±0,09
C18:2	54,10±0,05	44,58±0,33	37,24±0,18
C18:3	8,83±0,15	22,78±0,17	9,65±0,11
Otros	nd	4,33±0,17	2,81±0,29

Valor promedio ± desviación estándar. nd: no detectado

C14:0= mirístico. C16:0= palmítico. C18:0= esteárico. C18:1= oleico. C18:2= linoleico

C18:3= linolénico. Otros= ácido graso no identificado

Aunque el ácido linoleico es el mayoritario, es importante la cantidad de ácido linolénico, ya que existen pocas fuentes vegetales de ácidos grasos ω -3. Según Liu, (1997), los datos disponibles sugieren que la dieta de muchas personas es pobre en dicho ácido, de manera que el okara podría ser una buena fuente para incrementar su ingesta. Esta misma idea la sugiere Messina, (1999) al indicar que la contribución a la ingesta de ácido α -linolénico es interesante por parte de las legumbres en general, pero sin olvidar que el valor de grasa de estas es mucho menor que la de la semilla de soja y, por tanto, la de su subproducto, el okara.

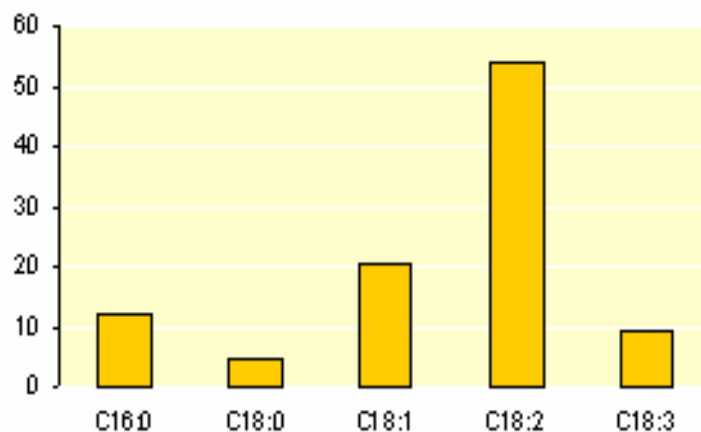


Gráfico 6: Perfil de ácidos grasos en el okara (g/100g m.s). C16:0= palmítico. C18:0= esteárico. C18:1= oleico. C18:2= linoleico. C18:3= linolénico

El ácido graso predominante en vaina de haba es el linoleico y presenta cantidades considerables de linolénico y palmítico. El ácido oleico está en poca proporción y los minoritarios son el esteárico y el mirístico (**Tabla 2**).

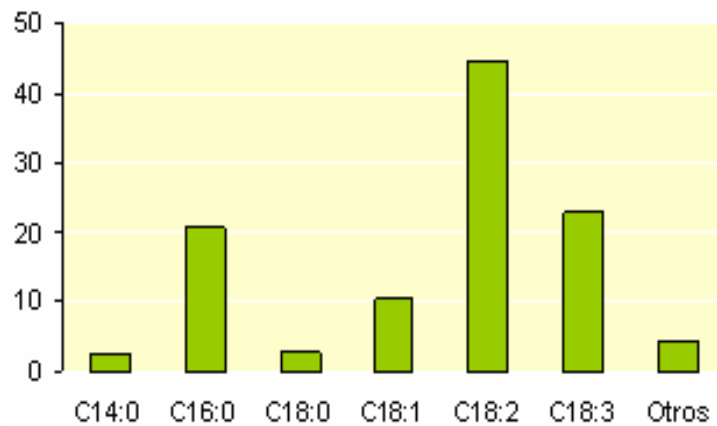


Gráfico 7: Perfil de ácidos grasos en vaina de haba (g/100g m.s). C14:0= mirístico. C16:0= palmítico. C18:0= esteárico. C18:1= oleico. C18:2= linoleico. C18:3= linolénico

La vaina de guisante presenta un perfil parecido, el ácido graso mayoritario es el C18:2, seguido de C16:0 y C18:1. Presenta una cantidad apreciable de C18:3 y los minoritarios son C18:0 y C14:0 (**Tabla 2**).

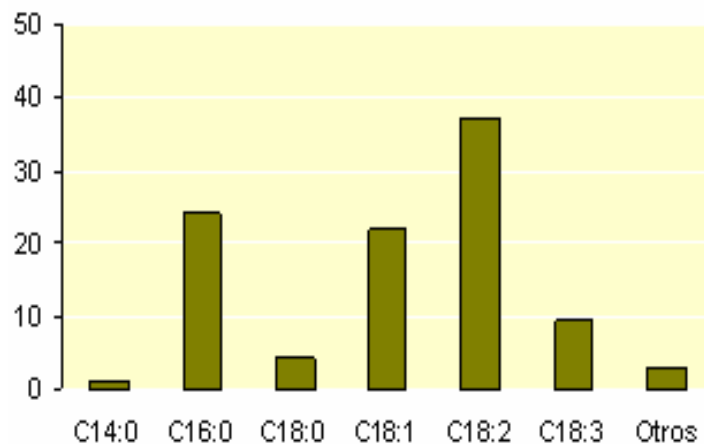


Gráfico 8: Perfil de ácidos grasos vaina de guisante (g/100g m.s). C14:0= mirístico. C16:0= palmítico. C18:0= esteárico. C18:1= oleico. C18:2= linoleico. C18:3= linolénico

Tanto la vaina de haba como la de guisante presentan un ácido graso no identificado con el mismo tiempo de retención, así que presumiblemente se podría tratar del mismo (**Tabla 2**). Se ha buscado en la literatura la existencia y nombre de este ácido graso pero no se ha encontrado. Se intentó identificar experimentalmente como ácido graso saturado, como el araquidónico (C20:0) y el behénico (C22:0) y como ácido graso insaturado, como el estearidónico (C18:4) que por sus lugares en el cromatograma, pudieran ser el ácido graso buscado, pero finalmente no se localizó. Sakaki y col., 1995 obtienen en hoja de haba porcentajes de C18:0, C18:1 y C18:3 algo mayores y los de C16:0 y C18:2 son, sin embargo, algo menores en la vaina de haba estudiada.

2.3. ESTUDIO DE LOS MACRO Y MICROELEMENTOS POR ABSORCIÓN ATÓMICA

La determinación se realiza en las cenizas totales obtenidas por incineración de la muestra y se cuantifican los macroelementos potasio, sodio, magnesio y calcio y los microelementos manganeso, zinc, hierro y cobre.

Las legumbres son ricas en hierro, sin embargo la biodisponibilidad de este microelemento es baja y por tanto su valor como fuente de hierro está disminuido. En algunos estudios (Monsen y col., 1978, Hunt y col., 1994), se ha visto que la adición de vitamina C a los alimentos puede aumentar la absorción del hierro (Lynch y col., 1984, Messina, 1999). Al contrario que la biodisponibilidad del hierro, la del zinc es relativamente buena, aproximadamente del 25% (Sandström y col., 1989). Además, muchas legumbres son importantes fuentes de calcio y su biodisponibilidad es de alrededor del 20%, menor que la de la leche o de los vegetales de hoja verde, pero razonablemente buena (Weaver y col., 1993). La biodisponibilidad del calcio en la semilla de soja es esencialmente equivalente a la que presenta este

elemento en la leche (Weaver y col., 1994), y por tanto podría ser aplicable al okara.

Tabla 3: Macroelementos (g/100g m.s) y microelementos (mg/100g m.s) determinados por absorción atómica en okara, vaina de haba y vaina de guisante

	Okara	V.Haba	V.Guisante
Potasio (K)	1,35±0,07	2,29±0,12	1,03±0,01
Sodio (Na)	0,03±0,00	0,09±0,00	0,14±0,00
Magnesio (Mg)	0,13±0,01	0,12±0,01	0,21±0,01
Calcio (Ca)	0,32±0,01	0,34±0,01	0,77±0,01
Manganeso (Mn)	0,21±0,00	0,13±0,01	0,27±0,00
Zinc (Zn)	0,29±0,00	0,14±0,00	0,16±0,01
Hierro (Fe)	0,62±0,00	0,65±0,04	1,20±0,04
Cobre (Cu)	0,10±0,00	0,05±0,00	0,06±0,00

Valor promedio ± desviación estándar

Dentro del grupo de los macroelementos, el potasio es el elemento mineral predominante en las tres muestras estudiadas. La vaina de haba es la que presenta un mayor contenido, aproximadamente dos veces la cantidad presente en okara y en la vaina de guisante. El calcio también se presenta en cantidad considerable en los tres subproductos, aunque es el doble en la vaina de guisante que en la vaina del haba y en el okara. Las cantidades de sodio y magnesio son minoritarias, aunque mayores en vaina de guisante que en las otras dos muestras. El magnesio es superior, tanto en okara como en las vainas, en comparación con el sodio (**Tabla 3, Gráfico 9**).

Los macroelementos en okara presentan unos valores semejantes en este estudio al realizado por van der Riet y col., 1989 (K: 1,05-1,23 g/100g; Na: 0,02 g/100g; Mg: 0,16-0,17 g/100g; Ca: 0,26-0,43 g/100g).

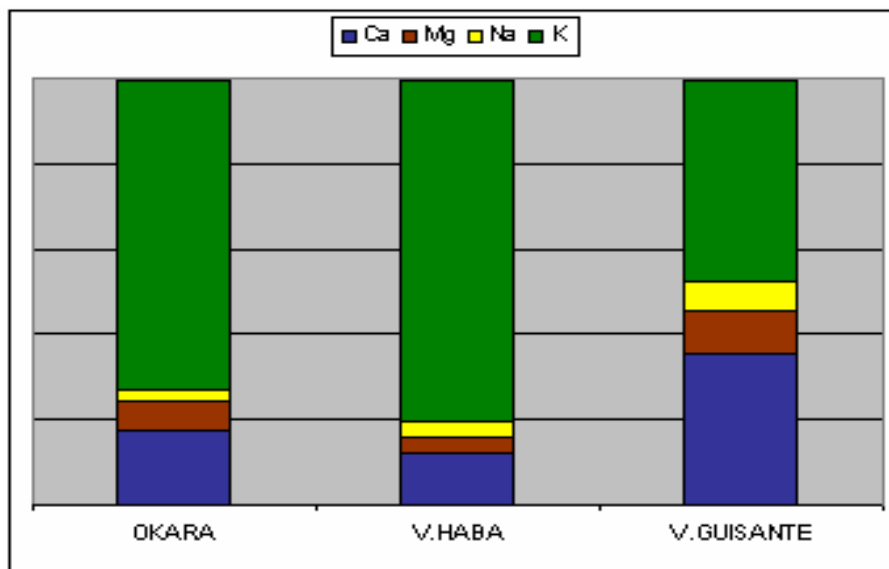


Gráfico 9: Distribución porcentual de los macroelementos en okara, vaina de haba y vaina de guisante

El microelemento predominante para las tres muestras estudiadas es el hierro, aunque más claramente mayoritario en vaina de guisante que en vaina de haba y okara, los cuales presentan valores semejantes. El manganeso también se presenta en cantidad considerable en vaina de guisante y okara.

El zinc es mayoritario en okara con respecto a la vaina de guisante y vaina de haba, y el cobre es minoritario en todas las muestras, aunque algo mayor en okara (Tabla 3, Gráfico 10). El orden de los valores de microelementos para okara coinciden con el orden de van der Riet y col., (1989).

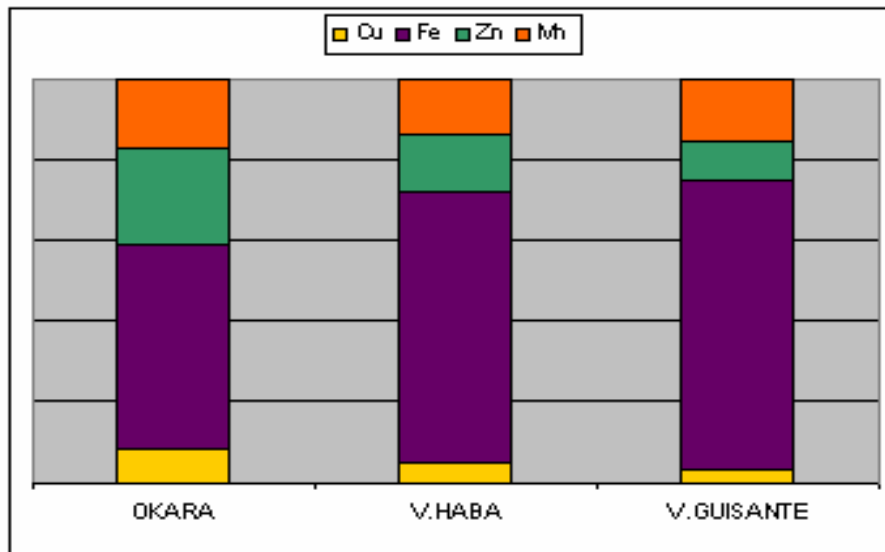


Gráfico 10: Distribución porcentual de los microelementos en okara, vaina de haba y vaina de guisante

2.4. ESTUDIO DE POLIFENOLES SOLUBLES Y TANINOS CONDENSADOS

Los polifenoles son los antioxidantes más abundantes de la dieta (Manach y col., 2004). Existe un creciente interés científico acerca de las propiedades de estos compuestos en la prevención de las enfermedades relacionadas con la edad, como el cáncer o la enfermedad cardiovascular.

Los alimentos vegetales presentan componentes indigeribles que no son absorbidos en el intestino delgado. Estos componentes incluyen parte de la fibra alimentaria, almidón resistente, proteína resistente, polifenoles, compuestos de la reacción de Maillard y otros productos asociados (Saura-Calixto y col., 2000). De manera que algunos de estos compuestos, que no son absorbidos en el intestino delgado, pueden ser susceptibles de fermentación colónica.

Una gran parte de los polifenoles presentes en los alimentos están asociados a la fracción insoluble de la fibra alimentaria, entre ellos, taninos condensados y

polifenoles hidrolizables, además de una cantidad considerable de polifenoles extraíbles.

Los polifenoles extraíbles o solubles son los polifenoles analizados en un extracto acuo-orgánico (metanol:acetona:agua). En los residuos de la extracción de los polifenoles solubles se pueden determinar los taninos-proantocianidina condensados y los polifenoles hidrolizables (Saura-Calixto y col., 2007). En este estudio sólo se han determinado polifenoles solubles y taninos condensados (**Gráfico 11**).

No se detectaron polifenoles solubles en okara. El valor de los polifenoles solubles para la vaina de haba es más alto ($0,46 \pm 0,03$ mg/g) que el de la vaina de guisante ($0,05 \pm 0,00$ mg/g). Estos valores obtenidos en las vainas estudiadas son menores que los valores de polifenoles solubles de las legumbres y otros alimentos de la dieta española (Saura-Calixto y col., 2007).

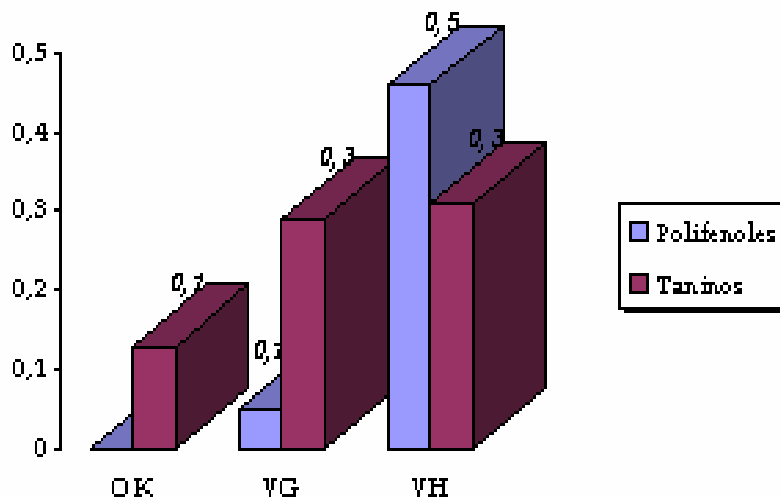


Gráfico 11: Valores de polifenoles solubles y taninos condensados en okara, vaina de guisante y vaina de haba (mg/g m.s). OK: okara. VG: vaina de guisante. VH: vaina de haba

Los valores de taninos condensados son bajos, siendo el menor el que corresponde al okara ($0,13\pm 0,01$ mg/g). Las vainas de guisante ($0,29\pm 0,02$ mg/g) y haba ($0,31\pm 0,01$ mg/g) presentan cantidades muy parecidas. Los valores de taninos condensados referenciados para distintos alimentos como frutas y legumbres son mayores, aunque en cereales, verduras y hortalizas no son detectables (Saura-Calixto y col., 2007).

3. ESTUDIO DE LA FRACCIÓN DE AZÚCARES Y OLIGOSACÁRIDOS DE BAJO PESO MOLECULAR

En este apartado se estudian los azúcares (mono y disacáridos) así como los oligosacáridos de bajo PM en las muestras seleccionadas por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC).

Para este análisis se eligieron dos columnas ampliamente utilizadas: Aminex HPX-87P (*BioRad*) y Carbohydrate Analysis (*Waters*), ya que se creyó interesante la comparación de los datos que se obtenían para un mismo análisis e iguales muestras, pero con condiciones diferentes.

Las columnas presentan una misma longitud (300 mm) pero un ancho diferente, así la Aminex HPX-87P tiene 7,8 mm y la Carbohydrate Analysis, 3,9 mm. La precolumna utilizada para ambas fue la misma (Precolumna NH₂ de Teknokroma). Sin embargo, la temperatura del horno fue 85°C en la columna de *Bio-Rad* y 40°C en la de *Waters*. Y la fase móvil en la HPX-87P era agua MilliQ desgasificada a un flujo de 0,5 ml/min y la Carbohydrate Analysis acetonitrilo-agua MilliQ (8:2) desgasificada a un flujo de 2 ml/min.

La columna Aminex HPX-87P (*BioRad*) separa los carbohidratos de mayor a menor peso molecular, de manera que los oligosacáridos aparecen primero y

después los disacáridos y los monosacáridos. Mientras que la Carbohydrate Analysis (*Waters*) separa de menor a mayor peso molecular, así aparecen enseguida los mono- y disacáridos y más tarde los oligosacáridos.

Se ha observado en el análisis de las muestras mediante la utilización de ambas condiciones cromatográficas que las columnas empleadas podrían ser complementarias.

Tabla 4: Mono-, Di- y oligosacáridos en los subproductos de leguminosas: okara, vaina de haba y vaina de guisante mediante análisis con la columna Aminex HPX-87P de BioRad (g/100g m.s)

	OKARA	V. HABA	V. GUISANTE
Inulina	0,04±0,01	nd	nd
Estaquirosa + Rafinosa	1,41±0,09	nd	nd
Sacarosa	0,56±0,06	6,05±0,13	7,90±0,07
Isomaltosa	nd	1,70±0,12	nd
Glucosa	0,17±0,03	13,27±0,26	11,93±0,55
Xilosa	0,14±0,05	nd	nd
Galactosa	0,21±0,01	0,29±0,01	0,76±0,04
Arabinosa	1,00±0,06	1,26±0,02	0,93±0,15
Fructosa	0,14±0,01	4,09±0,29	1,16±0,10
Total	3,69±0,18	26,54±0,36	22,50±0,13

Valor promedio ± desviación estándar. nd: no detectado

Los resultados obtenidos para los tres subproductos analizados con la columna Aminex HPX-87P (*BioRad*) se recogen en la **Tabla 4**. Se observa la imposibilidad de cuantificar por separado estaquirosa y rafinosa, dado que los tiempos de retención son muy próximos, incluso con el flujo utilizado de 0,5 ml, de forma que se cuantifican conjuntamente. Se consigue una buena separación para el

oligosacárido inulina, el disacárido sacarosa y todos los azúcares procedentes de los polímeros de la pared celular, así como los azúcares solubles propios de los alimentos, sacarosa, glucosa y fructosa.

Los valores de azúcares y oligosacáridos de bajo PM de las vainas de haba ($26,54 \pm 0,36$ g/100g) y guisante ($22,50 \pm 0,13$ g/100g) estudiadas son mucho mayores que en el okara ($3,69 \pm 0,18$ g/100g). La vaina de haba presenta un valor superior al obtenido en vaina de guisante (**Tabla 4**).

Tabla 5: Mono-, Di- y oligosacáridos en los subproductos de leguminosas: okara, vaina de haba y vaina de guisante mediante análisis con la columna Carbohydrate Analysis de Waters (g/100g m.s)

	OKARA	V. HABA	V. GUISANTE
Rafinosa	0,10±0,02	0,39±0,04	nd
Estaquirosa	0,20±0,02	1,12±0,13	nd
Sacarosa	0,52±0,05	6,43±0,19	7,32±0,08
Isomaltosa	nd	1,52±0,08	nd
Glucosa	0,19±0,02	13,46±0,24	11,98±0,49
Xilosa	0,18±0,06	nd	nd
Galactosa	nd	nd	nd
Arabinosa	1,05±0,01	1,11±0,13	1,01±0,14
Fructosa	0,13±0,02	4,13±0,38	1,11±0,14
Total	2,38±0,09	28,09±0,32	21,50±0,43

Valor promedio \pm desviación estándar. nd: no detectado

Los compuestos mencionados también se han estudiado mediante la columna Carbohydrate Analysis (*Waters*) y se comprueba que presenta ventajas e inconvenientes. El tiempo de análisis para los azúcares solubles (sacarosa, glucosa y fructosa) es menor que con la anterior columna y es posible identificar

de forma separada rafinosa y estaquiosa. La desventaja más importante, en lo que a este estudio se refiere, es que no separa oligosacáridos de mayor peso molecular.

Los valores totales de carbohidratos de bajo PM de las vainas (vaina de haba: $28,09 \pm 0,32$ g/100g y vaina de guisante: $21,50 \pm 0,43$ g/100g) son mucho mayores que el obtenido para el okara ($2,38 \pm 0,09$ g/100g). Además, dentro de las vainas, el valor de vaina de haba es más alto que el de vaina de guisante (**Tabla 5**).

- **Okara:** el valor total de azúcares y oligosacáridos de bajo PM para este subproducto es de $3,69 \pm 0,18$ g/100g analizado por la columna HPX-87P (*BioRad*) y un valor de $2,38 \pm 0,09$ g/100g por la columna Carbohydrate Analysis (*Waters*). La suma de monosacáridos es $1,66$ g/100g con la columna de *BioRad* y $1,55$ g/100g con la de *Waters*. Los oligosacáridos, $1,45$ g/100g con el análisis de la columna de *BioRad* y $0,30$ g/100g con la *Waters*. Dentro de estos últimos los más representativos son los α -galactósidos, estaquiosa y rafinosa, presentando un valor de $1,41 \pm 0,09$ g/100g, frente a los $0,04 \pm 0,01$ g/100g de la inulina, cuando el okara se analizó con la HPX-87P. Sin embargo con el análisis realizado con la Carbohydrate Analysis, la inulina no se detectó y los α -galactósidos sumaron tan sólo $0,30$ g/100g.

Van der Riet y col. (1989) aportan unos datos de carbohidratos en okara de 3,8-5,3 g/100g que incluyen el almidón total, los mono-, di- y oligosacáridos. Si al valor de los azúcares y oligosacáridos de bajo PM de okara obtenidos en este estudio, $3,69 \pm 0,18$ g/100g (**Tabla 4**) o $2,38 \pm 0,09$ g/100g (**Tabla 5**), se le suma el valor obtenido en el análisis del almidón, $0,46 \pm 0,04$ g/100g (**Tabla 1**), se alcanza una cifra de $4,14$ g/100g, en el primer caso (análisis con la columna HPX-87P) que se incluye en el rango dado por los autores citados, o $2,84$ g/100g (análisis con la Carbohydrate Analysis), valor menor que el reflejado en la bibliografía.

La semilla de soja es una buena fuente de oligosacáridos (Delzenne, 2003). Estos oligosacáridos pertenecen a la familia de los α -galactósidos y están asociados con la flatulencia que produce el consumo de legumbres como la soja (Lineback, 1999), pero también han aparecido diferentes estudios que muestran el posible papel de estos como ingredientes funcionales (Liu, 1997). Sosulski y col. (1982), van der Riet y col., (1989), Liu (1997), Huisman (2000), Guillon y Champ (2002) presentan valores de azúcares solubles y almidón de la semilla de soja comprendidos entre 4,0-19% y son debidos a la sacarosa, rafinosa, estaquiosa, verbascosa, fructosa, glucosa, arabinosa y en menos de un 1% al almidón. Las diferencias entre los valores de carbohidratos encontrados en la bibliografía pueden deberse a la diferente variedad de la semilla de soja y también a factores agronómicos, como el tipo de suelo, cultivo y localización geográfica (Grieshop y col., 2003), así como, en el caso del okara, a las condiciones del procesado de la semilla.

En el grupo de azúcares, destacan por un lado los específicos de la semilla de soja, sacarosa, glucosa y fructosa, aunque en menores cantidades que en el grano utilizado como materia prima, posiblemente por solubilización en la fase líquida (leche de soja). Por otro lado, los monosacáridos arabinosa, xilosa y galactosa, que pueden proceder de la hidrólisis de polisacáridos durante el procesado de las semillas de soja para la obtención del okara.

En el análisis con la columna HPX-87P los α -galactósidos, rafinosa y estaquiosa, presentan el valor más alto, seguidos del monosacárido arabinosa ($1,00 \pm 0,06$ g/100g) y del disacárido sacarosa ($0,56 \pm 0,06$ g/100g) (**Tabla 4**).

El valor mayoritario en los análisis realizados con la columna de *Waters* lo ocupa el monosacárido arabinosa con $1,05 \pm 0,01$ g/100g. El disacárido sacarosa también está presente en una cantidad considerable, $0,52 \pm 0,05$ g/100g. Sin

embargo, el resto de carbohidratos de bajo PM se presenta en cantidades minoritarias (**Tabla 5**).

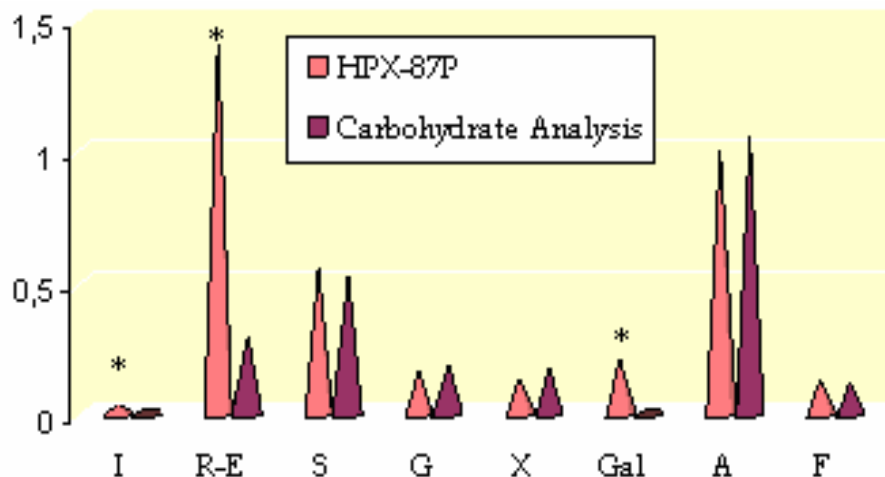


Gráfico 12: Valores de carbohidratos de bajo PM en okara (g/100g m.s). I=inulina. R-E=rafinosa-estaquirosa. S=sacarosa. G=glucosa. X=xilosa. Gal=galactosa. A=arabinosa. F=fructosa. * datos estadísticamente distintos ($p \leq 0,001$)

Se puede observar en la **Gráfico 12** que los valores de la mayor parte de los carbohidratos de bajo PM obtenidos empleando los dos tipos de columnas son similares. La diferencia en el valor total de los carbohidratos de bajo PM se debe en parte a que en el análisis con la HPX-87P se detecta algo de inulina y galactosa, y en cambio con la Carbohydrate Analysis no. Pero sobre todo, a la cantidad de α -galáctosidos, rafinosa y estaquirosa, que en el análisis con la Carbohydrate Analysis apenas son detectables aunque si se separan, mientras que con la HPX-87P no se separan pero su valor conjunto es el mayoritario entre los carbohidratos de bajo PM, en las condiciones analíticas empleadas.

En este estudio, los valores de rafinosa-estaquirosa en el okara oscilan entre 0,3-1,41 g/100g, dependiendo de la columna utilizada, que entrarían en el rango de valores dados por van der Riet y col. (1989) de 1,2-1,8 g/100g para okara. El

valor de sacarosa está entre 0,52 y 0,56 g/100g, dependiendo de la columna utilizada, que son valores menores a los dados por van der Riet y col. (1989) de 1,3-2,3 g/100g. Además, el valor total de monosacáridos que proporciona van der Riet y col. (1989) es de 0,6-0,7 g/100g, mientras que en este estudio se obtiene 1,66-1,55 g/100g.

• **Vaina de haba y de guisante:** el valor total de carbohidratos de bajo PM para las vainas es muy alto, así la de haba presenta un valor de $26,54 \pm 0,36$ g/100g con la columna de *BioRad* y $28,09 \pm 0,32$ g/100g con la *Waters*. El valor de los azúcares y oligosacáridos de bajo PM en vaina de guisante es parecido con las dos columnas, $22,50 \pm 0,13$ g/100g (HPX-87P) y $21,50 \pm 0,43$ g/100g (Carbohydrate Analysis).

Los azúcares más importantes tanto para la vaina de haba como para la vaina de guisante son la sacarosa, la glucosa y la fructosa. La glucosa es el monosacárido más abundante, aunque algo mayor en vaina de haba, $13,27 \pm 0,26$ g/100g (*BioRad*) y $13,46 \pm 0,24$ g/100g (*Waters*) que en vaina de guisante, $11,93 \pm 0,55$ g/100g (*BioRad*) y $11,98 \pm 0,49$ g/100g (*Waters*). La fructosa se encuentra en cantidades bastante más altas en vaina de haba, $4,09 \pm 0,29$ g/100g (*BioRad*) y $4,13 \pm 0,38$ g/100g (*Waters*) que en vaina de guisante, $1,16 \pm 0,10$ g/100g (*BioRad*) y $1,11 \pm 0,14$ g/100g (*Waters*).

La sacarosa, también se presenta en cantidad considerable en las vainas, siendo más alto el valor para vaina de guisante, $7,90 \pm 0,07$ g/100g (*BioRad*) y $7,32 \pm 0,08$ g/100g (*Waters*), que para vaina de haba, $6,05 \pm 0,13$ g/100g (*BioRad*) y $6,43 \pm 0,19$ g/100g (*Waters*). También existe presencia de otro disacárido en la vaina de haba, la isomaltosa, con un valor de $1,70 \pm 0,12$ g/100g (*BioRad*) y $1,52 \pm 0,08$ g/100g (*Waters*) (**Tabla 5**).

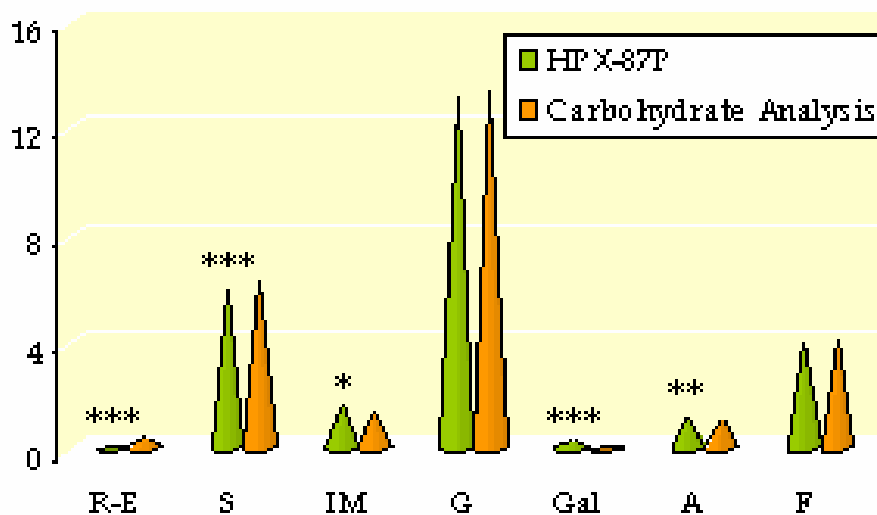


Gráfico 13: Valores de carbohidratos de bajo PM en vaina de haba (g/100g m.s). R-E=rafinosa-estaquirosa. S=sacarosa. IM=isomaltosa. G=glucosa. Gal=galactosa. A=arabinosa. F=fructosa Datos estadísticamente distintos: *($p \leq 0,05$), ** ($p \leq 0,01$), ***($p \leq 0,001$)

La vaina de haba presenta un valor de arabinosa de $1,26 \pm 0,02$ g/100g (*BioRad*) y $1,11 \pm 0,13$ g/100g (*Waters*), mientras que la presente en la vaina de guisante es $0,93 \pm 0,15$ g/100g (*BioRad*) y $1,01 \pm 0,14$ g/100g (*Waters*). Además, la vaina de haba presenta una cantidad nada despreciable de α -galactósidos, ya que la estaquirosa $1,12 \pm 0,13$ g/100g y la rafinosa $0,39 \pm 0,04$ g/100g (*Waters*).

En la vaina de haba (**Gráfico 13**), con la columna Carbohydrate Analysis se obtiene un valor total de carbohidratos de bajo PM ligeramente superior respecto a la HPX-87P, sobre todo debido a que la primera detecta la presencia de rafinosa y estaquirosa, sin embargo la HPX-87P no los detecta. Por otro lado, destaca el caso de la galactosa que es detectada con la HPX-87P y no con la Carbohydrate Analysis.

De forma parecida a lo que ocurre con la vaina de haba, los resultados obtenidos con la vaina de guisante (**Gráfico 14**) son similares se utilice una u

otra columna, la diferencia más destacable se refiere a la galactosa que se cuantifica sólo con la HPX-87P, aunque en pequeña proporción.

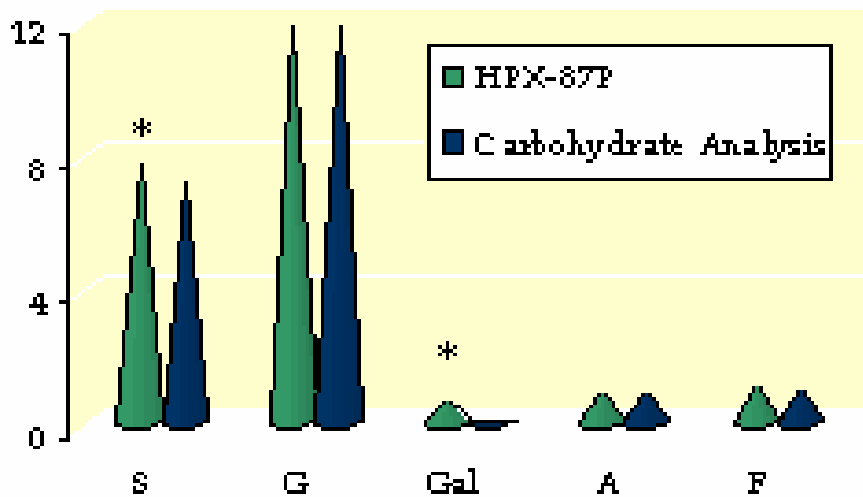


Gráfico 14: Valores de carbohidratos de bajo PM en vaina de guisante (g/100g m.s). S=sacarosa. G=glucosa. Gal=galactosa. A=arabinosa. F=fructosa. * datos estadísticamente distintos ($p \leq 0,001$)

Por otra parte, el balance positivo de la microflora intestinal es muy importante en la salud humana. En particular, el desarrollo de las bifidobacterias que tienen un papel dominante sobre las bacterias patogénicas. El crecimiento o presencia de estas bifidobacterias es facilitado por ciertos oligosacáridos, como los α -galactósidos o también llamados RFOs (oligosacáridos de la familia de la rafinosa). De manera que aunque las cantidades que presentan de α -galactósidos la vaina de haba y el okara no son muy altas pueden tenerse en cuenta como posible fuente de extracción de rafinosa y estaquiosa, ya que los oligosacáridos no digeribles se obtienen actualmente por solubilización directa de productos naturales, como podría ser el caso de interés de los subproductos estudiados en este trabajo, o por síntesis química o enzimática (Gibson y Roberfroid, 1995; Crittenden y Playne, 1996; Martínez-Villaluenga y col., 2005).

y su producción se ha disparado en los últimos años siendo Japón el principal productor mundial (Nakakuki, 1993).

4. ESTUDIO DE LA FIBRA ALIMENTARIA

El objetivo principal de este estudio se centra sobre todo en el conocimiento de la fibra alimentaria (FA) de los subproductos: okara, vaina de haba y vaina de guisante.

La caracterización de la fibra alimentaria como fibra soluble e insoluble, de gran interés desde el punto de vista fisiológico, se lleva a cabo por medio de los métodos más utilizados en el análisis de fibra: enzimático-gravimétrico de Prosky y col. (1988), adoptado por la AOAC (AOAC, 1995a; AOAC, 1995b) y enzimático-cromatográfico de Englyst y col. (1994).

La industria alimentaria genera anualmente una gran cantidad de subproductos que no son aprovechados o se utilizan para alimentación animal u otros fines distintos. Algunos de estos subproductos son parte del mismo vegetal que se eliminan con fines meramente comerciales pero cuyo contenido en nutrientes y sustancias de otra índole podrían hacerlos susceptibles de ser considerados como materia prima de interés para la elaboración o enriquecimiento de otros alimentos. El aprovechamiento de estos subproductos puede servir para obtener un valor añadido de los diferentes productos mejorando sus características sensoriales, equilibrándolos en cuanto a las necesidades nutritivas, así como elaborando alimentos funcionales.

Los objetivos de la industria alimentaria unidos a la necesidad de encontrar una manera de eliminar la elevada proporción de subproductos y efluentes que constituyen un problema debido a su inútil acumulación y un mayor coste en la

gestión de su eliminación, abren la posibilidad de la reutilización de estos subproductos en la obtención de ingredientes funcionales.

Los subproductos vegetales estudiados, okara y vainas de guisante y haba, son ricos en fibra por lo que pueden ser una fuente potencial de gran interés nutricional en la formulación de alimentos destinados al consumo humano.

La composición del subproducto okara va a depender sobre todo del procedimiento que se emplee en la obtención de la leche de soja (Erdman y col., 2004), pero también de la humedad residual de la muestra y de la composición de las semillas de soja de las que se parte como materia prima (Grieshop y col., 2003). Por ello, se ha llevado a cabo también la caracterización de la fibra alimentaria de las semillas de soja a partir de las cuales se obtiene el okara.

4.1. Análisis de fibra alimentaria mediante el método de Prosky y col. (1988) adoptado como método oficial de la AOAC

El método de la AOAC, basado en la indigeribilidad de los componentes determina los polisacáridos no-almidón (PNA), la lignina, almidón resistente y residuos no-específicos. El método de referencia de la AOAC es el método enzimático-gravimétrico de Prosky y col. (1988) y sus modificaciones (Charrondiere y col., 2004).

El método de Prosky y col. (1988) es un método enzimático-gravimétrico de determinación de FA que se fundamenta en la digestión de las muestras con α -amilasa, proteasa y amiloglucosidasa para eliminar la proteína y el almidón presentes. Este método ha sido adoptado oficialmente por la AOAC (AOAC, 1995a AOAC, 1995b) y permite determinar por separado FI y FS.

En este trabajo además se lleva a cabo una hidrólisis de los polisacáridos que forman parte de los residuos y posteriormente se derivatizan según el método de Englyst y col. (1994), para analizar los componentes monoméricos de los polisacáridos, tanto del residuo insoluble como del soluble. El análisis de los ácidos urónicos sigue el método de Scott (1979) y Rodríguez y col., (1992).

a) SEMILLA DE SOJA Y OKARA

Tanto el okara como la semilla de soja presentan un contenido importante de fibra total, más del doble en el caso del subproducto (55,48 g/100g) que en el de la semilla (24,36 g/100g). La fibra insoluble es la fracción mayoritaria tanto para la semilla de soja (20,86 g/100g) como para okara (50,77 g/100g) y la fibra soluble está escasamente representada (okara: 4,71 g/100g; semilla de soja: 3,50 g/100g).

Tabla 6: Composición del residuo de la semilla de soja y okara (g/100g m.s)

	SEMILLA DE SOJA	OKARA
Residuo gravimétrico FI		
Residuo	27,13±2,51	56,54±2,84
Proteínas	5,78±0,12	4,98±0,62
Cenizas	0,49±0,07	0,79±0,00
FI	20,86±0,67	50,77±2,93
Residuo gravimétrico FS		
Residuo	6,73±1,51	8,91±1,58
Proteínas	2,65±0,37	3,06±0,46
Cenizas	0,58±0,11	1,14±0,15
FS	3,50±0,60	4,71±1,83

Al estudiar el residuo obtenido por el método enzimático-gravimétrico se observa que el contenido de cenizas es superior en el residuo soluble que en el insoluble, y al mismo tiempo mayor en okara que en la semilla de soja. Sin

embargo en el caso de las proteínas residuales son más altas en el insoluble y similares en okara y semilla de soja (**Tabla 6**).

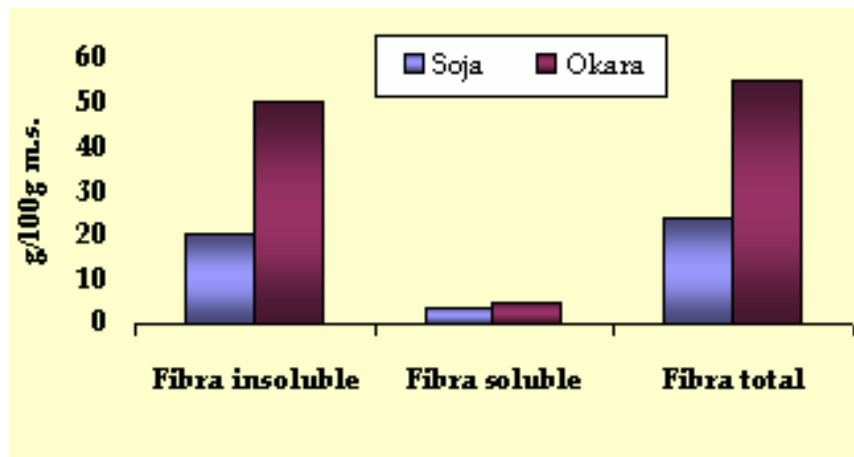


Gráfico 15: Fracciones de fibra de semilla de soja y okara (g/100g m.s)

Los valores de FI y FT de la semilla de soja y FS de la semilla de soja y de okara de este estudio son mayores que los obtenidos por van der Riet y col., 1989, que utiliza el método enzimático-gravimétrico de Asp y col., 1983. Sin embargo, el valor de FI de okara obtenido es mayor que los valores dados por los autores citados y el valor de FT de okara es similar al valor de la referencia mencionada.

El cociente FI/FS es 5,9 en el caso de la semilla de soja y 10,7 en el caso del okara, es decir aunque para las dos muestras FI es mayor que FS, el okara presenta una cantidad de FI mucho más elevada que la semilla de soja, debido al propio proceso de obtención del okara donde se lleva a cabo la separación de la fracción soluble (leche de soja).

El análisis de los monómeros de los PNA se realiza, a partir de los residuos, mediante la hidrólisis y derivatización descrita por Englyst y col. (1994).

Los monómeros mayoritarios tanto en la semilla de soja como en okara en la FI son la glucosa (35,8% en semilla de soja y 37,2% en okara), la galactosa (21,1% en semilla de soja y 23,1% en okara) y la arabinosa (13% en semilla de soja y 13,7% en okara). También presentan porcentajes apreciables de ácidos urónicos (12,2% en semilla de soja y 9,45% en okara) y xilosa (10,7% en semilla de soja y 10% en okara).

En la FS, el monómero mayoritario en ambas muestras es la galactosa (34,2% en semilla de soja y 43,6% en okara), seguido por los ácidos urónicos (31% en semilla de soja y 23,8% en okara) y la arabinosa (18% en semilla de soja y 15,7% en okara). La fibra total (FT) sigue el mismo orden monómero que la FI, lógicamente ya que ésta es la fracción mayoritaria mientras que la FS presenta un valor bajo.

Tabla 7: Azúcares neutros y ácidos urónicos en los residuos obtenidos por el método de la AOAC de semilla de soja y okara (g/100g m.s)

	SEMILLA DE SOJA			OKARA		
	FI	FS	FT	FI	FS	FT
Ramnosa	0,25±0,02	0,12±0,02	0,37±0,03	0,57±0,01	nd	0,57±0,01
Fucosa	0,22±0,04	nd	0,22±0,04	0,45±0,02	0,05±0,00	0,50±0,01
Arabinosa	1,72±0,28	0,57±0,08	2,29±0,44	5,19±0,07	0,60±0,02	5,79±0,03
Xilosa	1,41±0,03	0,07±0,02	1,48±0,04	3,79±0,11	0,13±0,01	3,92±0,13
Manosa	0,50±0,07	0,21±0,02	0,71±0,03	1,31±0,05	0,26±0,02	1,57±0,04
Galactosa	2,79±0,22	1,08±0,14	3,87±0,84	8,71±0,16	1,67±0,03	10,38±0,03
Glucosa	4,73±0,21	0,13±0,03	4,86±0,15	14,04±0,19	0,21±0,04	14,25±0,92
Ac. Uron.	1,61±0,24	0,98±0,09	2,58±0,17	3,57±0,14	0,91±0,10	4,48±0,20
Total	13,23±1,71	3,16±0,19	16,38±2,05	37,77±0,22	3,83±0,14	41,60±0,40

Valor promedio ± desviación estándar. nd: no detectado

FI=fibra insoluble. FS=fibra soluble. FT=fibra total. Ac. Uron.=ácidos urónicos

La suma de monómeros de la fibra total es mayor en okara ($41,60 \pm 0,40$ g/100g) que en semilla de soja ($16,38 \pm 2,05$ g/100g). La fracción mayoritaria es la FI, con un valor más elevado en okara ($37,77 \pm 0,22$ g/100g) que en semilla de soja ($13,23 \pm 1,71$ g/100g). La FS es semejante para okara ($3,83 \pm 0,14$ g/100g) y semilla de soja ($3,16 \pm 0,19$ g/100g).

b) VAINAS DE HABA Y GUISANTE

La fibra total presenta un valor más alto para vaina de guisante ($58,58 \pm 1,21$ g/100g) que para vaina de haba ($40,11 \pm 0,69$ g/100g). La fibra insoluble es la fracción mayoritaria en ambos subproductos, aunque mucho más alto el valor en vaina de guisante ($54,38$ g/100g) que en vaina de haba ($30,80$ g/100g). La fibra soluble presenta un valor bajo, menor en vaina de guisante ($4,20$ g/100g) que en vaina de haba ($9,31$ g/100g) (**Gráfico 16**).

Tabla 8: Composición del residuo de vaina de haba y guisante (g/100g m.s.)

	VH	VG
Residuo gravimétrico FI		
Residuo	$34,69 \pm 1,23$	$60,59 \pm 2,48$
Proteínas	$3,41 \pm 0,18$	$4,04 \pm 0,31$
Cenizas	$0,48 \pm 0,03$	$2,17 \pm 0,41$
FI	$30,80 \pm 1,16$	$54,38 \pm 1,56$
Residuo gravimétrico FS		
Residuo	$10,25 \pm 0,92$	$9,40 \pm 0,86$
Proteínas	$0,79 \pm 0,30$	$2,88 \pm 0,45$
Cenizas	$0,15 \pm 0,11$	$2,32 \pm 0,49$
FS	$9,31 \pm 0,61$	$4,20 \pm 0,56$

En la **Tabla 8** se muestra la composición de los residuos obtenidos por el método enzimático-gravimétrico. El valor de cenizas residuales es mayor en vaina de guisante, tanto en el insoluble como en el soluble, que en vaina de haba. Respecto a las proteínas sucede lo mismo, son superiores en la vaina de

guisante, tanto en el residuo insoluble como en el soluble. De aquí se deduce que la acción de las enzimas empleadas así como las filtraciones que se realizan son más eficaces en la vaina de haba que en la de guisante.

El cociente FI/FS es 3,3 en el caso de la vaina de haba y 13,0 en el caso de la de guisante, es decir aunque para las dos muestras FI es mayor que FS, la vaina de haba tiene una relación más equilibrada.

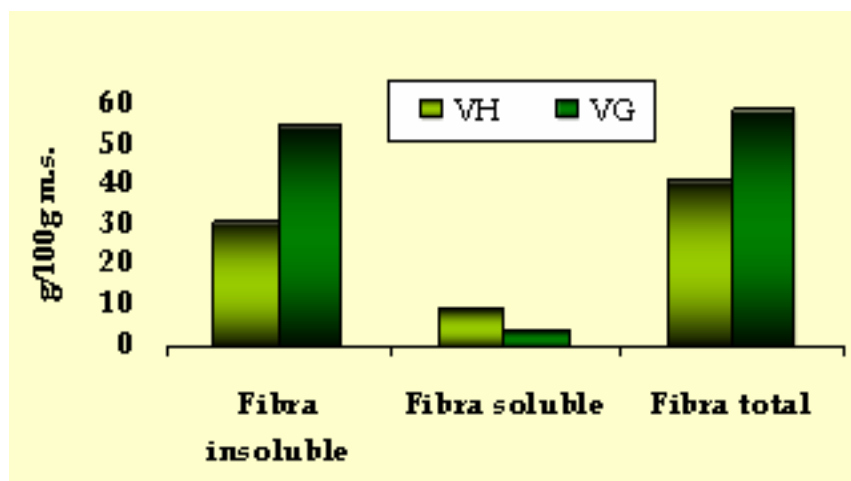


Gráfico 16: Fracciones de fibra de vainas de haba y de guisante (g/100g m.s.)

Del mismo modo que en el caso de la semilla de soja y okara, los residuos obtenidos por el método enzimático-gravimétrico se hidrolizan y derivatizan para conocer la composición en azúcares neutros y ácidos urónicos de los polisacáridos que constituyen la fibra alimentaria.

En la vaina de haba, los monómeros mayoritarios de la FI son la glucosa (39,5%) y los ácidos urónicos (23,9%). También se presentan en cantidades apreciables la galactosa (12,9%) y la arabinosa (13,1%). En la vaina de guisante, sin embargo, los azúcares con valores más elevados son la glucosa (43,4%) y la

xilosa (38,6%). Además, los ácidos urónicos (9,5%) presentan una cantidad considerable pero muy lejos de los valores de glucosa y xilosa.

En la FS, el valor de los ácidos urónicos es mayoritario en vaina de haba (71,9%) y en vaina de guisante (56%), aunque bastante más elevado en la primera. El monómero mayor después de los ácidos urónicos es la arabinosa (15,5%) en vaina de haba y la galactosa (25,7%) en vaina de guisante.

La vaina de haba en FT presenta cantidades más altas de ácidos urónicos (36,3%) que de glucosa (29,5%) debido a que el valor de ácidos urónicos en FS es bastante elevado. El resto de monómeros sigue el mismo orden que en FI. La vaina de guisante presenta el mismo orden monomérico que la FI correspondiente.

Tabla 9: Azúcares neutros y ácidos urónicos en los residuos obtenidos por el método de la AOAC de las vainas de haba y de guisante (g/100g m.s)

	VAINA DE HABA			VAINA DE GUISANTE		
	FI	FS	FT	FI	FS	FT
Ramnosa	0,34±0,03	nd	0,34±0,03	0,51±0,03	0,05±0,00	0,57±0,04
Fucosa	0,18±0,01	nd	0,18±0,01	0,06±0,02	nd	0,06±0,02
Arabinosa	3,27±0,03	1,36±0,04	4,63±0,05	0,95±0,05	0,33±0,01	1,28±0,04
Xilosa	1,86±0,12	nd	1,86±0,12	16,69±0,47	0,02±0,00	16,71±1,52
Manosa	0,40±0,01	0,15±0,01	0,56±0,01	0,37±0,01	0,13±0,02	0,50±0,01
Galactosa	3,23±0,62	0,86±0,05	4,09±0,59	1,76±0,07	1,04±0,00	2,80±0,05
Glucosa	9,86±0,52	0,09±0,01	9,95±0,52	18,76±0,50	0,19±0,02	18,94±0,93
Ac. Uron.	5,96±0,41	6,29±0,94	12,25±0,76	4,12±0,67	2,27±0,16	6,39±0,32
Total	24,98±1,19	8,75±0,89	33,73±1,42	43,22±0,75	4,05±0,20	47,26±1,86

Valor promedio ± desviación estándar. nd: no detectado

La suma total de monómeros es mayor en vaina de guisante ($47,26 \pm 1,86$ g/100g) que en vaina de haba ($33,73 \pm 1,42$ g/100g). La fracción mayoritaria es la FI, con un valor más elevado en vaina de guisante ($43,22 \pm 0,75$ g/100g) que en vaina de haba ($24,98 \pm 1,19$ g/100g). La FS, al contrario, es mayor en vaina de haba ($8,75 \pm 0,89$ g/100g) que en vaina de guisante ($4,05 \pm 0,20$ g/100g).

4.2. Análisis de fibra alimentaria como polisacáridos no-almidón mediante el método de Englyst

La fibra alimentaria está expresada como polisacáridos no-almidón (PNA), es decir como la suma de monómeros que se obtienen cromatográficamente. El término PNA es el que utilizan Englyst y col. para definir la fibra alimentaria (FA) (Englyst y col. 1994; Prosky, 1999b; Gray, 2006).

En la fracción de PNA no están englobados otros compuestos que podrían pertenecer a la fibra alimentaria según la definición aceptada como oficial por la AOAC, tales como la lignina, almidón resistente, oligosacáridos resistentes y otros compuestos como las gomas, mucílagos, etc. (Prosky, 1999b; AACC, 2001; Charrondiere y col., 2004; Gray, 2006).

El método de Englyst y col. (1994) consiste en el tratamiento de la muestra con enzimas simulando el proceso de digestión en el tracto gastrointestinal humano para conseguir un residuo en el que sólo esté la parte no digerible por las enzimas utilizadas. Este residuo es lo que Englyst considera fibra alimentaria.

Posteriormente, el residuo se somete a una hidrólisis para obtener los monómeros que conforman el residuo indigerible y después estos son transformados en derivados acetilados muy volátiles mediante un proceso de derivatización antes de proceder a su análisis por cromatografía de gases. Los ácidos urónicos se cuantifican espectrofotométricamente.

La suma de los monómeros neutros obtenidos cromatográficamente y los ácidos urónicos, es decir el valor de los llamados polisacáridos no-almidón (PNA), junto con la lignina es la definición de fibra alimentaria (FA) que se considera en Reino Unido desde 1991 (Gray, 2006).

a) SEMILLA DE SOJA Y OKARA

El okara presenta una cantidad de FA muy superior ($43,73 \pm 0,14$ g/100g) a la de la semilla de soja ($15,05 \pm 0,63$ g/100g) (**Tabla 10**). Los resultados totales de las fracciones del okara y semilla de soja de este estudio son algo menores a los obtenidos por van der Riet y col. (1989), que utiliza el método de Asp y col. (1983), tanto respecto a los valores totales de las fracciones como a los de los distintos monómeros obtenidos por el método de Englyst y col. (1994).

Tabla 10: Monómeros neutros y ácidos urónicos en los residuos obtenidos por el método de Englyst y col. (1994) de semilla de soja y okara (g/100g m.s)

	SEMILLA DE SOJA			OKARA		
	FI	FS	FT	FI	FS	FT
Ramnosa	0,21±0,02	0,15±0,02	0,35±0,03	nd	1,20±0,12	1,20±0,12
Fucosa	0,19±0,04	nd	0,19±0,04	0,32±0,08	0,07±0,01	0,41±0,01
Arabinosa	1,43±0,10	0,59±0,08	2,02±0,20	5,19±0,08	0,87±0,05	6,12±0,04
Xilosa	1,28±0,02	0,09±0,02	1,38±0,05	3,86±0,13	0,18±0,01	4,03±0,03
Manosa	0,45±0,07	0,25±0,03	0,70±0,08	1,30±0,05	0,26±0,03	1,58±0,02
Galactosa	2,43±0,75	1,27±0,18	3,70±0,29	8,71±0,12	2,23±0,04	10,94±0,09
Glucosa	3,96±0,27	0,19±0,03	4,15±0,29	14,47±0,14	0,27±0,04	14,77±0,20
Ac. Uron.	1,37±0,30	1,19±0,13	2,56±0,36	3,13±0,30	1,66±0,03	4,83±0,09
Total	11,32±0,42	3,73±0,38	15,05±0,63	37,01±0,14	6,09±0,04	43,73±0,14

Valor promedio \pm desviación estándar. nd: no detectado

FI=fibra insoluble. FS=fibra soluble. FT=fibra total. Ac. Uron.=ácidos urónicos

La fibra insoluble (FI) es la fracción mayor tanto en semilla de soja ($11,32 \pm 0,42$ g/100g) como en okara ($37,01 \pm 0,14$ g/100g), aunque claramente más alta en esta última. La fibra soluble (FS) es también mayor en okara ($6,09 \pm 0,04$ g/100g) que en semilla de soja ($3,73 \pm 0,38$ g/100g).

Respecto a la FI, todos los monómeros tienen un valor mayor en okara que en semilla de soja, excepto la ramnosa que tiene un valor bajo en semilla de soja ($0,21 \pm 0,02$ g/100g) pero en okara no se detecta. La glucosa (semilla de soja: 35% y okara: 39,1%) y la galactosa (semilla de soja: 21,5% y okara: 23,5%) son los monómeros más abundantes. También presentan cantidades considerables la arabinosa (semilla de soja: 12,6% y okara: 14%), xilosa (semilla de soja: 11,3% y okara: 10,4%) y los ácidos urónicos (semilla de soja: 12,1% y okara: 8,5%). Los monómeros minoritarios son la manosa (semilla de soja: 4% y okara: 3,5%) y la fucosa (semilla de soja: 1,7% y okara: 0,9%).

En la FS, al igual que en la FI, los distintos monómeros siguen el mismo orden, de mayor a menor. Sin embargo, no siempre la cantidad para el mismo monómero es mayor en okara que en semilla de soja. De manera que los monómeros mayoritarios son la galactosa (semilla de soja: 34% y okara: 36,6%), los ácidos urónicos (semilla de soja: 31,9% y okara: 27,3%) y la arabinosa (semilla de soja: 15,8% y okara: 14,3%).

La ramnosa es uno de los monómeros más representativos en okara (19,7%) mientras que en semilla de soja (4%) es prácticamente inexistente. La fucosa es el monómero minoritario en okara (1,2%) y en semilla de soja no se detectó.

Como FI es mucho mayor que FS, el orden de los monómeros en la fibra total (FT) es igual que para FI y se presenta la misma excepción en la ramnosa, ya que aparece en FI y FS en semilla de soja como monómero minoritario, sin

embargo en okara sólo aparece en FS pero en una cantidad considerable (**Tabla 10**).

b) VAINAS DE HABA Y GUISANTE

Se estudia la fibra de las vainas conjuntamente ya que son el mismo tipo de tejido o zona de la planta aunque de leguminosas distintas, de manera que se podrán esperar unos valores semejantes, sin embargo se han encontrado bastantes diferencias.

El valor de FT es mucho mayor en vaina de guisante ($43,46 \pm 1,54$ g/100g) que en vaina de haba ($30,97 \pm 1,19$ g/100g). FI también presenta un valor mucho más alto para vaina de guisante ($37,32 \pm 1,66$ g/100g) que en vaina de haba ($19,24 \pm 0,82$ g/100g) y FS, al contrario, es decir, mayor en vaina de haba ($11,73 \pm 0,82$ g/100g) que en vaina de guisante ($6,14 \pm 0,36$ g/100g) (**Tabla 11**).

En vaina de guisante se puede deducir claramente que las estructuras mayoritarias que forman parte de la FI son la celulosa y las hemicelulosas xiloglucanos, ya que los monómeros mayoritarios son glucosa (41,5%) y xilosa (40,8%) (**Tabla 11**). El resto de monómeros presenta cantidades minoritarias en comparación con la glucosa y la xilosa.

El monómero mayoritario en FI para vaina de haba es la glucosa (45,2%), a continuación, los ácidos urónicos (15,4%), la arabinosa (14,2%) y la galactosa (13,7%), que presentan valores semejantes.

En FS, los monómeros mayoritarios para vaina de guisante son los ácidos urónicos (62,2%) y la galactosa (21,3%), y en vaina de haba son, sobre todo, los ácidos urónicos (72,4%), la arabinosa (12,6%) y la galactosa (9,6%).

Tabla 11: Monómeros neutros y ácidos urónicos en los residuos obtenidos por el método de Englyst y col. (1994) de vaina de haba y vaina de guisante (g/100g m.s)

	VAINA DE HABA			VAINA DE GUISANTE		
	FI	FS	FT	FI	FS	FT
Ramnosa	nd	0,41±0,03	0,43±0,08	0,48±0,06	0,09±0,02	0,56±0,09
Fucosa	0,16±0,02	nd	0,16±0,02	nd	nd	nd
Arabinosa	2,74±0,17	1,48±0,13	4,22±0,20	0,90±0,05	0,50±0,02	1,40±0,19
Xilosa	1,63±0,05	nd	1,63±0,05	15,22±0,31	0,03±0,00	15,24±0,99
Manosa	0,41±0,02	0,09±0,02	0,50±0,02	0,33±0,03	0,15±0,01	0,48±0,06
Galactosa	2,63±0,18	1,12±0,15	3,75±0,28	1,41±0,08	1,31±0,07	2,73±0,31
Glucosa	8,70±0,31	0,15±0,04	8,84±0,31	15,48±1,51	0,24±0,03	15,72±0,78
Ac. Uron.	2,96±0,44	8,49±0,78	11,45±0,99	3,46±0,57	3,82±0,35	7,28±0,81
Total	19,24±0,82	11,73±0,82	30,97±1,19	37,32±1,66	6,14±0,36	43,46±1,54

Valor promedio ± desviación estándar. nd: no detectado

FI=fibra insoluble. FS=fibra soluble. FT=fibra total. Ac. Uron.=ácidos urónicos

4.3. Comparación de los valores de fibra alimentaria obtenidos mediante el método de Englyst y col. (1994) y el método de la AOAC después de hidrólisis y derivatización.

En ausencia de un acuerdo internacional acerca de la definición de fibra alimentaria o del método para analizarla, esta comparación se hace necesaria, ya que los dos métodos más ampliamente utilizados son el método de Englyst y col. (1994) y el método oficial de la AOAC.

Por otro lado, aunque la definición que más consenso de la comunidad científica recoge es la de la AACC (2001) en la que se basa el método de análisis de la AOAC, el método de Englyst y col. (1994) está muy extendido para el análisis de los monómeros que forman parte de los polisacáridos no-almidón, que son los polímeros más abundantes de la fibra.

Estos métodos parten de una definición de fibra alimentaria distinta, aún así el objetivo final es el mismo, es decir el aislamiento de un residuo indigerible por enzimas digestivas que denominan fibra alimentaria.

El método enzimático-químico de Englyst y col. (1994) mide los polisacáridos no-almidón de la pared celular después de retirar completamente el almidón mediante dispersión e hidrólisis enzimática, y el método enzimático-gravimétrico de la AOAC consigue un residuo de composición desconocida entre los que están los polisacáridos no-almidón, oligosacáridos resistentes, lignina, almidón resistente y otras sustancias.

Para que el estudio sea más real se compararán los resultados obtenidos por el método de Englyst y los procedentes de la hidrólisis y derivatización de los residuos del método de la AOAC.

a) SEMILLA DE SOJA Y OKARA

Se puede observar en la **Tabla 12** que todos los monómeros analizados a partir del residuo de la AOAC y por el método de Englyst en la fracción insoluble tienen valores semejantes aunque en algunos casos son significativamente distintos (**Gráfico 17**).

En la FI, el valor de glucosa y xilosa en semilla de soja es algo mayor ($p \leq 0,001$) en el análisis de los residuos obtenidos por la metodología de la AOAC que mediante el método de Englyst. También el valor de arabinosa ($p \leq 0,01$) y el de ramnosa ($p \leq 0,05$) y fucosa ($p \leq 0,05$) es mayor cuando se analizan los residuos obtenidos empleando la metodología de la AOAC.

En okara, los ácidos urónicos ($p \leq 0,001$), la ramnosa ($p \leq 0,001$) y la fucosa ($p \leq 0,01$) son algo mayores en los residuos aislados mediante el método de la

AOAC que mediante el método de Englyst. Sin embargo, a la glucosa ($p \leq 0,05$) le sucede lo contrario (**Tabla 12**).

Tabla 12: Comparativa de la composición monomérica de la fibra insoluble de semilla de soja y okara en los residuos obtenidos por el método de la AOAC y por el método de Englyst y col., 1994 (g/100g m.s)

	SEMILLA DE SOJA			OKARA		
	AOAC	Englyst	Sign	AOAC	Englyst	Sign
Ramnosa	0,25±0,02	0,21±0,02	*	0,57±0,01	nd	***
Fucosa	0,22±0,04	0,19±0,04	*	0,45±0,02	0,32±0,08	**
Arabinosa	1,72±0,28	1,43±0,10	**	5,19±0,07	5,19±0,08	-
Xilosa	1,41±0,03	1,28±0,02	***	3,79±0,11	3,86±0,13	-
Manosa	0,50±0,07	0,45±0,07	-	1,31±0,05	1,30±0,05	-
Galactosa	2,79±0,22	2,43±0,75	-	8,71±0,16	8,71±0,12	-
Glucosa	4,73±0,21	3,96±0,27	***	14,04±0,19	14,47±0,14	*
Ac. Uron.	1,61±0,24	1,37±0,30	-	3,57±0,14	3,13±0,30	***
Total	13,23±1,71	11,32±0,42	***	37,77±0,22	37,01±0,14	***

Valor promedio \pm desviación estándar. nd: no detectado

Sign=Significación. Ac.Uron.=ácidos urónicos. Datos estadísticamente distintos: * ($p \leq 0,05$), ** ($p \leq 0,01$) y *** ($p \leq 0,001$).

En la **Gráfico 17** se puede observar la proporción de cada monómero en la FI, y además, se puede ver que el porcentaje que representa cada uno de esos monómeros es similar sea en el producto semilla de soja o el subproducto okara e independientemente de la metodología usada.

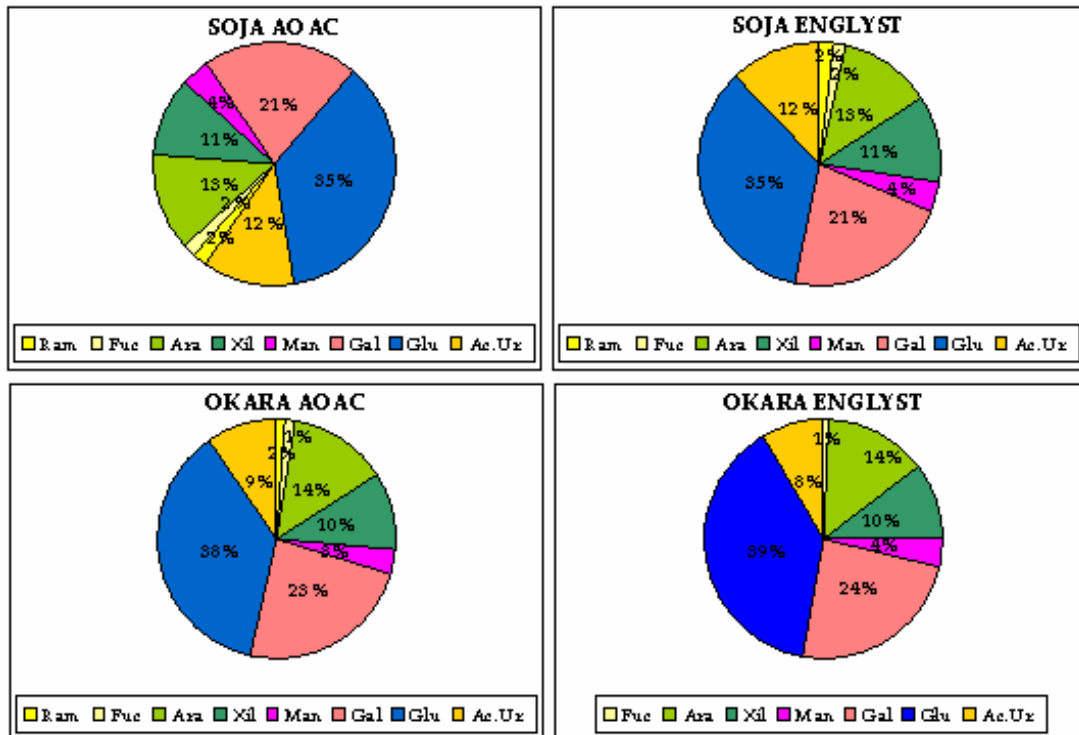


Gráfico 17: Distribución porcentual de la composición monomérica de la FI de semilla de soja y okara. Ram= Ramnosa. Fuc= Fucosa. Ara= Arabinosa. Xil= Xilosa. Man= Manosa. Gal= Galactosa. Glu= Glucosa. Ac. Ur.= Ácidos urónicos

En la FS (**Tabla 13**), en el caso de la semilla de soja los monómeros ramnosa ($p \leq 0,01$), xilosa ($p \leq 0,05$), manosa ($p \leq 0,01$), galactosa ($p \leq 0,05$), glucosa ($p \leq 0,01$) y los ácidos urónicos ($p \leq 0,01$), presentaron valores mayores cuando las muestras se analizaron según el método de Englyst respecto a la hidrólisis de los residuos de la AOAC. En el okara sucede lo mismo respecto a la fucosa ($p \leq 0,05$), la arabinosa ($p \leq 0,001$), la xilosa ($p \leq 0,001$), la galactosa ($p \leq 0,001$) y los ácidos urónicos ($p \leq 0,001$). Además, en el okara, la ramnosa, que presentaba un valor importante cuando fue analizado por el método de Englyst, no se detecta cuando se utiliza la metodología de la AOAC seguida de hidrólisis y determinación cromatográfica.

Tabla 13: Comparativa de la composición monomérica de la fibra soluble de semilla de soja y okara en los residuos obtenidos por el método de la AOAC y por el método de Englyst y col., 1994 (g/100g m.s)

	SEMILLA DE SOJA			OKARA		
	AOAC	Englyst	Sign	AOAC	Englyst	Sign
Ramnosa	0,12±0,02	0,15±0,02	**	nd	1,20±0,12	***
Fucosa	nd	nd	-	0,05±0,00	0,07±0,01	*
Arabinosa	0,57±0,08	0,59±0,08	-	0,60±0,02	0,87±0,05	***
Xilosa	0,07±0,02	0,09±0,02	*	0,13±0,01	0,18±0,01	***
Manosa	0,21±0,02	0,25±0,03	**	0,26±0,02	0,26±0,03	-
Galactosa	1,08±0,14	1,27±0,18	*	1,67±0,03	2,23±0,04	***
Glucosa	0,13±0,03	0,19±0,03	**	0,21±0,04	0,27±0,04	-
Ac. Uron.	0,98±0,09	1,19±0,13	**	0,91±0,10	1,66±0,03	***
Total	3,16±0,19	3,73±0,38	***	3,83±0,14	6,09±0,04	***

Valor promedio ± desviación estándar. nd: no detectado

Sign=Significación. Ac.Uron.=ácidos urónicos. Datos estadísticamente distintos: * (p≤0,05), ** (p≤0,01) y *** (p≤0,001).

En el **Gráfico 18** se puede observar la proporción que representa cada monómero en la fracción soluble. La semilla de soja presenta porcentajes semejantes tanto por el procedimiento de la AOAC con hidrólisis posterior como cuando se aplicó el método de Englyst. Sin embargo, en el caso del okara existen algunas diferencias. La más llamativa es el importante porcentaje que presenta la ramnosa en el análisis por el método de Englyst y, como ya se dijo, cuando se aplicó la metodología de la AOAC no se detectó ramnosa. Además, la galactosa presenta un porcentaje mucho mayor en el caso del método de la AOAC. El resto de monómeros es semejante en ambos casos. De todos modos, es normal que se presenten mayores diferencias en el análisis de la FS ya que el método de Englyst obtiene esta fracción por diferencia, lo que puede conllevar errores.

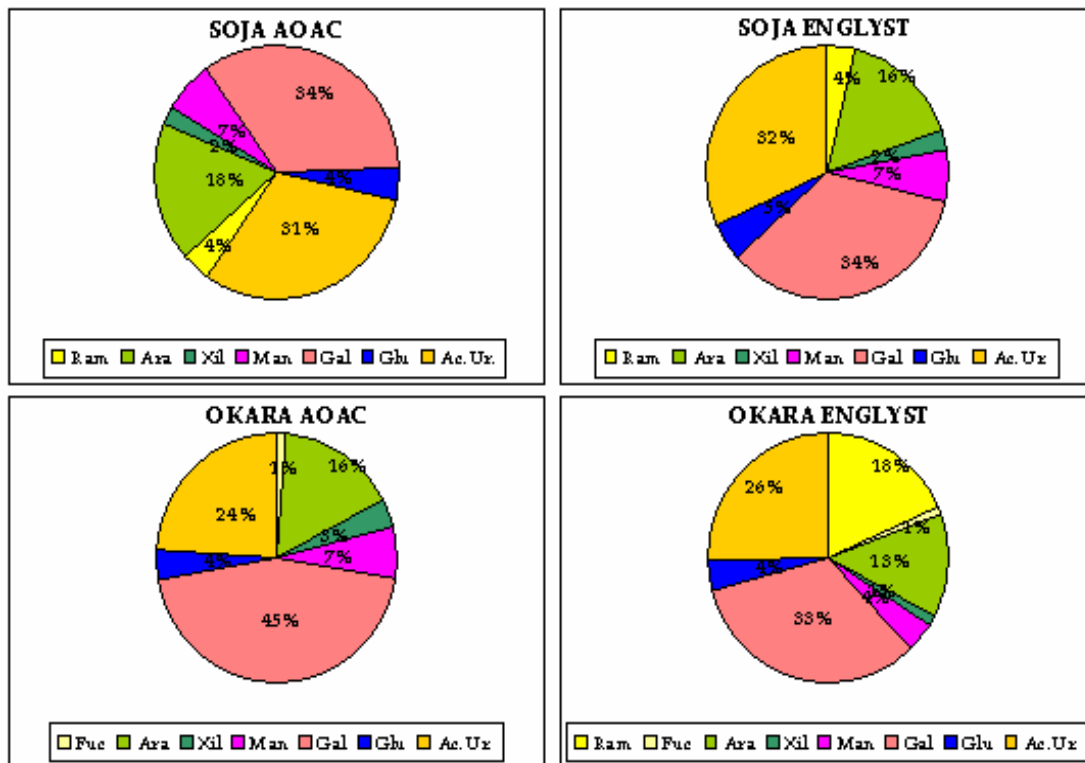


Gráfico 18: Distribución porcentual de la composición monomérica de la FS de semilla de soja y okara. Ram= Ramnosa. Fuc= Fucosa. Ara= Arabinosa. Xil= Xilosa. Man= Manosa. Gal= Galactosa. Glu= Glucosa. Ac. Ur.= Ácidos urónicos

La FT (**Tabla 14**) presenta unos valores muy interesantes desde el punto de vista de aporte de fibra. La mayor parte se debe a la fibra insoluble, de manera que estas muestras analizadas se convierten en interesantes fuentes de fibra insoluble, sobre todo el okara.

La FT presenta como monómeros mayoritarios la glucosa, la galactosa y la arabinosa tanto en semilla de soja como en okara, aunque son mucho mayores los valores para el okara, como en la FI ya que esta fracción es la que está en mayor proporción.

Tabla 14: Comparativa de la composición monomérica de la fibra total de semilla de soja y okara en los residuos obtenidos por el método de la AOAC y por el método de Englyst y col., 1994 (g/100g m.s)

	SEMILLA DE SOJA			OKARA		
	AOAC	Englyst	Sign	AOAC	Englyst	Sign
Ramnosa	0,37±0,03	0,35±0,03	-	0,57±0,01	1,20±0,12	***
Fucosa	0,22±0,04	0,19±0,04	*	0,50±0,01	0,41±0,01	***
Arabinosa	2,29±0,44	2,02±0,20	-	5,79±0,03	6,12±0,04	***
Xilosa	1,48±0,04	1,38±0,05	***	3,92±0,13	4,03±0,03	*
Manosa	0,71±0,03	0,70±0,08	-	1,57±0,04	1,58±0,02	-
Galactosa	3,87±0,84	3,70±0,29	-	10,38±0,03	10,94±0,09	***
Glucosa	4,86±0,15	4,15±0,29	***	14,25±0,92	14,77±0,20	-
Ac. Uron.	2,58±0,17	2,56±0,36	-	4,48±0,20	4,83±0,09	**
Total	16,38±2,05	15,05±0,63	*	41,60±0,40	43,73±0,14	***

Valor promedio ± desviación estándar. nd: no detectado

Sign=Significación. Ac.Uron.=ácidos urónicos. Datos estadísticamente distintos: * (p≤0,05), ** (p≤0,01) y *** (p≤0,001).

En la semilla de soja, la fucosa (p≤0,05), la xilosa (p≤0,001) y la glucosa (p≤0,001) presentan cantidades mayores analizadas por el método de la AOAC con hidrólisis posterior. Sin embargo, en el okara, la ramnosa (p≤0,001), la arabinosa (p≤0,001), la xilosa (p≤0,05), la galactosa (p≤0,001) y los ácidos urónicos (p≤0,01) presentan cantidades menores cuando se aplicó la AOAC. La cantidad de fucosa fue mayor (p≤0,001) en la AOAC que en Englyst.

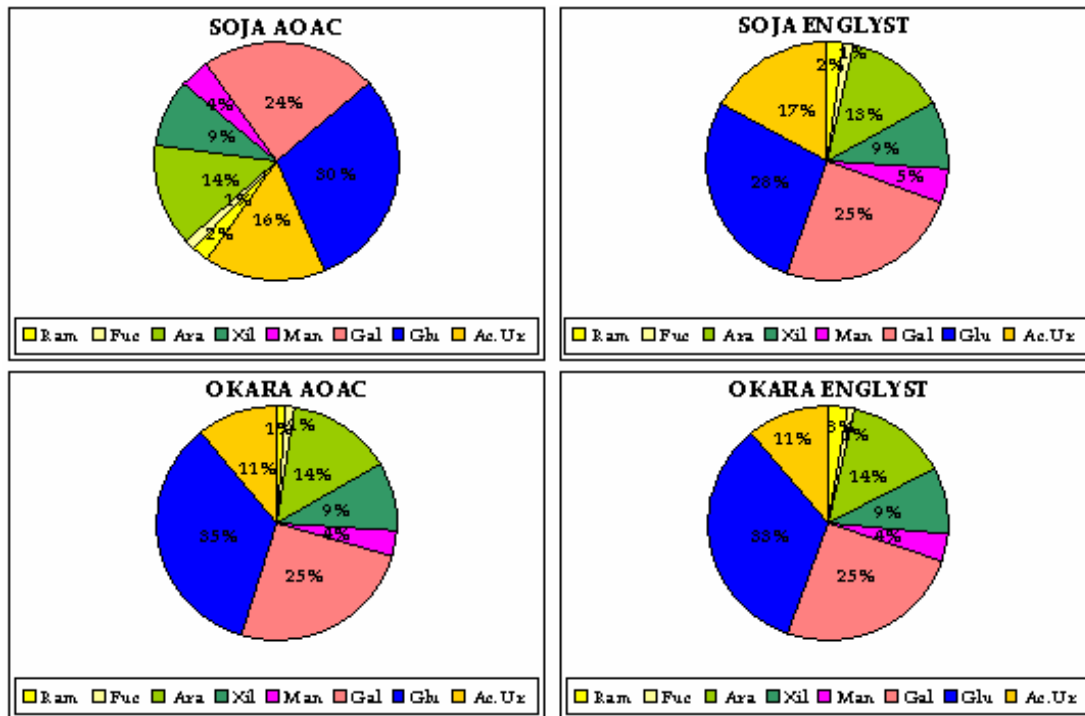


Gráfico 19: Distribución porcentual de la composición monomérica de la FT de semilla de soja y okara. Ram= Ramnosa. Fuc= Fucosa. Ara= Arabinosa. Xil= Xilosa. Man= Manosa. Gal= Galactosa. Glu= Glucosa. Ac. Ur.= Ácidos urónicos

En el **Gráfico 19** se puede observar el porcentaje que representa cada monómero en la FT. Se puede ver que la distribución de los monómeros es similar tanto en el producto semilla de soja como el subproducto okara e independiente de la metodología usada. Aunque existen ligeras diferencias en la misma muestra cuando es analizada por uno u otro método debidas a la FS como se vio en el **Gráfico 18**. Además, la glucosa es mayor en el caso del okara y los ácidos urónicos mayores en la semilla de soja. Estos valores son razonables ya que el subproducto okara presenta una mayor FI que la semilla de soja de la que proviene, de manera que aumenta la glucosa por ser el monómero más característico de esta fracción. Sin embargo, los ácidos urónicos presentes en las semillas de soja pertenecen en su mayoría a la FS y pasarían, en gran parte, a la leche de soja o al suero, también subproducto de la obtención de la leche de soja.

El okara contiene más fibra que la semilla de soja, pero sigue teniendo la misma distribución de monómeros y por lo tanto, en principio, las mismas propiedades.

b) VAINAS DE HABA Y GUISANTE

La FI es la fracción mayoritaria tanto para la vaina de haba como para la vaina de guisante, ya sea analizada por AOAC más hidrólisis o por Englyst. El método de la AOAC cuantifica valores superiores tanto en la vaina de haba (AOAC: 24,98 g/100g; Englyst: 19,24 g/100g) como en la vaina de guisante (AOAC: 43,22 g/100g; Englyst: 37,32 g/100g). Además, la vaina de guisante presenta una cantidad de FI mucho mayor que la que presenta la vaina de haba. Los valores de los monómeros analizados son diferentes en las dos vainas estudiadas (**Tabla 15**).

Todos los monómeros analizados, tanto en vaina de haba como en vaina de guisante, presentan una mayor cantidad cuando las muestras son analizadas por la AOAC más hidrólisis en lugar de emplear el método de Englyst.

En la vaina de haba, no se detectó ramnosa cuando se utilizó el método de Englyst. Las cantidades de galactosa ($p \leq 0,05$) y la fucosa, xilosa, galactosa, glucosa y los ácidos urónicos ($p \leq 0,001$) fueron significativamente más altas en el método de la AOAC.

En la vaina de guisante, no se detectó fucosa aplicando la metodología de Englyst. La ramnosa, arabinosa y manosa ($p \leq 0,05$), arabinosa, xilosa, glucosa y ácidos urónicos ($p \leq 0,001$) presentan valores mayores en el análisis por la AOAC (**Tabla 15**).

Tabla 15: Comparativa de la composición monomérica de la fibra insoluble de vaina de haba y vaina de guisante en los residuos obtenidos por el método de la AOAC y por el método de Englyst y col., 1994 (g/100g m.s)

	VAINA DE HABA			VAINA DE GUISANTE		
	AOAC	Englyst	Sign	AOAC	Englyst	Sign
Ramnosa	0,34±0,03	nd	***	0,51±0,03	0,48±0,06	*
Fucosa	0,18±0,01	0,16±0,02	-	0,06±0,02	nd	***
Arabinosa	3,27±0,03	2,74±0,17	***	0,95±0,05	0,90±0,05	*
Xilosa	1,86±0,12	1,63±0,05	***	16,69±0,47	15,22±0,31	***
Manosa	0,40±0,01	0,41±0,02	-	0,37±0,01	0,33±0,03	*
Galactosa	3,23±0,62	2,63±0,18	*	1,76±0,07	1,41±0,08	***
Glucosa	9,86±0,52	8,70±0,31	***	18,76±0,50	15,48±1,51	***
Ac. Uron.	5,96±0,41	2,96±0,44	***	4,12±0,67	3,46±0,57	***
Total	24,98±1,19	19,24±0,82	***	43,22±0,75	37,32±1,66	***

Valor promedio ± desviación estándar. nd: no detectado

Sign=Significación. Ac.Uron.=ácidos urónicos. Datos estadísticamente distintos: * (p≤0,05), ** (p≤0,01) y *** (p≤0,001).

Los porcentajes de los monómeros en cada muestra para cada método son parecidos, excepto en el caso de la vaina de haba, que presenta variabilidad en la glucosa (mayor cuando se utilizó el método de Englyst) y los ácidos urónicos (mayores en la AOAC).

La vaina de haba y la vaina de guisante presentan gran variabilidad en sus porcentajes, sobre todo en el caso de la xilosa, mucho mayor en vaina de guisante. La arabinosa, galactosa y los ácidos urónicos son, sin embargo, mayores en vaina de haba (**Gráfico 20**).

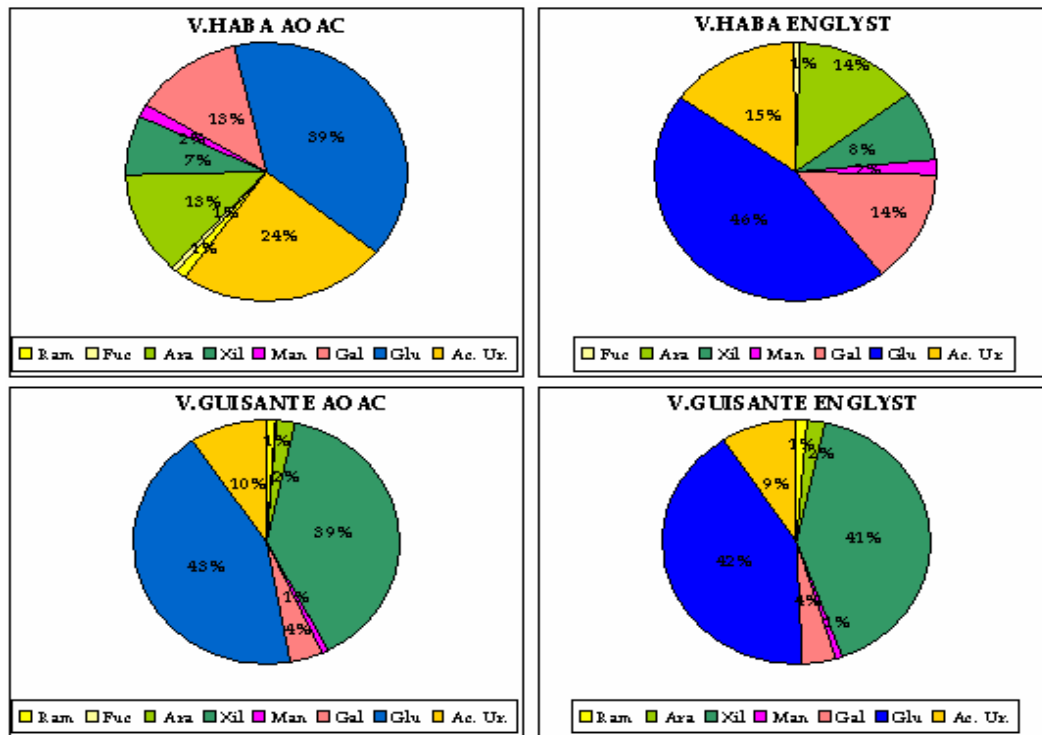


Gráfico 20: Distribución porcentual de la composición monomérica de la FI de las vainas de haba y guisante. Ram= Ramnosa. Fuc= Fucosa. Ara= Arabinosa. Xil= Xilosa. Man= Manosa. Gal= Galactosa. Glu= Glucosa. Ac. Ur.= Ácidos urónicos

FS presenta unos resultados mucho más bajos que FI tanto en vaina de haba como en vaina de guisante. Aunque la cantidad en la vaina de haba es bastante más alta que en la vaina de guisante.

Al contrario de lo que sucede en la FI, la FS es superior cuando se analiza por el método de Englyst tanto en vaina de haba (AOAC: 8,75 g/100g; Englyst: 11,73 g/100g) como en vaina de guisante (AOAC: 4,05 g/100g; Englyst: 6,14 g/100g). Esto se debe principalmente al valor de los ácidos urónicos más elevado obtenido cuando se aplicó el método de Englyst que el de la AOAC más hidrólisis.

El resto de monómeros también presenta cantidades algo mayores en el análisis de Englyst que en el de la AOAC más hidrólisis, excepto en vaina de haba

donde el valor de manosa es algo superior ($p \leq 0,001$) en la AOAC más hidrólisis que en Englyst.

En vaina de haba, la ramnosa no se detectó en el análisis por la AOAC más hidrólisis. La arabinosa ($p \leq 0,05$) y la galactosa, la glucosa y los ácidos urónicos ($p \leq 0,001$) son mayores cuando se utilizó el método de Englyst.

En la vaina de guisante, la xilosa ($p \leq 0,05$), la glucosa ($p \leq 0,01$) y la ramnosa, la arabinosa, la galactosa y los ácidos urónicos ($p \leq 0,001$) presentan valores mayores en el método de Englyst (**Tabla 16**).

Tabla 16: Comparativa de la composición monomérica de la fibra soluble de vaina de haba y vaina de guisante en los residuos obtenidos por el método de la AOAC y por el método de Englyst y col., 1994 (g/100g m.s)

	VAINA DE HABA			VAINA DE GUISANTE		
	AOAC	Englyst	Sign	AOAC	Englyst	Sign
Ramnosa	nd	0,41±0,03	***	0,05±0,00	0,09±0,02	***
Fucosa	nd	nd	-	nd	nd	-
Arabinosa	1,36±0,04	1,48±0,13	*	0,33±0,01	0,50±0,02	***
Xilosa	nd	nd	-	0,02±0,00	0,03±0,00	*
Manosa	0,15±0,01	0,09±0,02	***	0,13±0,02	0,15±0,01	-
Galactosa	0,86±0,05	1,12±0,15	***	1,04±0,00	1,31±0,07	***
Glucosa	0,09±0,01	0,15±0,04	***	0,19±0,02	0,24±0,03	**
Ac. Uron.	6,29±0,94	8,49±0,78	***	2,27±0,16	3,82±0,35	***
Total	8,75±0,89	11,73±0,82	***	4,05±0,20	6,14±0,36	***

Valor promedio \pm desviación estándar. nd: no detectado

Sign=Significación. Ac.Uron.=ácidos urónicos. Datos estadísticamente distintos: * ($p \leq 0,05$), ** ($p \leq 0,01$) y *** ($p \leq 0,001$).

En el **Gráfico 21** se puede observar que los porcentajes de los monómeros son muy semejantes en ambos métodos para la misma muestra, excepto en el caso

de los ácidos urónicos en vaina de guisante que es mayor en Englyst que en la AOAC más hidrólisis. La arabinosa y los ácidos urónicos son mayoritarios en la vaina de haba, mientras que la galactosa y la glucosa son mayores en la vaina de guisante. El resto de monómeros presenta porcentajes similares en las dos muestras.

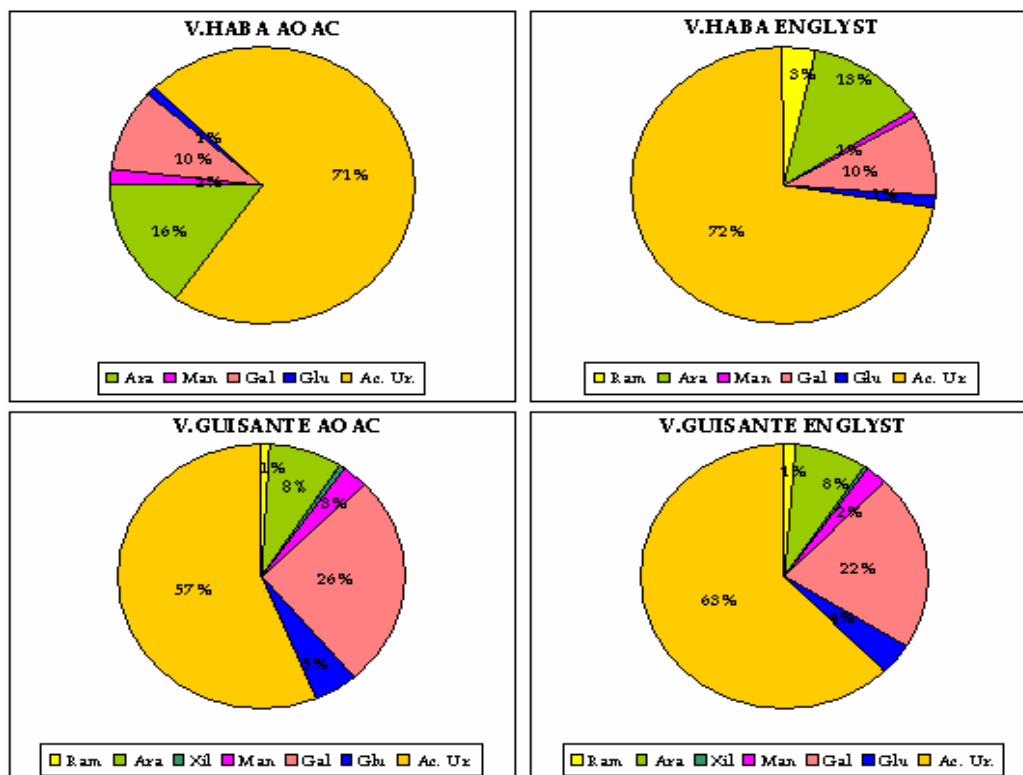


Gráfico 21: Distribución porcentual de la composición monomérica de la FS de vaina de haba y vaina de guisante. Ram= Ramnosa. Fuc= Fucosa. Ara= Arabinosa. Xil= Xilosa. Man= Manosa. Gal= Galactosa. Glu= Glucosa. Ac. Ur.= Ácidos urónicos

La FT presenta la misma distribución que la FI porque esta es la fracción mayoritaria. Así, la vaina de guisante contiene una cantidad de FT mucho mayor que la vaina de haba, y también los valores de los monómeros analizados son diferentes en las vainas estudiadas. Como la distribución es la misma que en la FI, los monómeros mayoritarios en vaina de haba son la

glucosa, mayor ($p \leq 0,001$) en AOAC más hidrólisis, y los ácidos urónicos que no presentan diferencia significativa. La arabinosa y la xilosa, con valores superiores ($p \leq 0,001$) en la AOAC más hidrólisis, y la galactosa, sin diferencia significativa, presentan cantidades apreciables. Con respecto a los monómeros mayoritarios de la vaina de guisante, destacan la glucosa y la xilosa, con valores más altos ($p \leq 0,001$) en la AOAC más hidrólisis. Además, el valor de ácidos urónicos, significativamente mayor ($p \leq 0,01$) en Englyst, es considerable. En general, los monómeros se presentan en mayor cantidad cuando las muestras son analizadas por la AOAC más hidrólisis (**Tabla 17**).

Tabla 17: Comparativa de la composición monomérica de la fibra total de vaina de haba y vaina de guisante en los residuos obtenidos por el método de la AOAC y por el método de Englyst y col., 1994 (g/100g m.s)

	VAINA DE HABA			VAINA DE GUISANTE		
	AOAC	Englyst	Sign	AOAC	Englyst	Sign
Ramnosa	0,34±0,03	0,43±0,08	***	0,57±0,04	0,56±0,09	-
Fucosa	0,18±0,01	0,16±0,02	*	0,06±0,02	nd	***
Arabinosa	4,63±0,05	4,22±0,20	***	1,28±0,04	1,40±0,19	***
Xilosa	1,86±0,12	1,63±0,05	***	16,71±1,52	15,24±0,99	***
Manosa	0,56±0,01	0,50±0,02	***	0,50±0,01	0,48±0,06	-
Galactosa	4,09±0,59	3,75±0,28	-	2,80±0,05	2,73±0,31	-
Glucosa	9,95±0,52	8,84±0,31	***	18,94±0,93	15,72±0,78	***
Ac. Uron.	12,25±0,76	11,45±0,99	-	6,39±0,32	7,28±0,81	**
Total	33,73±1,42	30,97±1,19	*	47,26±1,86	43,46±1,54	***

Valor promedio ± desviación estándar. nd: no detectado

Sign=Significación. Ac.Uron.=ácidos urónicos. Datos estadísticamente distintos: * ($p \leq 0,05$), ** ($p \leq 0,01$) y *** ($p \leq 0,001$).

Para estudiar la distribución monomérica de la fibra total de las vainas de haba y de guisante de una forma comparativa los resultados se expresan en tanto por ciento considerando la fibra como el 100% (**Gráfico 22**).

Se puede observar que las diferencias para los métodos utilizados son mínimas y que las diferencias que se pueden señalar se refieren a las muestras. De manera que los porcentajes de glucosa y xilosa son mayores en vaina de guisante mientras que el porcentaje, sobre todo de ácidos urónicos pero también de arabinosa y galactosa, es mayor en vaina de haba.

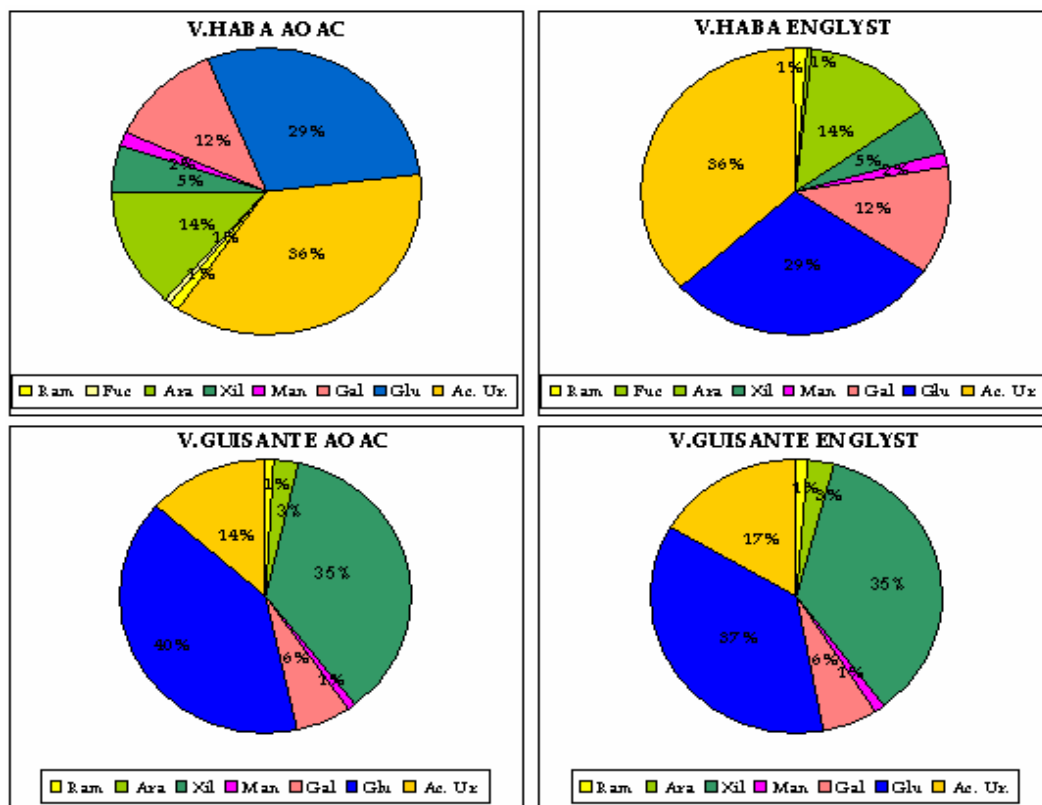


Gráfico 22: Distribución porcentual de la composición monomérica de la FT de vaina de haba y vaina de guisante Ram= Ramnosa. Fuc= Fucosa. Ara= Arabinosa. Xil= Xilosa. Man= Manosa. Gal= Galactosa. Glu= Glucosa. Ac. Ur.= Ácidos urónicos

5. ESTUDIO DE LA LIGNINA

La lignina es un polímero de alto peso molecular con estructura tridimensional formada a base de unidades de los alcoholes aromáticos sinapil y coniferil. Este

polímero se encuentra químicamente unido a las hemicelulosas en la pared de la célula vegetal y se la incluye, normalmente, dentro de la categoría de fibra alimentaria (AACC, 2001; Mataix y Gassull, 2002; Gray, 2006).

La lignina sólo se deposita en las paredes secundarias, en las cuales constituye, junto a las proteínas, la fracción mayoritaria de los componentes no polisacáridicos de la pared celular (Mataix y Gassull, 2002; Gray, 2006). La cantidad de lignina sumada a los PNA, se tendría que aproximar al valor del residuo indigerible que se obtiene mediante el método de la AOAC (1995a,b).

Tabla 18: Valores de lignina obtenidos mediante un método basado en la lignina Klason (Theander y Westerlund, 1986) de okara, vaina de haba y vaina de guisante (g/100g m.s.)

	Residuo	Cenizas	Proteínas	Lignina
Okara	10,31±1,17	0,38±0,01	1,50±0,08	8,43±1,75
VH	10,98±0,05	0,70±0,01	1,23±0,02	9,05±0,91
VG	11,57±1,06	nd	1,40±0,01	10,17±0,89

Valor promedio ± desviación estándar. nd: no detectado
VH= vaina de haba. VG= vaina de guisante

El valor de lignina más alto es el de la vaina de guisante, seguido de la vaina de haba y por último el okara.

Los valores totales (**Tabla 19**) obtenidos sumando las cantidades de los monómeros que componen los PNA, analizados en los residuos del método de Englyst y en el de la AOAC más hidrólisis, más los valores de lignina son muy parecidos a los valores de fibra total (**Tabla 1**) obtenidos sumando los residuos gravimétricos de FI y FS del método de la AOAC aplicado.

Tabla 19: Valores totales de fibra alimentaria de okara, vaina de haba y vaina de guisante obtenidos sumando los PNA y la lignina (g/100g m.s.)

	PNA Englyst	Lignina	Total	PNA AOAC	Lignina	Total
Okara	43,73±0,14	8,43±1,75	52,16±1,81	41,60±0,40	8,43±1,75	50,03±1,98
VH	30,97±1,19	9,05±0,91	40,02±2,10	33,73±1,42	9,05±0,91	42,78±0,51
VG	43,46±1,54	10,17±0,89	53,63±0,65	47,26±1,86	10,17±0,89	57,43±0,97

Valor promedio ± desviación estándar

VH= vaina de haba. VG= vaina de guisante

6. FRACCIONAMIENTO DE LA FIBRA ALIMENTARIA. ESTUDIO DE LAS CARACTERÍSTICAS DE LOS POLÍMEROS QUE LA INTEGRAN

En el apartado anterior, se han analizado las cantidades de fibra alimentaria por dos métodos y se ha establecido una comparativa entre los resultados obtenidos. Los valores de los monómeros analizados por GLC, tanto de los polisacáridos obtenidos mediante el método de la AOAC más hidrólisis como los de Englyst, nos dan una idea de las estructuras polisacáridicas que constituyen los polisacáridos no almidón (PNA).

Para intentar profundizar en el conocimiento de esas estructuras se realizó un fraccionamiento secuencial, basado en el método que describe Weightman y col. (1994) y Huisman (2000).

El fundamento es la utilización de diferentes extractantes para separar los diferentes polímeros, que constituyen la fibra, dependiendo de su solubilidad o no en ellos. El fraccionamiento secuencial permitirá un conocimiento más aproximado de cada una de las fracciones aisladas y de los polímeros que las integran, de manera que se podrá saber que polímeros forman parte de las sustancias pécticas o si son polímeros hemicelulósicos.

El okara, vaina de haba y vaina de guisante liofilizados se desengrasan y posteriormente se desproteinizan. Al residuo que se obtiene se le extraen los azúcares solubles en etanol 85°, de manera que una vez desecado, se aisló un residuo rico en fibra alimentaria. Los residuos aislados se pesaron y supusieron un rendimiento del 81,3% en el okara, 77,02% en la vaina de haba y 86,8% en vaina de guisante, de manera que probablemente parte de la proteína permanece en el residuo rico en fibra alimentaria debido a que está muy ligada a la estructura de la pared celular. Los sobrenadantes recogidos después del desproteinizado y de la extracción de azúcares solubles no presentaron ácidos urónicos después de ser analizados mediante el método de Scott (1979).

En el residuo rico en fibra alimentaria se realiza el fraccionamiento con los extractantes: CDTA 0,05M+oxalato amónico (extracto de CDTA), NaOH 0,05M (extracto de NaOH), KOH 1M (extracto de KOH 1M), KOH 4M (extracto de KOH 4M) y NaClO₂ 0,3% (extracto de NaClO₂). De manera que se obtienen diferentes extractos y un residuo final (RES) después de todas las extracciones. Todos ellos se neutralizan, se concentran y se dializan, para posteriormente ser liofilizados.

Los materiales liofilizados fueron sometidos al estudio de los monómeros constituyentes mediante hidrólisis de estos y posterior derivatización para su análisis por GLC (Englyst y col., 1994).

Además, se midieron los ácidos urónicos por espectrofotometría (Scott, 1979) y la cantidad de metanol por GLC (Ng y col., 1998) y de calcio por absorción atómica (Sagardoy, 2002) en cada extracto y en el residuo final.

6.1. Estudio monomérico de las fracciones obtenidas en los subproductos de okara, vaina de haba y vaina de guisante

Con el fraccionamiento aplicado se obtienen seis fracciones:

- **Extracto de CDTA:** Fracción obtenida con el extractante CDTA 0,05 M y NH_4 -oxalato 0,05 M en tampón acetato sódico 0,05 M (pH 4,8-5,2). El CDTA y el oxalato amónico se utilizan para extraer Ca^{2+} de las paredes celulares y por tanto liberan la mayoría de los polisacáridos pécticos unidos a las paredes celulares mediante enlaces iónicos cruzados (Huisman, 2000).
- **Extracto de NaOH:** Fracción obtenida con la solución extractante NaOH 0,05M. El álcali diluido extrae parcialmente los polisacáridos pécticos remanentes, los cuales, probablemente, están unidos en la pared celular mediante enlaces ester cruzados (Huisman, 2000).
- **Extracto de KOH 1M:** Fracción obtenida con el extractante KOH 1M. Este álcali solubiliza cantidades apreciables de material péctico conjuntamente con las hemicelulosas (Weightman y col., 1994; Huisman, 2000).
- **Extracto de KOH 4M:** Fracción obtenida con la solución extractante KOH 4M. El álcali fuerte extrae hemicelulosas aunque puede extraer parcialmente material péctico unido a estas (Weightman y col., 1994; Huiman, 2000).
- **Extracto de NaClO_2 :** Fracción obtenida utilizando NaClO_2 0,3% a pH 4,2-4,7 (ácido acético 0,12%) (Ghosh y col., 2004). Este extractante permite separar la lignina, pero debido a su naturaleza ácida y a las condiciones aplicadas ($T^a = 75^\circ\text{C}$), también se puede extraer material péctico retenido en la pared debido a un tratamiento previo insuficiente, o más probablemente,

debido a la naturaleza de la unión y la complejidad de la pared celular de la muestra.

- **RES:** Residuo remanente después de las extracciones secuenciales. Su naturaleza se presupone rica en glucosa, ya que contendría a la celulosa.

a) OKARA

En la **Tabla 20** y el **Gráfico 23** se observan los rendimientos y el contenido monomérico total de las distintas fracciones obtenidas mediante el fraccionamiento aplicado. Este contenido monomérico está expresado en g/100g de okara desengrasado.

Tabla 20: Rendimientos y contenido monomérico de las distintas fracciones obtenidas para el subproducto okara

EXTRACTO	RENDIMIENTO (%)	CONTENIDO MONÓMEROS (g/100g)
CDTA	15,8	2,26
NaOH	2,8	2,3
KOH 1M	19	2,78
KOH 4M	12,9	4,65
NaClO ₂	18,7	3,07
RES	20,8	16,54

Rendimiento= (peso extracto x100)/RIA

El contenido monomérico está expresado en g/100g de muestra desengrasada

El valor de RES es mucho mayor ($p \leq 0,05$) que el resto de fracciones. El resultado alcanzado en el extracto de KOH 4M es también muy interesante. Estas dos fracciones contienen la celulosa (RES) y la mayor parte de las hemicelulosas (extracto de KOH 4M). Estas fracciones podrían considerarse constituyentes de la FI.

Los extractos de CDTA, NaOH y KOH 1M contienen los polímeros pécticos y algunas hemicelulosas que constituirían la FS.

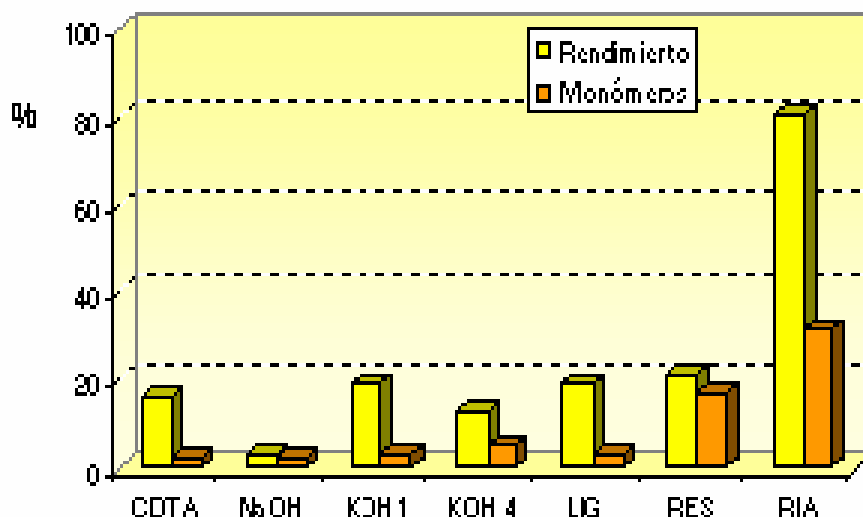


Gráfico 23: Rendimientos y monómeros constituyentes de las distintas fracciones en okara

La **Tabla 21** muestra la cantidad de los distintos monómeros en cada extracto y la cantidad que existe en total de cada monómero expresado en g/100g de okara desengrasado. Como se puede observar, en esta tabla, ramnosa, arabinosa, manosa, galactosa, glucosa y ácidos urónicos son monómeros mayoritarios en el RES. Sin embargo, el valor de fucosa y la xilosa son más altos en el extracto de KOH 4M.

Los extractos de CDTA, NaOH y KOH 1M presentan como monómeros mayoritarios los ácidos urónicos, la galactosa y la arabinosa. Aunque las cantidades en cada extracto son diferentes, así en el extracto de CDTA los ácidos urónicos presentan un valor elevado (54,9%), seguido por la galactosa (20%) y en último lugar la arabinosa (11%). El extracto de NaOH sigue el mismo orden pero con cantidades más cercanas entre los distintos monómeros, ácidos urónicos: 38,7%, galactosa: 31,7% y arabinosa: 21,3%. Sin embargo, en el

extracto de KOH 1M, el monómero mayoritario es la galactosa (37,4%) seguido de la arabinosa (21,9%) y por último los ácidos urónicos (16,2%). También presenta una cantidad apreciable de xilosa (12,6%).

Tabla 21: Fraccionamiento secuencial aplicado al subproducto okara (g/100g m.s)

	Ram	Fuc	Ara	Xil	Man	Gal	Glu	Ac.Ur.
CDTA	0,06±0,01 ^b	0,04±0,01 ^a	0,25±0,01 ^a	0,10±0,00 ^a	0,03±0,00 ^a	0,45±0,03 ^a	0,09±0,00 ^b	1,24±0,03 ^c
NaOH	nd	0,03±0,01 ^a	0,49±0,01 ^b	0,13±0,01 ^b	0,04±0,01 ^b	0,73±0,02 ^b	nd	0,89±0,06 ^b
KOH 1	0,03±0,01 ^a	0,06±0,00 ^b	0,61±0,09 ^c	0,35±0,02 ^d	0,10±0,01 ^c	1,04±0,05 ^c	0,14±0,02 ^c	0,45±0,04 ^a
KOH 4	0,07±0,01 ^b	0,10±0,02 ^d	0,66±0,01 ^d	1,43±0,03 ^f	0,25±0,02 ^d	1,11±0,02 ^c	0,58±0,09 ^d	0,45±0,03 ^a
NaClO₂	0,07±0,01 ^b	0,04±0,02 ^a	0,75±0,04 ^e	0,16±0,02 ^c	nd	1,08±0,08 ^c	0,05±0,00 ^a	0,92±0,15 ^b
RES	0,10±0,00 ^c	0,09±0,01 ^c	1,24±0,05 ^f	0,51±0,05 ^e	0,50±0,06 ^e	1,93±0,11 ^d	10,74±0,73 ^e	1,43±0,41 ^d
Total	0,33±0,00	0,36±0,01	4,01±0,05	2,67±0,05	0,92±0,10	6,33±0,11	11,59±0,06	5,38±0,15

Valor promedio ± desviación estándar. nd: no detectado

Ram= Ramnosa. Fuc= Fucosa. Ara= Arabinosa. Xil= Xilosa. Man= Manosa. Gal= Galactosa. Glu= Glucosa. Ac. Ur.= Ácidos urónicos

Diferentes letras en la misma columna representa diferencias significativas ($p \leq 0,05$) según el test de múltiple rango (Test de Duncan)

La composición monomérica de los extractos de CDTA, NaOH y KOH 1M podría indicar la presencia de arabinogalactanos, galactanos o arabinanos, cadenas laterales de los ramnagalacturonanos, principal constituyente de las sustancias pécticas. Además, la cantidad destacable de xilosa en el extracto de KOH 1M, podría hacer pensar en la existencia, además de las regiones de ramnagalacturonano, en regiones de xilogalacturonano, descritas en piel de guisante (Weightman y col., 1994), en manzana (Schols y col., 1995), en melón y algodón (Yu y col., 1996) y en harina de soja (Huisman, 2000). La distribución y proporción de los datos de este estudio son bastante similares a las encontradas para los mismos extractos por Huisman (2000) para harina de soja.

El extracto de KOH 4M, por la naturaleza del extractante que solubiliza sobre todo hemicelulosas, presenta como monómeros mayoritarios la xilosa (30,8%) y la galactosa (23,9%). La arabinosa (14,2%) y la glucosa (12,5%) son monómeros con cantidades apreciables. Esto confirmaría la presencia de los xiloglucanos y xilanos, hemicelulosas neutras ampliamente extendidas, pero también algún pentosano de arabinosa y xilosa y/o hexosano de galactosa, manosa y glucosa.

El extractante NaClO₂ 0,3% (pH 4,2-4,7) se usó para extraer lignina pero, además, se midió la cantidad de PNA extraídos por GLC. Los monómeros mayoritarios son la galactosa (35,2%), los ácidos urónicos (30%) y la arabinosa (24,4%). Este extracto presenta el mismo perfil que las fracciones obtenidas con el CDTA, el NaOH 0,05M y el KOH 1M, de manera que presentaría polímeros de la misma naturaleza, es decir polisacáridos pécticos. Esto es lógico porque el tratamiento con NaClO₂/ácido acético (pH ácido) solubiliza material péctico adicional. Este tratamiento deslignificador causa degradación oxidativa de polifenoles, lo que sugiere que este material péctico esté unido en las paredes celulares mediante enlaces cruzados fenólicos o ester fenólicos (Selvendran, 1985).

En el RES, el monómero mayoritario es claramente la glucosa (65%). Es destacable que el resto de monómeros, aunque con valores mucho menores que la glucosa, presentan la cantidad más alta en comparación con el resto de fracciones, por lo que viene a confirmar que la arquitectura de la pared celular de la semilla de soja, y por tanto el okara, es compleja y la accesibilidad a ella es limitada.

Observando las cantidades totales de los monómeros analizados en la **Tabla 20**, la glucosa es el monosacárido mayoritario (36,7%) debido a la presencia de la celulosa, que es el componente más abundante de las paredes celulares de las plantas superiores (Lineback, 1999; Mataix y Gassull, 2002). La disposición

estructural junto a la composición química de la celulosa le confiere un carácter insoluble en agua, por eso, al analizar la fracción insoluble se observa que la mayoría de esa glucosa se concentra en esta fracción.

La glucosa también forma parte de los xiloglucanos, que son los polisacáridos hemicelulósicos más importantes de la pared celular de la mayoría de las leguminosas. Estos consisten en cadenas de glucosa donde la mitad de estos residuos tienen cadenas de xilosa, frecuentemente unidas con otros azúcares como galactosa, fucosa y arabinosa (Huisman 2000). Por ello, la xilosa presenta una cantidad apreciable (8,5%)

Las cantidades altas de galactosa (20%), ácidos urónicos (17%) y arabinosa (12,7%) se deben, sobre todo a los arabinogalactanos (Van de Vis 1994, Huisman y col. 1998, Huisman 2000).

b) VAINA DE HABA

En la **Tabla 22** y el **Gráfico 24** se observan los rendimientos y contenido monomérico de las distintas fracciones obtenidas mediante el fraccionamiento aplicado. Este contenido monomérico está expresado en g/100g de vaina de haba desengrasada.

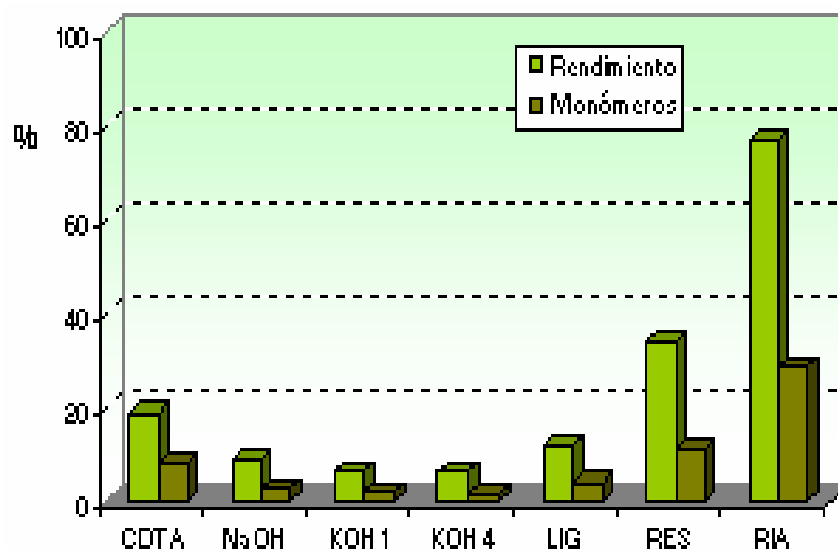
El RES presenta el valor más alto ($p \leq 0,05$) seguido del extracto de CDTA. El resto de fracciones son más pequeñas en comparación con las anteriores, aunque el extracto de NaClO_2 presenta una cantidad destacable.

Tabla 22: Rendimientos y contenido monomérico de las distintas fracciones obtenidas para el subproducto vaina de haba

EXTRACTO	RENDIMIENTO (%)	CONTENIDO MONÓMEROS (g/100g)
CDTA	18,7	8,17
NaOH	8,5	2,26
KOH 1M	5,8	1,89
KOH 4M	5,5	1,59
NaClO ₂	11,5	3,99
RES	34	10,89

Rendimiento= (peso extracto x100)/RIA

El contenido monomérico está expresado en g/100g de muestra desengrasada

**Gráfico 24:** Rendimientos y monómeros constituyentes de las distintas fracciones en vaina de haba

La **Tabla 23** muestra la composición monomérica de cada extracto y la cantidad total de cada monómero. Ramnosa, arabinosa, xilosa, manosa, galactosa y glucosa son monómeros mayoritarios en el RES. Sin embargo, el valor de fucosa es más alto en el extracto de KOH 4M, y el valor de los ácidos urónicos en el de CDTA.

En el extracto de CDTA, los ácidos urónicos son los monómeros claramente mayoritarios (88,6%), no sólo con respecto al resto de monómeros en la misma fracción, sino en comparación con el resto de fracciones. La arabinosa (5,6%) y la galactosa (4,5%) aparece en cantidades apreciables. El extracto de NaOH presenta como monómeros principales los mismos que el extracto de CDTA, los ácidos urónicos (75,7%), la arabinosa (9,7%) y la galactosa (9,3%), pero con valores menores, sobre todo en el caso de los ácidos urónicos. Se puede deducir la presencia de arabinogalactanos, galactanos y/o arabinanos.

Tabla 23: Fraccionamiento secuencial aplicado al subproducto vaina de haba (g/100g m.s)

	Ram	Fuc	Ara	Xil	Man	Gal	Glu	Ac.Ur.
CDTA	nd	nd	0,46±0,01 ^c	0,02±0,00 ^a	0,02±0,00 ^b	0,37±0,01 ^c	0,06±0,00 ^a	7,24±0,63 ^c
NaOH	nd	nd	0,22±0,03 ^b	0,02±0,00 ^a	nd	0,21±0,01 ^b	0,10±0,00 ^a	1,71±0,02 ^b
KOH 1	nd	nd	0,11±0,00 ^a	0,06±0,00 ^c	nd	0,08±0,00 ^a	1,58±0,17 ^d	0,05±0,01 ^a
KOH 4	nd	0,05±0,00 ^b	0,09±0,01 ^a	0,39±0,01 ^d	0,06±0,00 ^c	0,14±0,01 ^{ab}	0,79±0,01 ^c	0,07±0,02 ^a
NaClO₂	0,10±0,00 ^a	nd	0,76±0,06 ^d	0,04±0,00 ^b	0,01±0,00 ^a	0,81±0,07 ^d	0,47±0,01 ^b	1,80±0,35 ^b
RES	0,13±0,04 ^b	0,02±0,00 ^a	1,14±0,04 ^e	0,49±0,02 ^e	0,26±0,02 ^d	0,99±0,07 ^e	6,14±0,45 ^e	1,71±0,05 ^b
Total	0,23±0,00	0,06±0,00	2,79±0,05	1,03±0,05	0,36±0,00	2,60±0,11	9,15±0,16	12,58±0,65

Valor promedio ± desviación estándar. nd: no detectado

Ram= Ramnosa. Fuc= Fucosa. Ara= Arabinosa. Xil= Xilosa. Man= Manosa. Gal= Galactosa. Glu= Glucosa. Ac. Ur.= Ácidos urónicos

Diferentes letras en la misma columna representa diferencias significativas ($p \leq 0,05$) según el test de múltiple rango (Test de Duncan)

El extracto de KOH 1M, sin embargo, presenta un perfil muy distinto a los de CDTA y NaOH, cuando en el caso del okara estos tres perfiles eran semejantes. Así, la glucosa es el monómero más representativo (84%), mientras que los restantes están en cantidades minoritarias o bien no son detectables. En el extracto de KOH 4M, la glucosa es también el monómero mayoritario (49,7%) y presenta una cantidad destacable de xilosa (24,5%). En estas dos fracciones es

lógico pensar en la existencia de xiloglucanos, pero también, y sobre todo en el extracto de KOH 1M por su alta cantidad en glucosa, de alguna hemicelulosa neutra rica en glucosa y también alguna hemicelulosa ácidas, donde apareciese el ácido glucurónico.

La fracción de NaClO₂ presenta el mismo perfil definido para los extractos de CDTA y NaOH, es decir los monómeros mayoritarios son los ácidos urónicos (45,1%), la galactosa (20,3%) y la arabinosa (19%). También la glucosa se encuentra en una cantidad apreciable (11,8%). Por tanto, aparecerían arabinogalactanos, arabinanos y/o galactanos extraíbles en medio ácido.

En el RES aparece la glucosa en una cantidad claramente superior (56,4%) respecto a la de los demás monómeros, y también es el valor más alto en comparación con las cantidades que aparecen en el resto de fracciones. Existe una cantidad destacable de ácidos urónicos (15,7%) y de arabinosa (10,5%).

Los ácidos urónicos presentes pueden ser tanto galacturónicos como glucurónicos. Los galacturónicos podrían estar presentes como moléculas pépticas fuertemente unidas o firmemente envueltas en la red de celulosa/hemicelulosas. Los glucurónicos probablemente serían sustituyentes hemicelulósicos (Huisman, 2000).

Los valores para la galactosa (9,1%) y la xilosa (4,5%) son apreciables. Además, es la fracción, junto con la de NaClO₂, donde se concentra la mayor cantidad de galactosa y arabinosa.

c) VAINA DE GUISANTE

En la **Tabla 24** y el **Gráfico 25** se observan los rendimientos de las distintas fracciones obtenidas mediante el fraccionamiento aplicado. Este contenido monomérico está expresado en g/100g de vaina de guisante desengrasada.

El RES es la fracción mayoritaria ($p \leq 0,05$). El resto de fracciones son minoritarias en comparación con la mencionada, aunque cabe destacar el valor del extracto de KOH 1M. La fracción procedente de la extracción con NaOH es la que presenta el contenido menor.

Tabla 24: Rendimientos y contenido monomérico de las distintas fracciones obtenidas para el subproducto vaina de guisante

EXTRACTO	RENDIMIENTO (%)	CONTENIDO MONÓMEROS (g/100g)
CDTA	5,81	1,90
NaOH	4,87	1,28
KOH 1M	8,02	4,62
KOH 4M	6,68	2,87
NaClO ₂	2,66	2,26
RES	71,65	26,99

Rendimiento= (peso extracto x100)/RIA

El contenido monomérico está expresado en g/100g de muestra desengrasada

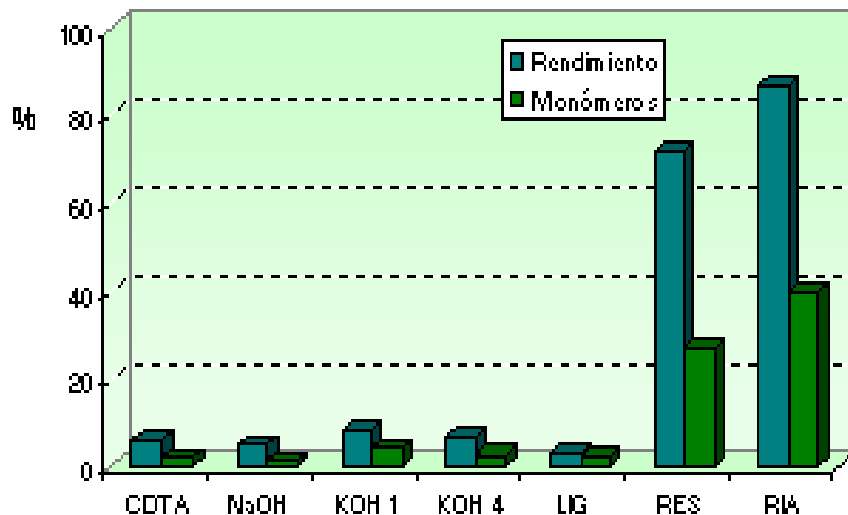


Gráfico 25: Rendimientos y monómeros constituyentes de las distintas fracciones en vaina de guisante

La **Tabla 25** muestra la cantidad de los distintos monómeros en cada extracto y la cantidad que existe en total de cada monómero. De manera que la ramnosa, arabinosa, xilosa, manosa, galactosa y glucosa son monómeros mayoritarios en el RES. Sin embargo, el valor de los ácidos urónicos es significativamente mayor ($p \leq 0,05$) en la fracción de CDTA. La fucosa apenas es detectada en el extracto de KOH 4M y en el RES.

Tabla 25: Fraccionamiento secuencial aplicado al subproducto vaina de guisante (g/100g m.s)

	Ram	Fuc	Ara	Xil	Man	Gal	Glu	Ac.Ur.
CDTA	nd	nd	0,03±0,00 ^a	nd	nd	0,21±0,01 ^e	0,06±0,01 ^a	1,90±0,15 ^e
NaOH	nd	nd	0,05±0,00 ^b	0,05±0,00 ^a	nd	0,15±0,00 ^c	0,04±0,00 ^a	0,99±0,08 ^c
KOH 1	nd	nd	0,06±0,01 ^c	3,05±0,02 ^d	nd	0,04±0,00 ^a	1,24±0,06 ^b	0,24±0,06 ^a
KOH 4	nd	0,02±0,00 ^b	0,05±0,00 ^b	2,11±0,40 ^c	0,04±0,00 ^a	0,11±0,00 ^b	0,38±0,02 ^a	0,16±0,01 ^a
NaClO₂	0,02±0,00 ^a	nd	0,13±0,00 ^d	1,05±0,06 ^b	nd	0,18±0,00 ^d	0,32±0,15 ^a	0,56±0,02 ^b
RES	0,23±0,01 ^b	0,01±0,00 ^a	0,27±0,00 ^e	8,23±0,30 ^e	0,16±0,00 ^b	0,50±0,01 ^f	16,39±1,10 ^c	1,20±0,07 ^d
Total	0,25±0,01	0,03±0,00	0,59±0,01	14,49±0,20	0,20±0,00	1,19±0,01	18,43±1,16	4,75±0,15

Valor promedio ± desviación estándar. nd: no detectado

Ram= Ramnosa. Fuc= Fucosa. Ara= Arabinosa. Xil= Xilosa. Man= Manosa. Gal= Galactosa. Glu= Glucosa. Ac. Ur.= Ácidos urónicos

Diferentes letras en la misma columna representa diferencias significativas ($p \leq 0,05$) según el test de múltiple rango (Test de Duncan)

En el CDTA-extracto, los ácidos urónicos son los monómeros claramente mayoritarios (86,4%), no sólo con respecto al resto de monómeros en la misma fracción, sino en comparación con el resto de fracciones. El RES presenta también una cantidad alta de estos, aunque la proporción (4,4%) en comparación con el resto de sus monómeros no es muy alta. Es destacable que la cantidad total de ácidos urónicos no es muy alta (11,9%), lo que es indicativo de la baja cantidad de FS que existe en este subproducto.

La presencia de la galactosa (9,5%) en el extracto de CDTA junto con los ácidos urónicos indica la extracción de regiones de homogalacturonano. La baja cantidad de la glucosa (2,7%) y la arabinosa (1,4%) señala que probablemente sean sustituyentes de la región de homogalacturonano.

El extracto de NaOH presenta como monómeros principales los mismos que el de CDTA, los ácidos urónicos (77,3%), aunque en menor proporción. La presencia de galactosa y glucosa es algo menor que la que presenta el extracto de CDTA, pero aparece la xilosa (3,9%).

El extracto de KOH 1M, sin embargo, presenta un perfil muy distinto a los del CDTA y NaOH. Al igual que sucedía en vaina de haba, aumenta la glucosa (26,8%) y la xilosa (66%) y disminuyen los ácidos urónicos (5,2%). Aunque de manera mucho más evidente y en mayor grado que en vaina de haba. En el extracto de KOH 4M, la xilosa es el monómero mayoritario (73,5%) y presenta una cantidad destacable de glucosa (13,2%). La concentración de glucosa está disminuida en este extracto en comparación con el de KOH 1M al igual que sucedía en la vaina de haba y al contrario de lo que sucedía en el okara. Y, sin embargo, la xilosa disminuye, si se establece la misma comparación, al contrario de lo que sucedía en los dos subproductos anteriores. De todos modos, en estas dos fracciones la presencia de xiloglucanos sería muy probable.

La fracción de NaClO₂ presenta como monómero más significativo la xilosa (46,5%), lo que hace pensar en la importante presencia de los xiloglucanos en esta muestra. Cabe destacar la cantidad de ácidos urónicos (24,8%) y la de glucosa (14,2%). Por primera vez aparece la ramnosa (0,9%), y la presencia de galactosa (8%) y arabinosa (5,8%) es apreciable. Esto podría indicar la existencia de zonas de ramnogalacturonano sustituido con pequeñas cadenas de arabinanos, galactanos o arabinogalactanos, accesibles gracias al medio ácido que presenta este extractante.

En el RES, la glucosa vuelve a ser el monómero más representativo (60,7%), que también es mayoritario en comparación con las cantidades que aparecen en el resto de fracciones. También existe una cantidad muy alta de xilosa (30,5%). Los ácidos urónicos (4,4%) presentes pueden ser tanto galacturónicos (presentes como moléculas pécticas fuertemente unidas o firmemente envueltas en la red de celulosa/hemicelulosas) como glucurónicos (probablemente sustituyentes hemicelulósicos) (Huisman, 2000). Los valores para la galactosa (1,9%) y la arabinosa (1%) son los más altos en comparación con el resto de fracciones. La cantidad detectable de ramnosa (0,85%) es mayor que en el resto de fracciones como ocurre en los otros subproductos estudiados. De manera que es probable la presencia de arabinanos, galactanos y arabinogalactanos como cadenas laterales de ramnogalacturonano.

La presencia de estos polímeros, en las cantidades en que se obtienen, puede indicar, tal y como se ha expuesto anteriormente, que la estructura de la pared celular impide la total accesibilidad de los extractantes seleccionados a la misma. Pero, también puede señalar la necesidad de un tratamiento en condiciones más energéticas, es decir alargando la exposición del extractante con la muestra o aumentando el número de repeticiones de cada extracción. Sin embargo, Selvendran (1985) afirma que el material péctico no solubilizado cuando se aplica un tratamiento con un agente quelante se encuentra siempre en fuerte asociación con otros polímeros de la pared celular, particularmente con la fracción de α -celulosa.

La presencia mayoritaria de xilosa en todas las fracciones, excepto en los extractos de CDTA y NaOH, podría indicar la presencia, aparte del xiloglucano, de un polímero de xilogalacturonano, probablemente sustituido con cortas cadenas laterales oligoméricas de xilosa, descrito anteriormente para la piel del guisante por Weightman y col., (1994), Renard y col. (1997) y Le Goff y col. (2001).

6.2. Estudio del grado de metilación y la cantidad de calcio de las fracciones obtenidas en los subproductos de este estudio: okara, vaina de haba y vaina de guisante

Las sustancias pécticas son una compleja mezcla de polisacáridos coloidales, que pueden aparecer parcialmente metil esterificados (ácidos pectínicos o pectinas) o libres (ácidos pécticos) (Lineback, 1999).

El ramnogalacturonano con un alto grado de metil esterificación probablemente estaría poco ramificado y aparecería en la lámina media en forma de sales cálcicas (pectinas), lo que indica que la cohesión de la lámina media depende de enlaces iónicos más que de enlaces covalentes. Para formar un complejo estable con calcio se necesitan secuencias continuas de α -D-(1,4)-galacturonano. El CDTA es un potente quelante que solubiliza principalmente sustancias pécticas de la lámina media unidas a las paredes celulares mediante enlaces iónicos cruzados (Huisman, 2000). Estas pectinas extraídas están poco ramificadas y presentan bajo grado de metilación (Weightman y col., 1994). Por otro lado, el ramnogalacturonano muy ramificado y menos metilado (ácidos pécticos), probablemente, aparecería en la pared primaria.

La presencia de ramnosa en la estructura del ramnogalacturonano daría lugar a irregularidades que permitirían dar flexibilidad a las cadenas (Rees y Wight, 1971). En estas zonas flexibles se acomodarían moléculas de agua de manera que la lámina media presentaría forma de gel pero bien organizado. En la pared primaria también se presentarían estas regiones flexibles, en las cuales una apreciable proporción de residuos de α -D-(1,4)-galacturonano estarían metil esterificados. Algunos de estos residuos deben estar unidos por enlace éster a grupos hidroxilo de compuestos polifenólicos, los cuales pueden formar parte de complejos hemicelúlicos. Esos enlaces éster son saponificados en condiciones alcalinas liberando los polímeros pécticos en la solución. Además,

algunos grupos hidroxilo de los azúcares neutros de las cadenas laterales forman un enlace éster con los ácidos urónicos de los complejos hemicelulósicos (Selvendran, 1985).

En los liofilizados obtenidos de cada extracto durante la aplicación de la metodología de fraccionamiento a estos subproductos se determinó el metanol (Ng y col., 1998), el grado de metilación y el calcio (Sagardoy, 2002).

a) OKARA

El análisis del metanol en las distintas fracciones del okara permitió calcular un grado de metilación total de 40,85. La suma de los valores obtenidos en el análisis del calcio en cada fracción proporcionó un dato de $1,71 \pm 0,01$ g/100g.

El mayor grado de metilación lo presenta el extracto de KOH 1M seguido muy de cerca por el de KOH 4M. Estas dos fracciones presentan la menor cantidad de calcio. El grado de metilación de las fracciones de NaClO_2 y NaOH es bastante destacable, siendo los valores más bajos los del extracto de CDTA y el RES. La mayor cantidad de calcio la presenta los extractos de NaOH y de CDTA. El extracto de NaClO_2 y el RES tienen cantidades semejantes (**Tabla 26**).

Tabla 26: Grado de metilación y cantidad de calcio (g/100g m.s.) de las distintas fracciones obtenidas mediante la aplicación del fraccionamiento secuencial basado en el método de Weightman y col. (1994) y Huisman (2000) de la muestra de estudio okara

	CDTA	NaOH	KOH 1	KOH 4	NaClO_2	RES
GM	$3,87 \pm 0,40$	$7,08 \pm 1,90$	$9,69 \pm 1,51$	$9,23 \pm 0,83$	$7,99 \pm 1,64$	$2,99 \pm 0,33$
Ca	$0,38 \pm 0,11$	$0,44 \pm 0,03$	$0,09 \pm 0,02$	$0,16 \pm 0,04$	$0,30 \pm 0,02$	$0,34 \pm 0,03$

Valor promedio \pm desviación estándar.

CDTA= extracto de CDTA. NaOH= extracto de NaOH. KOH 1= extracto de KOH 1M. KOH 4= extracto de KOH 4M. NaClO_2 = extracto de NaClO_2 RES= residuo. GM= grado de metilación. Ca= cantidad de calcio

Estos resultados apuntarían a que en los extractos de KOH 1M y KOH 4M se han extraído complejos péctico-hemicelulósicos de la pared primaria, ya que presentan cantidades apreciables de galactosa, ácidos urónicos y ramnosa, pero donde las hemicelulosas predominarían, siendo la presencia de los xiloglucanos mucho mayor en el extracto de KOH 4M (**Tabla 21**). Los extractantes alcalinos utilizados hidrolizan enlaces éster liberando polímeros pécticos en la solución, ya que estos enlaces están presentes entre algunos azúcares constituyentes de la estructura del ramnogalacturonano extraído y grupos hidroxilo de compuestos polifenólicos y/o entre algunos grupos hidroxilo de los azúcares neutros de las cadenas laterales y ácidos urónicos. Esos compuestos polifenólicos y los ácidos urónicos formarían parte de los complejos hemicelulósicos (Selvendran, 1985).

El apreciable grado de metilación y cantidad de calcio presente en las fracciones de NaOH y NaClO₂ (**Tabla 26**) se podría explicar de una manera semejante a la de los extractos de KOH 1M y KOH 4M, es decir extraerían polímeros pécticos, unidos por enlaces éster, ya que el alcali saponifica estos enlaces y el NaClO₂/ácido acético rompe los enlaces fenólicos y éster-fenólicos. La mayor cantidad de ramnosa, arabinosa, galactosa y ácidos urónicos existente en el extracto de NaClO₂ (**Tabla 21**) se debe a que el tratamiento de NaClO₂/ácido acético libera más cantidad de material péctico que el tratamiento con alcali (Selvendran, 1985) y las condiciones ácidas pueden producir hidrólisis de los enlaces glicosídicos y metil-éster afectando, sobre todo a los ácidos galacturónicos (Chou y Kokini, 1987).

En el extracto de CDTA y el RES con un grado de metilación menor y una cantidad destacable de calcio (**Tabla 26**) se han extraído regiones de ramnogalacturonano. Es lógico que en la fracción de CDTA se extraigan ya que es un potente quelante que solubiliza sobre todo sustancias pécticas de la lámina media (Selvendran, 1985; Huisman, 2000). Las regiones extraídas serían del ramnogalacturonano, ya que la presencia de ramnosa es destacable. Estas

regiones permitirían la formación de enlaces iónicos estables gracias a los iones calcio (**Tabla 21**).

En el RES, esas regiones de ramnogalacturonano, ya que la apreciable cantidad de calcio y los azúcares neutros indica la presencia de pectinas, podrían aparecer debido a que la arquitectura de la pared celular no ha permitido una mayor accesibilidad al CDTA + oxalato NH_4 , posiblemente debido a factores estéricos (Jarvis, 1982). Probablemente, una gran parte de ese material podría ser ácidos pécticos de la pared primaria, ya que están poco metilados y presentan unas cantidades de azúcares neutros destacables (**Tabla 21**), lo que apunta a un grado de ramificación alto. El material péctico muy ramificado presenta insolubilidad que hace que aparezca en asociación con otros polímeros, particularmente con la fracción de α -celulosa en el residuo (Selvendran, 1985; Ng y col., 1998).

b) VAINA DE HABA

El análisis del metanol permitió calcular un grado de metilación total de 134,40, mucho más alto que el que presentó el okara. Lo mismo sucede con el valor de calcio $2,86 \pm 0,01$ g/100g. Esto se podría traducir como que el material péctico presente en la pared de la vaina de haba estaría más metilado que el del okara. Además, podrían existir más enlaces iónicos en su pared celular que en la del okara.

El mayor grado de metilación lo presenta el extracto de KOH 1M con una diferencia muy grande sobre el resto de fracciones. El extracto de KOH 4M, también tiene un grado de metilación muy alto. Estas dos fracciones presentan la misma cantidad de calcio y la menor con respecto al resto de fracciones. Los extractos de NaOH y NaClO_2 y el RES tienen un grado de metilación semejante

y así como una cantidad de calcio similar. La fracción de CDTA presenta el menor grado de metilación y una baja cantidad de calcio (**Tabla 27**).

Tabla 27: Grado de metilación y cantidad de calcio (g/100g m.s) de las distintas fracciones obtenidas mediante la aplicación del fraccionamiento secuencial basado en el método de Weightman y col. (1994) y Huisman (2000) de la muestra de estudio vaina de haba

	CDTA	NaOH	KOH 1	KOH 4	NaClO ₂	RES
GM	1,63±0,05	2,34±0,14	82,54±3,12	43,32±0,87	2,30±0,37	2,27±0,11
Ca	0,25±0,03	0,82±0,10	0,14±0,01	0,14±0,02	0,79±0,03	0,72±0,01

Valor promedio ± desviación estándar.

CDTA= extracto de CDTA. NaOH= extracto de NaOH. KOH 1= extracto de KOH 1M. KOH 4= extracto de KOH 4M. NaClO₂= extracto de NaClO₂ RES= residuo. GM= grado de metilación. Ca= cantidad de calcio

La baja cantidad de calcio presente en los extractos de KOH 1M y KOH 4M indica que el material péctico extraído está unido en la pared celular mediante enlaces éster. El azúcar predominante en estas fracciones es la glucosa (**Tabla 23**), que junto con la xilosa en cantidad destacable en el extracto de KOH 4M, formaría xiloglucanos. Sin embargo, en el caso del extracto de KOH 1M, el resto de azúcares son minoritarios. De manera que esa baja cantidad de azúcares, exceptuando a la glucosa, en el extracto KOH 1M, podría indicar la presencia de una hemicelulosa neutra rica en glucosa pero también la existencia de cadenas laterales sustituyentes del ramnogalacturonano de la pared primaria muy ricas en glucosa. El altísimo grado de metilación indica que la baja proporción de residuos de ácido galacturónico (**Tabla 23**) presentes en estas fracciones están muy metilados, de manera que, probablemente se han extraído las regiones flexibles de la pared primaria descritas por Selvendran (1985), en las cuales una apreciable proporción de residuos de α -D-(1,4)-galacturonano estarían metil esterificados.

Los polímeros pécticos extraídos con NaOH y NaClO₂/ácido acético estarían unidos por enlaces éster, fenólicos o fenol-éster (Selvendran, 1985) o pueden liberarse debido a la hidrólisis de enlaces glicosídicos y metil éster (Chou y Kokini, 1987). La cantidad de calcio indica que se extrajeron, también, complejos pécticos estables gracias al calcio. La mayor cantidad de azúcares neutros existente en el extracto-NaClO₂ (**Tabla 23**) es debido a la mayor liberación de material péctico por parte de ese tratamiento en comparación al alcali. Sin embargo, la presencia de los ácidos urónicos es semejante en las dos fracciones, de manera que junto al similar grado de metilación y cantidad de calcio se deduce que ese material péctico extraído presenta una naturaleza parecida y podría estar localizado en zonas similares dentro de la pared celular, aunque nunca igual porque se han extraído con tratamientos diferentes.

En el RES, las grandes cantidades de azúcares neutros (**Tabla 23**) pueden apuntar a un grado de ramificación alto del ramnogalacturonano presente. Este material péctico estaría localizado en la pared primaria en forma de ácidos pécticos, pero también existiría formando sales cálcicas debido al valor del calcio en esta fracción. Estos últimos polímeros pécticos probablemente estén presentes en el residuo último debido a que no se extrajeron bien con el tratamiento de CDTA-oxalato amónico.

El extracto de CDTA presenta el menor grado de metilación y una baja cantidad de calcio. Los ácidos urónicos son los monómeros predominantes y presenta una cantidad destacable de galactosa y arabinosa (**Tabla 23**), lo que podría indicar la presencia de bloques de homogalacturonano alineados que darían lugar a las uniones “egg-box” estabilizadas por los iones calcio, ligeramente ramificadas con pequeñas cadenas de arabinanos o arabinogalactanos presentes en la lámina media, pero que presentarían una metilesterificación baja. Selvendran (1985) propone que estas estructuras presentan un grado de metilación alto.

c) VAINA DE GUISANTE

El grado de metilación total de la vaina de guisante presentó un valor de 79,57 y el valor total de calcio obtenido fue de $4,39 \pm 0,01$ g/100g. De manera que el material péctico presente en la pared de la vaina de guisante podría estar más metilado que el del okara pero menos que el de la vaina de haba. Además, ese material péctico podría presentar más enlaces iónicos que el del okara o el de la vaina de haba.

El grado de metilación mayor se sitúa en los extractos de KOH 4M y KOH 1M, que al mismo tiempo presentan los valores más bajos de calcio. El extracto de NaClO₂ tiene un grado de metilación alto y una cantidad de calcio apreciable. El grado de metilación de NaOH es destacable y presenta el valor más alto de calcio. El RES, sin embargo, presenta un valor de calcio bajo y un considerable grado de metilación. El grado de metilación más bajo corresponde con el extracto de CDTA, pero la cantidad de calcio es importante (**Tabla 28**).

Tabla 28: Grado de metilación y cantidad de calcio (g/100g m.s.) de las distintas fracciones obtenidas mediante la aplicación del fraccionamiento secuencial basado en el método de Weightman y col. (1994) y Huisman (2000) de la muestra de estudio vaina de guisante

	CDTA	NaOH	KOH 1	KOH 4	NaClO ₂	RES
GM	$3,25 \pm 0,18$	$5,31 \pm 0,42$	$27,68 \pm 2,20$	$28,61 \pm 0,17$	$10,68 \pm 0,69$	$4,04 \pm 0,14$
Ca	$1,03 \pm 0,51$	$1,75 \pm 0,23$	$0,18 \pm 0,02$	$0,32 \pm 0,07$	$0,62 \pm 0,10$	$0,49 \pm 0,07$

Valor promedio \pm desviación estándar.

CDTA= extracto de CDTA. NaOH= extracto de NaOH. KOH 1= extracto de KOH 1M. KOH 4= extracto de KOH 4M. NaClO₂= extracto de NaClO₂ RES= residuo. GM= grado de metilación. Ca= cantidad de calcio

Los extractos de KOH 1M y KOH 4M, con un bajo valor de calcio, presentan material péctico unido en la pared celular mediante enlaces éster. Los azúcares

predominantes son la xilosa y la glucosa. Es interesante que los valores más altos de esos monómeros aparezcan en el extracto de KOH 1M, indicando que en esta fracción se concentra el mayor porcentaje de xiloglucanos cuando normalmente es en el extracto de KOH 4M, pero también de xilanos ya que la proporción de xilosa es mayor que la de la glucosa, y esto sucede en los dos extractos (**Tabla 25**). La cantidad de ácidos urónicos es algo menor en el extracto de KOH 4M, sin embargo, el grado de metilación es mayor, de manera que los residuos de ácido galacturónico presentes en esta fracción estarían muy metilados. Probablemente, se hayan extraído regiones flexibles de la pared primaria. Los polímeros extraídos con KOH 1M, es posible que pertenezcan a la pared primaria pero menos metilados.

Los polímeros pécticos extraídos con NaClO₂/ácido acético estarían unidos por enlaces éster, fenólicos o ester fenólicos (Selvendran, 1985) o proceden de la hidrólisis de enlaces glicosídicos o metil-éster (Chou y Kokini, 1987). La xilosa es el monómero predominante, seguido de los ácidos urónicos, que en comparación con el resto de fracciones no presentan una cantidad muy alta (**Tabla 25**). Ese material péctico muestra un grado de metilación muy alto y una cantidad de calcio destacable (**Tabla 28**), por tanto, también, se extrajeron complejos pécticos estables gracias al calcio. Estos resultados posibilitan la presencia de un xilogalacturonano sustituido con pequeñas cadenas oligoméricas de xilosa.

El valor de calcio más alto corresponde con el extracto de NaOH y además su grado de metilación es apreciable. Por tanto, la mayor parte de complejos cálcicos pécticos se presentaran en esta fracción seguida del extracto de CDTA, cuyo grado de metilación es el menor (**Tabla 28**). Los valores monoméricos son muy parecidos para las dos fracciones, aunque el valor de los ácidos urónicos es mayor en el extracto del CDTA (**Tabla 25**).

El RES presenta un grado de metilación bajo en comparación con el resto de fracciones, y una cantidad de calcio moderada (**Tabla 28**). El monómero mayoritario es la glucosa. La xilosa presenta una cantidad muy alta y los ácidos urónicos son destacables (**Tabla 25**). Además de la celulosa, y los también probables xilanos y xiloglucanos, se podría esperar la presencia, antes comentada, de un xilogalacturonano levemente metilado presente posiblemente en la pared primaria.

6.3. Estudio comparativo de los monómeros de la fibra alimentaria procedente de los subproductos considerados en función de las metodologías utilizadas

La fibra alimentaria fue analizada por los métodos de la AOAC (1995a,b) y posterior hidrólisis de los residuos, y por el método de Englyst y col. (1994) y se estableció una comparativa entre ellos. Después se estudiaron los diferentes extractos obtenidos mediante el fraccionamiento aplicado basado en Weightman y col. (1994) y Huisman (2000). De manera que sería lógico establecer un estudio comparativo de los valores de monómeros totales obtenidos por todas las metodologías empleadas.

• Okara

El okara presenta una importante cantidad de fibra alimentaria total, 55,48 g/100g, (valor gravimétrico de la AOAC), de la cuál su valor de PNA (suma de los monómeros obtenidos por análisis en GLC) está entre 41,60-43,73 g/100g (valor de PNA de AOAC más hidrólisis y valor de PNA de Englyst, respectivamente).

La mayor parte de los PNA corresponde a la FI, 37,01-37,77 g/100g (valor de PNA de Englyst y valor de PNA de AOAC más hidrólisis, respectivamente),

mientras que la FS representa una fracción minoritaria, 3,83-6,09 g/100g (valor de PNA de AOAC más hidrólisis y valor de PNA de Englyst, respectivamente). Esto es lógico ya que el okara es un subproducto fundamentalmente formado por fibra insoluble (van der Riet y col., 1989; Rinaldi y col., 2000).

La suma total de los monómeros obtenidos en cada extracto del fraccionamiento (31,60 g/100g) es menor que el valor de PNA total (41,60-43,73 g/100g).

En el **Gráfico 26** se puede observar como los porcentajes para cada monómero son más parecidos en el caso del análisis por la AOAC más hidrólisis y por Englyst, y sin embargo, mayores que los del fraccionamiento, exceptuando el caso de los ácidos urónicos ya que el porcentaje obtenido en el fraccionamiento se presenta algo mayor que el de las otras dos metodologías.

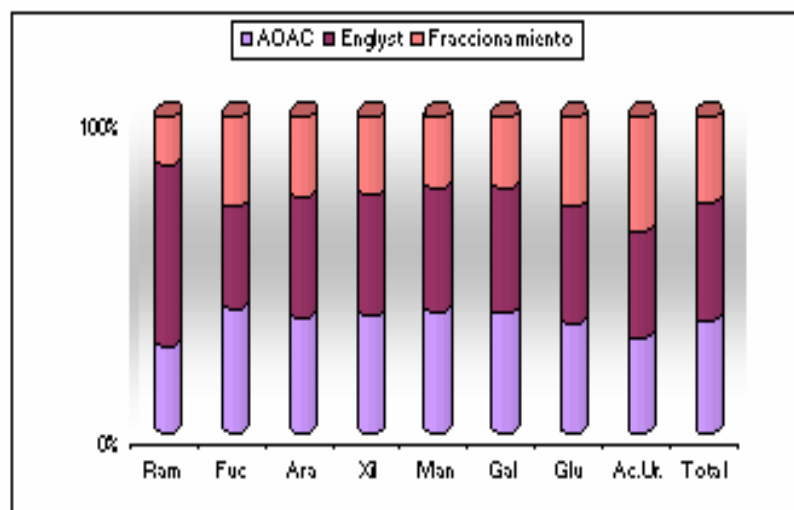


Gráfico 26: Comparación de la distribución porcentual de los valores totales de los monómeros obtenidos aplicando las tres metodologías utilizadas en este estudio para el análisis de la fibra alimentaria total en el subproducto okara. Ram= Ramnosa. Fuc= Fucosa. Ara= Arabinosa. Xi= Xilosa. Man= Manosa. Gal= Galactosa. Glu= Glucosa. Ac. Ur.= Ácidos urónicos

La glucosa es el monosacárido mayoritario, independientemente de la metodología utilizada, debido a la presencia de la celulosa que es el componente más abundante de las paredes celulares de las plantas superiores (Lineback, 1999; Mataix y Gassull, 2002). La glucosa también forma parte de los xiloglucanos, que son los polisacáridos hemicelulósicos más importantes de la pared celular de la mayoría de las leguminosas. Estos consisten en cadenas de glucosa donde la mitad de estos residuos tienen cadenas de xilosa, frecuentemente unidas con otros azúcares como galactosa, fucosa y arabinosa (Huisman 2000). Por ello, la xilosa presenta una cantidad apreciable, independientemente de la metodología utilizada.

Los monómeros más abundantes después de la glucosa son la galactosa, la arabinosa y los ácidos urónicos. Estos formarían parte de los arabinanos, galactanos y/o arabinogalactanos (Van de Vis 1994, Huisman y col. 1998, Huisman 2000) (**Tabla 14 y 21**).

- **Vaina de haba**

La vaina de haba presenta la cantidad de fibra alimentaria total más baja de los tres subproductos analizados, 40,11 g/100g (valor gravimétrico de la AOAC). Su valor de PNA oscila entre 30,97-33,73 g/100g (valor de PNA de Englyst y valor de PNA de AOAC más hidrólisis, respectivamente). La mayor parte de los PNA corresponde con la FI, 19,24-24,98 g/100g (valor de PNA de Englyst y valor de PNA de AOAC más hidrólisis, respectivamente). La FS presenta una cantidad menor, 8,75-11,73 g/100g (valor de PNA de AOAC más hidrólisis y valor de PNA de Englyst, respectivamente), aunque es una fracción destacable si se compara con la cantidad de FS que presentan las otras dos muestras.

La suma total de los monómeros obtenidos en cada extracto del fraccionamiento (28,80 g/100g) es menor que el valor de PNA total (30,97-33,73 g/100g).

En el **Gráfico 27** se puede observar como los porcentajes para cada monómero son más parecidos en el caso del análisis por la AOAC más hidrólisis y por Englyst, y sin embargo, mayores que los del fraccionamiento, exceptuando el caso de la glucosa y los ácidos urónicos, cuyos porcentajes son semejantes en las tres metodologías.

Los ácidos urónicos son los monómeros mayoritarios, seguidos de la glucosa. Este último es debido, como ya se ha dicho anteriormente, a la presencia de la celulosa, pero también a que forma parte de los xiloglucanos. Los ácidos urónicos formarían regiones de homogalacturonanos y algo menos de ramnogalacturonano, ya que la presencia de ramnosa no es muy grande para la alta proporción de ácidos urónicos que existe. Los monómeros más abundantes después de la glucosa y los ácidos urónicos son la galactosa y la arabinosa, que podrían pertenecer a cadenas de arabinanos, galactanos y/o arabinogalactanos (Van de Vis 1994, Huisman y col. 1998, Huisman 2000) (**Tabla 17 y 23**).

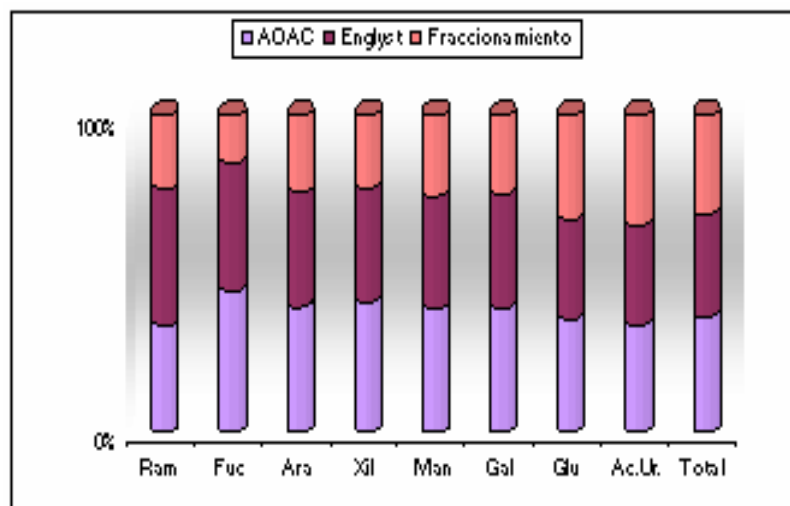


Gráfico 27: Comparación de la distribución porcentual de los valores totales de los monómeros obtenidos aplicando las tres metodologías utilizadas en este estudio para el análisis de la fibra alimentaria total en el subproducto vaina de haba. Ram= Ramnosa. Fuc= Fucosa. Ara= Arabinosa. Xil= Xilosa. Man= Manosa. Gal= Galactosa. Glu= Glucosa. Ac. Ur.= Ácidos urónicos

- **Vaina de guisante**

La vaina de guisante presenta una cantidad de fibra alimentaria total de 58,58 g/100g (valor gravimétrico de la AOAC) que es la cantidad más alta de los tres subproductos analizados. Su valor de PNA oscila entre 43,46-47,26 g/100g (valor de PNA de Englyst y valor de PNA de AOAC más hidrólisis, respectivamente). La mayor parte de los PNA es FI, 37,32-43,22 g/100g (valor de PNA de Englyst y valor de PNA de AOAC más hidrólisis, respectivamente). La FS presenta una cantidad mucho menor, 4,05-6,14 g/100g (valor de PNA de AOAC más hidrólisis y valor de PNA de Englyst, respectivamente).

La suma total de los monómeros obtenidos en cada extracto del fraccionamiento (39,90 g/100g) es menor que el valor de PNA total (43,46-47,26 g/100g).

En el **Gráfico 28** se puede observar como los porcentajes para cada monómero son más parecidos en el caso del análisis por la AOAC más hidrólisis y por Englyst. Por otro lado, estos porcentajes son mayores que los del fraccionamiento, exceptuando el caso de la glucosa y la xilosa, cuyos porcentajes son semejantes en las tres metodologías. En el caso de la fucosa, que no se detecta por Englyst, el porcentaje obtenido por la AOAC más hidrólisis es mayor que en el fraccionamiento.

La glucosa es el monómero mayoritario debido sobre todo a la celulosa, pero también a los xiloglucanos. La xilosa es el monosacárido con mayor porcentaje después de la glucosa, lo que indica la alta presencia de xiloglucanos, xilanos y también, como ya se comentó, la posible presencia de regiones de xilogalacturonano.

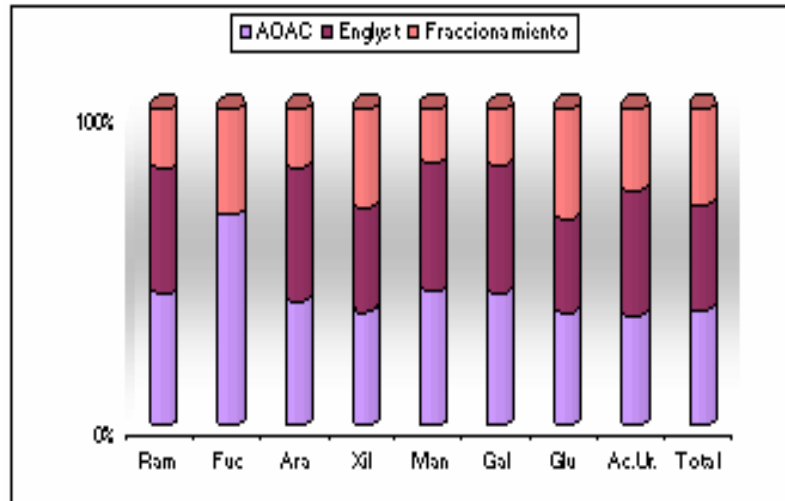


Gráfico 28: Comparación de la distribución porcentual de los valores totales de los monómeros obtenidos aplicando las tres metodologías utilizadas en este estudio para el análisis de la fibra alimentaria total en el subproducto vaina de guisante. Ram= Ramnosa. Fuc= Fucosa. Ara= Arabinosa. Xil= Xilosa. Man= Manosa. Gal= Galactosa. Glu= Glucosa. Ac. Ur.= Ácidos urónicos

Entre el resto de monómeros destaca la cantidad de ácidos urónicos y de galactosa, formando parte del citado xilogalacturonano o de regiones de homogalacturonanos y ramnogalacturonanos (Tabla 17 y 25).

7. ESTUDIO DE LAS PRINCIPALES PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS

El interés actual de la fibra alimentaria se debe a la asociación epidemiológica entre una dieta rica en fibra y una menor incidencia de enfermedades crónicas, como las enfermedades cardiovasculares o el cáncer de colon. Las repercusiones fisiológicas atribuidas al consumo de fibra derivan de sus características físico-químicas.

Las principales propiedades físico-químicas de la fibra alimentaria son el tamaño de partícula, las características de la superficie de la partícula, la

hidratación, la capacidad de intercambio catiónico, la capacidad de adsorber compuestos orgánicos y la fermentación. Estas propiedades específicas que se conocen estudiando la fibra *in vitro*, pueden modificarse en función de muchos factores, entre los que pueden citarse la madurez del alimento vegetal, tipo de cocinado, presencia de otros tipos de fibra, etc. (Guillon y Champ, 2000; Mälkki, 2001; Mataix y Gassull, 2002). Dentro de las propiedades que se han citado, las de hidratación, capacidad de intercambio catiónico y la adsorción de moléculas orgánicas tienen una mayor importancia desde el punto de vista fisiológico (Bach Knudsen, 2001). La capacidad de hidratación del material de la pared celular ha sido muy estudiada en relación con las hipótesis de la fibra alimentaria. El hinchamiento y la capacidad de retención de agua son las propiedades de hidratación más estudiadas (Robertson y col., 1998). La capacidad de retención de agua puede dar más información acerca de la fibra estudiada, en particular acerca del volumen de poro de ese sustrato, lo que ayudaría al entendimiento de su comportamiento en los alimentos, así como también durante el tránsito intestinal (Guillon y Champ, 2000).

La fibra compuesta principalmente de paredes celulares primarias, formada esencialmente por sustancias pécticas, hemicelulosas y algo de celulosa (Wakabayashi y col., 1989; Guillon y Champ, 2002), presenta en general valores más altos de hidratación que las formadas principalmente por paredes celulares secundarias (Guillon y Champ, 2000, Guillon y Champ, 2002). La pared secundaria aparece cuando la célula envejece y está formada esencialmente por celulosa, y en menor medida por hemicelulosas, sustancias pécticas y lignina (Wakabayashi y col., 1989; Guillon y Champ, 2002).

Los subproductos estudiados (**Tabla 29**), con valores semejantes a la fibra de manzana y cítricos (Guillon y Champ, 2000) y a la fibra de los cotiledones de guisante y soja (Guillon y Champ, 2002), podrían presentar una fibra formada mayoritariamente por paredes celulares primarias. La naturaleza de los

subproductos estudiados no coincide con lo expuesto antes debido a que las vainas son tejidos protectores y el okara proviene de un procesado. Además de la composición química y de las características anatómicas y físicas de la fibra (Guillon y Champ, 2000), el procesado, como el molido (Thibault y col., 1992), el pH, la fuerza iónica, la naturaleza de los iones (Fleury y Lahaye, 1991; Renard y col., 1994), la temperatura y la constante dieléctrica de la solución utilizada para medir las propiedades de hidratación (Fleury y Lahaye, 1991) influyen en estas, de manera que la fibra de los subproductos estudiados pueden estar influida por alguno de estos factores.

Tabla 29: Propiedades fisicoquímicas de hidratación de los subproductos de leguminosas: okara, vaina de haba y vaina de guisante

Muestra	SC (ml/g)	WRC (g/g)	ORC (g/g)
Okara	9,44±0,11	8,33±0,24	0,27±0,02
Vaina Haba	9,96±0,39	9,38±0,33	0,28±0,04
Vaina Guisante	8,96±0,19	8,01±0,17	0,13±0,02

Valor promedio ± desviación estándar.

SC (Sweling): hinchamiento. WRC (Water retention capacity): capacidad de retención de agua. ORC (Oil retention capacity): capacidad de retención de aceite

La capacidad de retención de aceite se comporta igual que la de retención de agua, es decir, presenta valores mayores si tienen un mayor porcentaje de paredes celulares primarias. Sin embargo, la capacidad de retención de aceite para los subproductos estudiados (**Tabla 29**) es menor que el que cabría esperar según los resultados de hinchamiento y capacidad de retención de agua.

Desde un punto de vista tecnológico, la fibra se utiliza como agente texturizante y para aumentar el volumen, sobre todo, en la fabricación de alimentos bajos en calorías. Estas propiedades dependen esencialmente de su capacidad de absorber agua (Dreher, 1987; Oakenfull, 2001). De manera que los datos de

hinchamiento y capacidad de retención de agua de los tres subproductos indicarían su posible aplicación como aditivo texturizante, sobre todo la vaina de haba que presenta los valores mayores de hinchamiento y capacidad de retención de agua (**Tabla 29**).

La capacidad de retención de aceite es similar para vaina de haba ($0,28\pm 0,04$) y okara ($0,27\pm 0,02$), y son algo mayores que en vaina de guisante ($0,13\pm 0,02$).

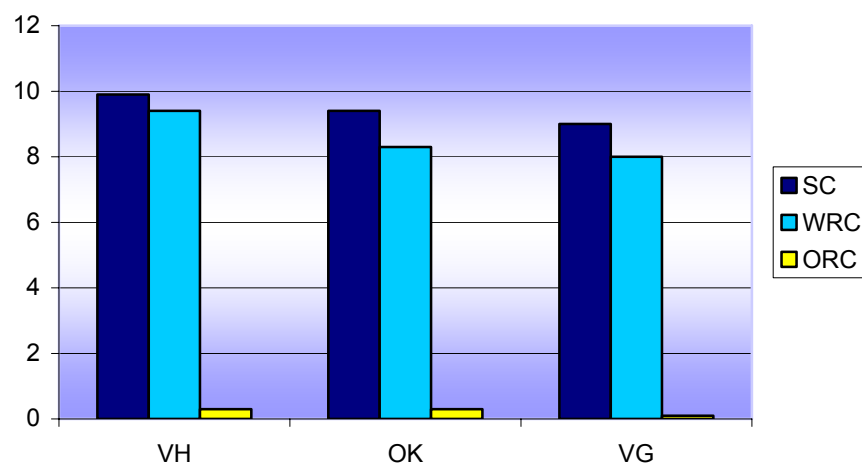


Gráfico 26: Valores de SC (hinchamiento), WRC (capacidad de retención de agua) y ORC (capacidad de retención de aceite) en los subproductos estudiados. OK: okara. VG: vaina de guisante. VH: vaina de haba

Los valores de capacidad de retención de aceite son bajos y los de hinchamiento y capacidad de retención de agua son comparables a fibras de frutas (Robertson y col., 1998), cotiledones de soja y guisante (Guillon y Champ, 2002) y a algas marinas españolas comestibles (Rupérez y Saura-Calixto, 2001), de manera que la naturaleza de los constituyentes de las muestras es mucho más hidrófila que lipófila. Además, el hinchamiento, la capacidad de retención de agua y la capacidad de retención de aceite presentan los valores más altos para vaina de haba, seguido del okara y por último de la vaina de guisante (**Gráfico 26**).

Conclusiones

Del estudio realizado y con los resultados obtenidos en el mismo se pueden extraer las siguientes conclusiones:

A. Caracterización de las semillas de soja y de su subproducto okara, así como de las vainas de haba y guisante

1. La semilla de soja y los subproductos de leguminosas estudiados, okara, vaina de haba y vaina de guisante, destacan por su alto contenido en fibra alimentaria. En la semilla de soja y el okara además es muy interesante la proporción existente de proteína y grasa.
2. La fracción grasa del okara está caracterizada por su alto contenido en ácido linoleico. También contiene cantidades considerables de ácido oleico y ácido linolénico pudiendo ser fuente de estos ácidos, sobre todo de ácido linolénico, pobre en la dieta de una gran parte de la población.
3. El potasio es el macroelemento mineral predominante, sobre todo en la vaina de haba, y el calcio también se presenta en cantidad importante, principalmente en la vaina de guisante. Respecto a los microelementos hay que señalar en primer lugar al hierro, concretamente en la vaina de guisante, y al manganeso, en vaina de guisante y okara. En el okara se puede señalar, también, la presencia de zinc.

B. Estudio de la fracción de carbohidratos de bajo peso molecular en okara, vainas de haba y guisante

1. Los carbohidratos de bajo peso molecular son mayores en las vainas que en el okara.
2. Los monosacáridos y disacáridos presentan valores semejantes independientemente de la columna cromatográfica utilizada para las tres muestras. Sin embargo, los oligosacáridos presentan valores más altos

analizados con la HPX-87P (Bio Rad) que con la Carbohydrate Analysis (Waters).

3. Los carbohidratos de bajo peso molecular más importantes en las vainas son la glucosa y la sacarosa. Sin embargo, en el okara la cantidad más alta la presenta los α -galáctosidos, rafinosa y estaquiosa, y la arabinosa.

C. Caracterización de la fibra alimentaria de la semilla de soja, de su subproducto okara y de las vainas de haba y guisante

1. Los subproductos estudiados presentan mayor contenido en fibra alimentaria que sus semillas correspondientes, siendo la fracción mayoritaria la fibra insoluble. La cantidad más alta de fibra alimentaria la presenta la vaina de guisante seguida del okara y por último la vaina de haba.

2. No se han observado grandes diferencias entre las dos metodologías aplicadas en el análisis de fibra, si bien se ha detectado significación estadística ($p \leq 0,05$) en la cuantificación de algunos componentes, en un mayor número de ocasiones a favor del método de la AOAC.

3. La proporción que representa cada monómero en la fibra alimentaria es similar en semilla de soja y okara y a la vez independiente del método de análisis utilizado. Sin embargo, al comparar las vainas estudiadas se presentan diferencias en las proporciones de los monómeros debido a que las estructuras polisacáridicas de la pared celular de ambas son distintas.

D. Fraccionamiento de la fibra alimentaria del okara y de las vainas de haba y guisante para conocer las características de los polímeros que la integran

1. El aislamiento de un residuo rico en fibra alimentaria proporciona una fracción que contiene los polisacáridos presentes en los subproductos y otros componentes en cantidades muy pequeñas.
2. La extracción secuencial del residuo rico en fibra alimentaria da lugar a tres extractos ricos en pectinas (extractos CDTA, NaOH y NaClO₂), dos extractos que contienen complejos péctico-hemicelulósicos (extractos KOH 1M y KOH 4M) y un residuo rico en celulosa (RES).
3. La composición monomérica de los extractos de CDTA, NaOH y KOH 1M en el okara podría indicar la presencia de arabinanos, galactanos y/o arabinogalactanos. Además, la cantidad destacable de xilosa en el extracto de KOH 1M, podría hacer pensar en la existencia de regiones de xilogalacturonano, además de los xiloglucanos.
4. Los extractantes alcalinos utilizados hidrolizan enlaces éster, liberando polímeros pécticos en la solución donde las hemicelulosas predominan, siendo la presencia de los xiloglucanos mucho mayor en el extracto de KOH 4M en el okara, ya que en vaina de guisante la mayor parte de xiloglucanos se concentra en el extracto de KOH 1M y además este subproducto presenta, posiblemente, xilanos. En la vaina de haba, la alta proporción de glucosa hace pensar en alguna hemicelulosa neutra rica en glucosa y/o en cadenas laterales sustituyentes del ramnogalacturonano de la pared primaria muy ricas en glucosa.
5. La mayor cantidad de ramnosa, arabinosa, galactosa y ácidos urónicos existente en el extracto de NaClO₂ se debe a que el tratamiento de NaClO₂/ácido acético libera más cantidad de material péctico que el tratamiento con alcali tanto en el okara como en las vainas. En la vaina de guisante, además, la cantidad tan alta de xilosa posibilita la presencia

de xilogalacturonano sustituido con pequeñas cadenas oligoméricas de xilosa.

6. Los porcentajes para cada monómero son más parecidos en el caso de los análisis por la AOAC más hidrólisis y por Englyst, y mayores que los del fraccionamiento, exceptuando el caso de los ácidos urónicos que en el fraccionamiento se presenta algo mayor en el okara. La glucosa y los ácidos urónicos en la vaina de haba y la glucosa y la xilosa en la vaina de guisante presentan porcentajes semejantes en las tres metodologías.

E. Estudio de las principales propiedades fisicoquímicas en el okara, vaina de haba y vaina de guisante

1. La naturaleza de los constituyentes de las muestras analizadas es mucho más hidrófila que lipófila, ya que los valores de la capacidad de retención de aceite son bajos y, sin embargo presenta valores considerables de hinchamiento y capacidad de retención de agua.

2. Los valores de hinchamiento y capacidad de retención de agua de los subproductos indican su posible aplicación como aditivo texturizante, sobre todo de la vaina de haba que presenta los valores más altos.

En resumen:

El aprovechamiento de los subproductos de leguminosas, okara y vainas de haba y guisante, puede proporcionar una fuente potencial de ingredientes funcionales, sobre todo de fibra alimentaria.

Resumen/Summary

Resumen

La elevada proporción de subproductos que genera la industria alimentaria constituye un problema debido a su acumulación inútil y al coste de su eliminación. Este problema no sería tal si existiera la posibilidad de reutilizarlos para la obtención, por ejemplo, de ingredientes funcionales.

En esta tesis se ha abordado el conocimiento del okara, la vaina de haba y la vaina de guisante, subproductos industriales de la obtención de leche de soja y del procesado de haba y de guisante. Estos subproductos tienen en común que la fibra alimentaria es la fracción más importante, pero hay poca información acerca de las estructuras químicas de los polisacáridos de la pared celular de dichos subproductos. Esta información es necesaria para seleccionar la forma más adecuada para su modificación y optimización para su posible uso como ingredientes funcionales.

La caracterización de los subproductos comenzó con una valoración nutricional donde se hizo especial hincapié en la fracción grasa analizando los ácidos grasos por cromatografía gas-líquido (GLC), así como en la fracción mineral estudiando los macro y microelementos por espectroscopia de absorción atómica (AAS). La fracción grasa del okara está caracterizada por su alto contenido en ácido linoleico y contiene cantidades considerables de ácido oleico y ácido linolénico pudiendo ser fuente de estos ácidos, sobre todo de ácido linolénico, pobre en la dieta de muchos individuos. Respecto a los elementos minerales, el potasio es el macroelemento mineral predominante, sobre todo en la vaina de haba, y el calcio también se presenta en cantidad considerable, principalmente en la vaina de guisante. El microelemento más destacable es el hierro, mayoritario en vaina de guisante. El manganeso se presenta en cantidad considerable en vaina de guisante y okara, y el zinc es el más importante en el okara.

Los carbohidratos de bajo peso molecular se analizaron por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) empleando dos columnas muy frecuentes en el análisis de carbohidratos, HPX-87P (Bio Rad) y la Carbohydrate Analysis (Waters). Estos carbohidratos son mayores en semilla de soja que en su subproducto okara, y muy superiores en las vainas de haba y de guisante. Los monosacáridos y disacáridos presentan valores semejantes independientemente de la columna utilizada, sin embargo, los oligosacáridos proporcionan valores más altos si se analizan con la HPX-87P (Bio Rad). Los carbohidratos de bajo peso molecular más importantes en las vainas fueron la glucosa y la sacarosa, y en el okara los α -galactósidos, rafinosa y estaquiosa, y la arabinosa.

El objetivo principal fue el conocimiento de la fibra alimentaria, y por ello se han aplicado distintas metodologías para intentar dilucidar los componentes que la constituyen y sus posibles estructuras. La cantidad más alta de fibra alimentaria la presenta la vaina de guisante seguida del okara y por último la vaina de haba, siendo la fibra insoluble superior a la fibra soluble en todos los casos.

La caracterización de los polisacáridos de la pared celular comenzó con el aislamiento del material de la pared celular. Este material contiene la mayoría de los polisacáridos de la pared y otros componentes en pequeña cantidad. La extracción secuencial de este residuo dio lugar a tres extractos ricos en pectinas (extractos CDTA, NaOH y NaClO₂), dos extractos que contienen complejos péctico-hemicelulósicos (extractos KOH 1M y KOH 4M) y un residuo rico en celulosa (RES). La composición monomérica de los extractos de CDTA, NaOH y KOH 1M en el okara podría indicar la presencia de arabinanos, galactanos y/o arabinogalactanos. Además, la cantidad destacable de xilosa en el extracto de KOH 1M, podría hacer pensar en la existencia de regiones de xilogalacturonano. Los extractantes alcalinos (KOH 1M y KOH 4M) utilizados hidrolizan enlaces éster liberando polímeros pécticos en la solución donde las

hemicelulosas predominarían, siendo la presencia de los xiloglucanos mucho mayor en el extracto de KOH 4M en el okara, ya que en vaina de guisante, la mayor parte de xiloglucanos se concentra en el extracto de KOH 1M y además este subproducto presentaría xilanos posiblemente. En la vaina de haba, la alta proporción de glucosa hace pensar en alguna hemicelulosa neutra rica en glucosa y/o en cadenas laterales sustituyentes del ramnogalacturonano de la pared primaria muy ricas en glucosa. La mayor cantidad de ramnosa, arabinosa, galactosa y ácidos urónicos existente en el extracto de NaClO₂ se debe a que el tratamiento de NaClO₂/ácido acético libera más cantidad de material péctico que la hidrólisis con álcali tanto en el okara como en las vainas. En la vaina de guisante, además, la cantidad tan alta de xilosa posibilita la presencia de xilogalacturonano sustituido con pequeñas cadenas oligoméricas de xilosa.

Los porcentajes de cada monómero son más parecidos en el caso de los análisis por la AOAC (Association of Official Analytical Chemists), más hidrólisis y por Englyst, y mayores que los del fraccionamiento exceptuando los ácidos urónicos, que en el fraccionamiento se presentan en cantidad superior en el caso del okara. La glucosa y los ácidos urónicos en la vaina de haba, y la glucosa y la xilosa en la vaina de guisante, presentan porcentajes semejantes independientemente de la metodología aplicada.

Los subproductos estudiados presentan una gran cantidad de fibra alimentaria, lo que les constituye como una posible fuente de ingredientes funcionales. El conocimiento de sus estructuras polisacáridicas puede facilitar su mejor aprovechamiento, por ejemplo, en la obtención de oligosacáridos y de fibra soluble.

Summary

The large quantities of by-products produced by the food industry present a major problem due to their high volumes and elimination costs. This opens the possibility to reuse these by-products for the obtaining of functional foods.

This PhD thesis studies okara, broad bean pod and pea pod, i.e. the industrial by-products from the obtaining of soybean milk, and the processing of broad beans and peas. These by-products have in common that the most important fraction is dietary fibre. Little available information exists about the chemical structures of the polysaccharides of the cell wall of these by-products. The knowledge of the structural polysaccharides is necessary to choose the right methods to modify them and to optimise their potential use as functional ingredients.

By-products characterization started with a nutritional evaluation, in which emphasis was given to the fat fraction, analysing the fatty acids by gas-liquid chromatography (GLC), and also the mineral content, studying the macro and microelements by atomic absorption spectroscopy (AAS). The okara's fat fraction presents a high content of linoleic acid and contains considerable amounts of oleic and linolenic acids, and so could be a source for these acids, especially for linolenic acid, which hardly appears in many people's diet. In relation to the mineral elements, potassium is the main macroelement, especially in the broad bean pod. The content of calcium is also high, being greatest in pea pod. Iron is the main microelement, especially in pea pod. Okara and pea pod present a considerable amount of manganese, and zinc is an important microelement in okara.

Low molecular weight carbohydrates (LMWC) were analysed by HPLC, using two widely used columns to analyse carbohydrates, HPX-87P (Bio Rad) and

Carbohydrate Analysis (Waters). LMWC were in greater amounts in soybean than in its by-product okara and even greater in broad bean and pea pods. Mono- and disaccharides showed similar values using both columns; however, oligosaccharides have higher values using the HPX-87P (Bio Rad). The most important LMWC in the broad bean and pea pods were glucose and sucrose; in okara, the main ones were α -galactosides, raffinose and stachyose, and arabinose.

The main objective of this thesis was the knowledge of dietary fibre in the by-products, so this fraction was analysed by different methods to determine its chemical structures. The highest values of dietary fibre correspond to pea pods, followed by okara and lastly broad bean pods, with the insoluble fibre being the major part.

The characterization of the cell wall polysaccharides started with the isolation of the cell wall material from the selected by-products. This material contains the majority of the polysaccharides and little of other components. This fraction was sequentially extracted resulting in three pectin-rich extracts (CDTA-, NaOH- and NaClO₂-extracts), two extracts containing pectin-hemicelulosic complexes (KOH 1M- and KOH 4M-extracts) and a cellulose-rich residue (RES). The monomeric composition of the CDTA-, NaOH- and KOH 1M-extracts in okara could indicate the presence of arabinans, galactans and/or arabinogalactans. Furthermore, the significant amount of xylose in the KOH 1M-extract could be due to the existence of xylogalacturonan regions. The alkali extractants used (KOH 1M and KOH 4M) hydrolyse ester linkages releasing pectic polymers in the extracts where hemicelulosics are the main component. The presence of xyloglucans is highest in KOH 4M-extract in okara. In pea pod, the major part of xyloglucans is in KOH 1M-extract, and also this by-product possibly presents, xylans. In broad bean pod, the high amount of glucose could be due to a glucose-rich neutral hemicellulose and/or glucose-rich side chains

substitutes of rhamnogalacturonan in the primary cell wall. The greater amount of rhamnose, arabinose, galactose and uronic acids in the NaClO₂-extract was due to the fact that the treatment with NaClO₂/acetic acid releases larger amounts of pectic material than the treatment with alkali in okara, and also in the pods. In pea pod, also, the high amount of xylose facilitates the presence of xylogalacturonan regions substituted by small oligomeric chains of xylose.

The percentages of each monomer were similar for the AOAC method plus hydrolysis and for the Englyst method and larger than those for the fractionation method, except for uronic acids in okara, which are greater in the fractionation method. Glucose and uronic acids in broad bean pod, and glucose and xylose in pea pod, presented similar percentages in these three methods.

The high amount of dietary fibre present in these by-products suggests the possibility to use them in order to obtain functional ingredients. The knowledge of their polysaccharide structures permits the selection of the right methods to improve their exploitation for example in oligosaccharides obtaining and, in general, soluble fibre obtaining.

Bibliografía

- Adler, E., (1977). Lignin chemistry: past, present and futures. *Wood Sci Technol*, 11: 169-218.
- Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (AFSSA), (2001). Report apports nutritionnels conseillés pour la population française. France.
- Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (AFSSA), (2002). Les fibres alimentaire: définitions, méthodes de dosage, allégations nutritionnelles. Rapport du comité d'experts spécialisé nutrition humaine. Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments, France.
- Alonso, R., Grant, G., Dewey, P., y Marzo, F., (2000). Nutritional Assessment in vitro and in vivo of raw and extruded peas (*Pisum sativa* L.). *J Agric Food Chem*, 48: 2286-2290.
- American Association of Cereal Chemist (AACC) (2001). The Definition of Dietary Fiber. *Cereal Foods World*, 46: 112-126.
- American Dietetic Association (ADA), (2004). Position of the American Dietetic Association: Functional Foods. *J Am Diet Assoc*, 104, 814-826
- Anderson, J.W., y Hanna, T.J., (1999). Impact of nondigestible carbohydrates on serum lipoproteins and risk for cardiovascular disease. *J Nutr*, 129: 1457-1466.
- Anderson, J.W., y Major, A.W., (2002). Pulses and lipaemia, short- and long-term effect: potential in the prevention of cardiovascular disease. *Br J Nutr*, 88: 263-271.
- Anderson, J.W., Johnstone, B.M. y Cook-Newell, M.E. (1995). Meta-analysis of the effects of soy protein intake on serum lipids. *New Eng J Med*, 333: 276-282.
- Anderson, J.W., Smith, B.M. y Washnock, C.S. (1999). Cardiovascular and renal benefits of dry bean and soybean intake. *Am J Clin Nutr*, 70: 464-474.
- AOAC (1995a). Method 991.42. *Official Methods of Analysis, 16th Edition*. Washington, DC: Association of Official Analytical Chemists.
- AOAC (1995b). Method 993.19. *Official Methods of Analysis, 16th Edition*. Washington, DC: Association of Official Analytical Chemists.

- AOAC (1995c). Method 955.04. *Official Methods of Analysis, 16th Edition*. Washington, DC: Association of Official Analytical Chemists.
- AOAC (1995d). Method 923.03. *Official Methods of Analysis, 16th Edition*. Washington, DC: Association of Official Analytical Chemists.
- Asp, N.G., (1996). Dietary carbohydrates: classification by chemistry and physiology. *Food Chem*, 57, 1, 9-14
- Asp, N.G., y Johansson, C. G., (1984). Dietary fibre analysis. *Nutr Abs Rev Clin Nutr*, 54, 9, 735-752
- Asp, N.G., Johansson, C.G., Hallmer, H. and Siljeström, M. (1983). Rapid enzymatic assay of insoluble and soluble fiber. *J Agric Food Chem*, 31, 3, 476-482
- Bach Knudsen, K.E. (2001). The nutritional significance of "dietary fibre" analysis. *Animal Feed Sci Technol*, 90:3-20.
- Bennett, W.G., y Cerda, J.J., (1996). Benefits of dietary fiber. *Dietary Fiber*, 99:153-172.
- Bergmann, J.F., Chassany, O., Pepit, A., Triki, R., Caulin, C. y Segrestaa, J.M., (1992). Correlation between echographic gastric emptying and appetite: influence of psyllium. *Gut*, 33: 1042-1043.
- Bingham, S.A., Day, N.E., Luben, R., Ferrari, P., Slimani, N., Norat, T., Clavel-Chapelon, F., Kesse, E., Nieters, A., Boeing, H., Tjønneland, A., Overvad, K., Martinez, C., Dorronsoro, M., Gonzalez, C.A., Key, T.J., Trichopoulou, A., Naska, A., Vineis, P., Tumino, R., Krogh, V., Bueno-de-Mesquita, H.B., Peeters, P.H.M., Berglund, G., Hallmans, G., Lund, E., Skeie, G., Kaaks, R. y Riboli, E., (2003). Dietary fibre in food and protection against colorectal cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC): an observational study. *Lancet*, 361: 1496-1501.
- Bravo, L., Abia, R., Saura-Calixto, F., (1994). Polyphenols as dietary fibre associated compounds. Comparative study on in vivo and in vitro properties. *J Agric Food Chem*, 42 (7): 1481-1487.

- Bravo, L., y Saura-Calixto, F., (1998). Characterization of dietary fibre and the in vitro indigestible fraction of grape pomace. *Am J Enol Viticul*, 49: 135-141.
- Bosaeus, I. (2004). Fibre effects on intestinal functions (diarrhoea, constipation and irritable bowel syndrome). *Clin Nutr Suppl*, 1(2), 33-38
- Cámara-Hurtado, M., Greve, L.C., y Labavitch, J.M., (2002). Changes in cell wall pectins accompanying tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) paste manufacture. *J Agric Food Chem*, 50: 273-278.
- Campbell, J.M., Fahey, G.C., y Wolf, B.W., (1997). Selected indigestible oligosaccharides affect large bowel mass, cecal and fecal short-chain fatty acids, pH and microflora in rats. *J Nutr*, 127: 130-136.
- Carpita, N.C., (1990). The chemical structure of the cell walls of higher plants. En: D Kritchevsky, C Bonfield y JW Anderson (eds.). *Dietary Fiber*. Plenum Press, New York. 15-31 pp.
- Carré, B., y Brillouet, J.M., (1989). Determination of water-insoluble cell walls in feeds : interlaboratory study. *J Assoc Off Chem*, 72, 3, 463-467
- Cervera, P., Clapes, J., y Rigolfas, R., (1999). *Alimentación y Dietoterapia*. McGraw-Hill Interamericana, Madrid.
- Chandalia, M., Garg, A., Lutjohann, D., Von Bergmann, K., Grundy, S.M. y Brinkley, L.J. (2000). Beneficial effects of high dietary fiber intake in patients with type 2 Diabetes Mellitus. *New Engl J Med*, 342: 1392-1398.
- Charrondiere, U.R., Chevassus-Agnes, S., Marroni, S. y Burlingame, B. (2004). Impact of different macronutrient definitions and energy conversion factors on energy supply estimations. *J Food comp anal*, 17, 339-360
- Cho, S.S., Prosky, L., y Dreher, M, (1999). Complex Carbohydrates in Foods. En: S.S., Cho, L., Prosky, y M. Dreher (eds.). *Food Science and Technology*. Marcel Dekker Inc., New York.
- Choct, M., (1997). Feed non-starch polysaccharides: Chemical structures and nutritional significance. *Feed Milling International*, June Issue: 13-26.
- Chou, T.D. y Kokini, J.L. (1987). Rheological properties and conformation of tomato paste pectins, citrus and apple pectins. *J Food Sci*, 52: 1658-1664.

- Codex Alimentarius Commission (CAC), (2006). Report of the 27th Session of the Codex Committee on Nutrition and Foods for Special Dietary Uses, Bonn, Germany 21-25 November 2005. ALINORM 06/29/26, 2006.
- Crittenden, R.G., (1999). Prebiotics. En: G.W. Tannock (ed.). Probiotics: A critical review. Horizon Scientific Press, Wymondham, 141-156 pp.
- Crittenden, R.G., y Playne, M.J., (1996). Production, properties and applications of food-grade oligosaccharides. *Trends Food Sci Technol*, 7: 353-361.
- Cummings, J.H., y Macfarlane, G.T., (1991). The control and consequences of bacterial fermentation in the human colon. *J Appl Bacteriol*, 70 (6): 443-459.
- Dantuma, G. y Thompson, R., (1983). Whole-crop physiology and yield components. En: Hebblethwaite, P.D. (ed.). The Faba Bean (*Vicia faba* L.). Butterworths Publishers, Londres, 143-158pp.
- De Almeida Costa, G.E., da Silva Queiroz-Monici, K., Pissini Machado Reis, S.M., Costa de Oliveira, A., (2004). Chemical composition, dietary fibre and resistant starch contents of raw and cooked pea, common bean, chickpea and lentil legumes. *Food Chem*, 94: 327-330.
- Delzenne, N.M., (2003). Oligosaccharides: state of the art. *Proc Nutr Soc*, 62: 177-182.
- Delzenne, N.M., y Kok, N., (2001). Effects of fructans-type prebiotics on lipid metabolism. *Am J Clin Nutr*, 73: 456-458.
- Department of Health, (1991). Dietary Reference Values for Food Energy and Nutrients in the United Kingdom. HMSO, London
- Devries, J.W., Prosky, L., Li, B. y Cho, S. (1999). A historical perspective on defining dietary fiber. *Cereal Foods World*, 44: 367-369.
- Dreher, M.L., (1987). En: Handbook of dietary fibre. An applied approach. Marcel Dekker, New York.
- Dust, J.M., Gajda, A.M., Flickinger, E.A., Brukhalter, T.M., Merchen, N.R., y Fahey, G.C., (2004). Extrusion conditions affect chemical composition

- and in vitro digestion of select food ingredients. *J Agric Food Chem*, 52: 2989-2996.
- Edwards, C.A., y Parrett, A.M., (1996). Plant cell wall polysaccharides, gums and hydrocolloids: Nutritional Aspects. En: A-C Eliasson (ed). Carbohydrates in foods. Marcel Dekker Inc., New York. 319-346 pp.
- Englyst, H.N., y Cummings, J.H., (1984). Simplified method for the measurement of total non-starch polysaccharides by gas-liquid chromatography of constituent sugars as alditol acetates. *Analyst*, 109, 937-942
- Englyst, H.N., Quigley, M.E. y Hudson, G.J. (1994). Determination of Dietary Fibre Non-starch Polysaccharides with Gas-Liquid Chromatographic, High-performance Liquid Chromatographic or Spectrophotometric Measurement of constituent sugars. *Analyst*, 119:1497-1509.
- Erdman, J.W., Badger, T.M., Lampe, J.W., Setchell, K.D.R., Messina, M., (2004). Not all soy products are created equal: Caution needed in interpretation of research results. *J Nutr*, 134: 1229s-1233s.
- Erdman, J.W. y Fordyce, E.J. (1989). Soy products and the human diet. *Am J Clin Nutr*, 49: 725-737
- Fincher, G.B., y Stone, B.A., (1974). A water-soluble arabinogalactan-peptide from wheat endosperm. *Aust J Biol Sci*, 27: 117-132.
- FAO, (2003). FAO Yearbook Production 2002, vol. 55. Food and Agriculture Organization of the United States. FAO Statistics Series No. 176. Roma
- Fernandes Abreu, J.M., y Martins Bruno-Soares, A., (1998). Chemical composition, organic matter digestibility and gas production of nine legume grains. *Animal Feed Sci Technol*, 70: 49-57
- Fleury, N., y Lahaye, M., (1991). Chemical and physicochemical characterisation of fibres from laminaria digitata (Kombu breton): a physiological approach. *J Sci Food Agric*, 55: 389-400.

- Furda, I. (1981). Simultaneous of soluble and insoluble fiber. En: W.P.T. James and O. Theander (eds.). *The analysis of dietary fiber in food*. Marcel Dekker, Inc. New York. 163-172
- Furda, I., Gengler, S.C., Johnson, R.R., Magnuson, J.S. y Smith, D.E., (1979). 93rd Annual Meeting of the AOAC. Abstr. 87. Washington, D.C. October, 15-18
- Furuta, H., y Maeda, H., (1999). Rheological properties of water-soluble soybean polysaccharides extracted under weak acidic condition. *Food Hydrocolloids*, 13: 267-274.
- García Peris, P., Bretón Lesmes, I., de la Cuerda Compes, C., y Cambolor Álvarez, (2002). Metabolismo colónico de la fibra. *Nutr Hosp*, 17:11-16.
- German Nutrition Society/Deutsche Gesellschaft für Ernährung, (2000). Österreichische Gesellschaft für Ernährung, Schweizerische Vereinigung für Ernährung. Referenzwerte für die Nährstoffzufuhr (1st edition). Frankfurt am. Main: Umschau/Braus.
- Ghosh, P., Ghosal, P., Thakur, S., Lerouge, P., Loutelier-Bourhis, C., Driouich, A., y Ray, B., (2004). Cell wall polysaccharides of *Brassica campestris* seed cake: isolation and structural features. *Carbohydrate Polymers*, 57: 7-13.
- Gibson, G.R., y Roberfroid, M.B., (1995). Dietary modulation of the human colonic microbiota : Introducing the concept of prebiotics. *J Nutr*, 125: 1401-1412.
- Gray, J., (2003). Hidratos de carbono: Aspectos nutricionales y de salud. ILSI Europe Concise Monograph Series. Brussels : ILSI
- Gray, J., (2006). Dietary Fibre. Definition, Analysis, Physiology and Health. ILSI Europe Concise Monograph Series. Brussels : ILSI
- Grieshop, C.M., Kadzere, C.T., Clapper, G.M., Flikinger, E.A., Bauer, L.L., Frazier, R.L., y Fahey, G.C., (2003). Chemical and nutritional characteristics of United States soybeans and soybeans meals. *J Agric Food Chem*, 51: 7684-7691.

- Guardiola, J.L., y García, A., (1990). Acumulación y movilización de las reservas. En: JL Guardiola Bárcena y A García Luis (eds). Fisiología vegetal I: Nutrición y transporte. Síntesis, Madrid. 379-394 pp.
- Guerrero, A. (1998). Soja. En: A Guerrero (ed). Cultivos herbáceos extensivos. Mundi-Prensa, Madrid. 755-855 pp.
- Guillon, F., y Champ, M.M.J., (2000). Structural and physical properties of dietary fibres, and consequences of processing on human physiology. *Food Research Int*, 33: 233-245.
- Guillon, F., y Champ, M.M.J., (2002). Carbohydrate fractions of legumes: uses in human nutrition and potential for health. *Br J Nutr*, 88 (Suppl. 3): 293-306.
- Guillon, F., Champ, M., y Thibault, J.F., (2000). Dietary fibre functional products. En: GR Gibson y CM Williams (eds.). Functional Foods. Woodhead Publishing, Cambridge, England. 315-355 pp.
- Health Council of the Netherlands, (2006). Guideline for dietary fibre intake. The Hague, 2006: publication no. 2006/03E.
- Hellendoorn, E.W., Noordhoff, M.G. y Slagman, J. (1975). Enzymatic determination of the indigestible residue (dietary fibre) content of human food. *J Sci Food Agric*, 26, 10, 1461-1468
- Hermida, J.R. (1993). Tratamiento y aprovechamiento del orujo de aceituna. *Tecnologías complementarias en la industria alimentaria*, 137-148
- Hoare, J., y Henderson, L., (2004). The National Diet & Nutrition Survey: adults aged 19 to 64 years. Volume 5 -Summary report. The Stationery Office, London.
- Holt, S.H.A., Brand-Miller, J.C., Stitt, P.A., (2001). The effects of equal-energy portions of different breads on blood glucose levels, feelings of fullness and subsequent food intake. *J Am Diet Assoc*, 101: 767-773
- Holt, S., Muntyan, I., y Likyer, L. (1996). Soya-based diets for Diabetes Mellitus. *Alternative & Complementary Therapies*, March/April 1996.

<http://www.infoagro.com>

- Huisman, M.M.H., (2000). Elucidation of the chemical fine structure of polysaccharides from soybean and maize kernel cell walls. PhD-thesis, Wageningen University, Wageningen , the Netherlands.
- Huisman, M.M.H., Schols, H.A. y Voragen, A.G.J., (1998). Cell wall polysaccharides from soybean (*Glycine max.*) meal. Isolation and characterisation. *Carbohydrate Polymers*, 37: 87-95
- Hunt, J.R., Gallagher, S.K., y Johnson, L.K., (1994). Effect of ascorbic acid on apparent iron absorption by women with low iron stores. *Am J Clin Nutr*, 59: 1381-1385.
- Hurst, W. J., Martin, R. A., Jr., y Zoumas, B. L., (1979). Application of HPLC to characterisation of individual carbohydrate in foods. *J Food Sci*, 44, 892-895.
- Institute of Medicine, (2002). Dietary reference intakes for energy, carbohydrate, fiber, fat, fatty acids, cholesterol, protein and amino acids. Washington DC: National Academy Press.
- James, C.S., (1995). Determination of fat by the Soxhlet and Soxhlet methods. En: C.S. James (ed). *Analytical chemistry of foods*. Blackie Academic & Professional, London. 91-92 pp.
- Jarvis, M.C., (1982). The proportion of calcium-bound pectin in plant cell walls. *Planta*, 154: 344-346
- Jenkins, D.J.A., Kendall, C.W.C., Augustin, L.S.A., Franceschi, S., Hamidi, M., Marchie, A., Jenkins, A.L. y Axelsen, M. (2003). Glycemic index: overview of implications in health and disease. *Am J Clin Nutr*, 76:266-273.
- Jenkins, D.J., Wolever, T.M., Rao, A.V., Hegele, R.A., Mitchell, S.J., Ranson, T.P., (1993). Effect of blood lipids of very high intakes of fiber in diets low in saturated fat and cholesterol. *N Engl J Med*, 329: 21-26.
- Johnson, I.T., (2000). Anti-tumour properties. En: GR Gibson and CM Williams (eds.). *Functional Foods*. Woodhead Publishing, Cambridge, England. 141-162 pp.

- Johnson, I.T., y Southgate, D.A.T., (1994). Dietary fibre and related substances. Chapman & Hall. London.
- Jones, J. (2000). Update on defining dietary fiber. *Cereal Foods World*, 45 (No. 5): 219-221.
- Kumar, V., Rani, A., Solanki, S., y Hussain, S.M., (2006). Influence of growing environment on the biochemical composition and physical characteristics of soybean seed. *J Food Comp Anal*, 19: 188-195.
- Kushi, L.H., Meyer, K.M. y Jacobs, D.R. (1999). Cereals, legumes, and chronic disease risk reduction: evidence from epidemiologic studies. *Am J Clin Nutr*, 70: 451-458.
- Lairon, D., Bertrais, S., Vincent, S., y col., (2003). Dietary fibre intake and clinical indices in the French Supplementation en Vitamines et Minéraux Antioxydants (SU.VI.MAX) adult cohort. *Proc Nutr Soc*, 62:11-5.
- Lampkin, N., (2001). La agricultura ecológica, una agricultura con futuro. En: N. Lampkin (ed). Agricultura ecológica. Mundi-Prensa, Madrid.
- Larrauri, J.A., (1999). New approaches in the preparation of the high dietary fibre powders from fruit by-products. *Trends Food Sci Technol*, 10: 3-8.
- Lee, S.C. y Prosky, L., (1994). Perspectives on new dietary fiber definitions. *Cereal Foods World*, 39,10, 767-768
- Le Goff, A., Renard, C.M.G.C., Bonnin, E., Thibault, J.-F. (2001). Extraction, purification and chemical characterisation of xylogalacturonans from pea hulls. *Carbohydrate Polymers*, 45: 325-334
- Lineback, D.R., (1999). The chemistry of complex carbohydrates. En: Susan Sungsoo Cho, Leon Prosky, Mark Dreher (eds). Complex Carbohydrates in Foods. Marcel Dekker, Inc. New York.
- Liu, K. (1997). Agronomic Characteristics, Production, and Marketing Chemistry and Nutritional value of Soybean Components. En: Keshun Liu (ed). Soybeans: Chemistry, Technology and Utilization. Chapman & Hall, New York, U.S.A. 1-113 pp.

- Loosveld, A.-M. A., Grobet, P. J., y Delcour, J. A., (1997). Contents and structural features of water-extractable arabinogalactan in wheat flour fractions. *J Agric Food Chem*, 45: 1998-2002.
- López-Bellido, L. (2002). Soja. En: LL Bellido (ed). Cultivos Industriales. Mundi-Prensa, Madrid. 755-855 pp.
- López-Bellido, F.J., López-Bellido, L., López-Bellido, R.J. (2005). Competition, growth and yield of faba bean (*Vicia faba* L.). *Europ J Agronomy*, 23: 359-378
- Lukaczer, D., Liska, D. J., Lerman, R.H., Darland, G., Schiltz, B., Tripp, M. and Bland, J. S. (2006). Effect of a low glycemic index diet with soy protein and phytosterols on CVD risk factors in postmenopausal women. *Nutrition*, 22: 104-113.
- Lynch, S.R., Beard, J.L., Dassenko, S.A., y Cook, J.D., (1984). Iron absorption from legumes in humans. *Am J Clin Nutr*, 41: 42-47.
- Macrae, R., Robinson, R.K., Sadler, M.J., (1993). Encyclopaedia of food science, food technology and nutrition. Academic Press, London.
- Maeda, H., (2000). Soluble soybean polysaccharide. En: GO Phillips y PA Williams. Handbook of Hydrocolloids. Woodhead Publishing, Cambridge, England.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Remesy, C., y Jimenez, L., (2004). Polyphenols : food sources and bioavailability. *A J Clin Nutr*, 79: 727-747.
- MAPA, (2003). Superficies y producciones de cultivos en la Unión Europea en www.mapa.es/ministerio/pags/hechoscifras/espanol/pdf/09.pdf
- MAPA, (2005). Distribución general de la tierra por tipos de cultivo (Ha) en <http://www.mapa.es/ministerio/pags/hechoscifras/espanol/pdf/09.pdf>
- Maroto, J.V., (1989). En: J.V. Maroto (ed.). Horticultura herbácea especial. 3ªed. Mundi-Prensa, Madrid.

- Martínez-Villaluenga, C., Frías, J., y Vidal-Valverde, C., (2005). Raffinose family oligosaccharides and sucrose contents in 13 Spanish lupin cultivars. *Food Chem*, 91: 645-649.
- Mataix Verdú, J., y Gassull, M.A., (2002). Fibra alimentaria. En : J Mataix Verdú (ed). *Nutrición y alimentación humana*. Ergon, Madrid. 119-135 pp.
- Mälkki, Y., (2001). Physical properties of dietary fiber as keys to physiological functions. *Cereal Foods World*, 46:196-199.
- McCleary, B.V. (2003). Dietary fibre analysis. *Proceedings Nutr Soc*, 62, 3-9.
- McQueen, R.E, y Nicholson, J.W.G., (1979). Modification of the neutral detergent fiber procedure for cereals and vegetables by using α -amilasa. *J Assoc Off Anal Chem*, 62, 3, 676-680
- Messina, M.J. (1999). Legumes and soybeans: overview of their nutritional profiles and health effects. *Am J Clin Nutr*, 70: 439-450.
- Miller Jones, J., (2004). Dietary fibre intake, disease prevention, and health promotion: An overview with emphasis on evidence from epidemiology. In: J.W. van der Kamp (ed.). *Bioactive Carbohydrates for Food and Feed*. Academic Publishers, Wageningen, Netherlands.
- Mongeau, R., y Brassard, R., (1986). A rapid method for the determination of soluble and insoluble dietary fiber procedure and Englyst's method. *J Food Sci*, 51, 5, 1333-1336
- Mongeau, R., y Brassard, R. (1990). Determination of insoluble, soluble and total dietary fiber: collaborative study of a rapid gravimetric method. *Cereal Foods World*, 35, 3, 319-324
- Mongeau, R., y Brassard, R. (1993). Enzymatic-gravimetric determination in foods dietary fiber as sum of insoluble and soluble fiber fractions: summary of collaborative study. *J AOAC Int*, 76, 4, 923-925
- Mongeau, R., Scott, F.W. y Brassard, (1999). Definition and analysis of dietary fiber. En: Susan Sungsoo Cho, Leon Prosky, Mark Dreher (eds). *Complex Carbohydrates in Foods*. Marcel Dekker, Inc. New York.

- Monsen, E.R., Hallberg, L., Layrisse, M., y col., (1978). Estimation of available dietary iron. *Am J Clin Nutr*, 31:134-141.
- Mussatto, S.I., y Mancilha, I.M., (2007). Non-digestible oligosaccharides: A review. *Carbohydrate Polymers*, 68: 587-597.
- Mwanamwenge, J., Loss, S.P., Siddique, K.H.M., Cocks, P.S. (1998). Growth, seed yield and water use of faba bean (*Vicia faba L.*) in a short-season Mediterranean-type environment. *Aust J Exp Agric*, 38, 171-180
- Nakakuki, T., (1993). Oligosaccharides. Production, properties and applications. En: T., Nakakuki (ed.). Japanese Technology Reviews Vol. 3, No 2. Gordon and Breach Science Publishers.
- Namesny, A. (1999). Compendio de horticultura. Postrecolección de hortalizas de fruto. Vol. 3. Horticultura, S.L., Lleida. 99-132pp.
- Ng, A., Parr, A.J., Ingham, L.M., Rigby, N.M., y Waldron, K. W., (1998). Cell wall chemistry of carrots (*Daucus caroto Cv. Armstrong*) during maturation and storage. *J Agric Food Chem*, 46: 2933-2939.
- Nordic Nutrition Recommendations, (2004). Integrating nutrition and physical activity. Nord 2004:013, ISBN 92-893-1062-6.
- Nyman, M., (2002). Fermentation and bulking capacity: of indigestible carbohydrates: the case of inulin and oligofructose. *Br J Nutr*, 87, Suppl 2: 163s-168s.
- Oakenfull, D., (2001). Physicochemical properties of dietary fiber: Overview. Chapter 13. En: S.S., Cho y M.L., Dreher (eds.). Handbook of dietary fiber. Marcel Dekker Editions, New York. 195-260 pp.
- OMS, (2004). Population nutrient intake goals for preventing diet-related chronic diseases. World Health Organization en www.who.es.
- O'Toole, D.K. (1999). Characteristics and uses of okara, the soybean residue from soymilk production - A review. *J Agric Food Chem*, 47:363-361.
- Peters, U., Sinha, R., Chatterjee, N., Subar, A.F., Ziegler, R.G., Kulldorff, M., Bresalier, R., Weissfeld, J.L., Flood, A., Schatzkin, A. y Hayes, R.B. (2003).

- Dietary fibre and colorectal adenoma in a colorectal cancer early detection programme. *Lancet*, 361: 1491-1495.
- Préstamo, G., Rupérez, P., Espinosa-Martos, I., Villanueva, M.J. y Lasunción, M.A. (2007). The effects of okara on rats growth, cecal fermentation and serum lipids. *Eur Food Res Technol*, 225: 925-928
- Prosky, L. (1999a). Inulin and oligofructose are part of the dietary fiber complex. *J AOAC Int*, 82, 2, 223-226
- Prosky, L. (1999b). What is fibre? Current controversies. *Trends Food Sci Technol*, 10: 271-275.
- Prosky, L., Asp, N.G., Furda, I., Devries, J.W., Schweizer, T.F. y Harland, B. F. (1984). Determinations of total dietary fiber in foods, food products, and total diets: interlaboratory study. *J Assoc Off Anal Chem*, 67, 6: 1044-1051
- Prosky, L., Asp, N.G., Schweizer, T.F., Devries, J.W., and Furda, I. (1988). Determination of insoluble, soluble and total dietary fiber in foods, and food products: interlaboratory study. *J Assoc Off Anal Chem*, 71, 5: 1017-1023
- Quigley, M.E., y Englyst, H.N. (1994). Determination of the uronic acid constituents of non-starch polysaccharides by high-performance liquid chromatography with pulsed amperometric detection. *Analyst*, 119, 7, 1511-1518
- Reed, J., McDowell, R.E., Van Soest, P.J., y Horvarth, P.J., (1982). Condensed tannins: a factor limiting the use cassava forage. *J Sci Food Agric*, 33: 213-220.
- Rees, D.A., y Wight, A. W., (1971). Polysaccharide conformation. Part VII. Model building computations for α 1,4-galacturonan and the kinking fuction of L-rhamnose residues in pectic substances. *J Chem Soc (B)*: 1366
- Redondo-Cuenca, A., Villanueva-Suárez, M.J., Rodríguez-Sevilla, M.D., y Mateos-Aparicio, I., (2007). Chemical composition and dietary fibre of yellow and green commercial soybeans (*Glycine max*). *Food Chem*, 101: 1216-1222.

- Renard, C.M.G.C., Crépeau, M.-J., y Thibault, J.-F., (1994). Influence of ionic strength, pH and dielectric constant on hydration properties of native and modified fibres from sugar-beet and wheat bran. *Industrial crops and products*, 3: 75-84.
- Renard, C.M.G.C., Weightman, R.M., y Thibault, J.-F., (1997). The xylose-rich pectins from pea hulls. *Int J Biol Macromol*, 21: 155-162.
- Reynolds, K., Chin, A., Lees, K.A., Nguyen, A., Bujnowski, D. and He, J. (2006). A Meta-Analysis of the Effect of Soy Protein Supplementation on Serum Lipids. *Am J cardio*, vol. 98: 633-640
- Rinaldi, V.E.A., Ng, P.K.W. y Bennink, M.R. (2000). Effects of extrusion on dietary fiber and isoflavone contents of wheat extrudates enriched with wet okara. *Cereal Chem*, 77: 237-240
- Robertson, J.A., Monredon, F.D., Dysseler, P., Guillon, F., Amadò, R. y Thibault, J.-F., (2000). Hydration properties of dietary fibre and resistant starch: a european collaborative study. *Lebensm-Wiss u-Technol*, 33: 72-79.
- Rodríguez, M.D., Redondo, A., y Villanueva, M.J., (1992). Estudio comparativo de los métodos m-hidroxifenilfenol y 3,5-dimetilfenol para determinar sustancias pécticas en nabo (*Brassica napus*). *Alimentaria*, 232:79-83.
- Rodríguez, M.D., Villanueva, M.J., y Redondo, A., (1999). Effect of processing conditions on soluble sugars content of carrot, beetroot and turnip. *Food Chem*, 66: 81-85.
- Rupérez, P., (1998a). Bifidogenic oligosaccharides. *Food Sci. Technol. Int.*, 4 (4): 237-244.
- Rupérez, P., y Saura-Calixto, F., (2001). Dietary fibre and physicochemical properties of edible Spanish seaweeds. *Eur Food Res Technol*, 212: 349-354.
- Sagardoy Muniesa, M.M., (2002). Incidencia del envasado en atmósfera modificada sobre la vida útil del espárrago verde y blanco (*Asparagus officinalis*, L.). Evaluación de los principales parámetros de calidad. Tesis Doctoral. UCM. Madrid, 2002

- Sakaki, T., Satoh, a., Tanaka, K., Omasa, K., y Shimazaki, K.-I., (1995). Lipids and fatty acids in guard-cell protoplast from vicia faba leaves. *Phytochemistry*, 40: 1065-1070.
- Sandström, B., Almgren, A., Kivistö, B., y Cederblad, A., (1989). Effect of protein level and protein source on zinc absorption in humans. *J Nutr*, 119: 48-53.
- Saris, W.H.M., (2003). Glycemic carbohydrate and body weight regulation. *Nutr Rev*, 61: 10s-16s
- Saura-Calixto, F., García-Alonso, A., Goñi, I., y Bravo, L., (2000). In vitro determination of the indigestible fraction in foods: an alternative to dietary fiber analysis. *J Agric Food Chem*, 48: 3342-3347.
- Saura-Calixto, F., Serrano, J., y Goñi, I., (2007). Intake and bioaccessibility of total polyphenols in a whole diet. *Food Chem*, 101: 492-501.
- Scheppach, W., Luethrs, H., Melcher, R., Gostner, A., Schaubert, J., Kudlich, T., Weiler, F., & Menzel, T. (2004). Antiinflammatory and anticarcinogenic effects of dietary fibre. *Clin Nutr Suppl*, 1(2), 51-58.
- Schols, H.A., Vierhuis, E., Baks, E.J., y Voragen, A.G.J., (1995). Different populations of pectic hairy regions occur in apple cell walls. *Carbohydrate Research*, 275: 343-360.
- Schweizer, T.F., y Würsch, P., (1979). Analysis of dietary fiber. *J Sci Food Agric*, 30, 613-619
- Scott, R.W., (1979). Colorimetric determination of hexuronic acids in plant materials. *Anal Chem*, 51,7: 936-941.
- Selvendran, R.R., (1985). Developments in the chemistry and biochemistry of pectic and hemicellulosic polymers. *J Cell Sci Suppl*, 2: 51-88
- Selvendran, R.R., Verena, F.V., y Verne, A., (1990). The chemistry and properties of plant cell walls and dietary fiber. En: D Kritchevsky, C Bonfield y JW Anderson (eds.). *Dietary Fiber*. Plenum Press, New York. 1-15 pp.
- Silveira, J.M. y Durán, J.M. (1998). La soja: un cultivo poco conocido en España. *Vida rural*, 75:28-33.

- Singleton, V.L., Orthofer, R., y Lamuela-Raventos, R.M., (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidant by means of Folin-Cicalteu reagent. *Methods Enzymol.*, 299: 152-178.
- Slavin, J.L., (2003). Impact of the proposed definition of dietary fiber on nutrient databases. *J Food Comp Anal*, 16:287-291.
- Slavin, J.L., (2005). Dietary fiber and body weight. *Nutr*, 21: 411-418.
- Sobrino-Illescas, E. y Sobrino-Vesperinas, (1992). Hortalizas de legumbre-tallo-bulbo y tuberosas. En: E. Sobrino-Illescas y Sobrino-Vesperinas (eds.). Tratado de horticultura herbácea. Aedos, S.A., Barcelona. 10-223pp.
- Sosulski, F.W., Elkowicz, L., y Reichert, R.D., (1982). Oligosaccharides in eleven legumes and their air-classified protein and starch fractions. *J Food Sci*, 47: 498-502.
- Souci, S.W., Fachmann, W., y Kraut, H., (1994). Soya bean. En: SW Souci, W Fachmann y H Kraut. Food Composition and Nutrition Tables. Scientific Publishers, Stuttgart, Germany. 770-771 pp.
- Southgate, D.A.T., (1969). Determination of carbohydrates in food II-unavailable carbohydrate. *J Sci Food Agric*, 20, 6: 331-335.
- Sun, R., Jones, G.L., Tomkinson, J., y Bolton, J., (1999). Fraccional isolation and partial characterization of non-starch polysaccharides and lignin from sago-pith. *Industrial crops and products*, 19: 211-220.
- Theander, O. y Åman, P., (1979). Studies in dietary fibres I. Analysis and chemical characterization of water-soluble and water-insoluble dietary fibres. *Swed J Agric*, 9, 97-106
- Theander, O., Åman, P., Westerlund, E., Andersson, R. y Pettersson, D., (1995). Total dietary fiber determined as neutral sugar residues, uronic acid residues, and Klason lignin (The Uppsala method) collaborative study. *J AOAC Int*, 78, 4, 1030-1044
- Theander, O., Åman, P., Westerlund, E., y Graham, H., (1990). The Uppsala method for rapid analysis of total dietary fiber. En: I. Furda and C.J.

- Brine. (eds.). New developments in dietary fiber. Plenum Press. New York. 273-281
- Theander, O., y Westerlund, E.A., (1986). Studies of dietary fiber 3. Improved procedures for analysis of dietary fiber. *J Agric Food Chem*, 34: 330-336.
- Thibault, J.-F., Lahaye, M., y Guillon, F., (1992). Physicochemical properties of food plant cell walls. En: T.F. Schweizer y C. Edwards (eds.). Dietary fibre, a component of food. Nutritional function in health and disease. ILSI Europe. Springer-verlag, Berlin. 21-39 pp.
- Tuohy, K.M., Rouzaud, G.C.M., Brück, W.M., y Gibson, G.R., (2005). Modulation of the human gut microflora towards improved health using prebiotics-Assesment of efficacy. *Current Pharmaceutical Design*, 11: 75-90.
- USDA, (2004). United States Department of Agriculture: www.fas.usda.gov/wap/circular/2004/04-12/wap%2012-04.pdf
- USDA, (2005). What we eat in America, NHANES 2001-2002: Usual Nutrient Intakes From Food Compared to Dietary Reference Intakes. United States Department of Agriculture, Agricultural Research Service, United States.
- Van de Vis, J.W., (1994). Characterization and mode of action of enzymes degrading galactan structures of arabinogalactans. PhD-thesis, Wageningen University, Wageningen , the Netherlands.
- Van der Riet, W.B., Wight, A.W., Cilliers, J.J.L. and Datel, J.M., (1989). Food Chemical Investigation of Tofu and its Byproduct Okara. *Food Chem*, 34, 193-202.
- Van Laere, K.M.J., (2000). Degradation of structurally different non-digestible oligossacharides by intestinal bacteria: Glycosylhydrolases of *Bi. adolescentis*. PhD-thesis, Wageningen University, Wageningen, the Netherlands.
- Van Loo, J., Cummings, J., Delzenne, N., Englyst, H., Frank, A., Hopkins, M., Kok, N., Macfarlane, G., Newton, D., Quigley, M., Roberfroid, M., van Vliet, T., y van den Heuvel, E., (1999). Functional food properties of non-

- digestible oligosaccharides: a consensus report from ENDO project (DGXII AIRII-CT94-1095). *Br J Nutr*, 81 (2): 121-132
- Van Soest, P.J., (1963a). Use of detergents in the analysis of fibrous feeds I. Preparation of fiber residues of low nitrogen content. *J Assoc Off Anal Chem*, 46, 5, 825-829
- Van Soest, P.J., (1963b). Use of detergents in the analysis of fibrous feeds II. A rapid method for the determination of fiber and lignin. *J Assoc Off Anal Chem*, 46, 5, 829-835
- Van Soest, P.J., y McQueen, R.W., (1973). The chemistry and estimation of fibre. *Proc Nutr Soc*, 32, 3, 123-130
- Van Soest, P.J., y Wine, R.H., (1967). Use of detergents in the analysis of fibrous feeds IV. Determination of plant cell wall constituents. *J Assoc Off Anal Chem*, 50, 1, 50-55
- Wadhwa, M., Kaushal, S., y Bakshi, M.P.S., (2006). Nutritional evaluation of vegetable wastes as complete feed for goat bucks. *Small Ruminant Research*, 64: 279-284.
- Wakabayashi, K., Sakurai, N., y Kuraishi, S., (1989). Effects of ABA on synthesis of cell-wall polysaccharides in segments of etiolated squash hypocotyl. *Plant Cell Physiol*, 30, 99-105.
- Weaver, C.M., Heaney, R.P., Proulx, W.R., Henders, S.M., Packard, P.T., (1993). Absorbability of calcium from common beans. *J Food Sci*, 58: 1401-1403.
- Weaver, C.M., y Plawewski, K.L., (1994). Dietary calcium: adequacy of a vegetarian diet. *Am J Clin Nutr*, 59 (suppl.): 1238s-1241s.
- Weightman, R.M., Renard, C.M.G.C., y Thibault, J.-F., (1994). Structure and properties of the polysaccharides from pea hull. Part 1: Chemical extraction and fractionation of the polysaccharides. *Carbohydrate polymers*, 24: 139-148.
- Wills, R. B. H., Balmer, N., y Greenfield, H., (1980). Composition of Australian foods. 2. Methods of analysis. *Food Technol In Aust*, 32(4), 198-202, 204.

Yu, L., y Mort, A.J., (1996). Pectins and Pectinases. En: J., Visser, A.G.J., Voragen (eds.). *Progress in Biotechnology* 14. Elsevier Science, Amsterdam. 79-88 pp.