

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Nutrición y Bromatología II (Bromatología)



**ESTUDIO DE FACTORES NO NUTRITIVOS EN “VICIA
FABA I.”: INFLUENCIA DE LA GERMINACIÓN SOBRE SU
VALOR NUTRITIVO**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Carmen Goyoaga Jorba

Bajo la dirección de las doctoras

Mercedes Muzquiz Elorrieta

Carmen Burbano Juana

Madrid, 2005

ISBN: 84-669-2747-6

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Nutrición y Bromatología II: Bromatología



**ESTUDIO DE FACTORES
NO NUTRITIVOS EN *VICIA FABAE* L.
INFLUENCIA DE LA GERMINACIÓN
SOBRE SU VALOR NUTRITIVO**

TESIS DOCTORAL

CARMEN GOYOAGA JORBA

Madrid, 2005

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Nutrición y Bromatología II: Bromatología



ESTUDIO DE FACTORES NO NUTRITIVOS EN *VICIA FAB* L. INFLUENCIA DE LA GERMINACIÓN SOBRE SU VALOR NUTRITIVO

Directoras: Dra. Mercedes Muzquiz Elorrieta

Dra. Carmen Burbano Juana

SGIT-INIA. Dpto. Tecnología de Alimentos

TESIS DOCTORAL

CARMEN GOYOAGA JORBA

Madrid, 2005

Esta Memoria titulada "Estudio de factores no nutritivos en *Vicia faba* L. Influencia de la germinación sobre su valor nutritivo" que presenta Dña. Carmen Goyoaga Jorba para optar al grado de Doctor en Farmacia, ha sido desarrollada en el Departamento de

Tecnología de Alimentos del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), bajo la dirección de Carmen Burbano y Mercedes Muzquiz, investigadoras del INIA, y bajo la tutoría de Carmen Díez, catedrática del Departamento de Nutrición y Bromatología II, de la Facultad de Farmacia de la UCM.

Este trabajo de investigación desarrollado por la doctoranda con total dedicación y rigor científico ha sido financiado por el INIA dentro del Proyecto “Influencia de la germinación sobre el valor nutritivo de distintas semillas de leguminosas (habas, garbanzos y judías) en monogástricos” del Programa Sectorial de I+D Agrario y Alimentario del MAPA, cumpliendo todas las exigencias académicas para la presentación, lectura y defensa como Tesis Doctoral de acuerdo con la legislación vigente.

Madrid, Julio de 2005

LAS DIRECTORAS

LA TUTORA

Fdo.: Dra. Carmen Burbano Juana
Fdo.: Dra. Mercedes Muzquiz Elorrieta
Investigadoras del INIA

Fdo.: Prof. Dra. Carmen Díez Marqués
Catedrática de la UCM

LA DOCTORANDA

Fdo.: Dña. Carmen Goyoaga Jorba
Lda. en Farmacia

A mi familia

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi más sincera gratitud a todas aquellas personas que han contribuido a la realización de esta Memoria de Doctorado.

En primer lugar, a la Dra. Mercedes Muzquiz Elorrieta y a la Dra. Carmen Burbano Juana, investigadoras del Departamento de Tecnología de Alimentos, del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), por su inestimable ayuda y constante dedicación en este proyecto bajo su dirección, y por haberme proporcionado en todo momento los medios necesarios para la realización de esta Tesis.

A la Dra. Carmen Díez Marqués, Catedrática del Departamento de Nutrición y Bromatología II: Bromatología, de la Facultad de Farmacia, de la Universidad Complutense de Madrid, por sus orientaciones y consejos bajo su tutoría.

A las Dras. Carmen Cuadrado Hoyo y Mercedes Martín Pedrosa, investigadoras del Departamento de Tecnología de Alimentos del INIA, por su gran ayuda en el trabajo de investigación desarrollado en el laboratorio.

Al Dr. Luis Rubio San Millán, investigador de la Estación Experimental del Zaidín, del Consejo Superior de Investigaciones Científicas de Granada (CSIC), por su valiosa contribución en las pruebas experimentales llevadas a cabo en ratas.

Al Centro de Investigación y Formación Agrario de Córdoba (CIFA), por el material vegetal suministrado para la realización de los ensayos.

A la Estación de Ensayo de Semillas y Plantas de Vivero del INIA, por sus importantes recomendaciones para llevar a cabo los ensayos de germinación.

A la Dra. Rosa Calvo, Jefa de Servicio de Biometría del INIA, por su colaboración en los análisis estadísticos.

A la Dra. Celia de la Cuadra González-Meneses, Jefa de Servicio de Conservación Genética del Centro de Recursos Fitogenéticos del INIA, por sus valiosos consejos.

A mis compañeros del laboratorio 5 del Departamento de Tecnología de Alimentos del INIA, Eva Guillamón, Pilar Altares y Blanca Cabellos, por su grata compañía y en especial a Alejandro Varela por su incondicional ayuda.

Al Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), por haberme concedido la beca con la que he podido realizar esta Tesis.

A mi familia y amigos, especialmente a mis padres y a Gerardo por el apoyo y cariño que me han mostrado en todo momento.

ÍNDICE

ÍNDICE

	Página
I. INTRODUCCIÓN	1
1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LAS LEGUMINOSAS	1
2. ASPECTOS BOTÁNICOS DE INTERÉS.....	4
2.1. ESTRUCTURA DE LA SEMILLA Y DE LA PLÁNTULA	4

2.2. CLASIFICACIÓN BOTÁNICA DE <i>VICIA FABA</i> L.	6
3. COMPOSICIÓN QUÍMICA Y VALOR NUTRITIVO	8
4. FACTORES NO-NUTRITIVOS	12
4.1. α -GALACTÓSIDOS	15
4.2. VICINA, CONVICINA Y L-DOPA	25
4.3. INOSITOLES FOSFATO	34
4.4. TANINOS	42
4.5. INHIBIDORES DE PROTEASAS	49
4.6. OTROS FACTORES NO-NUTRITIVOS	55
5. TÉCNICAS DE PROCESADO	58
5.1. DESCASCARILLADO	58
5.2. REMOJO	58
5.3. TRATAMIENTOS TÉRMICOS	59
5.4. FERMENTACIÓN	60
5.5. GERMINACIÓN	61
5.5.1 PROCESO DE GERMINACIÓN	61
5.5.2. EFECTO DE LA GERMINACIÓN SOBRE LA CALIDAD NUTRITIVA	65
6. VALORACIÓN NUTRITIVA DE LA PROTEÍNA	67
6.1. IMPORTANCIA DE LOS AMINOÁCIDOS EN LA CALIDAD DE LA PROTEÍNA	67
6.2. INCORPORACIÓN Y UTILIZACIÓN FISIOLÓGICA DE LAS PROTEÍNAS	69
6.3. EVALUACIÓN DE LA CALIDAD PROTEICA	70
II. OBJETIVOS	72
III. MATERIAL Y MÉTODOS	73
1. MATERIAL VEGETAL	73
2. GERMINACIÓN DEL MATERIAL VEGETAL	73
3. DETERMINACIÓN DEL PESO FRESCO Y SECO DEL MATERIAL VEGETAL	76

4. DETERMINACIÓN DE FACTORES NO-NUTRITIVOS	76
4.1. DETERMINACIÓN DE MONO-, DI- Y OLIGOSACÁRIDOS	76
4.2. DETERMINACIÓN DE VICINA, CONVICINA Y L-DOPA	80
4.3. DETERMINACIÓN DE INOSITOLES FOSFATO	83
4.4. DETERMINACIÓN DE TANINOS CONDENSADOS	87
4.5. DETERMINACIÓN DE INHIBIDORES DE TRIPSINA	90
5. PRUEBAS EXPERIMENTALES EN RATAS	95
5.1. ELABORACIÓN DE LAS RACIONES Y ANÁLISIS QUÍMICOS	95
5.2. ANIMALES Y CONDICIONES EXPERIMENTALES	99
5.3. ENSAYOS NUTRICIONALES	100
6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	102
IV. RESULTADOS	104
1. GERMINACIÓN DEL MATERIAL VEGETAL	104
2. PESO FRESCO Y SECO DEL MATERIAL VEGETAL	105
3. FACTORES NO-NUTRITIVOS	113
3.1. MONO-, DI- Y OLIGOSACÁRIDOS	113
3.2. VICINA, CONVICINA Y L-DOPA	133
3.3. INOSITOLES FOSFATO	145
3.4. TANINOS CONDENSADOS O PROANTOCIANIDINAS	157
3.5. INHIBIDORES DE TRIPSINA	158
4. PRUEBAS EXPERIMENTALES EN RATAS	167
4.1. PARÁMETROS PRODUCTIVOS Y BALANCE DE NITRÓGENO	167
4.2. DIGESTIBILIDAD ILEAL APARENTE DE AMINOÁCIDOS	168
4.3. AMINOÁCIDOS LIBRES EN PLASMA	168
4.4. PESOS DE ÓRGANOS	168
V. DISCUSIÓN	174

1. GERMINACIÓN DEL MATERIAL VEGETAL	174
2. PESO FRESCO Y SECO DEL MATERIAL VEGETAL	175
3. FACTORES NO-NUTRITIVOS	179
3.1. MONO-, DI- Y OLIGOSACÁRIDOS	179
3.2. VICINA, CONVICINA Y L-DOPA	196
3.3. INOSITOLES FOSFATO	203
3.4. TANINOS CONDENSADOS O PROANTOCIANIDINAS	211
3.5. INHIBIDORES DE TRIPSINA	212
4. PRUEBAS EXPERIMENTALES EN RATAS	217
VI. CONCLUSIÓN	222
VII. BIBLIOGRAFÍA	225

INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN

1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LAS LEGUMINOSAS

Las leguminosas son un conjunto de especies pertenecientes a la familia *Fabaceae* (*Papilionaceae* de la sistemática clásica), que se diferencian de otras familias por rasgos morfológicos muy característicos como es la presencia de semillas contenidas en una vaina constituyendo el fruto o legumbre. Sus semillas maduras se emplean en alimentación principalmente por su elevado contenido proteico (17-30%). Esta familia comprende unos 600 géneros y 13.000 especies, de las cuales unas 200 son de consumo humano y animal (Moreno, 1983; Torija y Díez, 1999).

Se clasifican en dos grupos en función de su contenido lipídico, diferenciándose así las leguminosas oleaginosas (soja y cacahuete) con unos niveles de grasa elevados: 20-50% y las legumbres secas o leguminosas grano (judía, haba, guisante, garbanzo, lenteja, altramuza, ...) con un contenido en grasa muy inferior: 1-7% (Torija y Díez, 1999).

Son cultivos autóctonos adaptados a las condiciones ambientales y contribuyen ecológicamente como fertilizantes naturales del suelo, ya que sus raíces suelen formar simbiosis con la bacteria *Rhizobium leguminosarum*, que tiene la propiedad de fijar el nitrógeno atmosférico en el suelo (Pérez y Torralba, 1997; Torija y Díez, 1999).

Las legumbres y los cereales fueron las primeras plantas cultivadas por el hombre, siendo la base esencial de su alimentación durante milenios. De hecho, en los yacimientos arqueológicos de diferentes civilizaciones del mundo, siempre aparece junto a un cereal una legumbre (Juste, 1992).

El origen de las leguminosas según restos encontrados o referencias escritas, se centra en las civilizaciones prehistóricas del continente americano o en las primeras sociedades de lo que hoy se conoce como Oriente Próximo. En España, las referencias históricas de las legumbres hay que buscarlas en el Libro de Agricultura del andalusí sevillano Abu Zacarías de principios del siglo XVI, que recoge las técnicas de siembra o producción y los efectos beneficiosos o perjudiciales de su consumo. Además, hace mención a otros usos comunes y habituales de las legumbres. Cuatrocientos años después, Alonso de Herrera elabora un tratado de agricultura, donde dedica un amplio y exhaustivo espacio a las leguminosas, con una atención muy especial a las virtudes medicinales y a los supuestos efectos perniciosos de su consumo desmesurado (Juste, 1992).

Estas referencias permiten valorar la importancia que siempre ha tenido la producción y consumo de legumbres en los principales países mediterráneos y de manera

muy especial, en España. Sólo en tiempos recientes se ha visto amenazado su consumo, llevando a sustituir sin un control racional, las proteínas de origen vegetal por las procedentes de animales. Pero en la actualidad, existe una actitud consciente de vuelta a una alimentación basada fundamentalmente en los productos vegetales, y las legumbres están recuperando la privilegiada posición que ocuparon en otros tiempos (Juste, 1992).

Los datos de superficie, producción y rendimiento de leguminosas grano en España durante los últimos años (1990-2002) se presentan en la Figura 1. La superficie dedicada a estos cultivos experimentó durante este periodo un incremento del 72%, obteniéndose un aumento en la producción del 94%. Además, se observó un ligero ascenso (12,5%) en el rendimiento de las cosechas (MAPA, 2003a).

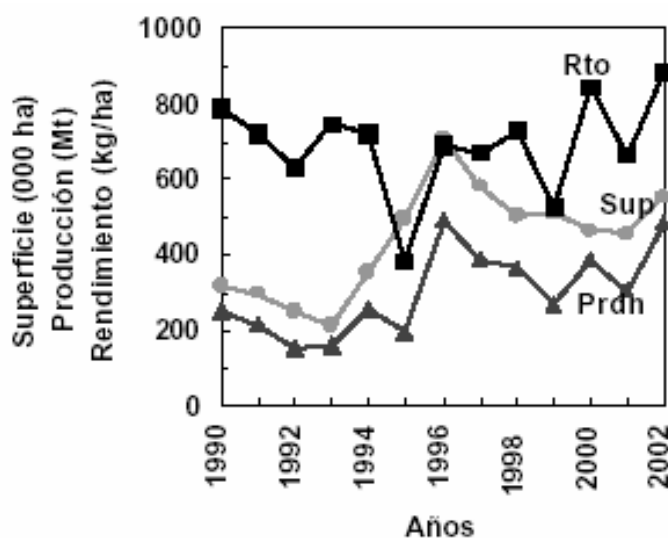


Figura 1.- Serie histórica de la superficie de cultivo y la producción de las leguminosas grano en España.

Como se refleja en la Figura 2, la mayor superficie (1,9-4,2%) dedicada al cultivo de leguminosas grano en España respecto a la superficie geográfica provincial, la ocupan las provincias de Toledo, Ciudad Real y Albacete, en Castilla La Mancha; y Valladolid y Palencia, en Castilla y León (MAPA, 2003b).

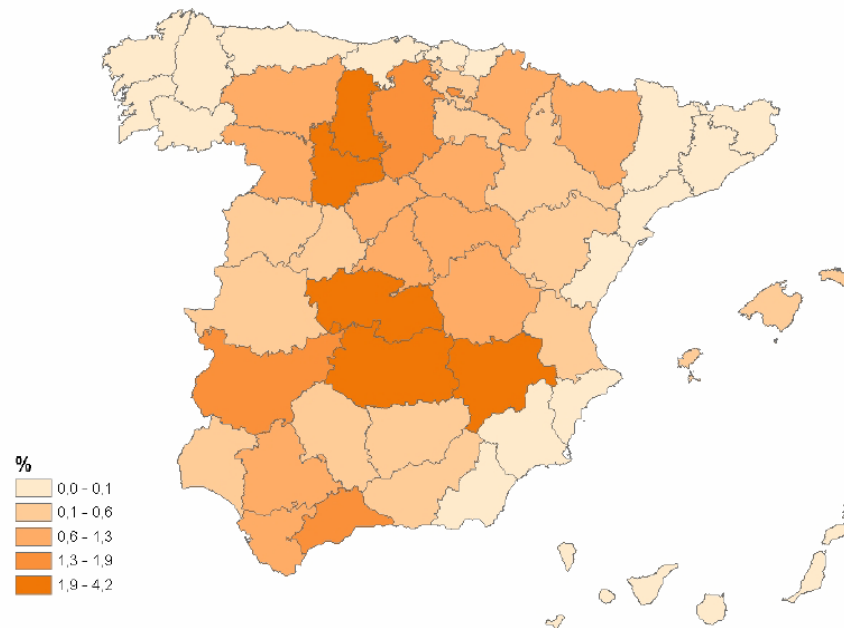


Figura 2.- Superficie de cultivo de leguminosas grano respecto a la superficie geográfica provincial en 2003.

Una de las leguminosas grano más prometedoras desde el punto de vista agronómico y económico es *Vicia faba* L. Esta especie comparte las características generales anteriormente indicadas para todas las leguminosas, pero además tiene unas características particulares que destacamos a continuación.

El centro originario exacto de *V. faba* se desconoce. Según algunos autores, es una especie nativa del Suroeste de Asia, aunque otros piensan que es del Nordeste de África, por lo que en definitiva podría decirse que procede de Oriente Próximo (Zohary, 1977; Everard, 1982).

El cultivo del haba es un de los más antiguos, pues su domesticación habría ocurrido en el período Neolítico, 6.000 años a.C. (Meletis y Konstantopoulos, 2004).

Esta especie, conocida por los antiguos egipcios, griegos y romanos, era consumida seca, como grano verde y como vaina verde. Los griegos asociaban con la muerte la pequeña cicatriz negra (el hilum) de estas semillas y a veces eran ofrecidas en sacrificios a Apolo. Los sacerdotes tenían prohibido comerlas, e incluso mencionar su nombre. En general, la historia de *V. faba* ha estado relacionada con supersticiones, prohibiciones, magia y temor. La causa, tal vez haya que buscarla en los trastornos que puede provocar su ingestión en individuos con una alteración enzimática genética (Meletis y Konstantopoulos, 2004).

Según el Anuario de Estadística Agroalimentaria del MAPA (2003c), la superficie mundial de cultivo del haba en el año 2000 fue de 2.332.000 ha, con una producción de 3.264.000 t. Su cultivo en Europa fue de 119.000 ha, con una producción de 249.000 t. El primer lugar lo ocupa Italia con 39.000 ha, le sigue Portugal con 24.000 ha, Francia y Alemania con 18.000 ha y en cuarto lugar está España con 12.445 ha. De las 13.279 t de habas que España produce, 12.754 t (el 96%) son utilizadas para alimentación animal, mientras que para consumo humano son destinadas únicamente 525 t. Además, la mayor superficie dedicada a su cultivo está en Andalucía (60%), ya que de las 12.445 ha de haba cultivadas en España, 7.505 se encuentran en esta provincia.

2. ASPECTOS BOTÁNICOS DE INTERÉS

2.1. ESTRUCTURA DE LA SEMILLA Y DE LA PLÁNTULA

La semilla constituye la primera fase del desarrollo de la nueva planta y las partes esenciales de ésta son las envueltas seminales y el embrión (Figura 3).

Las envueltas seminales, que se encuentran formando la testa o cascarilla, son capas que rodean completamente a la semilla, la protegen de posibles agresiones del medioambiente y regulan los intercambios que se producen entre el interior y el exterior de la semilla. Estas cubiertas se rompen al desarrollarse el embrión para formar la nueva planta.

El embrión consta de un eje embrionario unido a dos cotiledones. El eje embrionario está formado por dos partes íntimamente unidas entre sí: la parte que está por encima del par de cotiledones es el epicotilo y dará lugar al brote terminal de la planta formadora de las hojas, y la parte que está por debajo de los cotiledones es el hipocotilo, que al crecer por su extremo libre, denominado radícula, formará la raíz principal y creciendo por la parte que se continúa con el epicotilo desarrollará el tallo. Los cotiledones actúan como órganos de reserva donde se almacenan las sustancias nutritivas (proteínas, carbohidratos y lípidos) necesarias para la respiración y desarrollo del embrión (Kadam y col., 1989a; de la Cuadra, 1993).

La proporción de cada una de las partes de la semilla de *V. faba* es la siguiente: el par de cotiledones representa el 86% del peso total de la semilla, la testa constituye el 13% y el eje embrionario el 1% (Chavan y col., 1989).

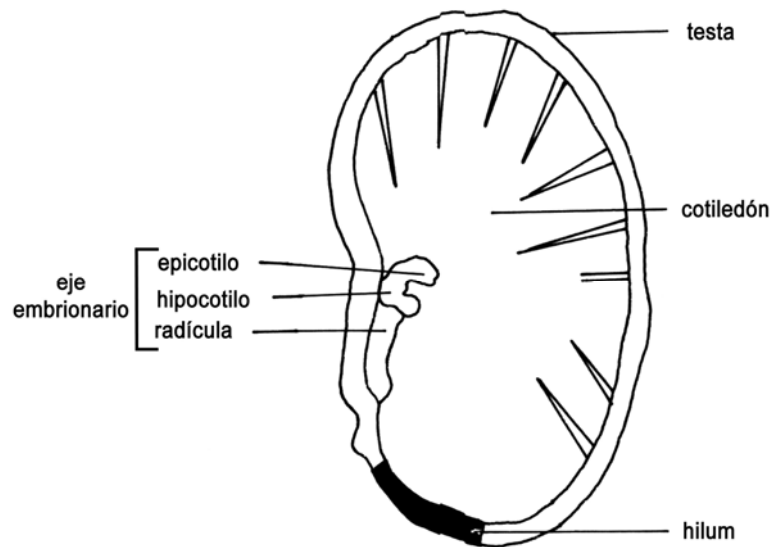


Figura 3.- Sección longitudinal de la semilla madura de *V. faba*.

Las leguminosas, dependiendo de la posición en la que se encuentren los cotiledones respecto a la superficie del sustrato durante su germinación, se clasifican en: plántulas epigeas (judía, lupino, soja) y plántulas hipogeas (haba, guisante, garbanzo, lenteja).

En las plántulas epigeas, los cotiledones emergen del suelo y se liberan de la testa como consecuencia de un considerable crecimiento del hipocotilo. En estas condiciones, los cotiledones desarrollan cloroplastos y producen clorofila, convirtiéndose así en órganos fotosintéticos (Figura 4).

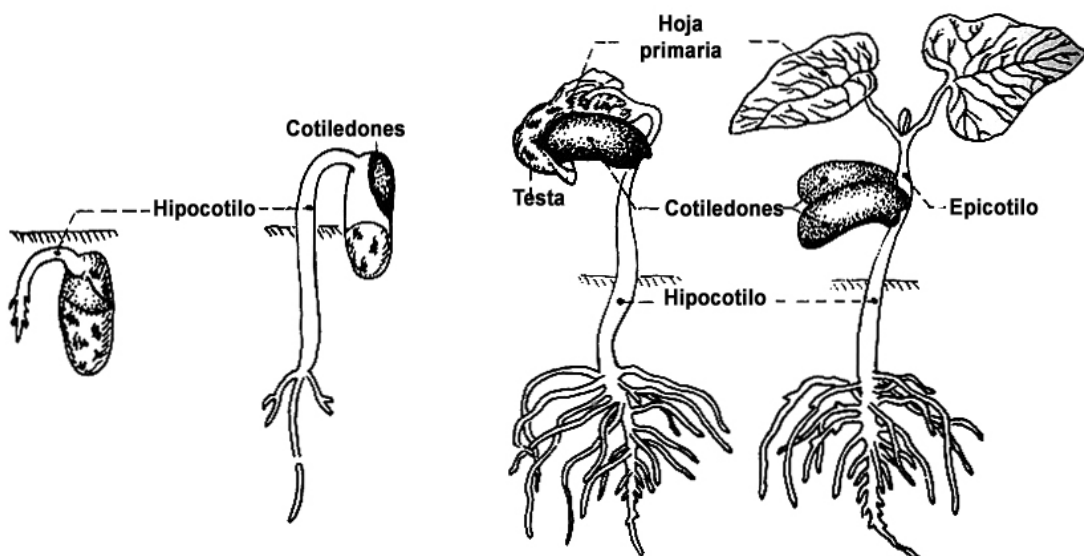


Figura 4.- Germinación epigea de la semilla y crecimiento de la plántula (*Phaseolus vulgaris* L.).

En las plántulas hipogeas, como las de *V. faba*, los cotiledones que contienen las sustancias de reserva, permanecen dentro de la testa y bajo el suelo con un corto hipocotilo, y con posterioridad el epicotilo se alarga y aparece el primer par de hojas (Figura 5) (García-Agustín y Primo-Millo, 1993; Barceló y col., 2001).

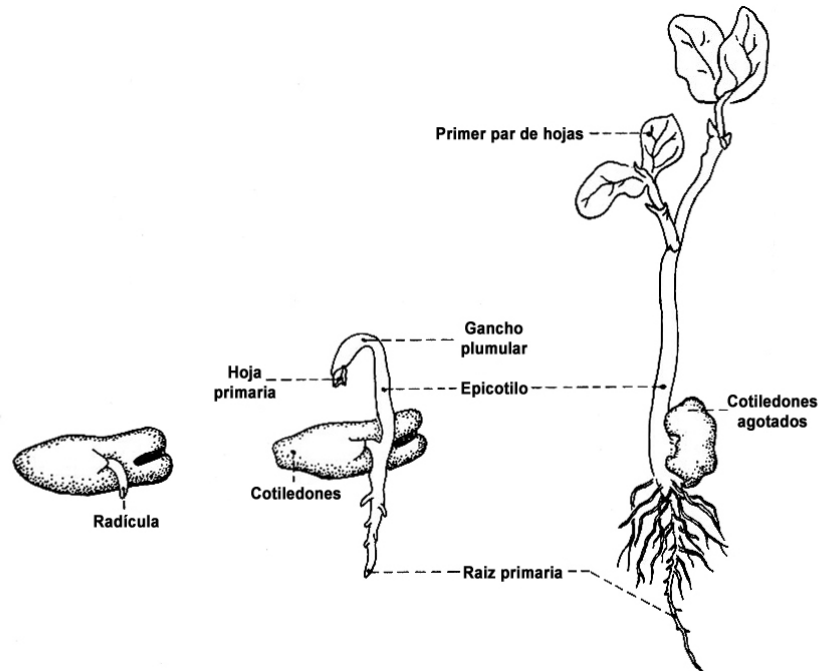


Figura 5.- Germinación hipogea de la semilla y crecimiento de la plántula (*Vicia faba*).

2.2. CLASIFICACIÓN BOTÁNICA DE *VICIA FABA* L.

La planta del haba pertenece a la división *Spermatophyta*, subdivisión *Angiospermae*, clase *Dicotyledoneae*, subclase *Rosidae*, orden *Fabales*, familia *Fabaceae*, tribu *Vicieae*, género *Vicia* y especie *Vicia faba* L. (Cronquist, 1981).

Para esta especie se han descrito diversas subespecies y variedades. En la clasificación taxonómica realizada por Muratova (1931) se diferencian dos subespecies: subsp. *faba* (con las variedades *faba*, *equina* y *minor*) y subsp. *paucijuga*. Hanelt (1972) también reconoce dos subespecies, pero en este caso son: subsp. *faba* (con las variedades *faba* y *equina*) y subsp. *minor* (con la variedad *minor*), sin embargo considera a *paucijuga* como una raza geográfica de la subsp. *minor*. Cubero (1974) distingue sólo la subespecie *faba* con cuatro variedades: *faba*, *equina*, *minor* y *paucijuga*. La var. *faba* se conoce comúnmente como var. *major*.

Vicia faba es una planta herbácea anual, erecta y glabra, que noduliza mediante la asociación simbiótica con *Rhizobium leguminosarum*. Posee tallos firmes y huecos de sección cuadrangular de 30-80 cm, con grandes flores en forma de mariposa de aproximadamente 2 cm de color blanco, con una mancha negro-purpúrea en cada pétalo, dispuestas en racimos axilares y casi sentados de 2-6 flores (Figura 6a). Las hojas son compuestas, con 1-4 pares de folíolos grandes, ovales, gruesos, glaucos, sin zarcillos, de 40-80x10-20 mm y provistos en su base de unas estípulas grandes, dentadas y maculadas. El fruto en legumbre (Figura 6b) de 80-200x10-20 mm, es verde-negruzco, carnoso, inflado y pubrescente, y contiene unas ocho semillas de 2-3 cm, ovales, oblongas, comprimidas, tersas y de color verde brillante (Figura 7) (Everard, 1982).



Figura 6.- Planta de *Vicia faba* L.: a) flor; b) fruto

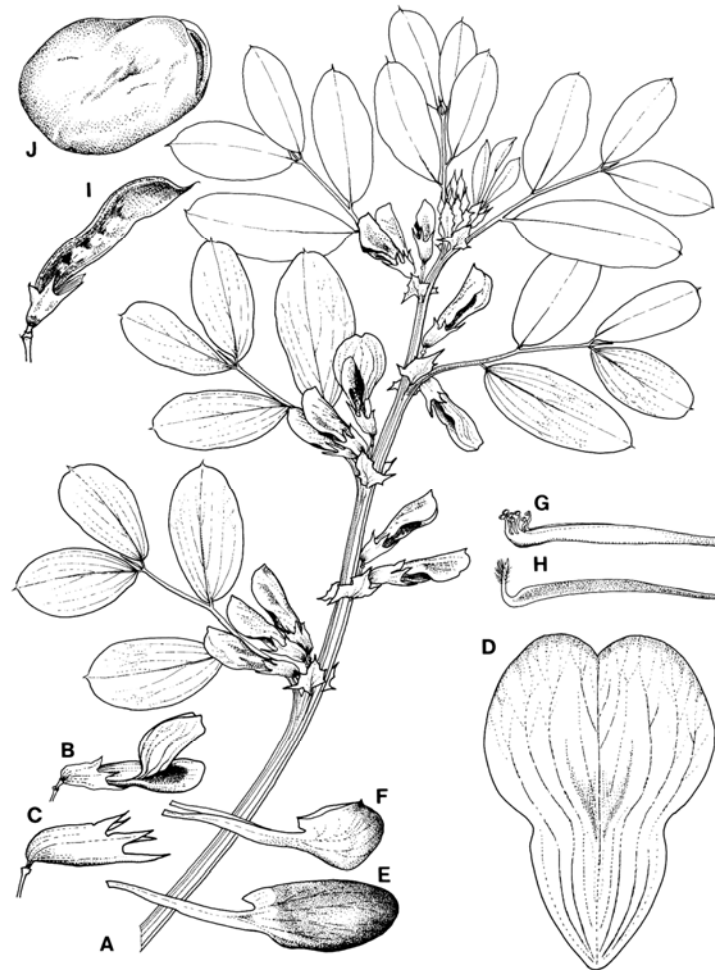


Figura 7.- *Vicia faba* L. subsp. *faba* var. *faba*: A planta; B flor; C cáliz; D, E y F pétalos; G estambre; H pistilo; I fruto; J semilla.

3. COMPOSICIÓN QUÍMICA Y VALOR NUTRITIVO

Las leguminosas grano suscitan un gran interés desde el punto de vista nutricional, debido a la presencia simultánea de proteína y almidón en proporciones adecuadas, así como por la riqueza en vitaminas y microelementos. Es por tanto, una de las fuentes más importantes de suministro de alimento en términos de aporte de energía y nutrientes. Su composición química varía en función del cultivar, la localización geográfica y las condiciones de desarrollo (Augustin y Klein, 1989; Kadam y col., 1989a).

La composición química del haba ha sido analizada tanto en la semilla completa, como en cada una de sus partes constituyentes. El par de cotiledones posee más del 90% de las proteínas, carbohidratos, lípidos y minerales, mientras que la testa contiene la mayoría de la fibra (9%) y de los taninos (Chavan y col., 1989).

Proteínas

El contenido proteico de las leguminosas se encuentra en un rango del 15-45%, siendo más elevado que el de los cereales. Las proteínas de la semilla, se localizan principalmente en los cotiledones y en el eje embrionario, mientras que sólo una pequeña cantidad está en la cascarilla (Marquardt y col., 1975; Kadam y col., 1989a).

La proteína de las leguminosas es pobre en aminoácidos azufrados (metionina y cisteína) pero es rica en lisina, de la que es altamente deficitaria la proteína de los cereales, pudiendo así complementarse cereales y legumbres. El bajo valor biológico y la escasa utilización de esta proteína se atribuye (i) a su deficiencia en aminoácidos azufrados, (ii) a su compacta estructura química, difícil de hidrolizar por los enzimas proteolíticos y (iii) a la presencia de factores antinutritivos (ácido fítico, taninos, inhibidores de proteasas, lectinas, etc.) que limitan la digestibilidad de la proteína y la absorción de los aminoácidos en el tracto digestivo (Blair, 1977; Eggum, 1980; Chang y Satterlee, 1981; Deshpande y Damodaran, 1989; Nielsen, 1991; Rubio, 2000).

Las semillas de *V. faba* presentan alrededor de un 30% de proteína, pero dicho contenido está influido por la variedad o cultivar de haba y por el nivel de maduración de la misma, así como por las condiciones climatológicas y zona de cultivo (Marquardt y col., 1975; Chavan y col., 1989). Las proteínas mayoritarias del haba son las globulinas, constituidas a su vez por dos fracciones: legumina y vicilina; estas proteínas de reserva se encuentran dentro de los cuerpos proteicos en una proporción de aproximadamente un 60%. Otras proteínas de reserva son las albúminas (20%), que tienen un elevado número de aminoácidos azufrados, y en esta fracción se incluyen la mayoría de los enzimas de la semilla. En menor proporción se encuentran las glutelinas (15%), localizadas principalmente en la testa, y las prolaminas, que apenas representan un 5% (de Haro, 1983).

Carbohidratos

Las legumbres se caracterizan por ser una importante fuente de carbohidratos, ya que se encuentran en una proporción del 24-68% (Kadam y col., 1989a). Estos compuestos se clasifican en carbohidratos solubles y polisacáridos. A su vez, los carbohidratos solubles se dividen en monosacáridos (pentosas y hexosas), disacáridos (azúcares reductores y azúcares no-reductores) y oligosacáridos. Estos últimos, se clasifican en: trisacáridos, tetrasacáridos, etc., dependiendo del número de monosacáridos que la molécula posea (Kadlec, 2000).

En las semillas de *V. faba*, el contenido en carbohidratos es aproximadamente de un 60%, con variaciones dependiendo del cultivar analizado, de las condiciones de cultivo y del grado de maduración de la semilla (Cerning y col., 1975; Chavan y col., 1989).

Los monosacáridos fructosa, glucosa y galactosa, son azúcares reductores presentes en haba en muy baja proporción. Sin embargo, sacarosa es un disacárido no-reductor encontrado en cantidades superiores: 1-2%. Todos ellos son azúcares solubles en agua y pueden ser fácilmente asimilados por el hombre (Augustin y Klein, 1989; Chavan y col., 1989).

Los oligosacáridos de la familia de la rafinosa (rafinosa, estaquiosa, verbascosa y ajucosa), son otros azúcares solubles presentes en esta especie en una proporción del 5-6%, donde verbascosa es el compuesto mayoritario. Los animales monogástricos no son capaces de hidrolizar estos oligosacáridos, por lo que llegan intactos al colon, donde son fermentados por bacterias de la flora intestinal. Como consecuencia, se produce un efecto indeseable que es la flatulencia, pero a su vez también se desencadenan efectos beneficiosos relacionados con su condición de prebióticos (Augustin y Klein, 1989; Chavan y col., 1989; Kadlec, 2000; Steer y Gibson, 2002; Guillon y Champ, 2002; Rubio y col., 2005).

En las semillas de *V. faba* también están presentes almidón y polisacáridos no amiláceos. El almidón, formado por amilosa y amilopectina, es un polisacárido de reserva soluble en agua, que encontramos en los cotiledones. Representa el 80% de los carbohidratos totales del haba y se encuentra en una proporción del 30-40% frente a los demás compuestos de la semilla. Es un carbohidrato que puede ser utilizado como fuente de energía por animales monogástricos, incluido el hombre, aunque no todo el almidón ingerido con la dieta, es digerido y absorbido en el intestino delgado. La fracción de almidón resistente a la digestión (5% en haba), llega al intestino grueso donde es metabolizada por bacterias colónicas, produciendo ácidos grasos de cadena corta y gases (CO₂, H₂, CH₄). Por tanto, al almidón resistente se le relaciona, además de con la flatulencia, con efectos beneficiosos como la reducción del colesterol o la prevención de cáncer colorectal. Pero además, la fracción digerida en el intestino delgado, va siendo absorbida lentamente, contribuyendo así a reducir la respuesta glucémica (Cerning y col., 1975; Lineback y Ke, 1975; Augustin y Klein, 1989; Chavan y col., 1989; Bravo, 1999; Kadlec y col., 2001; Guillon y Champ, 2002; Niba y Rose, 2003; Rubio y col., 2005).

Los polisacáridos no amiláceos (sustancias pécticas, celulosa y hemicelulosas), también denominados polisacáridos estructurales, forman parte de la fibra y están presentes principalmente en la cascarilla. En habas se encuentran en una proporción del 17%, donde más del 60% son hemicelulosas y alrededor del 35% celulosa. Las pectinas y algunas

hemicelulosas son solubles en agua, mientras que la celulosa y otras hemicelulosas, son insolubles. Los polisacáridos no amiláceos, no pueden ser digeridos porque son resistentes a los enzimas digestivos de los animales monogástricos, de manera que, en el colon son fermentados por la flora bacteriana, liberándose ácidos grasos de cadena corta. Este hecho, hace que se les relacione con efectos favorables para la salud como es la reducción del colesterol en sangre o la prevención y tratamiento de estreñimiento, colitis ulcerosa, cáncer de colon, litiasis biliar, diabetes, etc. (Reddy y col., 1984; Chavan y col., 1989; Rubio, 1991; Bravo, 1999; Fernández y Gassull, 1999; Bello, 2000; Rubio y col., 2005).

Lípidos

Las leguminosas grano contienen un 1-7% de lípidos, de los cuales el 32-51% son lípidos simples o neutros. Dentro de los lípidos compuestos, los fosfolípidos están en una proporción del 23-38% y los glucolípidos apenas constituyen el 8-12% (Salunkhe y col., 1989; Torija y Díez, 1999). Los principales ácidos grasos que forman parte de la estructura química de los lípidos son de tipo insaturado, pudiendo destacar los ácidos oleico, linoleico y linolénico. En menor cantidad algunas leguminosas también contienen ácidos grasos saturados como el ácido palmítico o el esteárico (Kadam y col., 1989a). Los ácidos grasos insaturados están relacionados con la reducción de los niveles de colesterol en sangre e hígado, y también se encuentran implicados en el desarrollo fisiológico y funcionamiento del cerebro y la retina (Augustin y Klein, 1989; Chavan y col., 1989; Akpinar y col., 2001).

El contenido lipídico del haba ronda el 2-3%, concentrándose el 97% en los cotiledones. Los lípidos simples se encuentran en una proporción del 48%, con los triglicéridos como compuesto mayoritario, el porcentaje en fosfolípidos es del 36% y el de glucolípidos del 10% (Salunkhe y col., 1989). Los ácidos grasos insaturados más abundantes de las semillas de *V. faba* son el oleico y el linoleico, y en menor proporción se encuentra el linolénico. Los ácidos grasos saturados mayoritarios son el palmítico y el esteárico.

Micronutrientes

Las legumbres son una buena fuente de vitaminas hidrosolubles, particularmente de las del grupo B. Tiene especial importancia la tiamina, que se encuentra en cantidades superiores a las de muchos cereales y productos de origen animal (0,3-1,3 mg/100g). Además presentan un alto contenido en riboflavina (0,1-0,8 mg/100g), niacina (1,3-2,6 mg/100g) y otras como vitamina B₆ o ácido fólico. De las vitaminas liposolubles, podemos indicar que la provitamina A está presente en algunas leguminosas como habas y guisantes. La biodisponibilidad de las vitaminas puede verse afectada por las interacciones

con fibra, almidón, lípidos o fenoles, incluso el almacenamiento o los distintos procesados pueden reducir su contenido. Así ocurre con la vitamina C, que además de estar presente en baja cantidad, desaparece durante el almacenamiento y la cocción (Augustin y Klein, 1989; Kadam y Salunkhe, 1989; Torija y Díez, 1999).

El contenido en minerales de las leguminosas es del 2,5-4,2%. El elemento mineral mayoritario es el potasio (586-1.830 mg/100g), seguido del fósforo (250-657 mg/100g). Los metales alcalinotérreos calcio y magnesio se encuentran en cantidades semejantes (45-290 mg/100g) y el microelemento más destacado es el hierro, con valores de 2,2-12,5 mg/100g (Kadam y col., 1989a; Torija y Díez, 1999). Los minerales acumulados en las leguminosas, tienen una baja biodisponibilidad debido a la presencia de fibra, almidón, inositoles fosfato, proteínas y lípidos entre otros, que forman complejos con ellos comprometiendo su utilización (Kadam y Salunkhe, 1989; Urbano y col., 1999).

Debemos destacar que tanto las sales minerales como las vitaminas, se encuentran principalmente en las envueltas seminales, lo cual representa una ventaja, ya que las legumbres se consumen enteras, sin la eliminación de dichas cubiertas (Torija y Díez, 1999).

Las habas en concreto, son una fuente rica en niacina, riboflavina (B₂), vitamina B₆, ácido fólico (B₉), ácido pantoténico y β -caroteno (Augustin y Klein, 1989). Además, presentan un elevado contenido en fósforo, potasio, calcio, azufre y hierro. Alrededor del 60% del azufre, se encuentra formando parte de los aminoácidos azufrados, pero el 40% restante no influye en el valor biológico de las proteínas. El 40-60% del fósforo localizado en el haba no está disponible, ya que se presenta en forma de inositoles fosfato (Chavan y col., 1989).

4. FACTORES NO-NUTRITIVOS

Dentro de las plantas destinadas a la alimentación, las leguminosas son unas de las más interesantes por su gran potencial nutritivo. Sin embargo, la utilización de sus nutrientes (proteínas, carbohidratos, minerales, ...) se ve limitada por la presencia de una serie de compuestos de carácter no nutritivo que obstaculizan su aprovechamiento y que producen efectos fisiológicos y bioquímicos adversos en humanos y animales, pudiendo llegar a presentar toxicidad en algunos casos. Es por ello, que a estos compuestos se les ha designado tradicionalmente como "factores antinutritivos" (Grant, 1989; Liener, 1989) y en los últimos tiempos como "factores no-nutritivos" (Bartholomai y col., 2000).

Hasta ahora, se había pensado que para lograr una mejor utilización de las leguminosas, era necesario eliminar estos factores. Sin embargo, datos recientes apoyan la idea de que en la proporción adecuada pueden tener un papel beneficioso para la salud, por

lo que empiezan a considerarse compuestos activos capaces de ejercer un efecto biológico, ya sea en el propio intestino o fuera de él, una vez absorbidos. De hecho, se les reconoce como: prebióticos, protectores del sistema circulatorio, reductores de la presión sanguínea, reguladores de la glucemia y la colesterolemia, anticancerígenos, mejoradores de la respuesta inmune, etc., y por ello, actualmente se les denomina “factores nutricionalmente activos” (Muzquiz y col., 2004). Es muy importante tener en cuenta la concentración y frecuencia de consumo, así como la interacción con otros componentes de la dieta, para que estos factores sean considerados antinutrientes o pronutrientes, o dicho de otra forma, con efectos nocivos o beneficiosos para la salud.

Estos compuestos, que no tienen una función nutricional clásicamente definida o no son considerados esenciales para la salud, pero que pueden tener un impacto significativo en el curso de alguna enfermedad, se les identifica como fitoquímicos, y las leguminosas que los contienen son consideradas alimentos funcionales, ya que proporcionan un beneficio para la salud incrementando el bienestar o disminuyendo el riesgo de enfermarse (Thompson, 1993; Silveira y col., 2003; Bello, 2005).

Los factores no-nutritivos intervienen en el metabolismo secundario de las leguminosas, bien como compuestos de reserva (inositolo fosfato, α -galactósidos, ...) que se sintetizan y acumulan durante la maduración de la semilla para utilizarse a lo largo del proceso germinativo, o bien como sustancias de defensa de la planta (inhibidores de proteasas, lectinas, taninos, L-DOPA, vicina, convicina, ...) frente al ataque de bacterias, virus, hongos, insectos y animales, incluido el hombre (Chung y col., 1998).

Desde un punto de vista bioquímico son compuestos de naturaleza muy variada. Pueden ser proteínas (inhibidores de proteasas, inhibidores de α -amilasas, lectinas), glúcidos (α -galactósidos, vicina, convicina, saponinas), aminoácidos no proteicos (L-DOPA, β -ODAP), polifenoles (taninos condensados), alcaloides, etc., por lo que su metodología de extracción y cuantificación es muy específica. Además, son compuestos que no aparecen por igual en todas las leguminosas, y sus efectos fisiológicos en el hombre y otros animales son también diferentes (Tabla 1). Así por ejemplo, los glucósidos pirimidínicos vicina y convicina, causantes del fabismo, únicamente están presentes en el género *Vicia* (Pitz y col., 1980) y el ácido β -oxalil-diamino-propiónico (β -ODAP), causante del latirismo, sólo se encuentra en el género *Lathyrus* (Khokhar y col., 1996; Grela y col., 2001).

Tabla 1.- Efectos fisiológicos provocados por los factores no-nutritivos de las leguminosas en animales monogástricos.

FACTORES NO-NUTRITIVOS	EFFECTOS FISIOLÓGICOS
<i>Proteínas</i>	
Inhibidores de proteasas	↓ Digestibilidad proteica Hipertrofia pancreática
Inhibidores de α -amilasas	↓ Digestibilidad del almidón Depresores del crecimiento
Lectinas	↓ Absorción de nutrientes Depresoras del crecimiento
<i>Glúcidos</i>	
α -galactósidos	Flatulencia
Saponinas	↓ Absorción de nutrientes Depresoras del crecimiento
Vicina/Convicina	Fabismo
<i>Aminoácidos no proteicos</i>	
L-DOPA	Fabismo
β -ODAP	Latirismo
<i>Otros</i>	
Inositoles fosfato	↓ Disponibilidad de minerales, proteína, almidón
Taninos condensados	↓ Disponibilidad de minerales, proteína, almidón
Alcaloides	Alteración del SNC Depresores del crecimiento

Algunos de los factores no-nutritivos de mayor interés presentes en las semillas de *V. faba* son: α -galactósidos, glucósidos pirimidínicos, L-DOPA, inositoles fosfato, taninos condensados o inhibidores de tripsina. Por lo que a continuación, se detallan las características particulares de cada uno de ellos.

4.1. α -GALACTÓSIDOS

Los oligosacáridos de la familia de la rafinosa (OFR): rafinosa, estaquiosa, verbascosa y ajucosa, son α -galactósidos que se encuentran dentro del grupo de los oligosacáridos de galactosil sacarosa.

Estos azúcares no-reductores de bajo peso molecular solubles en agua y en soluciones de agua-alcohol, son compuestos de reserva presentes en cantidades variables en órganos vegetativos y en semillas de numerosas plantas, incluidas las leguminosas. A estos oligosacáridos también se les denomina “factores de flatulencia” porque al ser fermentados a nivel de colon por la microflora intestinal, liberan cantidades considerables de gases (Liener, 1980; Delzenne y Roberfroid, 1994; Kadlec, 2000).

En las leguminosas, también están presentes otros azúcares solubles que pertenecen al grupo de los galactosil ciclitoles como son el galactinol y los galactopinitoles. Un importante α -galactósido englobado dentro del grupo de los galactopinitoles, cuya capacidad para producir flatulencia parece ser inferior a la de los OFR, es el ciceritol, denominado así tras su identificación en las semillas de *Cicer arietinum* (Fleming, 1981; Quemener y Brillouet, 1983; Kadlec, 2000).

Estructura química

Los oligosacáridos de la familia de la rafinosa se caracterizan por tener uno o más grupos α -D-galactopiranosil, unidos por enlace α -(1 \rightarrow 6)-galactosídico al C₆ de la molécula de glucosa que forma parte de la sacarosa (α -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 2)- β -D-fructofuranósido). Estos azúcares se acumulan en diferentes proporciones en las semillas de leguminosas, predominando estaquiosa o verbascosa (Kadlec, 2000). En la Figura 8 se muestra la estructura química de cada uno de ellos.

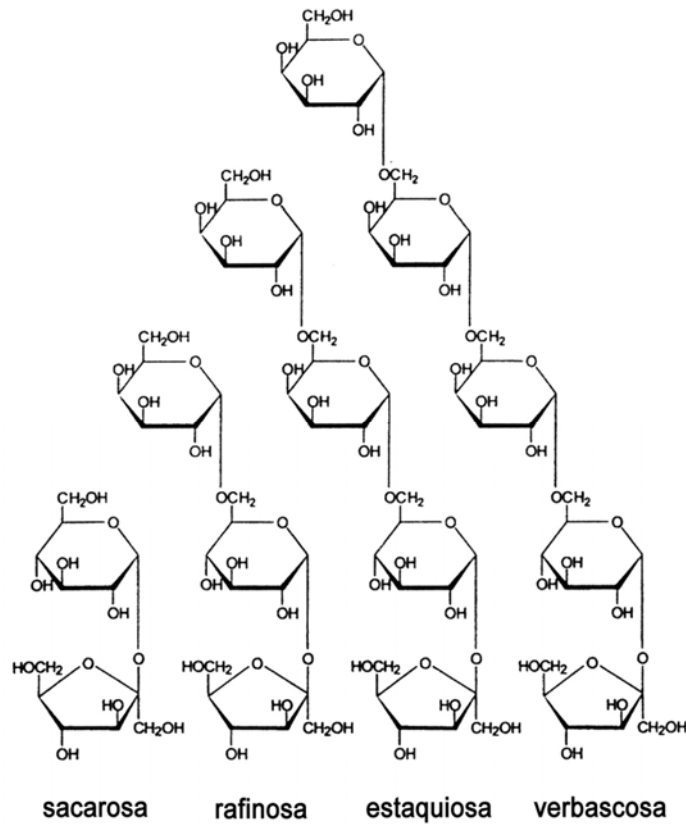


Figura 8.- Estructura química de la sacarosa y de los oligosacáridos de la familia de la rafinosa.

En las legumbres también están presentes otros α -galactósidos, entre los que cabe destacar el galactinol (*O*- α -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 3)-D-*mio*-inositol), mostrado en la Figura 9, que actúa como donador de galactosa en la síntesis de los oligosacáridos de la familia de la rafinosa. Este compuesto deriva del *mio*-inositol, que es un ciclohexano hexahidroxilado que se encuentra en su forma ópticamente inactiva (Sánchez-Mata, 1996).

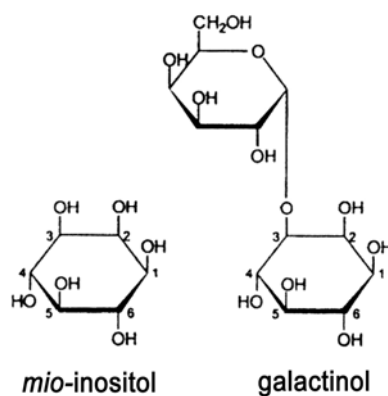


Figura 9.- Estructura química del *mio*-inositol y del galactinol.

A su vez, el *mio*-inositol tiene un derivado metilado denominado D-pinitol (3-O-metil-D-*qui*ro-inositol), cuya estructura química se muestra en la Figura 10. En las leguminosas, el D-pinitol, por unión a una o más moléculas de α -D-galactopiranosil, genera galactosil ciclitoles como el galactopinitol A (O - α -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 2)-4-O-metil-D-*qui*ro-inositol) o el ciceritol, de fórmula O - α -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 6)- O - α -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 2)-4-O-metil-D-*qui*ro-inositol (Horbowicz y Obendorf, 1994; Kadlec, 2000).

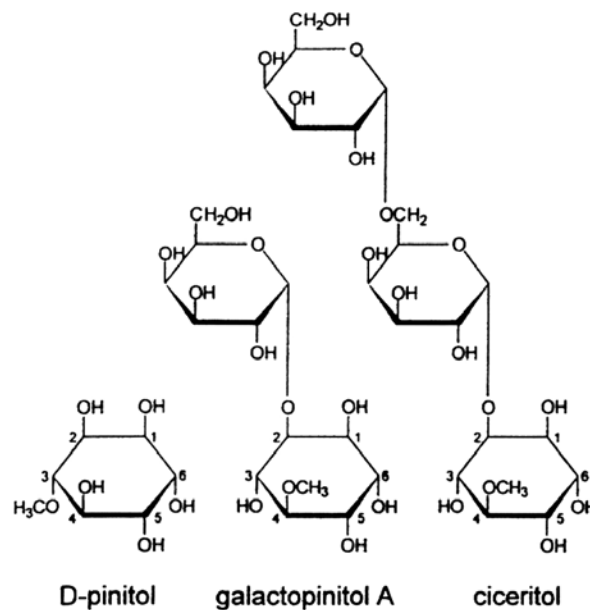


Figura 10.- Estructura química del ciceritol y de sus precursores.

Métodos analíticos

Se han desarrollado a lo largo de los años numerosos procedimientos para analizar azúcares solubles, pero no todos son adecuados para cuantificar individualmente los glúcidos de una muestra.

De las técnicas utilizadas para el análisis cualitativo de carbohidratos solubles, podemos destacar la cromatografía en papel (Pazur y col., 1962; Lineback y Ke, 1975). Pero el inconveniente de este procedimiento es que se necesita mucho tiempo para separar monosacáridos, y cuando se trata de oligosacáridos, esta separación resulta a menudo imposible. La cromatografía en capa fina es una técnica de mayor resolución y sensibilidad que la cromatografía en papel, y el tiempo de análisis requerido es menor, siendo útil para realizar análisis iniciales de carbohidratos en una muestra (Tanaka y col., 1975; Koizumi y col., 1985).

La separación y cuantificación de los azúcares solubles puede llevarse a cabo eficazmente por cromatografía de gases (CG) (Carlsson y col., 1992; Karoutis y Tyler, 1992; Horbowicz y Oberdorf, 1994), ya que es una técnica con elevado grado de sensibilidad y fiabilidad. Además, posee una gran estabilidad analítica, porque las columnas capilares se mantienen estables durante mucho tiempo. Pero también, presenta algunos inconvenientes debido a que los azúcares no son volátiles, siendo imprescindible la derivatización previa de la muestra. Para poder eluir los compuestos derivatizados son necesarios largos periodos de tiempo y elevadas temperaturas de columna (Knudsen, 1986; Kadlec, 2000).

La cromatografía líquida de alta resolución (CLAR), es quizá la más apropiada para valorar carbohidratos solubles, ya que se caracteriza por ser una técnica de gran sensibilidad, precisión y fiabilidad. El periodo de vida de la columna cromatográfica no es muy largo, ya que sus propiedades se van modificando con el transcurso del tiempo. Pero en cambio, la preparación de la muestra es sencilla porque no precisa derivatización, y el tiempo de análisis es corto (Palmer, 1975; Kadlec, 2000; Sánchez-Mata y col., 2002). Es habitual el uso de columnas en fase amino para separar los diferentes azúcares presentes en leguminosas (Knudsen, 1986; Muzquiz y col., 1992, 1999; Sánchez-Mata y col., 1998), aunque también pueden utilizarse columnas en fase reversa C_{18} (Kennedy y col., 1985). La detección se suele llevar a cabo utilizando un detector de índice de refracción. Cuando la cantidad de muestra es muy pequeña, es útil utilizar una columna de intercambio iónico y detector de pulsación amperométrica (Frías y col., 1994a, 1996a; Vinjamoori y col., 2000).

Otra técnica analítica de uso más reciente es la electroforesis capilar de alta resolución, que se basa en la separación en un campo eléctrico de los complejos borato-carbohidrato cargados negativamente y su posterior detección ultravioleta (Arentoft y col., 1993; Frías y col., 1996a; Liu y col., 1997). El inconveniente de este procedimiento es que es menos sensible que la CG o la CLAR (Kadlec, 2000).

Se han desarrollado métodos enzimáticos para analizar específicamente oligosacáridos de la familia de la rafinosa. De manera que, en presencia de α -galactosidasas es liberada D-galactosa, que puede ser valorada por métodos químicos o a través de D-galactosa deshidrogenasa. Con estos procedimientos no pueden determinarse los α -galactósidos individualmente, pero pueden ser utilizados como ensayos rápidos y sencillos, previos a otras técnicas más complejas (Kadlec, 2000).

Localización, metabolismo y función en la semilla

La evolución de los azúcares solubles a lo largo del desarrollo de la semilla es similar tanto en los cotiledones, como en el eje embrionario. El contenido de monosacáridos y ciclitoles libres, va disminuyendo a lo largo de este proceso, mientras que la sacarosa se acumula al inicio del desarrollo de la semilla y permanece hasta el estado de semilla madura.

Los oligosacáridos de la familia de la rafinosa y los galactopinitoles como el ciceritol, se sintetizan y acumulan en el citoplasma al final del desarrollo, durante el periodo de maduración y desecación. También en este momento, las α -galactosidasas son sintetizadas en el retículo endoplásmico rugoso y transportadas por medio de vesículas, procedentes del aparato de Golgi, a los cuerpos proteicos (Saini y Lymbery, 1983; Datta y col., 1985; Herman y Shannon, 1985; Lattanzio y col., 1986; Harley y Beevers, 1989; Górecki y col., 1996; Obendorf, 1997; Hoch y col., 1999; Górecki, 2000; Lahuta y col., 2000a; Modi y col., 2000).

La biosíntesis de los oligosacáridos de la rafinosa en la semilla (Figura 11), comienza con la producción de galactinol a partir de UDP-galactosa y *mio*-inositol en presencia de una galactosil transferasa denominada galactinol sintetasa. Posteriormente, por actuación de otras galactosil transferasas (rafinosa sintetasa, estaquiosa sintetasa, ...), el galactinol va donando secuencialmente moléculas de α -D-galactosa a la sacarosa, para sintetizar el correspondiente OFR de mayor peso molecular (rafinosa, estaquiosa, verbascosa, ...), liberándose a su vez *mio*-inositol (Lehele y Tanner, 1973; Saini y Lymbery, 1983; Lowell y Kuo, 1989; Suarez y col., 1999; Kadlec y col., 2000; Loewus y Murthy, 2000).

También se ha sugerido, que los oligosacáridos de rafinosa utilizan en algunas ocasiones otros galactosil ciclitoles diferentes al galactinol, como donadores de α -D-galactosa en su biosíntesis (Beveridge y col., 1977; Hoch y col., 1999; Odorcic y Obendorf, 2003).

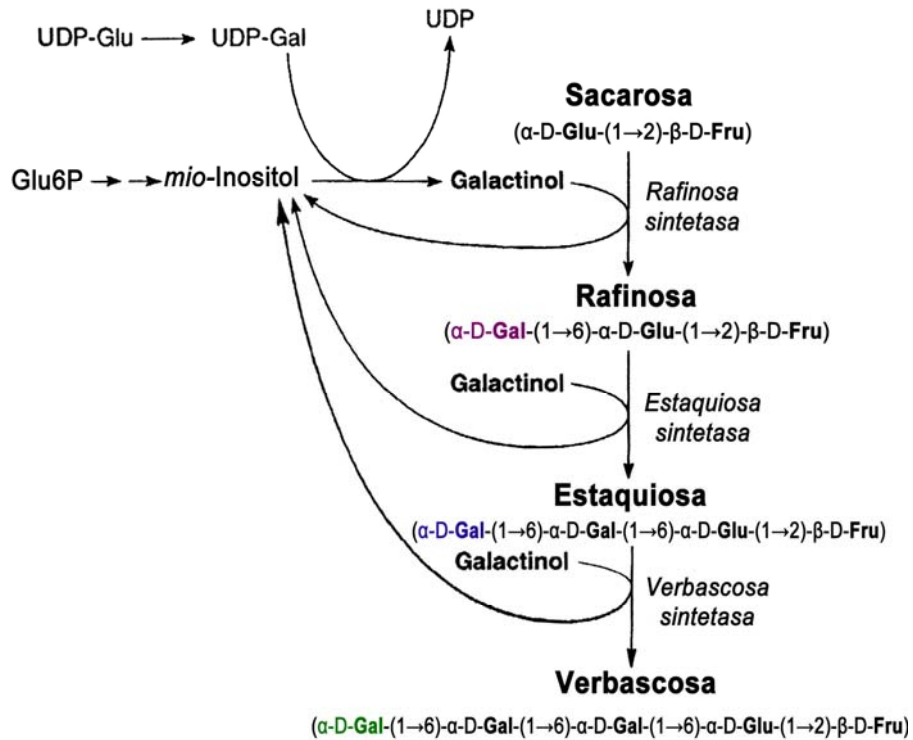


Figura 11.- Ruta biosintética de los oligosacáridos de la familia de la rafinosa.

Otro α -galactósido presente en algunas leguminosas, pero en este caso derivado del inositol, es el ciceritol, cuya ruta biosintética queda descrita en la Figura 12. La síntesis del ciceritol, podría iniciarse en las partes vegetativas de la planta con la metilación del *mio*-inositol, en presencia de la enzima *mio*-inositol O-metiltransferasa, para formar D-ononitol, que por actuación de la ononitol epimerasa se transformaría en D-pinitol. Este último, parece trasladarse desde la hoja madura a la semilla en desarrollo, y por analogía con los OFR, el galactinol podría ser el encargado de donarle una molécula de α -D-galactosa para formar galactopinitol A, y finalmente con la adición de otro residuo de α -D-galactosa ya se obtendría ciceritol. No hay referencias concisas de los enzimas que intervienen en la biosíntesis de ciceritol, quedando muchas cuestiones sin resolver relacionadas con este proceso metabólico. Aunque, sí parece existir un vínculo entre la ruta de los oligosacáridos de rafinosa y la ruta del ciceritol (Dittrich y Brandl, 1987; Horbowicz y Obendorf, 1994; Bohnert y Jensen, 1996; Frías y col., 1999; Hoch y col., 1999; Górecki, 2000; Lahuta y col., 2000a; Loewus y Murthy, 2000; Odorcic y Obendorf, 2003).

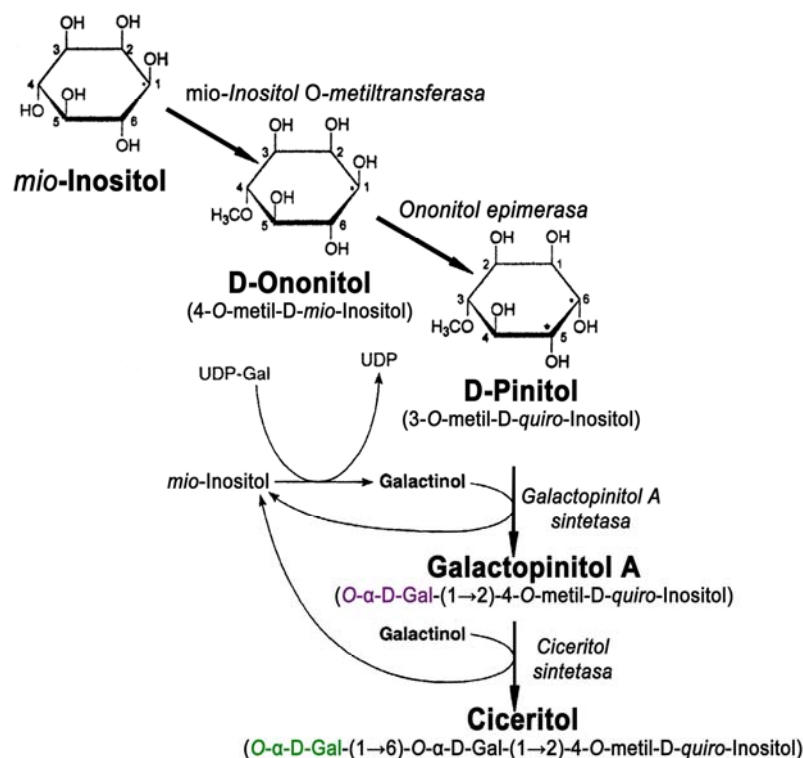


Figura 12.- Mecanismo propuesto para la biosíntesis del ciceritol.

La función de la sacarosa, de los oligosacáridos de rafinosa y de los galactosil ciclitolos en la semilla, parece estar relacionada con su implicación en situaciones de estrés medioambiental, como es la desecación o las bajas temperaturas, durante las cuales el agua de los tejidos va eliminándose. Los mecanismos de acción a través de los cuales estos azúcares podrían conferir a la semilla tolerancia a la desecación y aclimatación frente al frío se basan en la estabilización de componentes celulares. Los α -galactósidos serían los encargados de inhibir la cristalización de sacarosa, confiriéndole un estado de elevada viscosidad que evitaría el desarrollo de reacciones químicas deletéreas que pudieran deteriorar tejidos secos, y a su vez mantendrían la integridad estructural de las membranas celulares y proteínas durante el proceso de deshidratación por unión de los grupos hidroxilo (OH) de estos azúcares a los P=O de las cabezas polares de los fosfolípidos de la membrana y a los grupos carbonilo (C=O) de las proteínas (Strauss y Hauser, 1986; Caffrey y col., 1988; Koster y Leopold, 1988; Crowe y col., 1998; Frías y col., 1999; Górecki, 2000; Lahuta y col., 2000b; Szczecinski y col., 2000; Pennycooke y col., 2003).

La sacarosa y los α -galactósidos, también parecen intervenir de forma indirecta en la tolerancia a la desecación, debido a la baja concentración de monosacáridos en la semilla madura al haber sido empleados en su síntesis. Por ello, los monosacáridos no estarían

disponibles para intervenir en las reacciones de Amadori y Maillard (reacciones no enzimáticas carbonil-amino), con lo que se evitaría el deterioro de proteínas y por lo tanto de la propia semilla. Tampoco estarían presentes en procesos metabólicos como la respiración, que desencadenaría la liberación de radicales libres y el consecuente daño oxidativo a los tejidos secos (Bernal-Lugo y Leopold, 1992; Sun y Leopold, 1995; Modi y col., 2000).

Debido al alto porcentaje de α -galactósidos y al bajo contenido de azúcares reductores en las semillas secas y maduras, éstas podrán almacenarse durante largos periodos de tiempo sin perder su capacidad para germinar (Wettlaufer y Leopold, 1991; Horbowicz y Obendorf, 1994; Górecki, 2000; Groot y col., 2003).

Al inicio del proceso germinativo, los oligosacáridos de la rafinosa y los galactosil ciclitoles, que son azúcares de reserva, se degradan dentro de los cuerpos proteicos de los cotiledones por actuación de α -galactosidasas, que alcanzan su máxima actividad durante los primeros días de germinación (Herman y Shannon, 1985; Obendorf, 1997; Lahuta y col., 2000a). Estas enzimas, catalizan la liberación de galactosa, sacarosa y ciclitoles, que son transportados hacia el eje embrionario para ser utilizados en su crecimiento y desarrollo, como fuente de energía para los diferentes procesos metabólicos y como sustrato para la síntesis de polisacáridos de las paredes celulares, galactolípidos de las membranas celulares, etc. (Cruz y da Silva, 1986; Kuo y col., 1988; Bau y col., 1997; Górecki, 2000; Lahuta y col., 2000a; Modi y col., 2000; Kadlec y col., 2001).

También es importante destacar que durante este periodo de germinación, al hidrolizarse los α -galactósidos, generalmente desaparece la tolerancia a la desecación de la semilla, que suele coincidir con el momento en que se produce la emergencia de la radícula. Además, por actuación de los monosacáridos liberados, se generan radicales libres que producen daños oxidativos a membranas, enzimas y ácidos nucleicos (Senaratna y McKersie, 1983; Koster y Leopold, 1988; Sun y Leopold, 1995; Górecki, 2000; Groot y col., 2003).

Efectos fisiológicos en el organismo

Efectos indeseables

Uno de los fenómenos más comunes producido por el consumo de legumbres, es la formación de gases a nivel de colon, debido a la ausencia de la enzima α -(1 \rightarrow 6)-galactosidasa en la mucosa intestinal de los animales monogástricos, incluido el hombre, necesaria para hidrolizar los α -galactósidos. Estos azúcares, al no poder ser digeridos y no atravesar la pared intestinal, pasan intactos al colon, donde son metabolizados por bacterias

anaerobias de la flora colónica. A través de este proceso metabólico, conocido como fermentación, se producen ácidos grasos de cadena corta que reducen el pH, y también dióxido de carbono, hidrógeno y metano. Estos gases son los responsables de la flatulencia, que se manifiesta en forma de náuseas, dolor abdominal, retortijones, estreñimiento o diarrea, además de producir una disconformidad social asociada a la expulsión de gas rectal. Este fenómeno no es un factor tóxico de las legumbres, pero sí es indeseable para personas con problemas intestinales (Liener, 1980; Nowak y Steinkraus, 1988; Delzenne y Roberfroid, 1994; Sánchez-Mata y col., 1999; Piotrowicz-Cieslak, 2004).

Además de estos α -galactósidos, en las semillas están presentes polisacáridos no amiláceos y almidón resistente, que al ser fermentados por bacterias colónicas producen también flatulencia (Bravo, 1999; Granito y col., 2001; Kadlec y col., 2001; Silveira y col., 2003; Matella y col., 2004).

Efectos beneficiosos

Los oligosacáridos de la familia de la rafinosa, presentan efecto prebiótico, al promover la proliferación de bifidobacterias y lactobacilos que generan beneficios para la salud (Crittenden y Playne, 1996; Grizard y Barthelemy, 1999; Rubio y col., 2005). Los animales monogástricos, no pueden digerir estos azúcares, quedando disponibles en el colon para ser utilizados por bacterias intestinales beneficiosas como fuente de carbono y energía para su mantenimiento y crecimiento. Así se origina el aumento de esta microflora, que ejercerá una serie de funciones favorables para la salud del individuo descritas a continuación.

El gran número de bifidobacterias y lactobacilos generados en el colon, sintetizan sustancias antibióticas y producen niveles elevados de ácidos grasos de cadena corta que reducen el pH del medio. A través de estos mecanismos, estas bacterias beneficiosas reducen la proliferación de bacterias patógenas tanto exógenas como de la propia flora intestinal (*Escherichia coli*, *Salmonella*, *Shigella*, *Listeria*, ...), evitando infecciones intestinales que en algunos casos provocan diarrea y colitis en el individuo (Delzenne y Roberfroid, 1994; Tomomatsu, 1994; Grizard y Barthelemy, 1999).

Con la bajada de pH, también se inhibe el desarrollo de bacterias putrefactoras (*Clostridium perfringens*) que con la fermentación de los alimentos generan metabolitos tóxicos como nitrosaminas, indoles, fenoles, cresoles (cancerígenos) o estrógenos (promotores de cáncer de mama). Además, la ausencia de estas bacterias putrefactoras, provoca una falta de enzimas necesarias para llevar a cabo la α -deshidroxilación de los ácidos biliares a ácidos biliares secundarios (promotores de cáncer de colon) y la transformación de urea en amoníaco (promotor de cáncer colorectal). Por lo tanto, la ingestión de oligosacáridos previene el

desarrollo de procesos cancerígenos (Narisawa y col., 1974; Visek y col., 1978; Tomomatsu, 1994; Grizard y Barhomeuf, 1999).

Con esta bajada de pH, también se incrementa la solubilidad de minerales como Ca, Mg o Fe, por lo que los oligosacáridos podrían ser utilizados en la prevención de osteoporosis, en estados carenciales de Mg o en situaciones de anemia (Grizard y Barhomeuf, 1999).

Los ácidos grasos de cadena corta generados por la fermentación bacteriana, son absorbidos a través de la pared intestinal, pudiendo intervenir en distintos procesos fisiológicos. Concretamente el ácido butírico, es utilizado por los colonocitos como sustrato para su metabolismo energético, manteniendo así la salud del individuo a nivel de colon, incluso ayudando a prevenir el desarrollo de cáncer colorectal. Los ácidos láctico, propiónico y acético, también son utilizados como fuente de energía, pero principalmente a nivel de hígado (Cummings, 1981; Kim y col., 1982b; Révész y col., 1992; Delzenne y Roberfroid, 1994). Los ácidos láctico y propiónico reducen el colesterol en sangre y además, el propiónico inhibe la enzima hidroximetilglutaril-Co A reductasa, responsable de la síntesis hepática de colesterol (Chen y col., 1984; Wright y col., 1990; Tomomatsu, 1994). También se ha comprobado, que los ácidos grasos de cadena corta contribuyen a prevenir el estreñimiento (Tomomatsu, 1994).

El incremento de la masa bacteriana propicia un tamaño de bolo fecal mayor, reduciéndose la posibilidad de padecer cáncer de colon y estreñimiento (Jenkins y col., 1986; Shetty y Kurpad, 1986; Delzenne y Roberfroid, 1994).

Además, las bifidobacterias sintetizan vitaminas B₁, B₆, B₁₂, riboflavina (B₂), ácido nicotínico y ácido fólico (B₉), que podrán ser utilizadas por el hombre como nutrientes (Tomomatsu, 1994).

Otro efecto beneficioso destacable, está relacionado con la posibilidad de sustituir en alimentación, los azúcares cariogénicos por los oligosacáridos de la familia de la rafinosa, ya que estos últimos son azúcares indigestibles que no pueden ser utilizados como sustrato por las bacterias implicadas en el desarrollo de caries dentales (Crittenden y Playne, 1996; Grizard y Barhomeuf, 1999).

4.2. VICINA, CONVICINA Y L-DOPA

Los glucósidos pirimidínicos vicina y convicina, son los factores no-nutritivos más característicos del género *Vicia*. La vicina fue descubierta y aislada de semillas de *Vicia sativa* por Ritthausen y Kreusler en 1870 y la convicina por Ritthausen en 1881. Posteriormente, Jhonson (1914) identificó ambas moléculas en semillas de *V. faba*, pero la correcta formulación como β -glucósidos pirimidínicos fue dada por Bendich y Clemens en 1953 (en Pitz y col., 1980).

En 1913, Guggenheim fue el primer investigador que aisló de vainas de *V. faba* la forma levo de la dihidroxifenilalanina (L-DOPA), aminoácido no proteico que se encuentra distribuido entre las distintas especies de *Vicia*. Además, L-DOPA también fue aislada de semillas del género *Mucuna* por Miller en 1920 y por Damodaran y Ramaswamy en 1937.

Estructura química

Vicina y convicina son compuestos que presentan estructuras muy semejantes, ya que constan de un residuo de glucosa unido por enlace β -glucosídico a un anillo pirimidínico de divicina o isouramilo (Marquardt, 1989).

Vicina, es el 2,6-diamino-4,5-dihidroxipirimidina-5-(β -D-glucopiranosido), que por hidrólisis ácida o por hidrólisis enzimática (β -glucosidasas), libera su aglucón divicina que estaba unido a una molécula de glucosa (Figura 13).

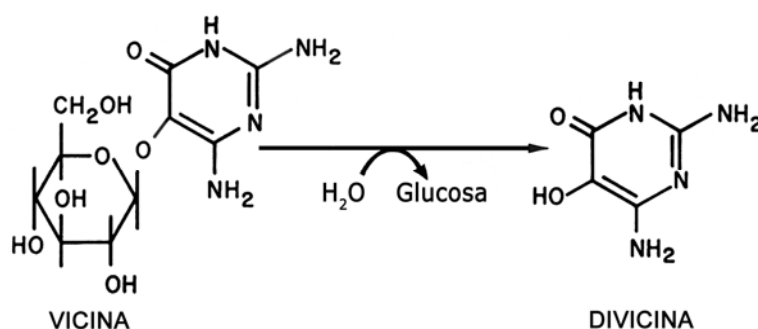


Figura 13.- Estructura química de vicina y su aglucón divicina.

Convicina, de fórmula 2,4,5-trihidroxi-6-aminopirimidina-5-(β -D-glucopiranosido), por hidrólisis ácida o enzimática, libera su aglucón isouramilo y una molécula de glucosa (Marquardt y col., 1989) y su estructura química se muestra en la Figura 14.

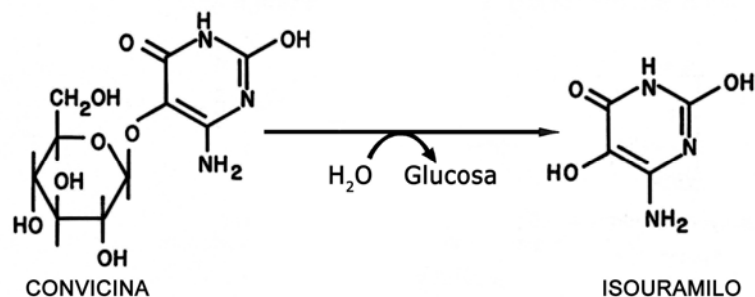


Figura 14.- Estructura química de convicina y su aglucón isouramilo.

En *V. faba* también están presentes compuestos fenólicos como la L-DOPA (3,4-L-dihidroxifenilalanina), que en algunas ocasiones está unido a una molécula de glucosa formando su derivado β -glucosídico (Andrews y Pridham, 1965). El DOPA-glucósido, de fórmula 3-(3'- β -D-glucopiranosido-4'-hidroxifenil) alanina, por hidrólisis del enlace β -glucosídico libera una molécula de L-DOPA y otra de glucosa (Figura 15).

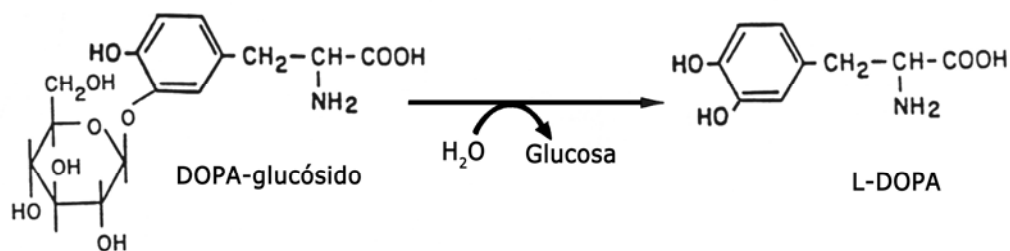


Figura 15.- Estructura química del DOPA-glucósido y de su aglucón L-DOPA.

Métodos analíticos

Para la cuantificación de vicina, convicina y L-DOPA en material vegetal, se han desarrollado distintos métodos espectrofotométricos y cromatográficos.

Uno de los primeros métodos espectrofotométricos fue el descrito por Higazi y Read (1974), basado en la reacción global de vicina y convicina con el reactivo fenólico Folin-Ciocalteu con el que se obtiene una coloración azul. Este procedimiento fue criticado por Chevion y Navok (1983), ya que al no ser un método específico para vicina y convicina, aminoácidos aromáticos como tirosina, triptófano o DOPA, presentes en alta concentración en habas, reaccionan también con dicho reactivo.

Collier (1976) desarrolló un método de espectrofotometría ultravioleta directa, basado en la absorción de luz ultravioleta por vicina y convicina en una solución ácida. Con este

ensayo se sobreestiman los glucósidos pirimidínicos, ya que parte de la absorbancia procede de otros compuestos.

Un tercer procedimiento fue el de Kim y col. (1982a), basado en la reacción de color que producen los aglucones divicina e isouramilo, resultantes de la hidrólisis ácida de vicina y convicina con un reactivo de titanio. Sin embargo, no es seguro que un extracto de haba esté libre de otros compuestos como nucleótidos o nucleósidos que puedan interferir en este proceso. Además, la absorbancia del complejo divicina-titanio, es aproximadamente un 10% más baja que la del complejo isouramilo-titanio. Por tanto, sería imposible obtener un coeficiente de absorbancia molar preciso para muestras con diferentes proporciones de vicina y convicina.

Un cuarto ensayo fue el descrito por Chevión y Navok (1983) en el cual vicina y convicina son sometidos a una hidrólisis enzimática con β -glucosidasas en condiciones anaerobias. Los aglucones liberados: divicina e isouramilo, reducen anaeróticamente dos moléculas de O-ferrifenantrolina a O-ferrofenantrolina y la reacción se mide espectrofotométricamente a 515 nm. Este procedimiento no es muy preciso y el grado de recuperación de los glucósidos totales no es exacto.

Como podemos observar, estos métodos tienen limitaciones, particularmente con vistas a la especificidad. Sin embargo, pueden ser útiles como ensayos sencillos y rápidos para dar una estimación global de los glucósidos presentes en una muestra.

Dentro de los métodos cromatográficos, está el desarrollado por Olsen y Andersen (1978) basado en la separación de los glucósidos pirimidínicos por cromatografía en capa fina y cuantificación de los mismos por espectrofotometría ultravioleta. No es un procedimiento muy preciso, pero puede ser utilizado para la identificación de cada glucósido. También hay que destacar el método de cromatografía de gases de Pitz y Sosulski (1979) que presenta una alta fiabilidad y precisión, pero es muy laborioso, ya que requiere la previa derivatización de los glucopiranosidos. Además, esta derivatización puede ser incompleta o bien llevar a la formación de isómeros ópticos.

La cromatografía líquida de alta resolución se utiliza frecuentemente para separar y cuantificar individualmente vicina, convicina y L-DOPA, ya que es una técnica sencilla, sensible y segura. Además, con la rapidez con que se realiza, se evita la oxidación y precipitación de los glucósidos pirimidínicos (Marquardt, 1982; Bjerg y col., 1985; Wang y Ueberschär, 1990). Las columnas cromatográficas necesarias para la separación de estos compuestos son muy variadas y así por ejemplo, algunos autores utilizan columnas de fase reversa C₁₈ (Marquardt y Fröhlich, 1981; Burbano y col., 1993; Siddhuraju y Becker, 2001a;

Arias y col., 2004) y otros utilizan columnas Li-Chrosorb NH₂ (Quemener y col., 1982). En estos ensayos la detección y cuantificación se realiza por absorción de luz ultravioleta.

Los glucósidos pirimidínicos también pueden valorarse individualmente por electroforesis capilar. La separación de los compuestos se lleva a cabo en un campo eléctrico y su detección se realiza por absorción ultravioleta a 280 nm (McKay, 1992). El problema está, en que es un procedimiento analítico más complejo y precisa un mayor tiempo de análisis que la CLAR, además de presentar menor sensibilidad frente a las impurezas (Bjerg y col., 1984a; Wang y Ueberschär, 1990).

Localización, metabolismo y función en la semilla

Vicina y convicina se sintetizan en la semilla durante los primeros estadios del desarrollo, por lo que su concentración en semillas verdes y frescas es elevada. En cambio, en vainas y hojas estos compuestos no están presentes (Jamalian y Bassiri, 1978; Pitz y col., 1981; Lattanzio y col., 1982; Bjerg y col., 1985; Burbano y col., 1995b). Según los experimentos realizados por Brown y Roberts (1972) en *V. faba*, estos glucopiranosídeos se sintetizan en la semilla en desarrollo, y no se produce una traslocación desde otros tejidos. Ramsay y Griffiths (1996) identifican a la testa como lugar de su biosíntesis, desde donde se exportarían a cotiledones y eje embrionario, pero según Ramsay y col. (1991) podría haber una síntesis adicional en la planta madre, que pasaría a la semilla.

El contenido de glucósidos pirimidínicos disminuye al final del desarrollo, durante la maduración y desecación de la semilla, aunque siempre están presentes porque son productos finales de un proceso metabólico (Jamalian y Bassiri, 1978; Lattanzio y col., 1982).

Como se muestra en la Figura 16, vicina y convicina parecen sintetizarse mediante la ruta metabólica del ácido orótico. Con el ácido aspártico y el carbamoilfosfato, en presencia de los enzimas correspondientes, se inicia la síntesis del ácido orótico, a partir del cual, podrían formarse los anillos pirimidínicos de divicina y de isouramilo. Con la unión de una molécula de glucosa por enlace β -glucosídico a cada uno de los anillos, se sintetizarían vicina y convicina (Brown y Roberts, 1972; Mathews y Van Holde, 1998).

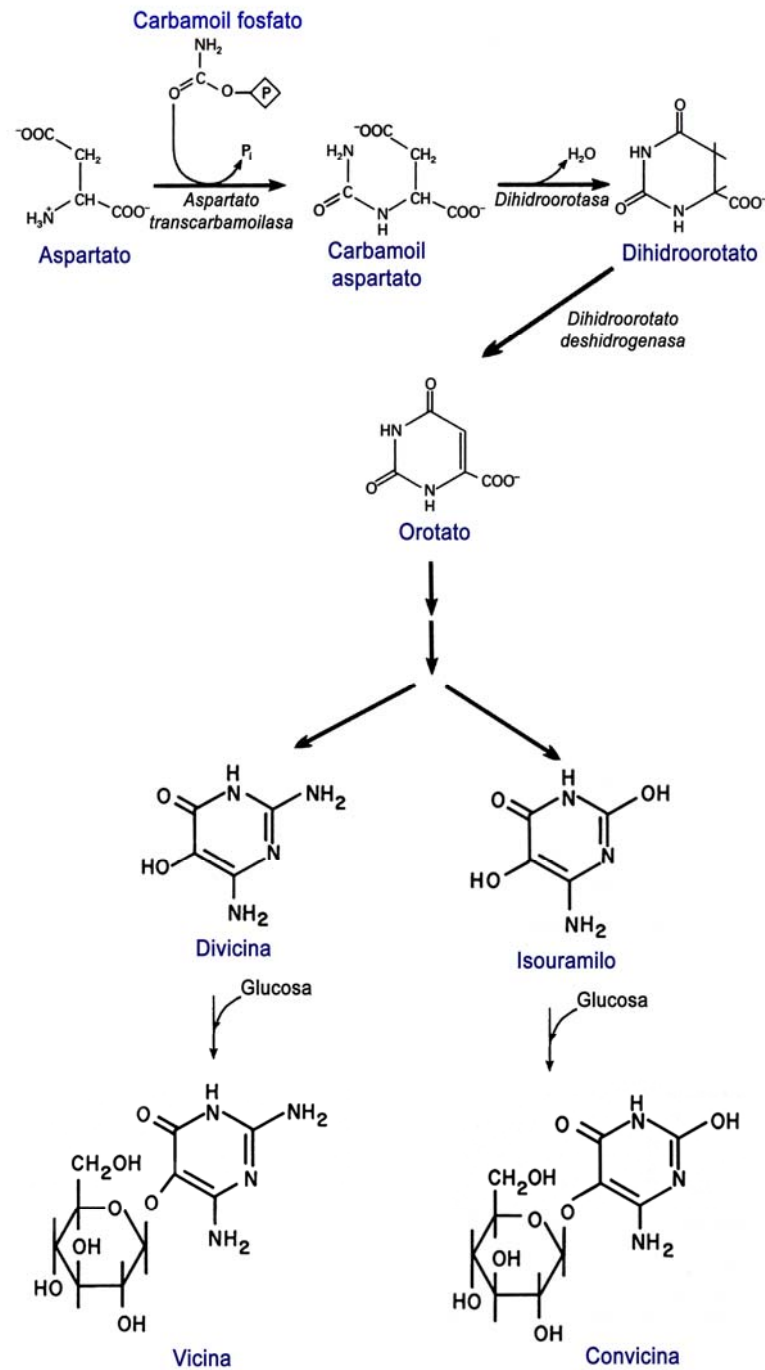


Figura 16.- Mecanismo propuesto para la síntesis de vicina y convicina.

A diferencia de los glucósidos anteriormente señalados, L-DOPA se acumula en vainas, tallos y hojas, mientras que las semillas maduras están prácticamente libres de este compuesto. En las semillas muy jóvenes pueden detectarse pequeñas cantidades de este aminoácido fenólico, que van disminuyendo conforme se utilizan en las diferentes reacciones biosintéticas (Longo y col., 1974; Lattanzio y col., 1982; Wong y Lim, 1992; Burbano y col., 1995; Kirakosyan y col., 2004).

La síntesis de L-DOPA (Figura 17) se inicia por la ruta metabólica de las pentosas fosfato y continúa por la ruta del ácido shikímico, donde es sintetizado su precursor L-tirosina. Este proceso termina con la actuación de la enzima tirosina hidroxilasa, que cataliza la hidroxilación del anillo aromático de L-tirosina para transformarlo en L-DOPA (Griffith y Conn, 1973; Shetty y col., 2001; Randhir y col, 2002).

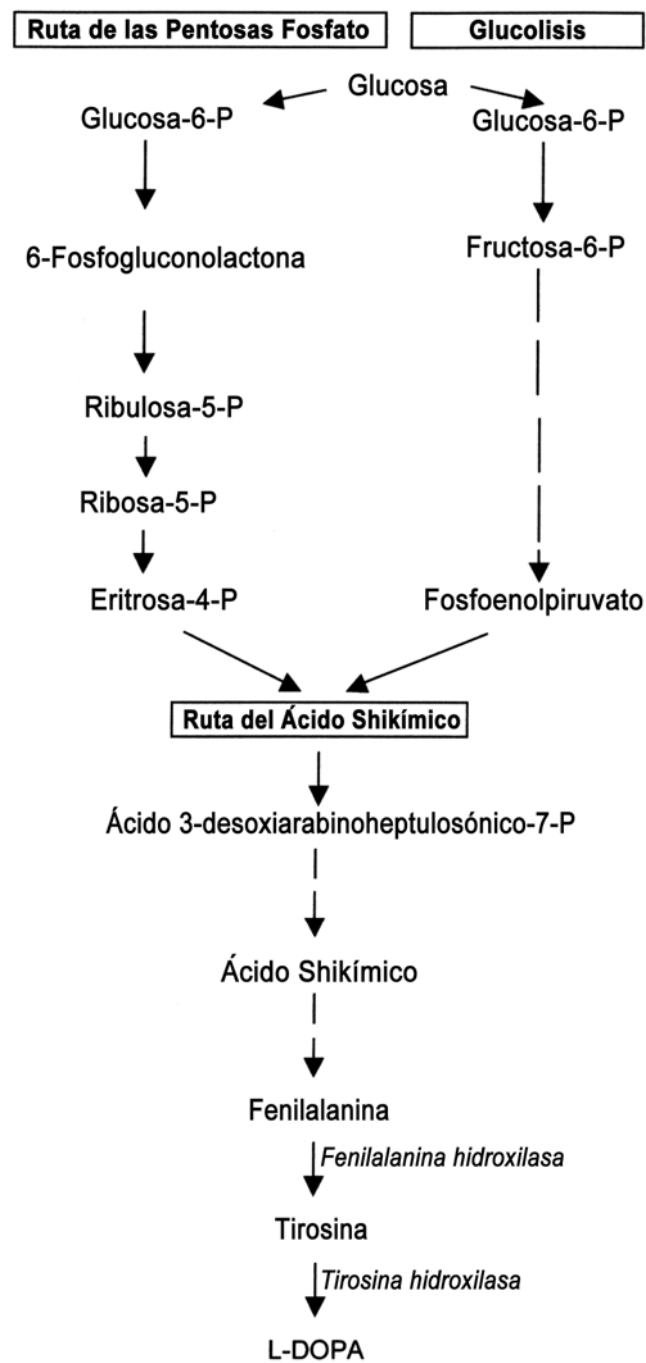


Figura 17.- Ruta biosintética de L-DOPA.

— Durante la germinación de la semilla, el contenido de vicina y de convicina presente en los cotiledones va disminuyendo, mientras que en la plántula en desarrollo se van acumulando grandes cantidades de L-DOPA (Griffith y Conn, 1973; Griffiths y Ramsay, 1996; Jamalian, 1999; Kirakosyan y col., 2004).

Los glucósidos pirimidínicos presentan un elevado contenido en nitrógeno, y podrían ser para la planta una fuente importante de nitrógeno metabolizable (Mager y col., 1980; Ramsay y Griffiths, 1996). Sin embargo L-DOPA, al ser un compuesto fenólico, tiene propiedades antioxidantes que la semilla utiliza para proteger a las células de daños oxidativos durante la germinación (Shetty y col., 2001).

Vicina, convicina y L-DOPA están implicados en mecanismos de defensa frente a insectos, nematodos, hongos y bacterias. Concretamente, el efecto inhibitorio de vicina y convicina sobre el desarrollo micótico podría deberse (i) a la similitud estructural entre estos derivados pirimidínicos y diferentes cofactores redox y (ii) a la producción de peróxido de hidrógeno por parte de sus aglucones, que podría interferir con cofactores redox (Navon y Bernays, 1978; Bjerg y col., 1984b; Pavlík y col., 2002; Randhir y col., 2004).

Efectos fisiológicos en el organismo

Efectos nocivos

Los glucósidos pirimidínicos vicina y convicina, son hidrolizados por β -glucosidasas de la microflora anaerobia en el tracto intestinal. Por actuación de estas enzimas hidrolíticas, se liberan los aglucones divicina e isouramilo, que son los principios tóxicos causantes de una enfermedad hereditaria conocida como fabismo, que cursa con anemia hemolítica aguda (McKay, 1992).

El fabismo se manifiesta tras la ingestión de habas, en un 10-20% de los individuos con falta de la enzima glucosa-6-P-deshidrogenasa (G-6-PDH) en sus glóbulos rojos. Se presenta principalmente entre los habitantes de la Región Mediterránea, teniendo una mayor predisposición los varones jóvenes. Pero en estas poblaciones susceptibles, la incidencia anual de esta enfermedad es de entre 1 y 9 casos por 10.000 personas aproximadamente (Belsey, 1973; Marquardt, 1989).

Es un trastorno de carácter recesivo que se transmite a través de un gen mutante (X^c) localizado en el cromosoma X. Por tanto, la deficiencia en G-6-PDH se expresa completamente en el varón hemicigótico (X^cY), pero en las hembras, la manifestación de esta enfermedad no es frecuente, para ello necesitan un genotipo mutante homocigótico (X^cX^c). Excepcionalmente, también hembras heterocigóticas (X^cX) con elevada proporción de

eritrocitos mutantes con bajos niveles de G-6-PDH, pueden presentar síntomas (Mager y col., 1980; Marquardt, 1989).

Los primeros síntomas del fabismo se manifiestan al cabo de 5-24 h de haber ingerido las habas, y se observa fatiga, cefalea, mareos, náuseas, vómitos, escalofríos, palidez, dolor abdominal y lumbar, y fiebre. Le sigue una hemólisis de intensidad y gravedad variable, que en los peores casos va acompañada de hemoglobinuria, que aparece entre las 5 y las 30 h siguientes al consumo de las habas. Unas horas después, se observa ictericia y en algunas ocasiones se desarrolla una afección renal aguda que puede incluso provocar la muerte (Marquardt, 1989).

Como consecuencia del fabismo, se desencadena en los eritrocitos una serie de reacciones metabólicas (Figura 18):

Mediante la ruta metabólica de las pentosas fosfato, la enzima G-6-PDH cataliza la transformación de glucosa-6-P en ácido fosfogluconico, y a su vez el NADP se transforma NADPH, coenzima necesario para que la enzima glutatión reductasa reduzca la forma oxidada del glutatión (GS-SG) a G-SH. Por lo tanto, una deficiencia en G-6-PDH da lugar a niveles anormalmente bajos de G-SH, haciendo que los glóbulos rojos sean más vulnerables a la hemólisis, ya que el G-SH es necesario para mantener la integridad de las membranas celulares.

También se observa como los potentes agentes reductores divicina e isouramilo liberan en presencia de O_2 , peróxido de hidrógeno, y éste último, de forma espontánea o por acción de glutatión peroxidasas, oxida el G-SH a GS-SG.

De manera que, por ambas causas los niveles de G-SH son muy bajos, y como consecuencia se producen alteraciones irreversibles relacionadas con la destrucción de los eritrocitos secuestrados por el retículo endotelial (Olaboro y col., 1981; Chevion y col., 1982; Liener, 1989).

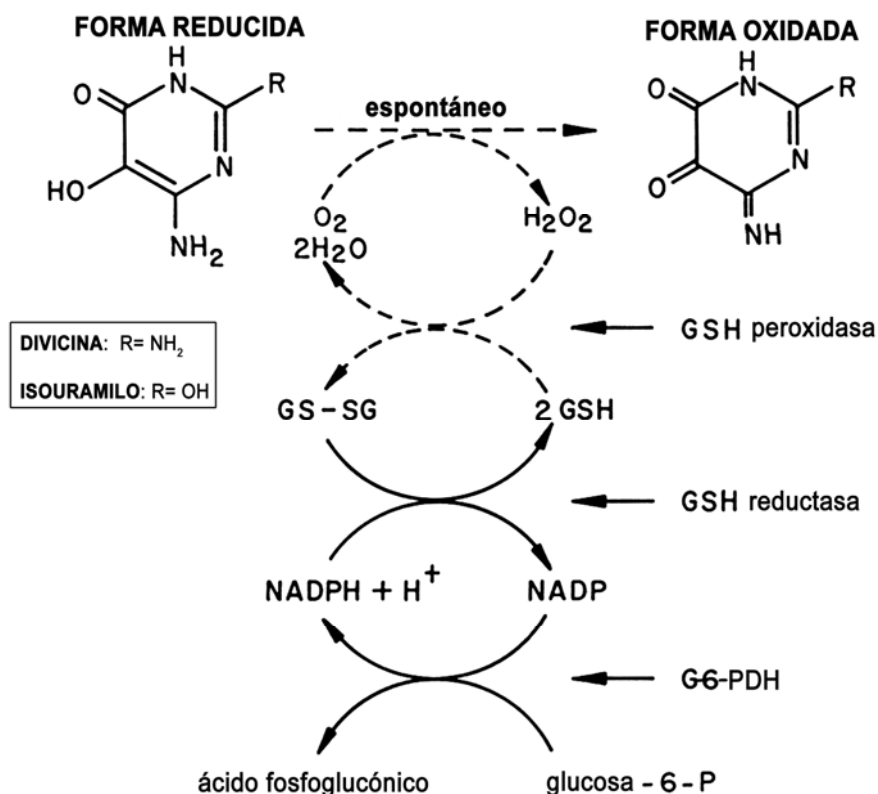


Figura 18.- Reacciones metabólicas producidas en los glóbulos rojos como consecuencia del fabismo.

Flecha continua: formación de G-SH en presencia de G-6-PDH.

Flecha discontinua: oxidación espontánea de divicina o isouramilo reducido, que provoca la disminución de G-SH por formación de GS-SG.

La divicina y el isouramilo, son compuestos altamente reactivos generadores de radicales libres, que parecen ser inductores de otros desórdenes metabólicos como la peroxidación lipídica, la alteración del metabolismo lipídico y mitocondrial o la diabetes (Marquardt, 1982; Graf y col., 1985; Rocic y col., 1985).

El aminoácido fenólico L-DOPA, podría estar asociado al fabismo, ya que en ensayos realizados *in vitro* se observó que tenía la capacidad de disminuir el contenido en G-SH de los eritrocitos deficientes en G-6-PDH (Kosower y Kosower, 1967). En estudios posteriores llevados a cabo también *in vitro*, se sugirió que L-DOPA no era responsable directo de la hemólisis por ingestión de *V. faba*, aunque sí el precursor del factor hemolítico dopaquinona, obtenido por oxidación de L-DOPA en presencia de tirosinasas (Beutler, 1970). En ensayos *in vivo* no se han podido confirmar ninguno de estos resultados (Gaetani y col., 1970).

-

Efectos beneficiosos

Vicina y convicina, presentan propiedades positivas para el hombre como es la prevención de la arritmia cardiaca (Marquardt, 1989). Además, sus aglucones divicina e isouramilo parecen inhibir el crecimiento del parásito de la malaria *Plasmodium falciparum*. La fuerte capacidad reductora de estos compuestos lleva a la formación de peróxido de hidrógeno, radicales superóxido y radicales hidroxilo que producen un fuerte daño oxidativo en eritrocitos deficientes en G-6-PDH, limitando la multiplicación del parásito de la malaria. Esto únicamente se da en poblaciones donde la ingesta de habas es habitual, es decir en aquellos lugares donde existe el fabismo. El parásito es destruido en los eritrocitos del varón hemicigótico y únicamente en los eritrocitos deficientes en G-6-PDH de la hembra heterocigótica (Golenser y col., 1983; Roth y col., 1983).

La divicina también posee propiedades antitumorales, ya que en presencia de O₂ genera H₂O₂ y este último junto al ión ferroso, provoca la liberación de ·OH causante de daños a membranas celulares, produciéndose por tanto la lisis de células tumorales (Cowden y col, 1987).

Por otra parte, la ingestión de las vainas o de las plántulas de *V. faba* con un contenido elevado en L-DOPA, es de gran interés para el tratamiento del Parkinson y otras alteraciones neurológicas. Esta molécula atraviesa fácilmente la barrera hematoencefálica, y ya en el cerebro, por acción de la L-DOPA descarboxilasa se transforma en dopamina, logrando el incremento de la actividad motora de los pacientes. Además, con el consumo de *V. faba* conseguimos evitar los efectos secundarios producidos por la L-DOPA sintética y su interferencia con los alimentos ingeridos (Kempster y col., 1993; Rabey y col., 1993; Shetty y col., 2001; Randhir y col., 2002). A nivel renal, también se produce una descarboxilación enzimática de la L-DOPA, que proporciona la dopamina necesaria para tratar hipertensión, alteraciones cardiacas y renales, y cirrosis hepática (Vered y col., 1997).

4.3. INOSITOLES FOSFATO

El *mio*-inositol hexaquisfosfato, comúnmente conocido como ácido fítico (IP6), fue aislado por Pfeffer (1872) en forma de derivado de calcio/magnesio de los granos de aleurona del endospermo de semillas de trigo. Su concentración relativa y su distribución en la semilla fueron descritas por primera vez por Palladin en 1894, e identificado como un inositol por Winterstein en 1897 (En Cosgrove, 1980).

Es un compuesto ampliamente distribuido en las semillas de leguminosas, que puede ser degradado por fitasas (*mio*-inositol hexaquisfosfato fosfohidrolasas) tanto endógenas como exógenas. Estas enzimas pertenecen al grupo de las fosfatasas, y son capaces de hidrolizar secuencialmente el IP6 a ésteres de *mio*-inositol con menor número de grupos ortofosfato (*mio*-inositol pentaquis-, tetraquis-, tri-, di- y monofosfato) y fosfato inorgánico. Se conocen dos tipos de fitasas: 3-fitasas y 6-fitasas, que inician la desfosforilación del anillo de *mio*-inositol en la posición 3 y 6, respectivamente. Las 3-fitasas suelen estar presentes en microorganismos, mientras que las 6-fitasas se encuentran generalmente en las semillas de plantas superiores (Gibson y Ullah, 1990; Greiner y Konietzny, 1997; Greiner y col., 2002).

Estructura química

Durante muchos años, la estructura del ácido fítico dio lugar a numerosas controversias. En 1908, Neuberg propuso un modelo que contenía tres moléculas cíclicas de pirofosfato y en 1914, Anderson propuso una estructura donde los seis grupos hidroxilo del *mio*-inositol estaban esterificados con moléculas de ortofosfato (Cheryan, 1980; Loewus y Murthy, 2000). Posteriormente, los trabajos de Johnson y Tate (1969) demostraron que la estructura molecular descrita por Anderson era la correcta (Figura 19).

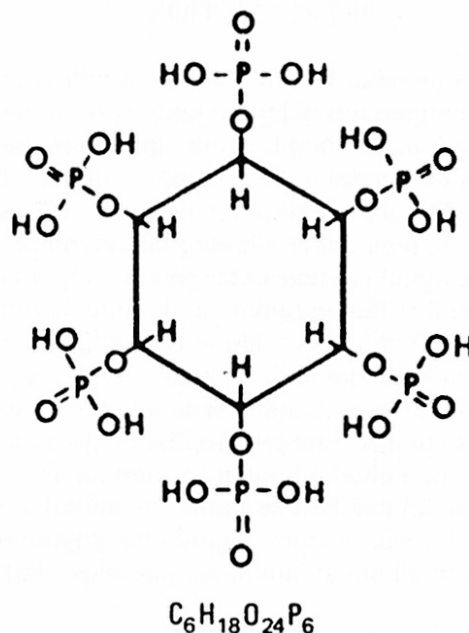


Figura 19.- Estructura molecular del ácido fítico propuesta por Anderson.

Métodos analíticos

Debido a la importancia que tiene la identificación y cuantificación de los inositoles fosfato, tanto por sus propiedades antinutritivas, como por sus efectos beneficiosos para la salud descubiertos en los últimos tiempos, se han ido desarrollado procedimientos cada vez más especializados para su determinación.

Los primeros métodos analíticos estaban basados en las observaciones realizadas por Heubner y Stadler (1914). Dichos autores comprobaron que el ión férrico formaba con el ácido fítico un complejo insoluble que precipitaba a pH ácido. Esta propiedad constituyó la base de la mayoría de las técnicas iniciales para la determinación del ácido fítico. Estos ensayos se basaban en la extracción de la muestra en medio ácido, precipitación del complejo fitato-Fe³⁺ por adición de ión férrico y estimación del contenido de ácido fítico a través de la cuantificación del fósforo, inositol o hierro del precipitado. Son métodos laboriosos y poco sensibles, pero el principal inconveniente es que carecen de especificidad para distinguir al ácido fítico de sus derivados parcialmente desfosforilados que coprecipitan, produciéndose así una sobreestimación del IP6 (Xu y col., 1992).

Harland y Oberleas desarrollaron en 1977 un método en el que se utilizaba una columna de intercambio aniónico para eliminar el fósforo inorgánico y concentrar el ácido fítico. A continuación se realizaba una hidrólisis ácida, y el fósforo liberado del IP6 se cuantificaba colorimétricamente. Este procedimiento analítico fue modificado por Ellis y Morris (1983), ya que el IP6 presente en el extracto ácido se encontraba ligado a proteínas, metales y otros componentes que dificultaban su extracción. Posteriormente fue adoptado por la Association of Official Agricultural Chemists (AOAC) como método oficial para la determinación de ácido fítico (Harland y Oberleas, 1986), a pesar de que su contenido se sobrevalora cuando están presentes los productos de su hidrólisis (Lehrfeld y Morris, 1992).

Para solventar los problemas derivados de la sobreestimación de IP6 por los métodos analíticos anteriormente descritos, autores como Tangendjaja y col. (1980) o Knuckles y col. (1982) determinan el IP6 por cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) utilizando una columna de fase reversa C₁₈ y un detector de índice de refracción, ya que estos compuestos no absorben luz visible ni ultravioleta. Como paso previo a su análisis por CLAR, Graf y Dintzis (1982) mostraron la necesidad de emplear una columna de intercambio aniónico en el proceso de purificación y concentración de la muestra, y así eliminar los sólidos solubles que pudieran eluir al mismo tiempo que el IP6. Con la fase reversa convencional utilizada por estos autores, es difícil cuantificar el pico del ácido fítico, ya que coincide con el frente del solvente. Lee y Abendroth (1983) resuelven este problema con la

introducción del par iónico en la columna de fase reversa, separando así el frente del solvente del analito.

En los trabajos de Sandberg y Ahderinne (1986) y Sandberg y col. (1989) quedó demostrado que la CLAR de par iónico en fase reversa proporciona una alta eficacia en la separación y cuantificación de inositoles tri-, tetra-, penta- y hexafosfato, ajustando el pH de la fase móvil de 7,1 a 4,3. Aunque Lehrfeld (1989, 1994) con el objeto de reducir el tiempo de análisis, sustituye la columna de fase reversa C₁₈, por una columna polimérica PRP-1 con valores reproducibles y una excelente resolución de los compuestos, siendo un método muy adecuado para analizar individualmente los inositoles fosfato presentes en legumbres.

Otro procedimiento utilizado para cuantificar inositoles fosfato individualmente, es la CLAR de intercambio aniónico desarrollada por Phillippy y Bland (1988) y utilizada por diversos investigadores en los últimos años (Skoglund y col., 1997, 1998; Mañez y col., 2002; Chen, 2004). Para la separación de estas moléculas son necesarias columnas de intercambio aniónico, y generalmente, a partir de los productos de reacción post-columna, se produce su detección ultravioleta. El inconveniente de estos métodos es que para la separación de los inositoles fosfato se requieren tiempos superiores a los de CLAR de par iónico. Además, es necesaria la derivatización previa de estos compuestos para poder medir su absorbancia.

Localización, metabolismo y función en la semilla

Durante la maduración de la semilla, el ácido fítico se sintetiza en el citoplasma, posiblemente en asociación con el retículo endotelial y es transportado por medio de vesículas a los cuerpos proteicos (Greenwood y Bewley, 1984; Brinch-Pedersen y col., 2002). En unas inclusiones de estos cuerpos proteicos conocidas como globoides (Figura 20) el ácido fítico se almacena en su forma aniónica (fitato) unido a cationes mono- y divalentes, como K⁺, Mg²⁺ o Ca²⁺, formando unas sales denominadas fitinas (Lott y Buttrose, 1977; Cosgrove 1980; Griffiths, 1984; Honke y col., 1998).

El IP6 podría ser inductor de la dormición de la semilla, ya que al unirse a cationes multivalentes necesarios para el control de procesos celulares, el metabolismo se ralentiza (Williams, 1970; Cosgrove, 1980; Gibson y Ullah, 1990). Además, gracias a su propiedad antioxidante, el IP6 podría preservar la viabilidad de la semilla durante el periodo de latencia (Graf y col., 1987).

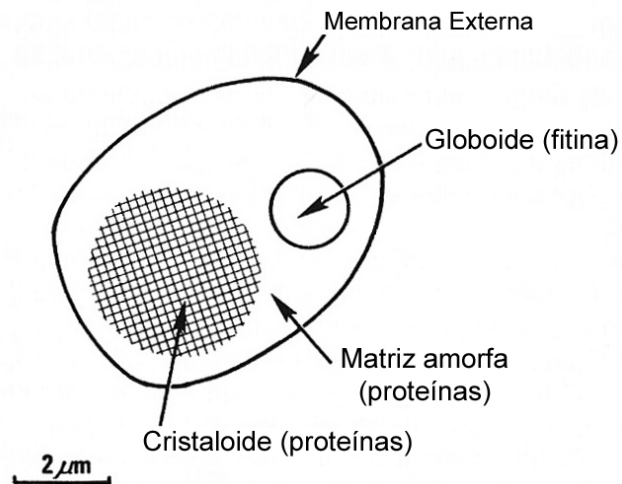


Figura 20.- Estructura de un cuerpo proteico con dos tipos de inclusiones: globoides y cristaloides.

En la Figura 21, queda descrita la biosíntesis del ácido fítico en la semilla, que se inicia con la formación del *D-mio*-inositol-3-monofosfato (IP1) a partir del *mio*-inositol, en presencia de *mio*-inositol quinasa, o a partir de *D*-glucosa-6-fosfato por actuación de la isomerasa *D-mio*-inositol-3-fosfato sintetasa. Posteriormente, las fosfoinositol quinasa catalizan la fosforilación gradual del IP1 a *mio*-inositol di-, tri-, tetra-, penta- y hexafosfato (Cosgrove, 1980; Honke y col., 1998; Loewus y Murthy, 2000).

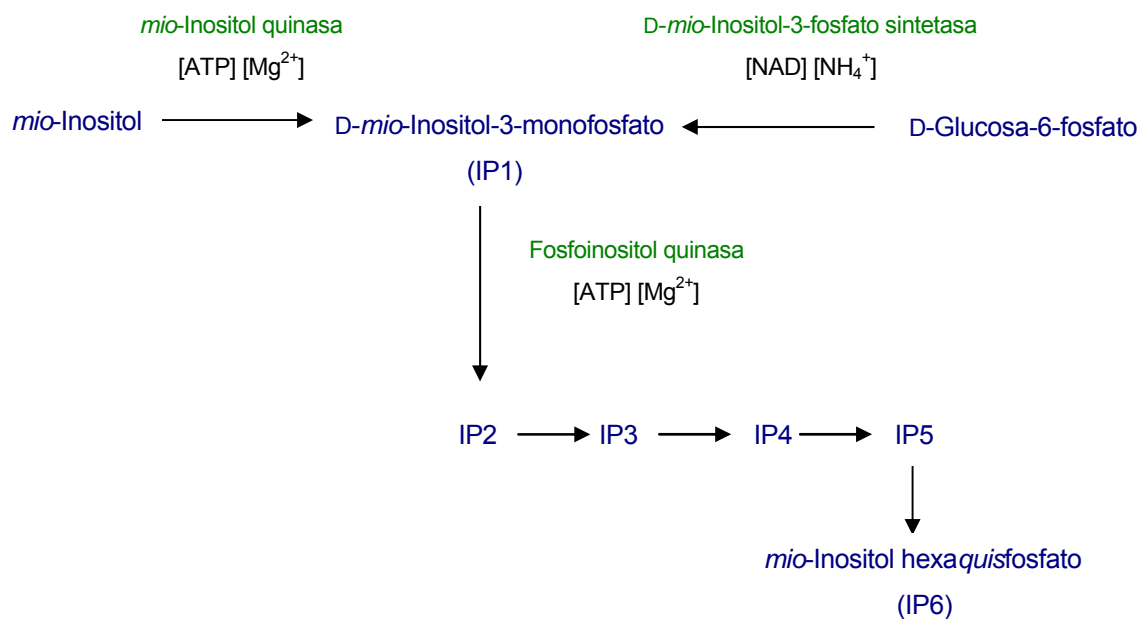


Figura 21.- Ruta biosintética del *mio*-inositol hexaquisfosfato.

El ácido fítico constituye la principal forma de reserva de fosfato inorgánico y *mio*-inositol de la semilla, y concretamente en habas entre un 40-60% del fósforo total se encuentra en forma de IP6. Con la activación de las fitasas preexistentes y la síntesis de fitasas *de novo*, segregadas por el aparato de Golgi y transportadas a los cuerpos proteicos durante la germinación, puede hidrolizarse el *mio*-inositol hexaquisfosfato allí presente. A partir de este compuesto se obtiene el fosfato inorgánico necesario para el crecimiento de la planta, y el *mio*-inositol utilizado *in situ* para la síntesis de la pared celular (Gabard y Jones, 1986; Gorospe y col., 1992; Crans y col., 1995; Ravindran y col., 1995; Fernández y col., 1997; Loewus y Murthy, 2000). También, los cationes mono- y divalentes que se encontraban formando sales con el ácido fítico, quedan disponibles para ser utilizados en el desarrollo de la planta (Cosgrove, 1980).

Interacciones y efectos fisiológicos en el organismo

Los animales monogástricos, entre ellos el hombre, tienen escasas fitasas a nivel de estómago e intestino delgado, de manera que no pueden hidrolizar la molécula de ácido fítico y utilizar el fósforo que se encuentra formando parte de su estructura, ni los minerales con los que forma sales. Al llegar al intestino grueso, la actividad fitásica de la mucosa tampoco es suficiente para hidrolizar el IP6, por lo que es metabolizado por bacterias de la flora intestinal, aunque el fósforo y los demás minerales liberados ya no pueden ser absorbidos a ese nivel (Fernández y col., 1997; Steer y Gibson, 2002).

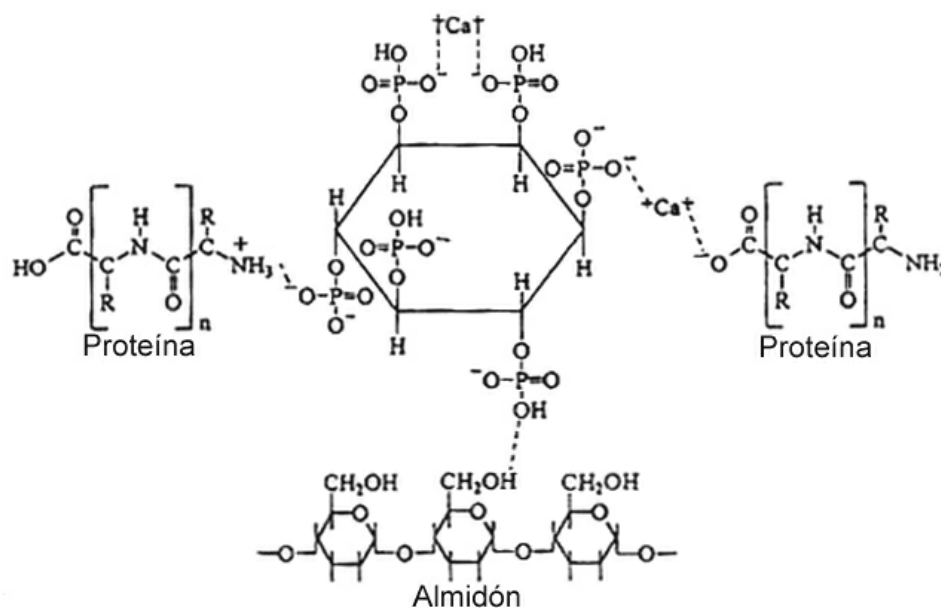


Figura 22.- Interacciones del ácido fítico con minerales, proteínas y almidón.

El *mio*-inositol hexaquisfostato ha sido considerado tradicionalmente como un antinutriente por su unión a minerales, proteínas y almidón (Figura 22), con los que forma complejos que no pueden ser asimilados. Sin embargo, estas interacciones moleculares también pueden ser favorables para la salud (Rickard y Thompson, 1997).

Efectos nocivos

La capacidad del ácido fítico para formar complejos insolubles con minerales esenciales como Cu^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} , $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$, Mn^{2+} , Ca^{2+} y Mg^{2+} , hace que disminuya la absorción intestinal y biodisponibilidad de éstos (Evans y Pierce, 1982; Nolan y col., 1987; Pallauf y Rimbach, 1997; Persson y col., 1998). En estudios realizados con animales y humanos, se ha observado que el IP5 y el IP6 tienen un efecto negativo sobre la biodisponibilidad de minerales, mientras que los inositoles fosfato menos fosforilados, IP1, IP2, IP3 e IP4, tienen baja capacidad de unión a cationes inorgánicos y los complejos que forman son más solubles. Sin embargo, el IP3 y el IP4 en presencia de inositoles fosfato altamente fosforilados, contribuyen a reducir la biodisponibilidad del hierro (Lönnerdal y col., 1989; Sandström y Sandberg, 1992; Sandberg y col., 1993, 1999).

Otra limitación a nivel nutritivo es la interacción iónica del ácido fítico con proteínas formando complejos proteína-fitato a pH ácido y proteína-mineral-fitato a pH básico. En ensayos realizados *in vitro* se ha observado una reducción de la solubilidad y biodisponibilidad de las proteínas, mientras que trabajos *in vivo* no siempre confirman este efecto (Cosgrove, 1980; Deshpande y Damodaran, 1989; Thompson, 1990). Además, debido a las interacciones fitato-proteína enzimática, el ácido fítico inhibe enzimas digestivas como lipasas, proteasas o α -amilasas, paralizando reacciones enzimáticas a nivel digestivo (O'Dell y de Boland, 1976; Knuckles y Betschart, 1987).

Efectos beneficiosos e importancia nutricional

Las interacciones del ácido fítico con cationes, pueden ser en algunas ocasiones beneficiosas, como en el caso de su unión a metales tóxicos como Cd^{2+} o Al^{3+} para ser excretados por las heces (Evans y Martin, 1988). También posee propiedades anticancerígenas, ya que gracias a su unión a Zn^{2+} y Mg^{2+} , reduce la biodisponibilidad de estos minerales necesarios para la síntesis de ADN, evitando la proliferación celular (Steer y Gibson, 2002). Además, parece estar implicado en la prevención de caries dentales por su capacidad de unión al calcio del esmalte, quedando los dientes más protegidos frente al ataque de ácidos y bacterias (Konietzny y Greiner, 2003).

El inositol hexafosfato actúa como un agente hipolipidémico a nivel plasmático, minimizando el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares. Esto se debe a su mayor afinidad por el Zn^{2+} frente al Cu^{2+} . El exceso de Zn^{2+} , produce una reducción en la absorción de

Cu^{2+} a nivel del intestino delgado, ya que el Zn^{2+} y el Cu^{2+} compiten por el mismo transportador. Pero como el ácido fítico preferentemente quela Zn^{2+} , se reducen los niveles de Zn^{2+} en plasma sin interferirse la absorción de Cu^{2+} , con la consecuente reducción de los niveles de colesterol y triglicéridos (Rickard y Thompson, 1997; Alarcón-Corredor, 2000; Zulet y Martínez, 2001).

El IP6 también tiene propiedades antioxidantes gracias a las cuales previene el desarrollo de cáncer y daños celulares. Concretamente, al ser un agente quelante de Fe^{3+} , evita la intervención de este catión metálico en la formación de radicales hidroxilo ($\cdot\text{OH}$), reduciendo así la peroxidación lipídica (factor cancerígeno) y daños en el ADN. Además, con la quelación de este catión a nivel intestinal, se reduce su absorción y se inhibe la peroxidación de las lipoproteínas de baja densidad en plasma, con lo que disminuye la posibilidad de padecer arteriosclerosis (Urbano y col., 2000; Shamsuddin, 2002).

El ácido fítico puede retrasar la digestión y absorción del almidón de varias formas: por su unión directa a este polisacárido, por su unión a las α -amilasas, o por su quelación de Ca^{2+} necesario para la activación de la amilasa. A través de estos mecanismos se produce un retraso en la respuesta glucémica, por lo tanto, debido a la disminución de glucosa en sangre, es requerida menos insulina y disminuye el riesgo de padecer diabetes (Rickard y Thompson, 1997; Pallauf y Rimbach, 1997). Además, al reducirse la digestibilidad del almidón y producirse una mala absorción del mismo, queda disponible en el colon para ser fermentado por bacterias colónicas, y como consecuencia, se liberan ácidos grasos de cadena corta que provocan la bajada del pH. Esta reducción del pH tiene un efecto protector, ya que precursores tumorales como ácidos biliares y amoniaco se insolubilizan y neutralizan, respectivamente, disminuyendo así el riesgo de padecer cáncer de colon. Aunque una excesiva fermentación y su consecuente bajada de pH, puede provocar carcinogénesis (Jacobs, 1986; Thompson, 1993; Steer y Gibson, 2002).

Por otro parte, la interacción entre el ácido fítico y proteínas enzimáticas puede ser beneficiosa. Concretamente, al unirse a enzimas bacterianas como β -glucuronidasas y mucinasas en el colon, reduce la actividad de estas enzimas, evitando la conversión de ácidos biliares primarios en secundarios, que son precursores tumorales (Thompson, 1993).

La actividad antineoplásica del IP6 puede estar mediada por sus derivados de menor peso molecular, principalmente IP3, que además de poseer propiedades antiinflamatorias, incrementa la actividad de las células "natural killer" que se encuentran involucradas en la destrucción e inhibición del crecimiento de células tumorales (Cecconi y col., 1994; Zhou y Erdman, 1995). También se ha observado, que la elevada ingesta de ácido fítico, lleva a un incremento de los niveles de *mio*-inositoles menos fosforilados (IP2, IP3) en el contenido

urinario, que podrían ser responsables de inhibir la formación de cálculos renales (Konietzny y Greiner, 2003).

A través de una serie de estudios realizados en el cerebro de mamíferos se ha llegado a la conclusión de que los inositoles fosfato podrían controlar a nivel central la presión sanguínea (Vallejo y col., 1987).

El efecto positivo o negativo del *mio*-inositol hexaquisfosfato para un individuo depende de varios factores: (i) la concentración relativa de este compuesto y de otros nutrientes, (ii) las condiciones bajo las cuales es consumido (efecto del procesado, presencia de enzimas hidrolíticas, interacción con otros compuestos de la dieta) y (iii) su estado nutricional y de salud. Por tanto, aquellas personas que consumen alimentos ricos en ácido fólico, pero pobres en otros nutrientes como minerales y proteínas, tendrán una mayor predisposición a desarrollar enfermedades relacionadas con deficiencias en minerales o a padecer malnutrición proteica. Concretamente los niños, al requerir un mayor aporte de nutrientes, serán más susceptibles al efecto del ácido fólico. Por el contrario, individuos que consumen exceso de calorías y nutrientes, al igual que aquellos con un mayor riesgo de padecer enfermedades crónicas como el cáncer, afecciones cardiovasculares o diabetes, pueden tolerar mayores dosis, actuando incluso como anticancerígeno, hipolipemiente o hipoglucemiante, pero han de confirmarse las dosis apropiadas de ácido fólico necesarias para disminuir los efectos adversos y potenciar los efectos favorables para la salud (Fernández y col., 1997; Steer y Gibson, 2002).

4.4. TANINOS

Los taninos son compuestos fenólicos solubles en agua, con pesos moleculares de 500-3.000 Da, que contienen un gran número de grupos hidroxilo y otros grupos funcionales (1 o 2 por 100 Da) con los que se unen a proteínas y otras macromoléculas de manera inespecífica (Chung y col., 1998; Scalbert y col., 2000).

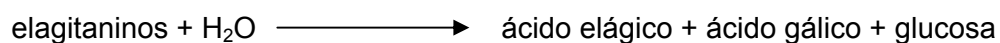
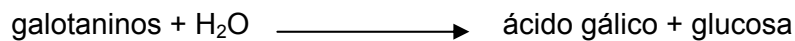
Los taninos condensados están presentes en las habas, y los primeros investigadores que los detectaron en estas semillas fueron Barker y Morris (1968). Posteriormente, Marquart y col. (1977) lograron su aislamiento y purificación (en Chavan y col., 1989).

Clasificación y estructura química

Los taninos pueden clasificarse en dos categorías:

Taninos hidrolizables

Son ésteres de un poliol, generalmente glucosa, y un ácido fenólico como el ácido gálico (galotaninos) o un ácido fenólico más complejo como el ácido hexahidroxidifénico (elagitaninos). Los galotaninos se hidrolizan en presencia de ácidos, bases o enzimas, y liberan glucosa y ácido gálico, mientras que los elagitaninos liberan glucosa, ácido elágico y ácido gálico. El ácido hexahidroxidifénico de los elagitaninos sufre una lactonización para formar ácido elágico. Estos taninos se encuentran en escasa proporción en los alimentos de origen vegetal, aunque suelen estar en bayas como fresas, frambuesas o moras (Chung y col., 1998; Scalbert y col., 2000).



Taninos no hidrolizables o condensados

Los taninos condensados son polímeros de flavan-3-oles y/o flavan-3,4-dioles y su naturaleza polimérica les hace únicos dentro de los polifenoles (Figura 23). En presencia de calor y medio ácido liberan antocianidinas, de ahí que también se les denomine proantocianidinas.

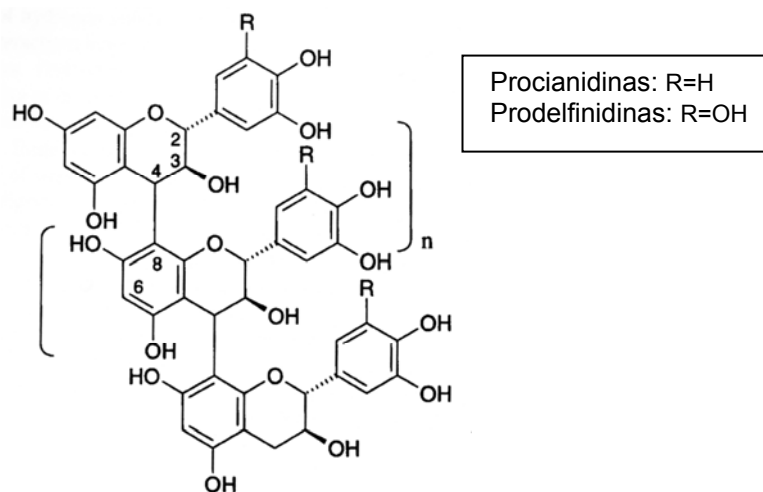
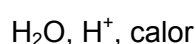
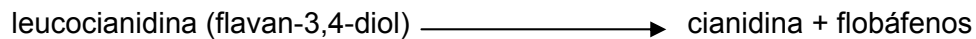


Figura 23.- Estructura química de las proantocianidinas.

Los flavan-3-oles son conocidos como catequinas y dentro de este grupo está la catequina y la galocatequina. Los flavan-3,4-dioles pertenecen a la clase de compuestos denominados leucoantocianidinas, entre los que encontramos leucocianidina y leucodelphinidina. Mediante calentamiento en solución ácida, se libera la correspondiente antocianidina junto a unos compuestos poliméricos amorfos e insolubles denominados flobáfenos (Chung y col., 1998).





Los taninos condensados se encuentran ampliamente distribuidos en vegetales y son más abundantes en nuestra dieta que los taninos hidrolizables. Las principales fuentes son semillas de leguminosas, frutas, té, vino tinto, cacao, cerveza, etc. (Scalbert y col., 2000).

Métodos analíticos

Los taninos condensados o proantocianidinas, son moléculas de elevado peso molecular y con una estructura química muy compleja, por lo que los métodos desarrollados para su determinación son muy variados.

- *Métodos de precipitación de proteínas:* son procedimientos basados en la unión de taninos condensados a proteínas (Makkar y col., 1987). Les falta especificidad, ya que estas moléculas no son las únicas capaces de precipitar proteínas, muchas otras poseen esa propiedad (Scalbert, 1992).

- *Métodos basados en reacciones con anillos fenólicos:* están relacionados con la propiedad reductora que poseen los grupos fenólicos de las proantocianidinas, y con ellos se determinan fenoles totales y *m*-difenoles.

Determinación de fenoles totales: son ensayos en los que los grupos fenólicos reducen un reactivo específico, proporcionando complejos coloreados que se miden espectrofotométricamente (Eskin y col., 1978). No son métodos exclusivos para proantocianidinas, ya que otros compuestos fenólicos con propiedades reductoras se determinan simultáneamente (Scalbert, 1992).

Determinación de *m*-difenoles: son métodos basados en la reacción de estos fenoles con aldehidos aromáticos en medio fuertemente ácido para formar un compuesto coloreado. El reactivo utilizado puede ser vainillina (Broadhurst y Jones, 1978) o 4-dimetilaminocinamaldehído (McMurrough y McDowell, 1978; Treutter, 1989) y la reacción se desarrolla con catequinas y proantocianidinas, aunque no puede conocerse ni la composición ni el tamaño del tanino. Además, la reactividad de la molécula varía dependiendo de su estructura y de su grado de polimerización, haciendo difícil la comparación de resultados (Scalbert, 1992; Santos-Buelga y Scalbert, 2000).

- *Métodos basados en la despolimerización:*

En este grupo encontramos metodologías relacionadas con la despolimerización oxidativa de proantocianidinas con calor en medio ácido y la posterior determinación colorimétrica a 550 nm de las antocianidinas liberadas. Bate-Smith (1973) propuso el método original para la determinación de estos polifenoles utilizando una mezcla de butanol/HCl.

Posteriormente se han desarrollado otros métodos en los que se incluye además, un ión metálico como Fe^{2+} o Fe^{3+} (Porter y col., 1986) que actúa como catalizador en el desarrollo de color durante la reacción de autooxidación, incrementando así la sensibilidad y la reproducibilidad del ensayo. El principal inconveniente en la utilización de estos métodos, es que no podemos conocer ni la composición ni el tamaño de las proantocianidinas. Además, su aplicación para el análisis cuantitativo, está limitada porque la transformación de proantocianidinas en antocianidinas no es completa y porque se desarrollan sustancias colaterales (flobáfenos). Pero a pesar de todo, son procedimientos adecuados para la determinación de proantocianidinas en leguminosas, ya que son rápidos, sencillos y específicos de estos compuestos (Scalbert, 1992; Santos-Buelga y Scalbert, 2000; Stobiecki y Makkar, 2004).

También se utilizan otros métodos donde se produce la despolimerización de proantocianidinas en presencia del reactivo nucleófilo bencilmercaptano, ácido y calor, debido a una tiolisis (Matthews y col., 1997). Con la adición de este reactivo se forma un tioeter con el C_4 de cada unidad de polímero, evitando la formación de productos colaterales. Además, los compuestos de degradación derivados de las procianidinas y de las prodelfinidinas, se separan y cuantifican por CG o CLAR, obteniéndose información a cerca de la composición y grado de polimerización de los taninos condensados (Santos-Buelga y Scalbert, 2000).

- *Métodos basados en el infrarrojo cercano*: las proantocianidinas se cuantifican por espectroscopia reflectante de infrarrojo cercano a una longitud de onda de $2,15 \mu\text{m}$ (Goodchild y col., 1997). Son procedimientos apropiados para determinar proantocianidinas, pero tienen un alto coste y son muy laboriosos (Stobiecki y Makkar, 2004).

Localización, metabolismo y función en la planta

Durante la maduración de la semilla, los taninos condensados presentes en los cotiledones disminuyen, sin embargo, los de la testa se incrementan debido a la polimerización de compuestos fenólicos ya existentes. Por lo tanto, en las semillas maduras de leguminosas la mayor parte de los taninos condensados se localizan en la testa (Chang y col., 1994; Alonso y col., 2000; Chavan y col., 2003).

Diferentes estudios confirman que las semillas procedentes de flores blancas contienen menos taninos condensados que aquellas que provienen de flores de color. Además, las semillas de color tienen mayor cantidad de estos compuestos que las semillas blancas (Griffiths, 1981; Sjödin y col., 1981; Moneam, 1990; Borowska y col., 2003).

La biosíntesis de proantocianidinas comienza con el paso de carbohidratos sencillos, procedentes de la ruta metabólica de las pentosas fosfato, a la ruta del ácido shikímico para transformarse en aminoácidos aromáticos (Figura 17). A continuación, la fenilalanina pasa a la ruta metabólica del fenilpropanoide, y como se observa en la Figura 24, interviene junto a ésteres del acetil coenzima A en la formación de estos taninos (Shirley, 1996; Randhir y col., 2002).

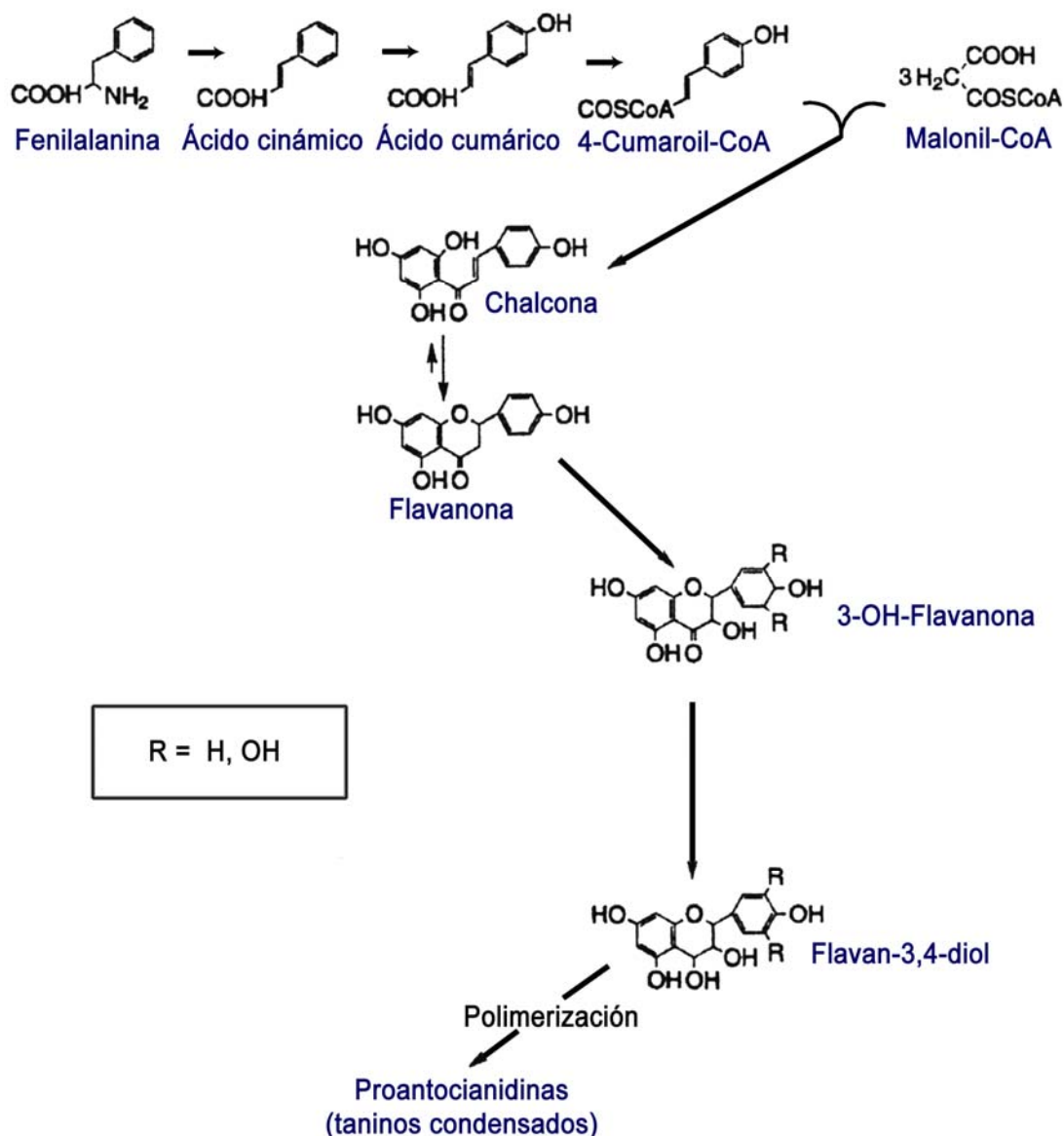


Figura 24.- Ruta biosintética de las proantocianidinas.

Los taninos condensados son metabolitos secundarios esenciales para la vida de la planta, que actúan como mecanismo de defensa frente al ataque de bacterias, virus y hongos, debido a su capacidad de inhibir enzimas (Deshpande y col., 1985; Butler, 1989; Shirley, 1996). Además, gracias a su propiedad astringente, provocada por la unión a

proteínas salivares y mucosa epitelial, su presencia en las semillas y frutos inmaduros, hace que los animales rechacen su consumo (Salunkhe y col., 1982; Wang y col., 1998b).

Otra propiedad de los taninos es su intervención en la nodulación de leguminosas, de manera que en presencia de bacterias simbióticas de la familia *Rhizobiaceae*, generan importantes cantidades de nitrógeno necesario para las plantas (Shirley, 1996).

Los taninos favorecen la polinización de la planta mediante la producción de pigmentos en flores y frutos que atraen a los insectos a su fuente de alimentación (Cook y Samman, 1996).

Interacciones y efectos fisiológicos en el organismo

El consumo de taninos condensados puede ser positivo para la salud, ya que son moléculas que actúan como agentes anticancerígenos, antimicrobianos, antidiarreicos, antihipertensivos, antiinflamatorios, etc. Pero también están relacionados con procesos cancerígenos y hepatotoxicidad, además de poseer una actividad antinutricional, ya que provocan daños en la mucosa gastrointestinal, excreción de cationes y proteínas, etc. (Chung y col., 1998; Dueñas y col., 2003).

Los efectos biológicos de las proantocianidinas están relacionados con su estructura y especialmente con su grado de polimerización, y el número de grupos fenólicos presentes en la molécula es la base de su unión a proteínas, carbohidratos, cationes metálicos y radicales libres (Santos-Buelga y Scalbert, 2000).

Como ya se ha indicado, el grado de polimerización del tanino es importante para que se produzca la unión con la proteína, siendo los tetrámeros y los pentámeros los que poseen la máxima reactividad. Estos polifenoles interactúan con proteínas muy diversas: enzimas, toxinas, hormonas, etc., y producen efectos tanto beneficiosos como perjudiciales para la salud (Butler, 1989; Chung y col., 1998; Saint-Cricq de Gaulejac y col., 1999). Así por ejemplo, se ha comprobado que el valor nutritivo de los alimentos se reduce debido a la inhibición de la digestión de la proteína por interacción entre las proantocianidinas y las enzimas digestivas, o bien por la formación de complejos insolubles con dicha proteína (Schulze y col., 1993; Santos-Buelga y Scalbert, 2000). Aunque en la saliva, se encuentran unas proteínas ricas en prolina que se unen a los taninos, permitiendo la absorción de la proteína ingerida con la dieta (Jansman y col., 1994). Por otro lado, poseen propiedades terapéuticas o preventivas frente a enfermedades gastrointestinales como la diarrea o la úlcera. Su efecto antidiarreico lo desarrollan por unión a proteínas de la mucosa intestinal para formar una película protectora y su actividad antiulcerosa es debida también a su

capacidad de unión a proteínas, pero en este caso para cubrir la superficie dañada del estómago (Hör y col., 1995; Saito y col., 1998).

Los taninos interfieren con la asimilación de disacáridos procedentes de la digestión de oligosacáridos, mediante una fuerte inhibición de maltasas, sacarasas y lactasas. Además, inhiben el transporte activo de azúcares como glucosa a través del intestino, mediante la formación de complejos con componentes del epitelio intestinal (Carmona y col., 1996). También reducen la digestión y absorción del almidón por su unión directa a este polisacárido, a la α -amilasa, o al calcio necesario para la activación de esta enzima. A través de los tres mecanismos se reducen los niveles de glucosa en sangre y se incrementan los de insulina, pudiéndose utilizar los taninos como terapia frente a la diabetes y para el control de la obesidad (Griffiths, 1979; Thompson, 1993).

Las proantocianidinas quelan Fe^{3+} y provocan una deficiencia de este mineral en el organismo, desencadenándose en algunas ocasiones anemia. También reducen la biodisponibilidad de otros minerales como Ca^{2+} , Mg^{2+} y Zn^{2+} , pero con el Cu^{3+} ejercen una acción contraria, ya que al tener poca afinidad por él, su biodisponibilidad se incrementa (Zdunczyk, 1996; Chung y col., 1998; Santos-Buelga y Scalbert, 2000).

Gracias a la capacidad reductora de los taninos condensados, se evitan daños oxidativos y se previenen enfermedades. La mayor capacidad para atrapar radicales libres la poseen los tetrámeros y los pentámeros, ya que en los taninos de mayor tamaño no están accesibles los grupos hidroxilo necesarios para captar estos radicales que causan degradación oxidativa de proteínas, lípidos insaturados, carbohidratos y ácidos nucleicos, además de estimular macrófagos y monocitos que liberan citoquinas (compuestos inductores de inflamación) y participar en patogénesis como úlcera, diabetes, arteriosclerosis, carcinogénesis o envejecimiento.

La actividad anticancerígena y antimutagénica la desarrollan protegiendo a los componentes celulares de daños oxidativos, siendo menor la peroxidación lipídica y el daño del ADN. Además, evitan el desarrollo de la arteriosclerosis inhibiendo la peroxidación lipídica de lipoproteínas de baja densidad en plasma. Pero ésta, no es la única forma de prevenir enfermedades cardiovasculares, también reducen el riesgo de padecer trombosis inhibiendo la agregación plaquetaria (Ricardo da Silva y col., 1991; Frei, 1995; Chung y col., 1998; Jovanovic y col., 1998; Saito y col., 1998; Ho y col., 1999; Mazur y col., 1999; Saint-Cricq de Gaulejac y col., 1999; Santos-Buelga y Scalbert, 2000).

Las proantocianidinas, son agentes antimicrobianos que actúan frente a un gran número de bacterias, virus y hongos. Pueden inactivar bacterias causantes de diarrea y de

caries dentales, incluso el herpes virus, el virus de la gripe o el virus de la inmunodeficiencia humana, entre otros (Chung y col., 1998; Sakanaka, 1990).

Por otra parte, también se ha observado que con la ingestión habitual de grandes cantidades de taninos se incrementa el riesgo de padecer enfermedades tumorales. De hecho, Singleton (1981) demostró que el efecto cancerígeno de los taninos era debido a la irritación y daño celular, más que a la mutagénesis del ADN. Otros efectos adversos que las proantocianidinas pueden producir son: anemia hemolítica, trombocitopenia, hepatitis, fiebre, reacciones de la piel o deficiencia renal aguda (Cook y Samman, 1996).

4.5. INHIBIDORES DE PROTEASAS

Los inhibidores de proteasas son proteínas distribuidas ampliamente en el reino vegetal, que tienen la capacidad de inhibir la actividad proteolítica de enzimas digestivas como las serina proteasas (tripsina y quimotripsina) propias del tracto gastrointestinal de los animales, aunque también pueden inhibir proteasas endógenas y enzimas de bacterias, hongos e insectos (Domoney, 1999).

Clasificación y estructura química

Los estudios de caracterización realizados en semillas de soja son los más amplios y han permitido clasificar a los inhibidores de serina proteasas en: inhibidor de Kunitz e inhibidor de Bowman-Birk, denominados así tras su aislamiento por Kunitz (1945) y Bowman (1946), respectivamente. En el último caso, la caracterización fue llevada a cabo por Birk y col. (1963), por lo que se añadió este nombre. Los inhibidores de serina proteasas han sido aislados también en otras semillas de leguminosas, aunque no todas contienen los dos tipos de inhibidores (Domoney, 1999).

Inhibidores de proteasas tipo Kunitz

El inhibidor de tripsina de Kunitz de soja es termolábil, con un peso molecular de 21 KDa y dos puentes disulfuro. Está formado por 181 aminoácidos, con un único sitio activo localizado en Arg63-Ile64 (Figura 25). Su especificidad está directamente relacionada con la tripsina, de manera que inhibe fuertemente tripsina y débilmente quimotripsina. Una molécula de inhibidor, inactiva una molécula de tripsina y el complejo que forma es análogo al complejo enzima-sustrato.

En otras leguminosas como *Albizzia julibrissin*, *Acacia elata* o *Psophocarpus tetragonolobus*, se han aislado y caracterizado inhibidores de proteasas tipo Kunitz, homólogos al de la soja, con pesos moleculares de 20-25 KDa, con algunos puentes

de tripsina (Valdebouze y col., 1980; Belitz y Weder, 1990). Concretamente en el presente estudio, la extracción y valoración de los inhibidores se lleva a cabo siguiendo el método de Welham y Domoney (2000).

Además de estos métodos enzimáticos, también se han desarrollado métodos basados en inmunoquímica y electroforesis capilar. Entre los primeros están los descritos por Hajós y col. (1995) o por van Amerongen y col (1998) que son útiles para la detección y cuantificación de inhibidores de Kunitz o de Bowman-Birk mediante la unión del inhibidor a un anticuerpo específico. Son técnicas sensibles, precisas y específicas, pero relativamente complejas y de larga duración. También está el microensayo desarrollado por Bacon y col. (1995) que parece ser efectivo para propósitos rutinarios de muestreo.

Localización, metabolismo y función en la semilla

La localización de los inhibidores de proteasas es importante para entender su función fisiológica, ya que su papel en la semilla no está del todo claro. Wolf (1972) identifica inhibidores de proteasas únicamente en el citoplasma de semillas de soja y posteriormente, Horisberger y Tacchini-Vonlanthen (1983) detectan inhibidores de Bowman-Birk, además de en el citoplasma, en los cuerpos proteicos, núcleo y espacios intercelulares del cotiledón de esta misma especie, mientras que en el eje embrionario, se localizan en la pared celular, citoplasma y cuerpos proteicos. Estos autores, también identifican inhibidores de Kunitz en el cotiledón, pero no en el eje embrionario.

Se ha comprobado que los inhibidores de tripsina se incrementan en los cotiledones y en el eje embrionario durante el desarrollo de la semilla, alcanzando los niveles máximos durante el periodo de desecación. Por lo tanto, una de sus funciones en la semilla, podría estar relacionada con la adquisición de tolerancia a la desecación, proporcionando estabilidad a las proteínas (Kute y col., 1984; Giri y col., 1998; Welham y col., 1998; Lam y col., 1999). Aunque también, gracias al elevado contenido en cisteína que los inhibidores de tripsina presentan en su estructura, la semilla podría utilizarlos como fuente de aminoácidos azufrados (Pusztai, 1972).

Uno de los principales papeles de los inhibidores de proteasas, es el de defensa frente a la invasión de microorganismos e insectos, y para ello, las leguminosas elaboran inhibidores de proteasas tanto microbianas, como digestivas de insectos (Ryan, 1983; Janzen y col., 1986; Giri y col., 1998; Pusztai y col., 2004).

Estos inhibidores podrían también regular la proteólisis de la proteína almacenada en los cuerpos proteicos antes y durante la germinación de la semilla, inhibiendo proteasas endógenas, ya que en algunas ocasiones la actividad de los inhibidores de proteasas no se

— modifica o incluso se incrementa a lo largo del periodo germinativo (Bhatty, 1977; Rani y Hira, 1993; Alonso y col., 2000). También se ha observado, como la actividad de los inhibidores de proteasas se reduce durante la germinación, mientras que las proteasas endógenas van incrementando su actividad. Por ello, se ha pensado que las propias proteasas de la semilla, podrían degradar los inhibidores de proteasas (Liener y Kakade, 1980; Norton, 1991; Savelkoul y col., 1992; Lam y col., 1999).

Según los estudios llevados a cabo por Birk (1968), estos inhibidores no pueden intervenir en la regulación de la hidrólisis proteica, ya que al ser extraídos de la planta son incapaces de inhibir sus propias proteasas. Además, si es cierto que se encuentran localizados en el citoplasma (Wolf, 1972), su actividad inhibitoria no puede estar asociada a los cuerpos proteicos, pero podrían evitar la hidrólisis de proteínas citoplasmáticas en situaciones de ruptura accidental de los cuerpos proteicos que contienen proteasas (Baumgartner y Chrispeels, 1976).

Efectos fisiológicos en el organismo

Los inhibidores de proteasas presentes en las semillas de leguminosas, son denominados compuestos antinutritivos como resultado de su actuación sobre enzimas digestivos animales (tripsina y quimotripsina), pero también podrían considerarse compuestos nutritivos al ser proteínas con un alto contenido en aminoácidos azufrados (Domoney, 1999).

Efectos nocivos

Los inhibidores de proteasas ingeridos con las leguminosas provocan efectos nocivos en animales. En primer lugar, forman complejos inactivos con tripsina y/o quimotripsina, por lo que los niveles de estas enzimas digestivos libres se reducen, dificultándose así la proteólisis y absorción de la proteína adquirida con la dieta. Además, estos complejos enzima-inhibidor ricos en aminoácidos azufrados son excretados. Por último, los inhibidores provocan una hipertrofia/hiperplasia del páncreas debido a la crónica hipersecreción de enzimas pancreáticos (tripsina y quimotripsina), consiguiendo que los aminoácidos azufrados que se encontraban sintetizando proteínas del tejido corporal, se desvíen hacia la síntesis de estas enzimas. Todo esto, lleva a una reducción en el contenido de aminoácidos esenciales, que provoca una inhibición del crecimiento del animal, agravándose así una situación ya crítica con respecto a la proteína de leguminosas que en sí misma es deficiente en aminoácidos azufrados (Grant, 1989; Liener, 1989; Hedemann y col., 1999; Carbonaro y col., 2000; Friedman y Brandon, 2001).

El mecanismo a través del cual los inhibidores de proteasas estimulan la secreción pancreática no está del todo claro. Existe una teoría según la cual esta secreción estaría regulada mediante un mecanismo de retroalimentación negativo, de manera que, cuando el contenido de tripsina/quimotripsina se reduce en el duodeno por debajo de un determinado nivel, las células endocrinas de la mucosa duodenal liberan la hormona colecistoquinina, induciendo al páncreas a sintetizar más serina proteasas. La reducción de los niveles de tripsina y quimotripsina se produce cuando los inhibidores de proteasas ingeridos con la dieta, llegan al duodeno y se unen a estas enzimas digestivas formando complejos. Aunque éste, no parece ser el único mecanismo por el cual la secreción pancreática se activa. Estudios recientes han demostrado, que tanto los inhibidores de proteasas libres, como los complejos enzima-inhibidor, se unen a la mucosa duodenal y estimulan la liberación de colecistoquinina, incrementándose así la secreción pancreática de serina proteasas (Liener, 1989; Pusztai y col., 1997, 2004).

La acción que ejercen los inhibidores de tripsina sobre el hombre no está del todo clara, ya que la tripsina humana tiene dos formas: una catiónica que constituye el principal componente del jugo pancreático y que es débilmente inhibida, y una aniónica que comprende alrededor del 10-20% de la tripsina total, que es inhibida completamente (Liener y Kakade, 1980; Liener, 1989).

Los inhibidores de tripsina, pueden llegar a producir cáncer a nivel de páncreas o incluso potenciar el efecto cancerígeno de otros compuestos (McGuinness y col., 1980). Además, son capaces de desencadenar procesos alérgicos en individuos predispuestos, y un buen ejemplo de ello es el inhibidor de Kunitz, que puede provocar anafilaxia en personas sensibles a la soja (Rodríguez, 2004).

Efectos beneficiosos

Debido a que los inhibidores tipo Bowman-Birk son proteínas con una cantidad elevada de cisteína, hacen una contribución importante en el contenido de aminoácidos azufrados, incrementando así el valor nutritivo de la leguminosa (Sastry y Murray, 1987; Hedemann y col., 1999).

Los inhibidores de Bowman-Birk de soja, al igual que sus homólogos presentes en otras leguminosas, intervienen en la prevención y tratamiento de cáncer (colon, mama, hígado, pulmón, próstata, etc.) mediante la inhibición de quimotripsina. Un mecanismo a través del cual estos compuestos pueden evitar la carcinogénesis, es con la reducción de la digestibilidad de la proteína y menor disponibilidad de aminoácidos como leucina, fenilalanina o tirosina, necesarios para el desarrollo de células cancerígenas (Troll y col., 1987; Tamir y col., 1996; Kennedy, 1998; Clemente y col., 2004). Según los estudios

realizados por Fernandes y Banerji (1995), los inhibidores de Bowman-Birk de *V. faba* previenen la formación de tumores estomacales.

4.6. OTROS FACTORES NO-NUTRITIVOS

Hemaglutininas o lectinas

Las lectinas se definen como proteínas o glicoproteínas de naturaleza no-inmune capaces de reconocer carbohidratos y glicoconjugados con una alta especificidad, y de unirse a ellos de forma reversible sin alterar su estructura. Esta reacción se pone de manifiesto *in vitro* por la aglutinación de los eritrocitos de diferentes especies animales (Kocourek y Horejsi, 1981; Lis y Sharon, 1986).

Estos compuestos se descubrieron en extractos de leguminosas, pero sin embargo no son exclusivos de especies vegetales, están presentes en la mayoría de los organismos vivos, desde virus a vertebrados (Grant y van Driessche, 1993).

La mayoría de las especies pertenecientes a la familia de las leguminosas presentan lectinas y muchas de ellas se han purificado y caracterizado (Goldstein y Porezt, 1986).

Las lectinas se sintetizan durante el desarrollo de la semilla en el retículo endoplásmico y se transportan por mediación del aparato de Golgi a los cuerpos proteicos de los cotiledones, alcanzando en la semilla madura porcentajes del 1-8% frente al contenido total de proteína. Durante la germinación, son hidrolizadas enzimáticamente y utilizadas como fuente de aminoácidos, aunque su principal función en la semilla parece ser de defensa frente a depredadores (Jaffé, 1980; Datta y col., 1985; Murdock y col., 1990; Chrispeels y Raikhel, 1991; Savelkoul y col., 1992; Bau y col., 1997; Pusztai y col., 2004).

El efecto tóxico de las lectinas se debe a su alta resistencia a la degradación proteolítica *in vivo* y a su capacidad para reconocer y unirse a receptores específicos (restos azucarados) de células de la mucosa intestinal causando una interferencia no específica con la absorción de nutrientes. Pero además, esta reducción de la biodisponibilidad de nutrientes también se debe a la acción directa de las lectinas sobre enzimas digestivas (peptidasas, disacaridasas, fosfatasas, amilasas, etc.), disminuyendo así la actividad enzimática. Su toxicidad es variable, tan sólo algunas de ellas han mostrado efectos deletéreos en animales, pero estas lectinas tóxicas interfieren con el balance hormonal y producen alteraciones en el metabolismo de lípidos y proteínas, que culmina en una disminución severa del crecimiento y que incluso puede conducir a la muerte del animal (Thompson y col., 1986; Adsule y col., 1989; Grant y van Driessche, 1993; Thompson, 1993).

A bajas dosis, las lectinas poseen efectos beneficiosos para la salud debido a que mimetizan la acción de la insulina, disminuyendo los niveles de glucosa en sangre. Además pueden inhibir el crecimiento tumoral, ser coadyuvantes en la vacunación oral o incluso actuar como prebióticos (Pusztai y col., 2004).

Las semillas de *V. faba* presentan un contenido en lectinas de 25-100 UI/mg (Valdebouze y col., 1980; Alonso y col., 2000) y la lectina aislada de esta especie es la fabina, que consta de dos subunidades idénticas y cada una posee dos lugares de unión a metales y otro lugar para un residuo azucarado, e interacciona específicamente con residuos de D-manosa y D-glucosamina en la superficie de los eritrocitos (Adsule y col., 1989). En las habas, toda la actividad de hemaglutinación parece estar ligada a los cotiledones y sus extractos aglutinan glóbulos rojos tanto de animales como de humanos (Marquart y col. 1975; Jaffé, 1980).

Las técnicas más utilizadas para la determinación de lectinas en muestras vegetales, son aquellas semicuantitativas como el test de hemaglutinación, o las cuantitativas basadas en métodos inmunoenzimáticos (ELISA).

Saponinas

Las saponinas se encuentran en las partes vegetativas y semillas de algunas leguminosas, donde actúan como metabolitos secundarios. Su estructura se caracteriza por la presencia de un grupo esteroídico o triterpénico, ligado a una o más moléculas de mono- y oligosacáridos, formando así los glicósidos de sapogenina esteroídicos o triterpénicos (Fenwick y Oakenfull, 1983; Kadam y col., 1989). El contenido en saponinas localizado en las habas es aproximadamente de 13 mg/g (Sharma y Sehgal, 1992; Saharan y col., 2002).

El consumo de leguminosas con elevadas concentraciones de saponinas es bajo, porque son sustancias amargas y astringentes. Además tienen propiedades detergentes, pudiendo interactuar con las membranas produciendo cambios de permeabilidad (Thompson, 1993).

Cuando estos compuestos se administran por vía intravenosa producen inflamación local, pero pueden llegar a provocar la muerte del individuo, debido a la masiva rotura de los eritrocitos. Sin embargo, la toxicidad es menor cuando se administran por vía oral, y esto se debe por una parte, a la dificultad para atravesar el intestino y penetrar en el torrente sanguíneo y por otra, a que el efecto hemolítico en el intestino es mucho menor que en plasma. Por tanto, la ingesta de elevadas cantidades puede causar irritación en el epitelio intestinal, pero si acceden al torrente circulatorio a través de lesiones, pueden producir daño hepático, hemólisis, fallo respiratorio y coma. Las saponinas también son capaces de

hidrolizar otras células, como aquellas de la mucosa intestinal, interfiriendo con la absorción de nutrientes. Además, inhiben enzimas metabólicos y digestivos como proteasas, amilasas o lipasas (Cheeke, 1976; Birk y Peri, 1980; Price y col., 1987; Thompson, 1993).

Pequeñas concentraciones de saponinas absorbidas por el intestino, ejercen un efecto positivo sobre el tracto gastrointestinal. Se les atribuye una función protectora frente al cáncer de estómago e intestino, también poseen propiedades antiinflamatorias y tienen influencia sobre factores inmunitarios haciendo que se produzcan más anticuerpos. Además, son capaces de unirse al colesterol alimentario en el intestino e impedir así que pueda llegar al torrente sanguíneo. Pueden captar ácidos biliares y facilitar su eliminación del organismo, esto implica que el hígado debe producir nuevos ácidos biliares a partir del colesterol presente en sangre, por lo que disminuye su concentración a nivel plasmático. Muchas saponinas inhiben el crecimiento y la esporulación de un amplio rango de hongos patógenos y algunas son muy tóxicas para los invertebrados causantes de plagas, siendo por tanto, factores de resistencia con los que la planta se protege de infecciones (Birk y Peri, 1980; Oakenfull y Topping, 1983; Price y col., 1987; Thompson, 1993).

Para la determinación de saponinas en material vegetal, se han utilizado diferentes técnicas como la gravimetría, los bioensayos o la espectrofotometría. Pero estos procedimientos no tienen la suficiente especificidad y selectividad, por lo que se utiliza el término “saponina” cuando se hace referencia a mezclas de sustancias cuya composición y pureza no están completamente definidas.

La cromatografía en capa fina, cromatografía de gases y cromatografía líquida de alta resolución, son las técnicas más adecuadas para su detección y cuantificación, si se dispone de los patrones específicos de la saponina que se quiere analizar.

El uso de la espectrometría de masas con bombardeo de átomos rápidos es quizá uno de los mejores procedimientos para analizar muestras cuando no se dispone de patrones, facilitando información sobre la estructura química de la saponina en estudio (Price y col., 1988; Ayet y col., 1996).

5. TÉCNICAS DE PROCESADO

La presencia de factores no-nutritivos en leguminosas y la limitación de su uso en alimentación tanto humana como animal, ha llevado a la aplicación de toda una serie de técnicas encaminadas a reducir estos compuestos y a incrementar la calidad y el valor nutritivo de la semilla. A continuación se describen algunos de los tratamientos más utilizados, que en algunos casos se combinan con el fin de potenciar su efecto.

5.1. DESCASCARILLADO

Es un tratamiento físico basado en la separación de la cascarilla del resto de la semilla, con el que se consigue eliminar al menos una parte de los compuestos no deseables. Es un procesado que constituye en muchos casos un paso previo a la cocción y puede realizarse en seco o después del remojo.

Estudios llevados a cabo en *V. faba*, han demostrado que el contenido de α -galactósidos, vicina, convicina, inositoles fosfato, inhibidores de proteasas y lectinas, es muy bajo o incluso nulo en cascarilla, por lo que esta práctica no es efectiva. Por el contrario, los taninos condensados se localizan en esta cubierta, por lo que el descascarillado es una técnica adecuada para la eliminación de estos compuestos polifenólicos (Deshpande y col., 1982; Beal y Mehta, 1985; Kadam y Salunkhe, 1989; Urdaneta y col., 2004).

5.2. REMOJO

El remojo de las semillas de leguminosas, generalmente constituye un paso previo al uso de otros procesados como la cocción o germinación. Sin embargo, en sí mismo es un método de reducción de ciertos componentes solubles en agua como oligosacáridos de rafinosa, glucósidos pirimidínicos, saponinas, inositoles fosfato, inhibidores de proteasas, lectinas o taninos, que pasan al agua de remojo. Aunque en ocasiones, la cascarilla gruesa y fuerte de algunas leguminosas, evita la difusión de estos compuestos. El grado de eliminación de factores no-nutritivos depende de la temperatura de remojo, del pH del medio, del tipo de legumbre y de las propiedades de solubilidad de los componentes (Kakade y Evans, 1966; Khokhar y Chauhan, 1986; Sathe y Salunkhe, 1989; Moneam, 1990; Revilla y col. 1990; Abdel-Gawad, 1993; Vijayakumari y col., 1996; Jamalian, 1999; Farran y col., 2002).

La reducción de factores no-nutritivos mediante remojo, suele ir acompañada de una pérdida de nutrientes como proteínas y vitaminas solubles en este medio (Sathe y Salunkhe, 1989).

5.3. TRATAMIENTOS TÉRMICOS

Los procesos tecnológicos en los que se utiliza calor para reducir compuestos no-nutritivos de semillas de leguminosas están muy extendidos. Podemos destacar la cocción, que puede realizarse a presión atmosférica mediante hervido, o bien a alta presión y temperatura. Otros procesados son el tostado, la fritura, la extrusión o los tratamientos con microondas.

A pesar de que las altas temperaturas inactivan ciertos factores no-nutritivos, un excesivo calentamiento puede destruir aminoácidos esenciales o vitaminas, también puede causar daños irreversibles a proteínas, disminuyendo así la calidad proteica y perdiéndose la solubilidad de la proteína, y puede incluso facilitar interacciones entre nutrientes, reduciéndose la calidad nutritiva de la semilla (Sathe y Salunkhe, 1989).

En algunos de los ensayos realizados con temperaturas elevadas, los oligosacáridos de la rafinosa acumulados en las legumbres se han reducido por hidrólisis. Sin embargo, en otros trabajos se ha incrementado su contenido, debido a la modificación de la microestructura celular, que lleva a la liberación de los oligosacáridos que se encontraban unidos a proteínas y otras macromoléculas, o que formaban parte de polisacáridos de gran peso molecular (Rao y Belavady, 1978; Revilleza y col., 1990; Sánchez-Mata y col., 1999; Porzucek y col., 2002; Kadlec y col., 2004).

Debido a la naturaleza termolábil de las saponinas, su contenido se reduce con procesos en los que se utiliza calor (Khokhar y Chauhan, 1986).

Estos tratamientos no son los más apropiados para eliminar vicina y convicina, ya que para que sean efectivos hay que aplicar temperaturas muy elevadas, con las que se modifican las características organolépticas y se reduce el valor nutritivo de la semilla (Hegazy y Marquardt, 1983; Arbid y Marquardt, 1985).

Al inicio de un proceso térmico, las fitasas endógenas se incrementan e hidrolizan el ácido fítico, pero a medida que las temperaturas van ascendiendo, estas enzimas se desnaturalizan y la hidrólisis del IP6 ya se produce por las altas temperaturas (Maga, 1982; Beal y Metha, 1985; Greiner y Konietzny, 1998).

En algunos trabajos se han observado reducciones de taninos condensados tras un tratamiento por calor y en otros por el contrario, se ha detectado un incremento de los mismos (Adewusi y Falade, 1996; Chau y Cheung, 1997; Alonso y col., 2000; Marzo y col., 2004). El aumento podría estar causado por la modificación de la estructura celular, ya que los taninos se hacen más accesibles al análisis. Además, gracias a la liberación de los taninos que formaban complejos con proteínas y otros compuestos, disminuye su grado de polimerización (Fernández y col., 1993; Vidal-Valverde y col., 1994).

Los inhibidores de tripsina presentes en las semillas de leguminosas son proteínas que generalmente se inactivan con las altas temperaturas (Khokhar y Chauhan, 1986; Iyer y col., 1989; Fernández y col. 1993; Khalil y Mansour 1995; Elsheikh y col., 2000; Haddad y Allaf, 2004).

Los niveles de lectinas también suelen reducirse o incluso eliminarse con tratamientos térmicos (Bansal y col., 1988; Savelkoul y col., 1992; Carvalho y Sgarbieri, 1997; Alonso y col., 2000).

5.4. FERMENTACIÓN

La fermentación es una de las técnicas de procesado más antigua y económica, con la que podemos incrementar la calidad nutritiva de las leguminosas, siendo especialmente útil en semillas duras o con alto contenido tóxico. Este procesado lo llevan a cabo microorganismos, y se producen cambios de naturaleza catabólica como la hidrólisis de proteínas o carbohidratos. Se utiliza para la eliminación parcial o total de factores no-nutritivos como oligosacáridos de la familia de la rafinosa, que se hidrolizan en presencia de α -galactosidasas tanto endógenas como de los microorganismos responsables de la fermentación (Sathe y Salunkhe, 1989; García y Mendoza, 1992; Chitra y col., 1996; Czukor y col., 2000; Frías y col., 1996b, 2004).

El contenido en ácido fítico disminuye debido a la producción de ácido láctico y otros ácidos orgánicos que reducen el pH, y debido a la activación de fitasas de la propia leguminosa y de los microorganismos causantes de la fermentación (Sathe y Salunkhe, 1989; Sandberg, 1994; Yadav y Khetarpaul, 1994).

Los polifenoles se reducen por causa de la actividad de las polifenol oxidasas presentes en la legumbre y en la microflora (Yadav y Khetarpaul, 1994). También se incrementa el contenido en catequinas, debido a la reducción del grado de polimerización de los taninos condensados (Tabera y col., 1995).

Los inhibidores de tripsina (Vidal-Valverde, 1993; Tabera y col., 1995) y las lectinas (Reddy y Salunkhe, 1989) son otros compuestos indeseables que se reduce con la fermentación.

Por el contrario, las vitaminas hidrosolubles como tiamina, niacina o riboflavina se incrementan con la fermentación (Vidal-Valverde, 1993; Prodanov y col., 1997).

5.5. GERMINACIÓN

5.5.1. PROCESO DE GERMINACIÓN

El proceso de germinación puede abarcar diferentes periodos, de manera que quedaría definido como:

a) aquel periodo que comienza con la imbibición de la semilla seca y que concluye con la elongación del eje embrionario. La señal visible que indica el final de la germinación, es la emergencia de la radícula y los procesos que ocurren posteriormente, incluida la movilización de las sustancias de reserva, están relacionados con el crecimiento de la plántula (Bewley, 1997).

b) el conjunto de cambios metabólicos y morfogénéticos que se producen en la semilla y que tienen como resultado la transformación de un embrión en una plántula capaz de valerse por sí misma y finalmente convertirse en una planta adulta (ISTA, 1999). Esta definición de germinación es la que se adopta en esta Memoria.

Para que la germinación tenga lugar, es necesario que se den una serie de condiciones ambientales favorables como son: un sustrato húmedo, suficiente disponibilidad de oxígeno que permita la respiración aerobia y una temperatura adecuada para los distintos procesos metabólicos y para el desarrollo de la plántula. Sin embargo, hay ocasiones en las que la semilla es incapaz de germinar a pesar de que las condiciones para ello sean las adecuadas, debido a que se encuentra en estado de latencia o dormición.

Este proceso de germinación consta de tres fases que quedan representadas en la Figura 27 y que a continuación se describen (Opik y Simon, 1963; García-Agustín y Primo-Millo, 1993; Barceló y col., 2001).

Fase de hidratación: es el periodo durante el cual la semilla embebe agua, provocando el hinchamiento de la misma y el aumento de su peso fresco. Esta rápida absorción de agua va acompañada de un aumento proporcional de la respiración.

Fase de germinación: una vez que el agua atraviesa las envueltas seminales y llega al embrión en cantidad suficiente, éste se activa y comienzan los procesos metabólicos necesarios para su crecimiento y transformación en una planta autónoma. En esta fase, la toma de agua y de oxígeno se reduce considerablemente, llegando incluso a detenerse.

Fase de crecimiento: se asocia a la emergencia de la radícula (cambio morfológico visible), movilización de las reservas y desarrollo de la plántula. Durante este periodo vuelve a incrementarse la absorción de agua, así como la actividad respiratoria.

La duración de cada fase depende de ciertas propiedades de la semilla, como su contenido en compuestos hidratables y la permeabilidad de las cubiertas al agua y al oxígeno. Pero en estas fases, también intervienen las condiciones del medio, el nivel de humedad, las características y composición del sustrato, la temperatura, etc.

Otro aspecto interesante, es la relación de estas fases con el metabolismo de la semilla, de manera que, la primera fase se produce tanto en semillas vivas como muertas, pero la segunda y tercera sólo se produce en aquellas semillas viables.

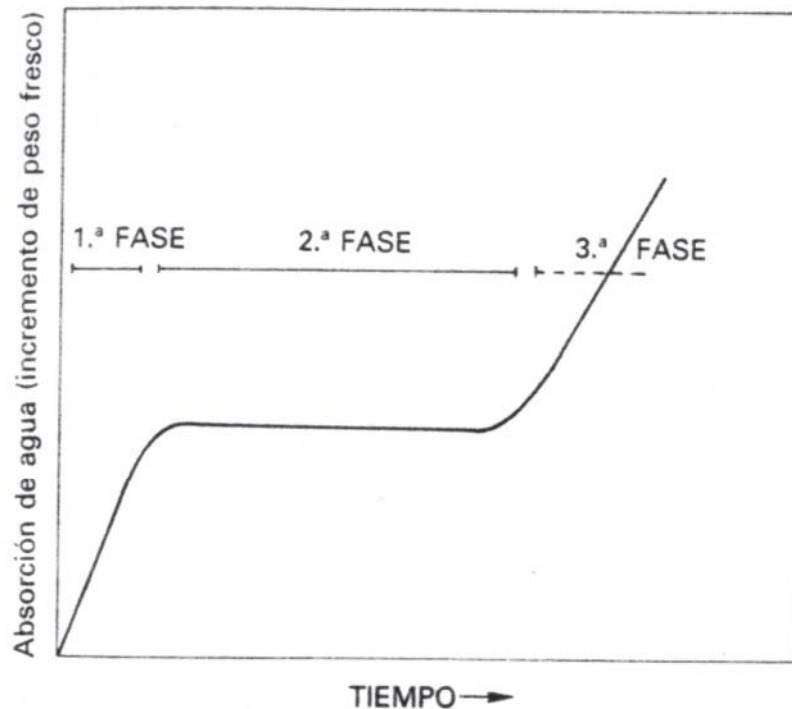


Figura 27.- Fases de la imbibición de agua por una semilla madura, medidas a través del incremento de peso fresco durante el proceso de germinación.

Los principales procesos metabólicos relacionados con la germinación son la respiración y la movilización de sustancias de reserva (Opik y Simon, 1963; de la Cuadra, 1993; García-Agustín y Primo-Millo, 1993; Barceló y col., 2001).

1) Respiración

Como queda reflejado en la Figura 28, el proceso respiratorio de la semilla puede dividirse en cuatro fases:

Fase I: se caracteriza por el rápido incremento de la respiración, que suele producirse antes de transcurridas 12 h desde el inicio de la imbibición y puede atribuirse en parte a la activación e hidratación de enzimas mitocondriales. El aumento de la actividad respiratoria es proporcional al incremento de la hidratación de los tejidos de la semilla.

Fase II: la actividad respiratoria se estabiliza entre las 12 y 24 h desde el inicio de la imbibición, y esto es debido en parte a que las cubiertas seminales, que todavía permanecen

intactas, limitan la entrada de O_2 . Durante esta fase, la hidratación de la semilla se ha completado y todos los enzimas preexistentes se han activado. Además, probablemente se ha producido un ligero ascenso en enzimas respiratorias o en el número de mitocondrias.

Fase III: aquí se produce un segundo incremento en la actividad respiratoria, que se asocia a la mayor disponibilidad de O_2 como consecuencia de la ruptura de la testa, producida por la emergencia de la radícula. Otro factor que contribuye a ese aumento, es la actividad de las mitocondrias y enzimas respiratorias, recientemente sintetizadas en las células del eje embrionario en desarrollo. El número de mitocondrias en cotiledones también aumenta, frecuentemente en asociación con la movilización de los compuestos de reserva.

Fase IV: en esta última fase tiene lugar una acusada disminución de la respiración, producida por la desintegración de los cotiledones una vez exportadas las reservas almacenadas.

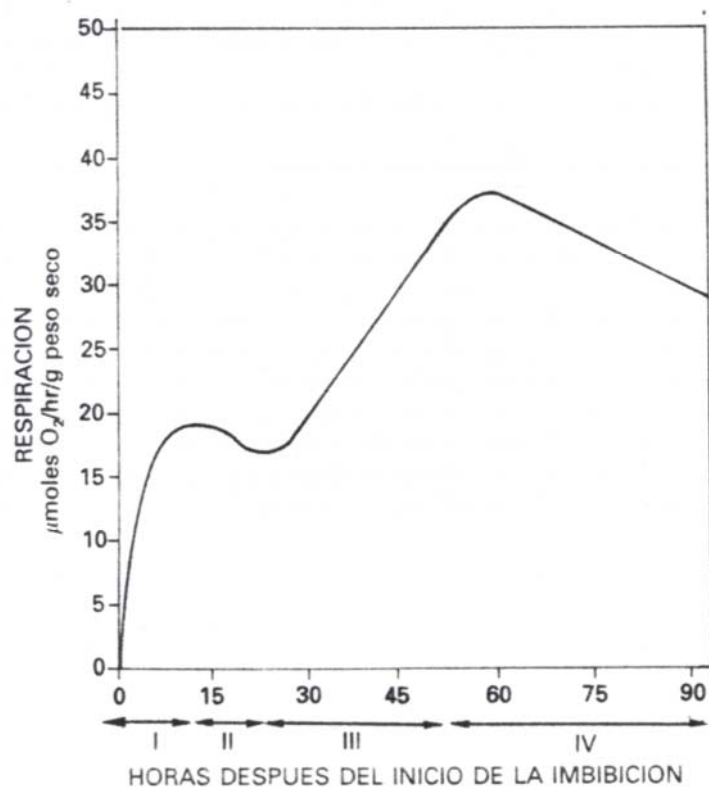


Figura 28.- Evolución de la actividad respiratoria durante la germinación de la semilla.

2) Movilización de sustancias de reserva

Los cotiledones contienen importantes cantidades de compuestos de reserva (proteínas, carbohidratos, lípidos y compuestos inorgánicos) necesarios para el desarrollo de la plántula, hasta que es capaz de alimentarse por sí misma.

Cuando la semilla se encuentra lo suficientemente hidratada, se activa la síntesis proteica, formándose entre otras proteínas, enzimas digestivas que hidrolizan parte de las sustancias de reserva. En algunas ocasiones, los productos de la hidrólisis sufren una serie de transformaciones metabólicas antes de ser transportados desde los cotiledones al eje embrionario en desarrollo.

El eje embrionario utiliza los nutrientes digeridos y absorbidos desde los cotiledones para su respiración, elongación y división celular. Durante la elongación celular se observa cómo este eje se va abultando hasta que uno de los extremos rompe las envueltas seminales. El extremo del eje embrionario que aparece primero es el lado libre del hipocotilo, denominado radícula, que dará lugar a la raíz principal. Posteriormente aparece el otro extremo del eje o epicotilo que formará el primer brote.

La germinación continúa con el desarrollo del eje embrionario para formar su radícula y su primer brote, pero aún se alimenta de las reservas nutritivas de los cotiledones.

A continuación se transforma en una plántula, que rápidamente formará las primeras hojas que podrán realizar la función clorofílica y en la raíz desarrollará pelos absorbentes a través de los cuales tomará del suelo agua con sales minerales disueltas.

El proceso de germinación finaliza con la formación de la planta joven, que es aquella capaz de vivir totalmente independiente de la semilla, por lo que los restos de las cubiertas seminales y cotiledones se pudren y desaparecen (Figuras 3 y 5).

5.5.2. EFECTO DE LA GERMINACIÓN SOBRE LA CALIDAD NUTRITIVA

La germinación es una técnica de procesado de bajo coste, muy útil para incrementar el valor nutritivo de las semillas de leguminosas, ya que se consigue aumentar la digestibilidad de la proteína y de los hidratos de carbono, y el contenido en algunas vitaminas (riboflavina, niacina, ácido ascórbico), además de reducirse o incluso eliminarse factores no-nutritivos. Generalmente, estos factores suelen formar parte de las sustancias de reserva de la semilla y durante el proceso de germinación van siendo degradados y utilizados en el desarrollo de la plántula (Sathe y Salunkhe, 1989; Ghorpade y Kadam, 1989;

Savage y Thompson, 1993; Frías y col., 1995; Khalil y Mansour, 1995; Chitra y col., 1996; Czukur y col., 2000; Vidal-Valverde y col., 2002).

Los carbohidratos presentes en la semilla se hidrolizan durante la germinación, proporcionando la energía necesaria para la síntesis de proteínas, que serán utilizadas en el crecimiento de la planta (Adjei-Twum y Splittstoesser, 1976; Bau y col., 1997). Durante este periodo, aumenta la digestibilidad del almidón y por tanto el contenido en monosacáridos, debido a la mayor actividad de las α -amilasas y fosforilasas responsables de la hidrólisis de este polisacárido de reserva, y también por la reducción de factores no-nutritivos como ácido fítico, taninos condensados, lectinas o saponinas, que inhiben α -amilasas (Thompson y Yoon, 1984; Ghorpade y Kadam, 1989; Thompson, 1993; Alonso y col., 2000; Saharan y col., 2002). Además, se incrementan las α -galactosidasas encargadas de hidrolizar los oligosacáridos de la familia de la rafinosa a azúcares de menor tamaño, necesarios para el desarrollo de la planta (Czukur y col., 2000). En el caso de los glucósidos pirimidínicos vicina y convicina, generalmente las reducciones son pequeñas (Hegazy y Marquardt, 1983; Griffiths y Ramsay, 1996; Jamalian, 1999).

Las lipasas aumentan gradualmente a lo largo de la germinación provocando la hidrólisis de los lípidos, que son utilizados como fuente de energía para la síntesis de proteínas durante el desarrollo de la planta (Adjei-Twum y Splittstoesser, 1976; García-Agustín y Primo-Millo, 1993; Bau y col., 1997).

Como acabamos de señalar, con la degradación de lípidos y carbohidratos se produce la energía necesaria para sintetizar proteínas durante la germinación, por lo que éstas últimas aumentan ligeramente. Pero a su vez, la digestibilidad proteica se incrementa y el contenido en aminoácidos libres también y esto se debe a la mayor actividad de las proteasas y a la reducción de factores no-nutritivos como el ácido fítico o los taninos condensados que interaccionan con proteínas, formando complejos menos susceptibles al ataque proteolítico (Briarty y col., 1970; Adjei-Twum y Splittstoesser, 1976; Ghorpade y Kadam, 1989; Bau y col., 1997; Alonso y col., 2000).

Este aumento de la digestibilidad de la proteína, también está relacionado con la reducción de inhibidores de proteasas (Khalil y Mansour, 1995; Chau y Cheung, 1997; Alonso y col., 2000). Incluso las lectinas y saponinas, que interfieren con la hidrólisis de proteínas, se reducen durante la germinación por degradación enzimática (Khokhar y Chauhan, 1986; Thompson y col., 1986; Savelkoul y col., 1992; Thompson, 1993; Bau y col., 1997; Saharan y col., 2002).

También durante este proceso, enzimas endógenas como polifenol oxidasas se activan y modifican la estructura química de los compuestos fenólicos, y en ocasiones las procianidinas y catequinas se condensan, incrementándose las formas polimerizadas (Bartolomé y col., 1997). Según algunos autores, el contenido en taninos condensados disminuye durante la germinación debido a su degradación enzimática (Rao y Deosthale, 1982; Khalil y Manssur, 1995; Chau y Cheung, 1997; Alonso y col., 2000), aunque otros han observado un incremento de los mismos, posiblemente por la modificación de la estructura celular o incluso por la liberación de su unión a proteínas y otras moléculas, facilitando su extracción y determinación (Vidal-Valverde y col., 1994).

La germinación no parece influir directamente sobre la composición mineral de la semilla, pero con el incremento de las fitasas endógenas que hidrolizan el ácido fítico, el fósforo que formaba parte de la molécula se libera y también aumenta la biodisponibilidad de otros minerales (Tabekhia y Luh, 1980; Ghorpade y Kadam, 1989; Skoglund y col., 1997; Greiner y Konietzny, 1998; Egli y col., 2002).

Respecto a las vitaminas del grupo B, se ha observado que con la germinación los niveles se incrementan del 100 al 300% (Ghorpade y Kadam, 1989).

6. VALORACIÓN NUTRITIVA DE LA PROTEÍNA

La calidad biológica de la proteína es uno de los aspectos determinantes del valor nutritivo de una materia prima. Por otra parte, la evaluación nutricional de una fuente proteica como las leguminosas, requiere conocer el funcionamiento del metabolismo proteico para poder valorar los distintos parámetros utilizados en dicha evaluación (productividad, utilización neta de la proteína, digestibilidad intestinal, etc.).

6.1. IMPORTANCIA DE LOS AMINOÁCIDOS EN LA CALIDAD DE LA PROTEÍNA

Se sabe que la capacidad que poseen las proteínas de mantener diversas respuestas fisiológicas, tales como el crecimiento de los animales, es muy variada. Esto ha llevado a desarrollar una serie de métodos encaminados a la determinación del valor nutritivo. La calidad de una proteína viene determinada en primer lugar por la concentración y proporción de los distintos aminoácidos que ésta posea. Los animales, a diferencia de las plantas y muchos microorganismos, carecen de la capacidad de sintetizar, a partir de compuestos nitrogenados simples como los nitratos, los aminoácidos necesarios para la síntesis proteica, por ello, precisan de una fuente alimentaria de aminoácidos. No todos los aminoácidos de las proteínas alimentarias tienen la misma importancia, muchos de ellos pueden sintetizarse

a partir de otros mediante procesos de transaminación, pero otros no. Clásicamente a estos últimos se les ha denominado aminoácidos esenciales, mientras que a los sintetizables a partir de otros se les denominó no-esenciales. Sin embargo, esta clasificación ha dado paso a una nomenclatura más apropiada y actual que los distribuiría en aminoácidos indispensables, cuando no pueden ser sintetizados *in vivo* por el animal, semidispensables, cuando se obtienen únicamente a partir de la modificación de un aminoácido indispensable, y dispensables cuando pueden sintetizarse *in vivo* a partir de otros (Eggum, 1989; Mercer y col., 1989; Friedman, 1996).

Por otra parte, hay que tener en cuenta que las proteínas corporales no se encuentran en un sistema estable, sino que están en continua síntesis y degradación en lo que se conoce como recambio o turnover proteico. De esta forma, cerca del 60-80% de las necesidades de síntesis proteica del organismo se ven mantenidas mediante los diferentes reservorios endógenos de proteína, mientras que el 20-40% restante debe obtenerse de la dieta (Rubio, 2000).

La proteína contenida en la dieta se utiliza en el mantenimiento de diversas funciones fisiológicas, aparte del crecimiento del organismo animal. Así, en animales jóvenes el uso de los aminoácidos de la dieta en funciones de mantenimiento, tales como la producción de energía, es baja frente a los mecanismos de síntesis de proteínas, necesarias para la construcción de estructuras corporales y enzimas metabólicas. Por el contrario, en animales adultos su uso en la producción es mínimo si se compara con las cantidades utilizadas en funciones de mantenimiento. Por consiguiente, los requerimientos en cuanto a las proporciones de aminoácidos necesarios van a ser diferentes dependiendo del estado fisiológico del animal o del tipo de producción a que esté destinado (Owens y Pettigrew, 1989).

También hay que tener en cuenta el equilibrio en la proporción de aminoácidos suministrados en la ración. El uso de raciones equilibradas en aminoácidos, dan lugar a un mejor rendimiento productivo en comparación con las desequilibradas con mayor contenido proteico, a pesar de superarse en ambos casos las necesidades en cuanto a aminoácidos limitantes (Wethli y col., 1975; D'Mello, 1994).

El desequilibrio parece afectar tanto a la ingesta total de alimento como a la eficiencia en la utilización de la proteína. Por tanto, el equilibrado aminoacídico de las raciones permite estudiar los efectos de la estructura y accesibilidad de las proteínas, y otros factores que afectan a la disponibilidad aminoacídica. La máxima utilización de la proteína no sólo depende de los aminoácidos indispensables, sino que también necesita de un aporte mínimo

de aminoácidos dispensables. Se ha sugerido que la proporción entre el nitrógeno procedente de aminoácidos indispensables con respecto al total debe estar cerca del 65%.

6.2. INCORPORACIÓN Y UTILIZACIÓN FISIOLÓGICA DE LAS PROTEÍNAS

Un prerrequisito esencial para la adecuada absorción de la proteína alimentaria, es su correcta digestión y absorción intestinal. En el estómago, la proteína es degradada por pepsinas en lo que es una hidrólisis limitada, pero gran parte de las proteínas llegan intactas al intestino delgado, donde se produce la principal hidrólisis enzimática al romperse las proteínas en péptidos pequeños. De manera que, cerca del 80% de los aminoácidos en la luz del yeyuno e ileon se encuentran en forma de estos pequeños péptidos. Finalmente, las aminopeptidasas producen en la luz intestinal una hidrólisis, generando así dipéptidos, tripéptidos y aminoácidos libres (Adibi y Mercer, 1973; Friedrich, 1989; Wapnir, 1990).

Los productos de la hidrólisis proteica pueden penetrar en las células del epitelio intestinal como aminoácidos libres o como pequeños péptidos. En ocasiones, principalmente en animales jóvenes, puede darse incluso una absorción de ciertas proteínas intactas. Existen distintas cinéticas de transporte que permiten la entrada de los aminoácidos libres en los enterocitos, por lo que su absorción podrá ser rápida, como en el caso de la metionina, o lenta, como ocurre con la arginina (Stevens y col., 1984; Friedrich, 1989). Los sistemas de transporte de dipéptidos y otros pequeños péptidos parecen ser independientes del transporte de los aminoácidos libres (Wapnir, 1990; Webb, 1990). La posible existencia de oligopéptidos resistentes a la digestión con capacidad de ser absorbidos por las células intestinales, serían responsables de que al menos un 10% de los aminoácidos pasaran al torrente sanguíneo tras la absorción de di- y tripéptidos (Friedrich, 1989). Finalmente, una pequeña proporción entraría como proteínas de gran tamaño. El tracto gastrointestinal en los animales adultos es una eficaz barrera selectiva contra el paso de macromoléculas, sin embargo, durante los primeros meses de vida del animal, principalmente durante la lactancia, la inmadurez del tracto, junto con la de las enzimas digestivas, permite el paso de una importante cantidad de proteínas. Esto es vital para el desarrollo y mantenimiento del sistema inmune durante este periodo (Wapnir, 1990).

El intercambio diario de la proteína corporal excede en más de cinco veces la ingesta de proteína y esto significa, que la síntesis de proteína se sustenta con el reciclaje de las proteínas corporales. Esta reutilización de aminoácidos implica un intercambio de los mismos entre los diferentes tejidos, en lo que sería una ruta de intercambio externa. También tendría lugar una reconversión de aminoácidos procedentes de las proteínas internas de la misma célula, orientada hacia una nueva síntesis proteica, en lo que constituiría un circuito interno. Este recambio es de carácter selectivo, por lo que las

proteínas son desmontadas a diferentes velocidades. La magnitud de la reutilización de los aminoácidos depende en gran medida de la ingesta de proteína, que lleva a cambios adaptativos en la síntesis proteica. Si el abastecimiento aminoacídico sobrepasa los requerimientos mínimos, la eficiencia en la utilización de los aminoácidos decrece, ya que el exceso de aminoácidos es desviado a procesos alternativos o son eliminados a través de las vías urinarias. Por el contrario, cuando el suministro de aminoácidos es inferior a los requerimientos óptimos, la eficiencia en su utilización aumenta considerablemente. Existen mecanismos fisiológicos, principalmente por modificaciones en las vías de degradación proteica, encaminados a mantener los niveles de determinados aminoácidos cuando su suministro es pobre. Sin embargo, la eficiencia en la reutilización de aminoácidos esenciales es distinta en función del aminoácido, y depende a su vez de factores metabólicos y hormonales del animal (Heger y Frydrych, 1989; Simon, 1990).

Durante el crecimiento rápido se aprecia una mayor eficiencia general y en este estado, la relación entre síntesis, degradación proteica y pérdida de nitrógeno debe estar desequilibrada hacia la primera, de forma que el organismo reciba más aminoácidos de los que pierde por oxidación. Al mismo tiempo, las tasas de síntesis deben superar a las de reciclaje (Simon, 1989).

6.3. EVALUACIÓN DE LA CALIDAD PROTEICA

Una vez visto el funcionamiento del metabolismo proteico, queda claro que para evaluar la eficiencia proteica de una dieta, el objetivo es estimar la calidad de proteína biológicamente utilizable.

Este valor nutricional de proteínas estructuralmente diferentes, va a depender de una serie de parámetros como son la proporción aminoacídica y sus posibles deficiencias, los coeficientes de aminoácidos esenciales, la susceptibilidad a la hidrólisis o los efectos de un posible procesado, entre otros.

Debido a la importancia que tiene la calidad proteica en nutrición, se han desarrollado distintos métodos para evaluar la capacidad de la proteína alimentaria para transformarse en proteína corporal, así como su capacidad para mantener tanto el crecimiento como otras funciones fisiológicas vitales para el animal.

La calidad proteica puede determinarse a través de métodos indirectos que se basan por ejemplo en el aumento de peso corporal o en el rendimiento productivo (peso corporal ganado respecto al peso de pienso ingerido). También puede analizarse mediante métodos directos basados en el estudio del balance de nitrógeno del organismo, digestibilidad de la

—
proteína, valor biológico, etc. Para ello, se registran las cantidades de nitrógeno ingeridas y se trata de determinar la proporción absorbida y retenida del mismo. No obstante, la determinación de estos parámetros está sometida a una serie de errores derivados de la dificultad de diferenciar la proporción real del nitrógeno perdido que se corresponde con nitrógeno no absorbido, del nitrógeno perdido de origen endógeno (Eggum, 1989; Friedman, 1996). Por tanto, la forma más adecuada de abordar el estudio de la calidad proteica con métodos directos, sería a través del uso de valores aparentes de incorporación y retención de nitrógeno, que pese a ser menos exactos, ya son tenidas en cuenta las posibles variaciones que el uso de diferentes dietas puede tener sobre las pérdidas endógenas de nitrógeno.

OBJETIVOS

II. OBJETIVOS

El objetivo general de esta Memoria es estudiar el efecto de la germinación sobre el contenido de los factores no-nutritivos en las semillas de *Vicia faba* L. var. Alameda y var. Brocal y conocer la influencia de la germinación sobre su valor nutritivo.

Para alcanzar este objetivo general se establecen los siguientes objetivos específicos:

- 1.- Estudio de la germinación en las semillas de *V. faba* var. Alameda y var. Brocal.
- 2.- Determinación del peso fresco y seco de las semillas y de las plántulas enteras de las variedades Alameda y Brocal y de sus partes constituyentes a lo largo de la germinación.
- 3.- Determinaciones analíticas de los factores no-nutritivos en *V. faba* var. Alameda y var. Brocal: α -galactósidos, vicina, convicina, L-DOPA, inositoles fosfato, taninos condensados e inhibidores de tripsina.
 - 3.1.- Estudio de los factores no-nutritivos en cotiledones, eje embrionario y cascarilla de las semillas maduras y secas sin germinar.
 - 3.2.- Estudio de los factores no-nutritivos en las distintas partes de las semillas y de las plántulas enteras durante la germinación.
- 4.- Estimación del valor nutritivo de las semillas de *V. faba* var. Alameda, sin germinar y germinadas, en ratas macho en crecimiento.

*MATERIAL Y
MÉTODOS*

III. MATERIAL Y MÉTODOS

1. MATERIAL VEGETAL

Las semillas de *Vicia faba* L. var. Alameda y var. Brocal suministradas por el Centro de Investigación y Formación Agrario de Córdoba (CIFA), fueron utilizadas como material vegetal para la realización de los distintos ensayos de esta Memoria.

2. GERMINACIÓN DEL MATERIAL VEGETAL

Las semillas maduras y secas de las variedades Alameda y Brocal, se germinaron siguiendo las Normas Internacionales para el Ensayo de Semillas (ISTA, 1999).

- Los sustratos utilizados, según dichas normas, fueron el papel toalla (Albert 1516, 42x55 cm) y la arena de calibrado nº 5, libres de hongos, bacterias y sustancias tóxicas que pudieran interferir con el crecimiento y evaluación de las plántulas.

El papel toalla, presenta una textura adecuada para que no se introduzcan las raíces, sino que se desarrollen encima. Es resistente, con lo que se evita su rotura durante la manipulación y tiene la suficiente capacidad para retener el agua requerida durante el periodo de ensayo.

La arena de calibrado, posee espacios porosos para la aireación, imprescindible para la óptima germinación y crecimiento de la raíz. También tiene la capacidad de retener el agua necesaria para la germinación de las semillas.

- Las muestras de semillas se cogieron aleatoriamente y se eliminaron las impurezas.

- El agua que se utilizó fue destilada.

En este trabajo, se realizaron varios ensayos de germinación para llevar a cabo los diferentes objetivos planteados.

a) Para la elección del sustrato, se germinaron semillas de las variedades Alameda y Brocal en papel toalla y en arena de calibrado. El ensayo en papel se realizó con 60 semillas de cada variedad por bandeja (40x25 cm), colocadas entre dos pliegos de dicho papel, llevado previamente a saturación con agua destilada. Utilizando arena como sustrato, se germinaron 20 semillas de cada variedad por bandeja (32x20 cm) con arena y agua en proporción 5/1 (p/v). Las bandejas se introdujeron en una cámara de germinación durante 12 días en condiciones de 8 h de luz por día, 20°C de temperatura y humedad constante, de acuerdo con las Normas Internacionales para el Ensayo de Semillas (ISTA, 1999) y con los

ensayos previos realizados en nuestro laboratorio (Ayet y col., 1997). Los parámetros analizados para determinar el buen desarrollo de la plántula a lo largo de los 12 días de germinación, fueron la longitud del eje embrionario y el porcentaje de germinación (plántulas viables).

b) Para el estudio de los factores no-nutritivos, se colocaron 40 semillas de la var. Alameda o de la var. Brocal por bandeja (40x25 cm) y se germinaron en las condiciones anteriormente descritas. Las muestras se recogieron a las 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192 y 216 horas de incubación, y el ensayo se realizó por duplicado. Este material vegetal también fue utilizado para la determinación del peso fresco y seco (Figura 29).



Figura 29.- Germinación de semillas de *V. faba* durante 216 h en arena/agua 5/1 (p/v) en condiciones constantes de 8 h luz/día y 20°C.

Los diferentes estadios de germinación del haba observados a lo largo de las 216 h de ensayo se muestran en la Figura 30. Durante este proceso, no se produjo un desarrollo homogéneo de todas las plántulas, sino que se observaron variaciones individuales. Aunque en líneas generales, lo que se produjo durante las primeras 24 h, fue el engrosamiento de las semillas debido a la toma de agua por parte de las mismas. A las 48 h, se observó la emergencia de la radícula en la mayoría de las semillas y a continuación, el eje embrionario fue creciendo y transformándose en una plántula, a la vez que los cotiledones fueron reduciéndose. A las 120 h de ensayo, en muchas de las plántulas en desarrollo, apareció el primer par de hojas necesario para llevar a cabo la fotosíntesis. A las 168 h comenzaron a formarse las raíces secundarias y a las 216 h, éstas alcanzaron el suficiente tamaño como para absorber del suelo agua y sales minerales.

Para la realización de los análisis anteriormente mencionados, las semillas en germinación se separaron en: eje embrionario, par de cotiledones y cascarilla. Pero es importante aclarar, que aproximadamente a las 120 h de ensayo los ejes embrionarios ya se habían transformado en plántulas (Figura 30) y por lo tanto, a partir de ese momento sería más adecuado identificar a cada una de esas partes como: plántula, resto de cotiledones y cascarilla. Aunque para simplificar y facilitar la comunicación, en esta Memoria se mantuvo en todo momento la denominación de eje embrionario, tanto para dicho primordio, como para la plántula y para los estadios intermedios entre ambos. Además, al conjunto de eje embrionario, par de cotiledones y cascarilla, se le dio el nombre de semilla entera o de plántula entera, dependiendo de la fase de germinación a la que se estuviera haciendo referencia.

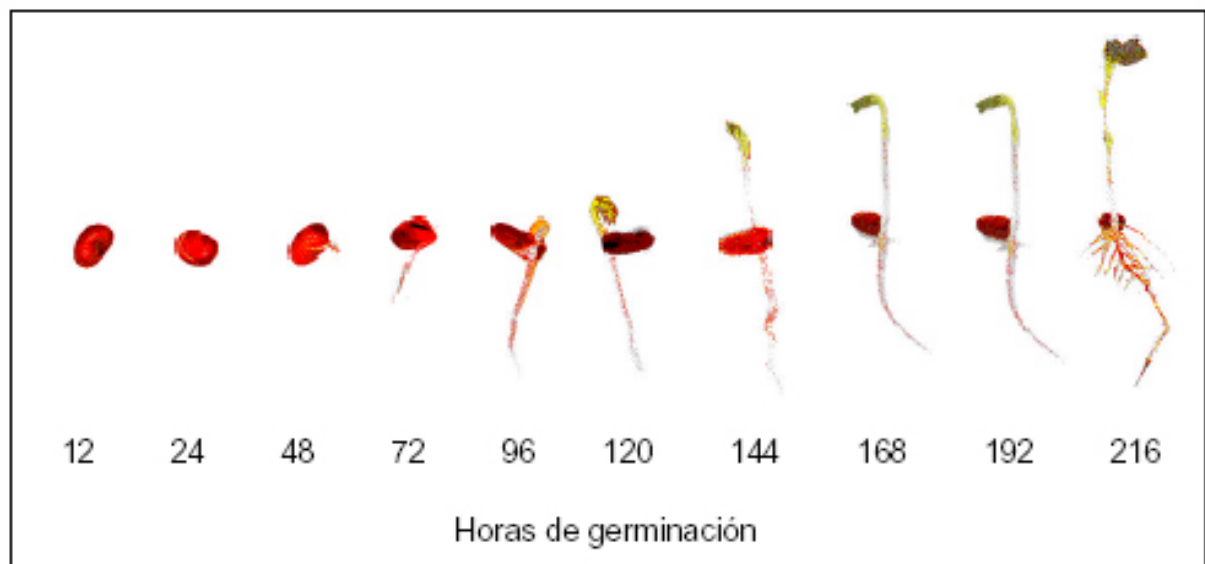


Figura 30.- Fases de germinación de la semilla de *V. faba* y crecimiento de la plántula a lo largo de 216 h de ensayo.

c) Para determinar el valor nutritivo de *V. faba* var. Alameda en ratas en crecimiento, se germinaron en arena 2 Kg de semillas en las mismas condiciones utilizadas anteriormente. La duración de este ensayo fue de 72 horas.

3. DETERMINACIÓN DEL PESO FRESCO Y SECO DEL MATERIAL VEGETAL

Para determinar el peso fresco de las variedades Alameda y Brocal, primero se pesaron individualmente las 40 semillas y plántulas enteras recogidas a lo largo de las 216 h de germinación. A continuación se dividieron en tres partes: par de cotiledones, eje embrionario y cascarilla, que se pesaron por separado.

Para la determinación del peso seco del material vegetal, se recopilaron por separado los cotiledones, los ejes embrionarios y las cascarillas, procedentes de las 40 semillas y plántulas enteras. Este material se congeló inmediatamente a -20°C, se liofilizó y se pesó.

4. DETERMINACIÓN DE FACTORES NO-NUTRITIVOS

Los cotiledones, ejes embrionarios y cascarillas de las semillas de *V. faba* var. Alameda y var. Brocal sin germinar (0 h) y germinadas en arena durante 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192 y 216 h, una vez liofilizadas, se molieron y tamizaron a través de una malla de 1 mm de luz (Ciclotec 1093 Sample Mill, Tecator, Suecia) para obtener una harina homogénea que fue conservada a 5°C en un desecador hasta su utilización.

Los compuestos no-nutritivos analizados en este material vegetal fueron: α -galactósidos, vicina, convicina, L-DOPA, inositoles fosfato, taninos condensados e inhibidores de tripsina.

4.1. DETERMINACIÓN DE MONO-, DI- Y OLIGOSACÁRIDOS

En las distintas partes de las semillas sin germinar y germinadas de las variedades Alameda y Brocal se analizaron además de los α -galactósidos como factores no-nutritivos, los monosacáridos y disacáridos, con el fin de realizar un análisis más completo de los azúcares solubles aquí presentes.

Extracción y purificación

La extracción de los azúcares solubles se realizó por duplicado para cada muestra, utilizando los métodos de Muzquiz y col. (1992) y Johansen y col. (1996) con algunas modificaciones.

Para llevar a cabo este procedimiento, a 0,1 g de harina se añadieron 5 mL de etanol acuoso al 50% (Panreac, España) y se homogeneizaron en frío durante 1 min en Ultra-turrax (T25 basic, IKA, Alemania). El extracto se centrifugó a 670 g durante 5 min (Sorvall Econospin, EEUU) y el sobrenadante se recogió por decantación y el precipitado fue reextraído dos veces más en las mismas condiciones. Se mezclaron los tres sobrenadantes, que contenían los azúcares solubles en etanol-agua, y se purificaron a través de una columna de fase reversa C₁₈ (fase apolar enlazada a sílice, 500mg/6mL, IST, Reino Unido) conectada a un sistema de vacío (Supelco, EEUU).

A continuación, esta columna se lavó con 3 mL de etanol acuoso al 50% y todo el filtrado recogido, se evaporó a sequedad en un concentrador de muestras (Uni Equip, Alemania). El residuo, con los correspondientes azúcares, se disolvió en 1 mL de agua ultrapura (bidestilada-desionizada, Milli-Q) y se centrifugó a 12.000 g durante 8 min (Sorvall Superspeed RC2-B, EEUU).

La solución se filtró (disco de filtración 0,45 µm, Millipore, Irlanda) para eliminar cualquier material en suspensión, ya que las muestras deben quedar libres de impurezas antes de ser inyectadas en el cromatógrafo, para evitar interferencias y el rápido deterioro de la columna (Figura 31).

Separación y cuantificación

La determinación de los mono-, di- y oligosacáridos se realizó de acuerdo con el método de Muzquiz y col. (1992) por cromatografía líquida de alta resolución, utilizando un cromatógrafo (Beckman System Gold, EEUU) equipado con dos bombas controladas automáticamente (Módulo 126), un inyector automático (508 autosampler) y un detector de índice de refracción (Módulo 156).

La fase móvil utilizada en condiciones isocráticas con un flujo de 1 mL/min, se componía de acetonitrilo/agua en proporción 75/25 (v/v) para cuantificar monosacáridos (fructosa, glucosa y galactosa), y de acetonitrilo/agua en proporción 60/40 (v/v) para valorar disacáridos (sacarosa y melibiosa) y α -galactósidos (rafinosa, ciceritol, estaquiosa, verbascosa y ajucosa). Esta fase móvil se desgasificó y se filtró a vacío a través de una membrana (0,45 µm, Sartorius, Alemania).

Como fase estacionaria se empleó una columna Spherisorb-S5-NH₂ (grupo aminopropilo ligado a sílice, 250 x 4,6 mm, Waters, España) equilibrada con la fase móvil correspondiente antes de comenzar el análisis. Se realizaron dos análisis cromatográficos de cada muestra y el volumen de inyección fue de 20 µL (Figura 31).

Preparación de patrones

Los hidratos de carbono presentes en la muestra se cuantificaron por comparación con patrones externos de fructosa (Merck, Alemania), glucosa (Merck, Alemania), galactosa (Fluka, Suiza), sacarosa (Serva, Alemania), melibiosa (Fluka, Suiza), rafinosa (Fluka, Suiza) y estaquiosa (Sigma, EEUU). La verbascosa y el ciceritol fueron purificados y cedidos por el profesor K. Gulewicz (Academia Polaca de Ciencias, Poznan, Polonia) y la ajucosa se determinó a través del factor respuesta de la verbascosa.

Las soluciones patrón se prepararon disolviendo los azúcares en agua ultrapura, y a cada solución se añadió un determinado volumen de acetonitrilo para obtener una composición similar a la de la fase móvil (75/25 v/v o 60/40 v/v).

En la Tabla 2 quedan definidos los rangos de concentración utilizados para realizar las correspondientes rectas de calibrado, donde "x" es el área del pico e "y" la concentración de cada azúcar (mg/mL).

Tabla 2.- Parámetros de calibración de los azúcares solubles analizados en *V. faba* var. Alameda y var. Brocal.

Azúcar	Ecuación de la recta	Coefficiente de Correlación (r)	Rango de Concentración (mg/mL)
Fructosa	$y = 0,1276 x + 0,0012$	0,9995	0,08 - 3,31
Glucosa	$y = 0,1541 x - 0,0190$	0,9994	0,09 - 3,58
Galactosa	$y = 0,2114 x + 0,0123$	0,9962	0,08 - 3,62
Sacarosa	$y = 0,1249 x + 0,0080$	0,9962	0,26 - 2,64
Melibiosa	$y = 0,1249 x + 0,0579$	0,9969	0,39 - 3,15
Rafinosa	$y = 0,1174 x + 0,0585$	0,9963	0,41 - 2,20
Ciceritol	$y = 0,1546 x + 0,0677$	0,9976	1,00 - 4,00
Estaquiosa	$y = 0,1380 x + 0,0768$	0,9962	0,48 - 2,60
Verbascosa	$y = 0,1625 x - 0,0551$	0,9989	0,12 - 2,79

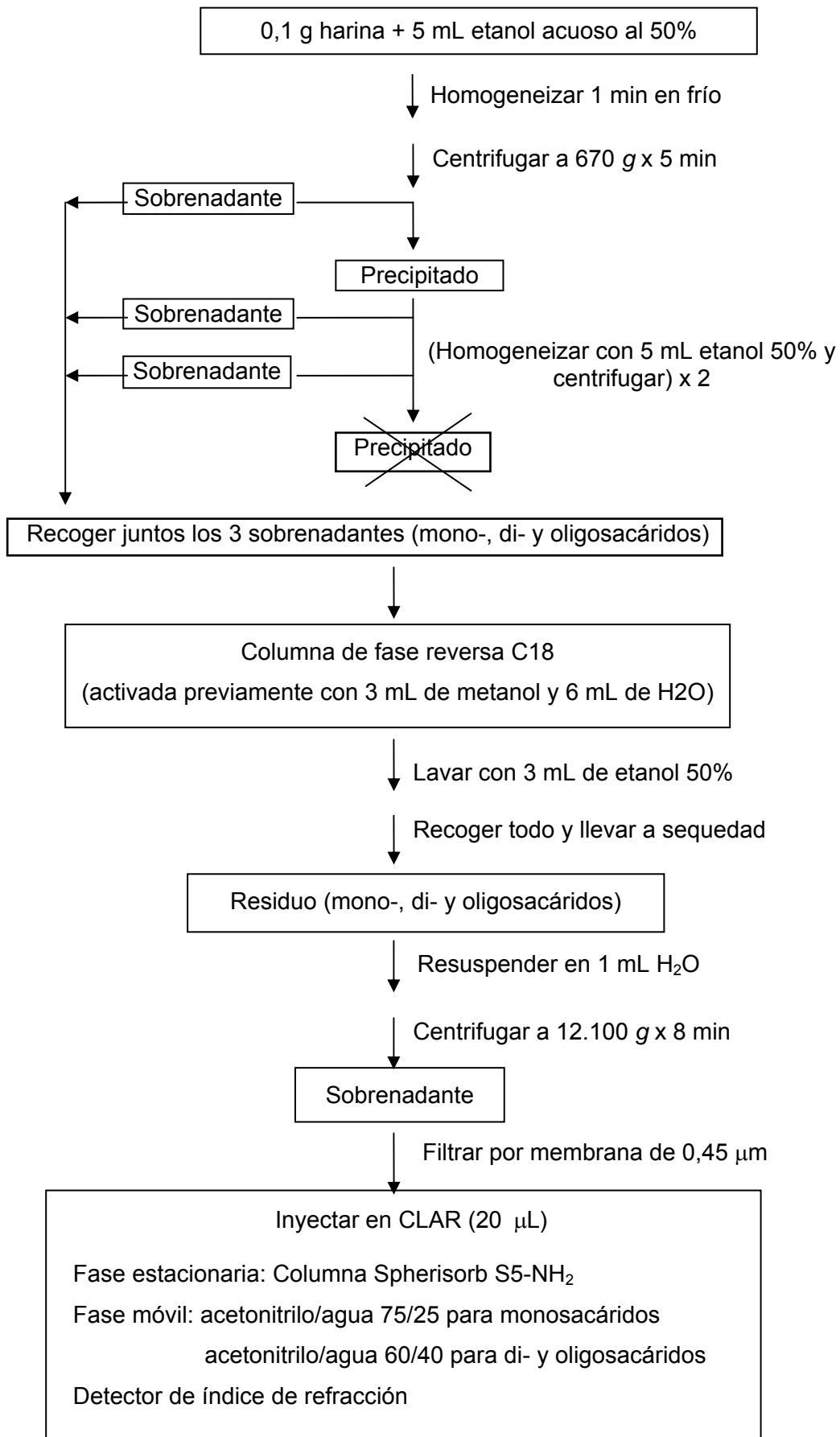


Figura 31.- Esquema de determinación de mono-, di- y oligosacáridos.

4.2. DETERMINACIÓN DE VICINA, CONVICINA Y L-DOPA

Los glucósidos pirimidínicos vicina y convicina, y el aminoácido no proteico L-DOPA, se valoraron en las diferentes partes de las semillas y plántulas de las dos variedades en estudio, siguiendo el método de Burbano y col. (1993), basado a su vez en el desarrollado por Marquardt y Fröhlich (1981).

Extracción

Para proceder a la extracción de los glucósidos pirimidínicos y de la L-DOPA, se tomaron 0,05 g de harina y se añadieron 5 mL de ácido perclórico al 5% (Scharlau, España), la mezcla se homogeniza durante 1 min en el Ultra-turrax (T25 basic, IKA, Alemania) y se centrifugó a 20.200 g durante 10 min (Sorvall Superspeed RC2-B, EEUU). A continuación, se recogió el sobrenadante y se filtró a través de una membrana (0,45 μm , Millipore, Irlanda). El filtrado se mantuvo en un baño de hielo hasta el momento de la inyección, para minimizar la posible hidrólisis de los glucósidos (Figura 32). La extracción de estos compuestos se realizó por duplicado para cada muestra.

Separación y cuantificación

La valoración de vicina, convicina y L-DOPA se realizó por cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa, utilizando un cromatógrafo (Beckman System Gold, EEUU) equipado con dos bombas controladas automáticamente (Módulo 126), un inyector manual y un detector UV-visible (Módulo 168).

Para obtener la fase móvil, se preparó inicialmente una solución de ácido fosfórico 0,5 M (Panreac, España) ajustada a pH 1,44 con hidróxido amónico (Baker, Holanda), que se mantuvo estable durante varias semanas a 2°C. Esta solución, se diluyó 10 veces con agua ultrapura y se filtró a vacío a través de una membrana (0,45 μm , Sartorius, Alemania), obteniéndose así una solución tampón de fosfato amónico 0,05 M a pH 2, estable durante una semana a 23°C, necesaria para la separación y resolución de los compuestos.

Como fase estacionaria se utilizó una columna de fase reversa C₁₈ (fase no polar enlazada a sílice, 5 μm , 250x4,6 mm, Teknokroma, España), y para evitar su rápido deterioro por causa del pH ácido de la fase móvil, una vez finalizado el análisis, se lavó con agua, a continuación con metanol/agua 70/30 (v/v) y cuando fue necesario con metanol al 100%. Al comienzo del análisis, se retiró el metanol haciendo pasar por la columna agua ultrapura y a continuación se equilibró con la fase móvil. Tomando estas precauciones, la columna puede utilizarse para más de 1000 muestras, durante un periodo de tiempo de unos 6 meses.

Cada muestra se analizó por duplicado, en condiciones isocráticas, con un flujo de fase móvil de 1,2 mL/min y un volumen de inyección de 20 μ L. La longitud de onda seleccionada en el detector para medir la absorbancia fue de 280 nm (Figura 32).

Preparación de patrones

La cuantificación de los compuestos se llevó a cabo con patrones de vicina y convicina purificados por Burbano (1990), bajo la dirección del profesor Marquardt (Universidad de Manitoba, Winnipeg, Canadá) y con patrones de L-DOPA comercial (Serva, Alemania).

Para la realización de las rectas de calibrado, se preparó una solución patrón disolviendo vicina, convicina y L-DOPA en agua ultrapura. Esta solución se mantiene estable durante una semana a 2°C.

A partir de la solución patrón se prepararon diluciones con ácido perclórico al 5%, consiguiendo que las condiciones de elución de los patrones fueran similares a las de las muestras. Las diluciones se mantienen estables durante 8 h en un baño de hielo.

Los compuestos fueron lineales en un rango de concentración de 0,009-0,310 mg/mL para vicina, de 0,004-0,134 mg/mL para convicina y de 0,047-0,567 mg/mL para L-DOPA, con coeficientes de correlación (r) de 0,999 para los tres compuestos (Figura 33).

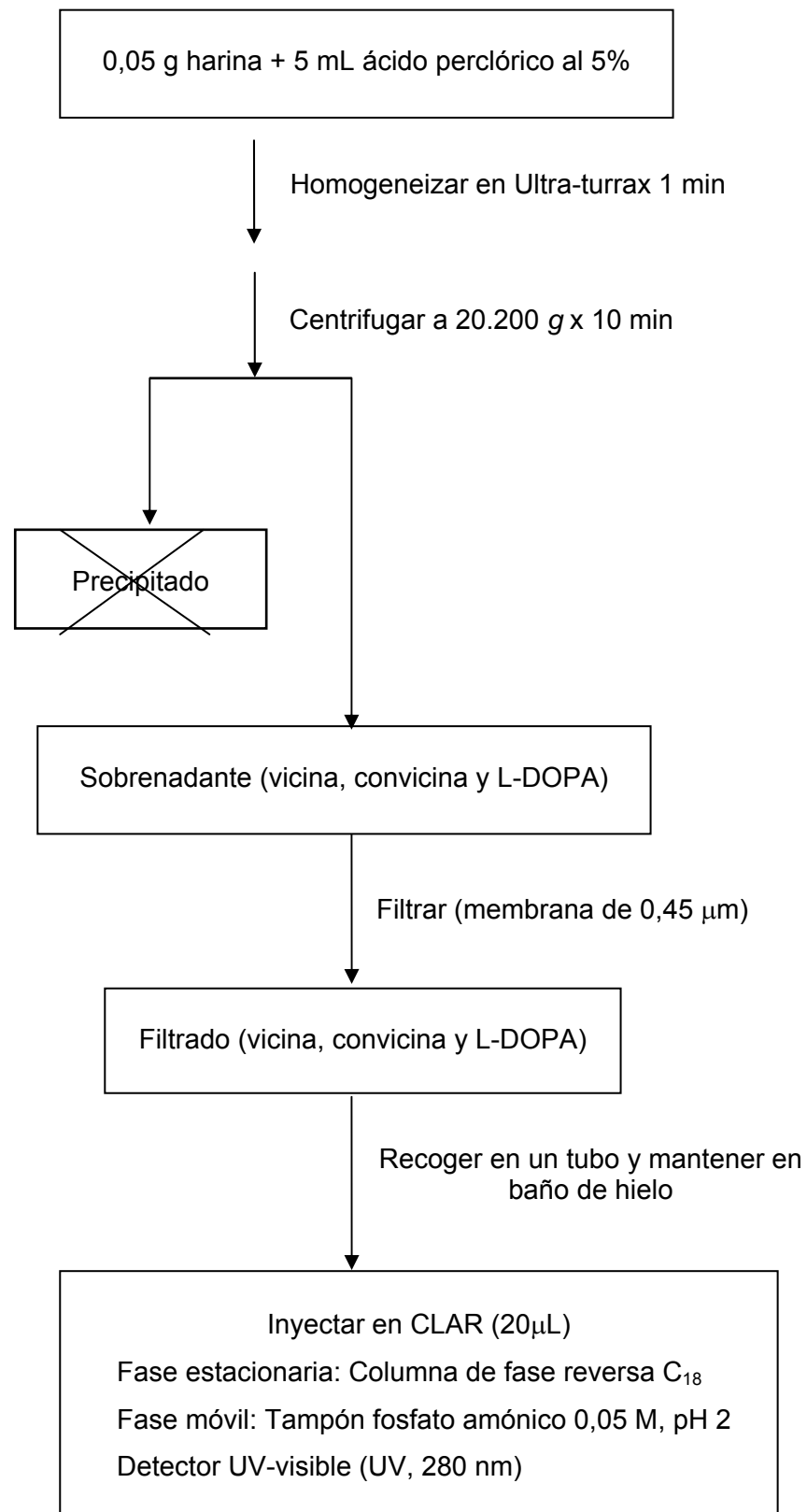


Figura 32.- Esquema de determinación de vicina, convicina y L-DOPA.

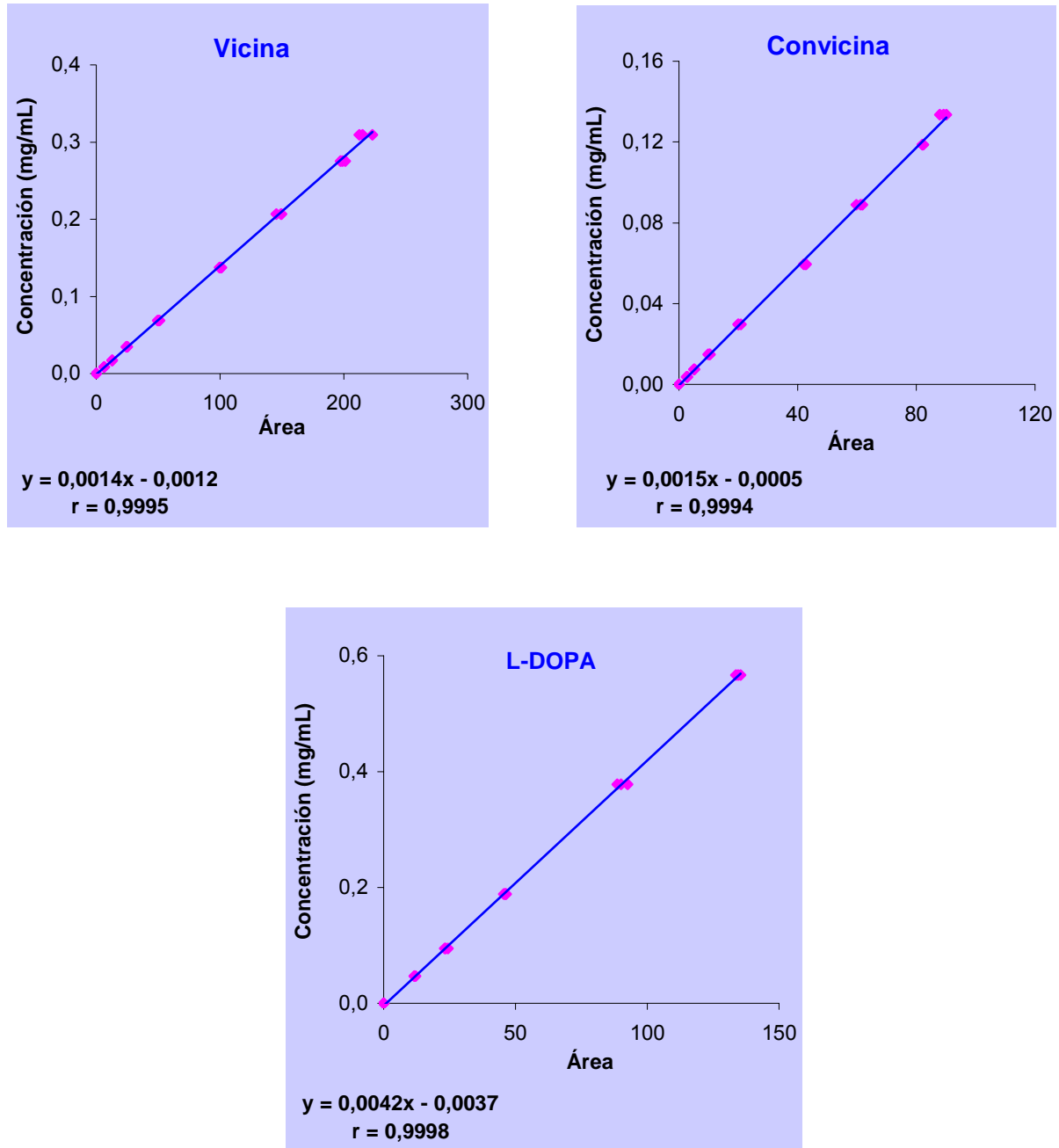


Figura 33.- Rectas de calibrado de vicina, convicina y L-DOPA.

4.3. DETERMINACIÓN DE INOSITOLES FOSFATO

Los inositoles fosfato: inositol trifosfato (IP3), inositol tetrafosfato (IP4), inositol pentafosfato (IP5) e inositol hexafosfato (IP6), se valoraron en las distintas partes de las semillas sin germinar y germinadas de Alameda y Brocal, siguiendo el método de Burbano y col. (1995a), basado a su vez en el de Lehrfeld (1994).

Extracción y purificación

Para poder llevar a cabo la extracción de estos compuestos, a 0,5 g de harina se añadieron 5 mL de HCl 0,5 M (Scharlau, España) y se homogeneizaron en frío durante 2 min en el Ultra-turrax (T25 basic, IKA, Alemania). El extracto obtenido se centrifugó a 27.000 g durante 15 min (Sorvall Superspeed RC2-B, EEUU) y 2,5 mL de sobrenadante se diluyó en 25 mL de agua ultrapura.

Los inositolos fosfato de esta solución se concentraron y purificaron a través de una columna de intercambio aniónico fuerte SAX (amina cuaternaria ligada a sílice, 500mg/3mL, Varian, EEUU) conectada a un sistema de vacío (Supelco, EEUU), y a continuación la columna se lavó con 2 mL de agua. Los inositolos fosfato retenidos en esta columna se eluyeron con 2 mL de HCl 2 M y el filtrado recogido se evaporó a sequedad en un concentrador de muestras (Uni Equip, Alemania).

El residuo obtenido se disolvió en 0,5 mL de una solución tampón preparada con: 100 mL de metanol acuoso al 51,5% (Panreac, España), 1,6 mL de hidróxido de tetrabutilamonio al 40% (TBNOH, Fluka, Suiza), 0,2 mL de ácido sulfúrico 5 M (Merck, Alemania) y 0,1 mL de ácido fórmico al 91% (Fluka, Suiza). La solución se centrifugó a 12.100 g durante 6 min (Sorvall Superspeed RC2-B, EEUU) para retirar las partículas en suspensión. La extracción de estos compuestos se realizó por duplicado para cada muestra (Figura 34).

Separación y cuantificación

La separación y cuantificación de IP3, IP4, IP5 e IP6 presentes en el extracto, se realizó mediante cromatografía líquida de alta resolución de fase iónica en columna de fase reversa, en un cromatógrafo (Beckman System Gold, EEUU) equipado con dos bombas controladas automáticamente (Módulo 126), un inyector automático (508 autosampler) y un detector de índice de refracción (Módulo 156).

Como fase estacionaria se utilizó una columna de fase reversa con relleno polimérico PRP-1 (5 μ m, 150x4,1 mm, Hamilton, EEUU) equilibrada con fase móvil durante 1 h y termostatizada a 45°C, para evitar variaciones en los tiempos de retención y en las áreas de los picos.

La fase móvil se preparó con metanol/agua en proporción 52/48 (v/v) desgasificando y filtrando a vacío (filtro de 0,45 μ m, Sartorius, Alemania) y añadiendo sucesivamente: 8 mL de TBNOH al 40% como reactivo del par iónico, 1 mL de ácido sulfúrico 5 M para acidificar, 0,5 mL de ácido fórmico al 91% y 0,2 mL de una solución de ácido fítico libre de impurezas. La solución

de ácido fítico se preparó con 83 mg de fitato sódico/5 mL de agua, lavándola a través de una minicolumna de 2,2 mL de resina de intercambio aniónico Dowex 50WX8H⁺ (Serva, Alemania) y enrasándola a 10 mL con agua ultrapura. El ácido fítico se añade para saturar la columna y así prevenir la adsorción de la muestra sobre el soporte metálico de la misma. El pH resultante de la fase móvil se ajustó a 4,3 con ácido sulfúrico con objeto de obtener una mejor resolución de los picos.

Los análisis cromatográficos de cada muestra se realizaron por duplicado y se llevaron a cabo en condiciones isocráticas con un flujo de fase móvil de 1,2 mL/min y un volumen de inyección de muestra de 10 µL (Figura 34).

Preparación de patrones

El patrón de calibración utilizado fue la sal sódica del ácido fítico, también denominada fitato sódico (Sigma, Alemania).

Para conocer los tiempos de retención de los inositoles tri-, tetra-, penta- y hexafosfato, se preparó una mezcla de los mismos, hidrolizando en autoclave una solución acuosa de fitato sódico (6 mg/mL) a 120°C durante 1 h.

Por Espectroscopía de Emisión de Plasma se determinó el fósforo presente en el fitato sódico, estimándose una relación de 0,87 g fitato sódico/g de polvo empleado.

La solución patrón se preparó disolviendo una cantidad de fitato sódico en agua ultrapura, equivalente a una concentración de 5 mg IP6/mL. La recta de calibrado se realizó a partir de diluciones acuosas de la solución patrón, con un rango de concentración de 0,13-5,0 mg IP6/mL, y el coeficiente de correlación fue de 0,9987. A partir de la recta de IP6, se obtuvieron las rectas de los derivados menos fosforilados IP5, IP4 e IP3, teniendo en cuenta los pesos moleculares de cada uno de ellos (Figura 35).

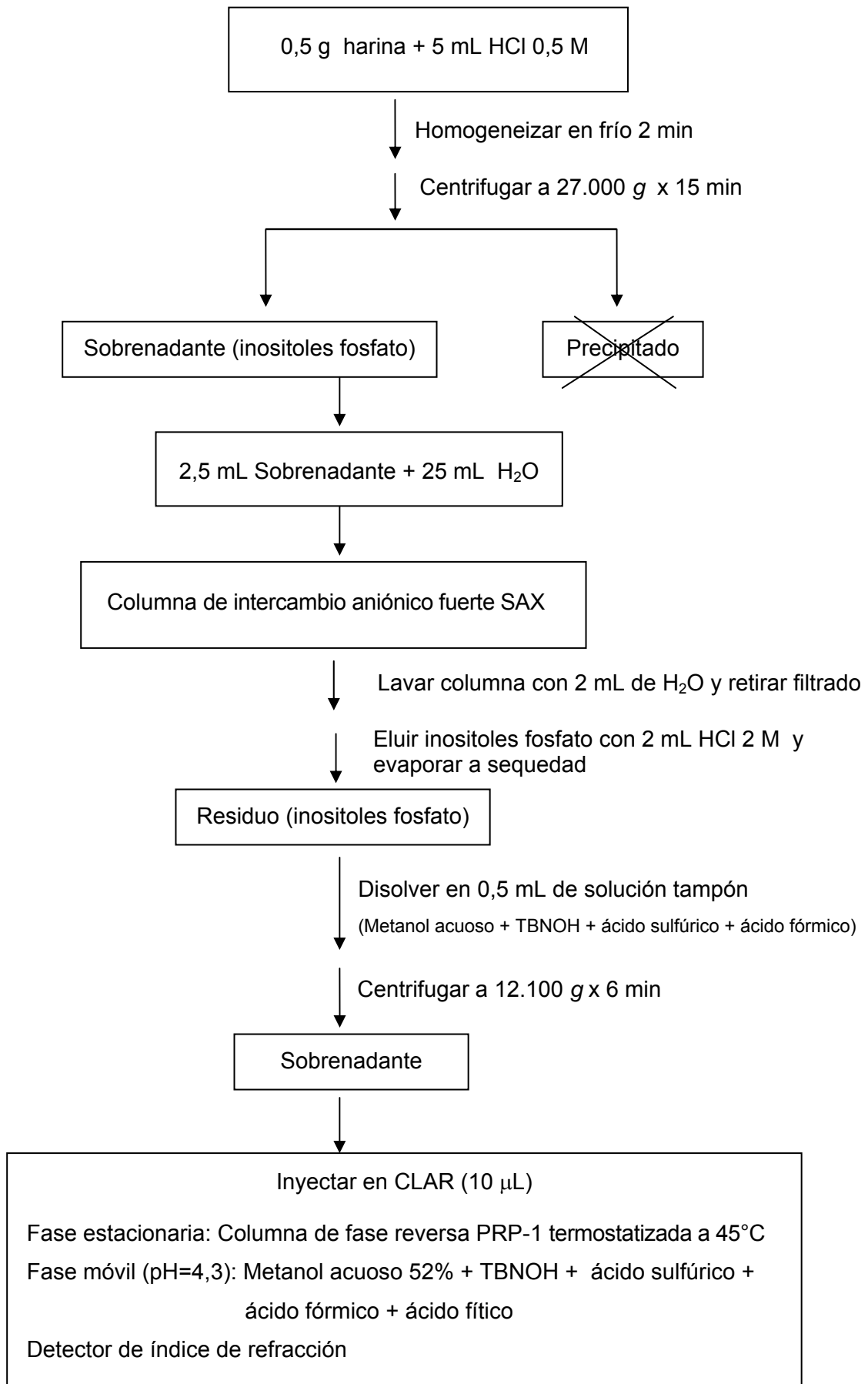


Figura 34.- Esquema de determinación de inositoles fosfato.

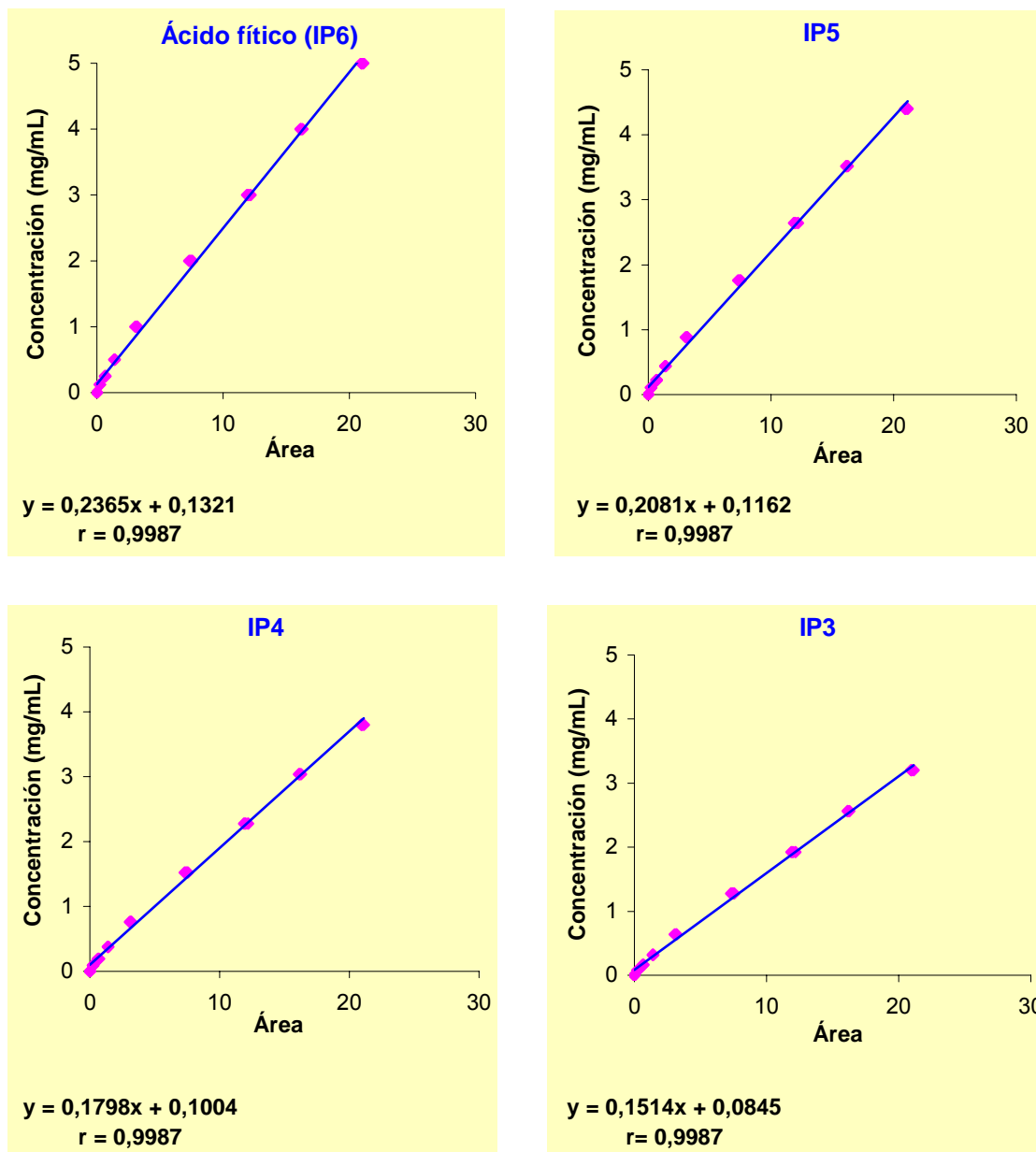


Figura 35.- Rectas de calibrado de IP6, IP5, IP4 e IP3.

4.4. DETERMINACIÓN DE TANINOS CONDENSADOS

En la semilla entera, los cotiledones y la cascarilla de *V. faba* var. Alameda y var. Brocal, se valoraron proantocianidinas siguiendo el método de Porter y col. (1986), con algunas modificaciones.

Extracción y purificación

La extracción de proantocianidinas se realizó por duplicado para cada muestra, y para ello a un matraz de fondo redondo se añadieron 0,05 g de harina y 20 mL de reactivo

de proantocianidinas. Este reactivo se preparó añadiendo 0,15 g de sulfato ferroso heptahidratado (Panreac, España) a 1 L de mezcla butanol/HCl (50/50, v/v). El sulfato ferroso se añade para acelerar la autooxidación y poder incrementar el color de la reacción. El matraz, al que se acopla un refrigerante, se introdujo en un baño de agua a 100°C durante 1 h y a continuación se enfrió. Su contenido se filtró, fue transferido a un matraz aforado y se llevó a un volumen final de 25 mL con el mismo reactivo de proantocianidinas (Figura 36). Durante este proceso, se produjo la despolimerización oxidativa de las proantocianidinas, liberándose antocianidinas.

Detección y cuantificación

La determinación de proantocianidinas se realizó a través de la absorbancia de las antocianidinas, en un espectrofotómetro (Beckman DU-7, EEUU) a una longitud de onda de 550 nm, frente a un blanco que contenía únicamente reactivo de proantocianidinas.

La lectura de cada muestra se realizó por duplicado y los valores de absorbancia obtenidos, se llevaron a una recta de calibrado donde el contenido de proantocianidinas se expresó como cloruro de cianidina (Figura 36).

Preparación de patrones

El patrón de calibración utilizado fue cloruro de cianidina (Extrasynthèse, Francia). A partir de una solución patrón de 20 mg cloruro de cianidina/L reactivo de proantocianidinas, se prepararon diluciones en un rango de concentración comprendido entre 5 y 20 mg/L.

A partir de las absorbancias de estas diluciones leídas a una λ de 550 nm, se obtuvo la correspondiente recta de calibrado (Figura 37), donde "x" es la absorbancia e "y" la concentración de cloruro de cianidina (mg/L). El coeficiente de correlación (r) obtenido fue de 0,9998.

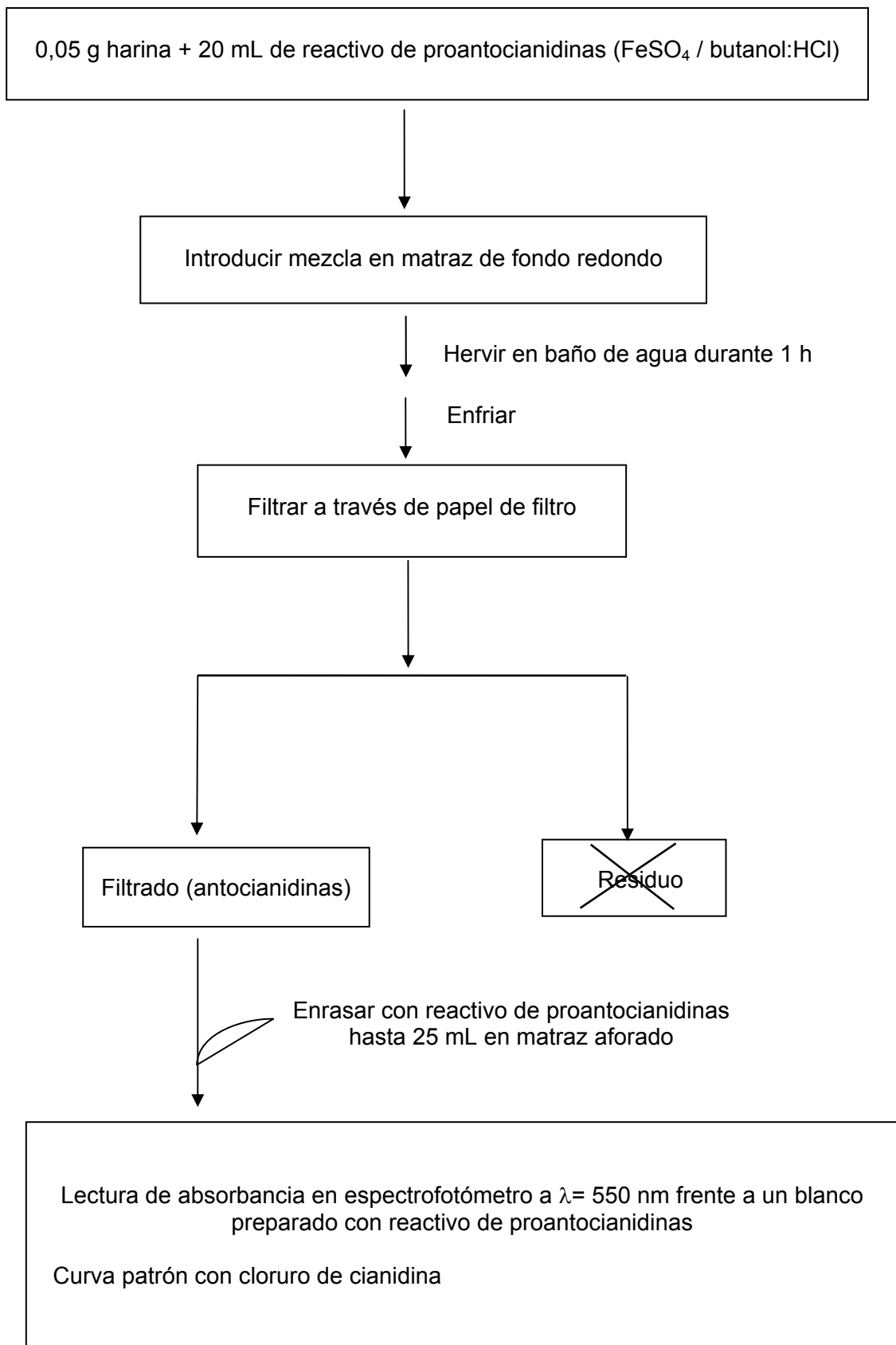


Figura 36.- Esquema de determinación de taninos condensados o proantocianidinas.

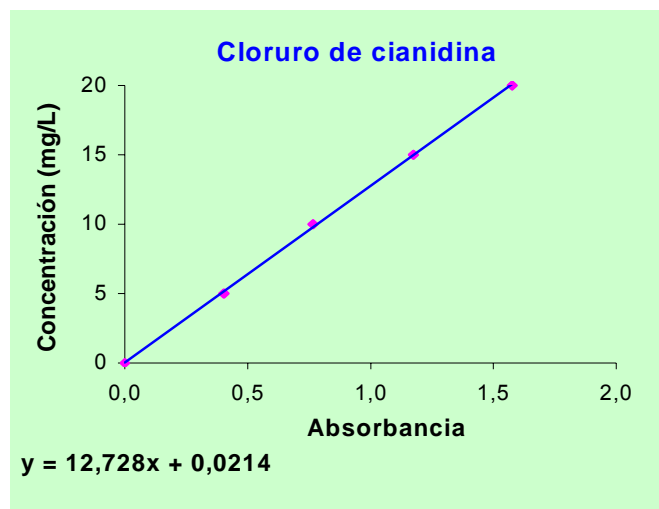


Figura 37.- Recta de calibrado de cloruro de cianidina para la cuantificación de taninos condensados.

4.5 DETERMINACIÓN DE INHIBIDORES DE TRIPSINA

La valoración de la proteína total y de los inhibidores de tripsina se realizó en las partes constituyentes de la semilla entera de *V. faba* var. Alameda y var. Brocal, sin germinar y germinadas a lo largo de 216 h.

La extracción de la proteína total se llevó a cabo con una solución tampón Tris-HCl 0,05 M/CINa 0,5 M, a pH 8. Su cuantificación se realizó con el método desarrollado por Bradford (1976) utilizando albúmina de suero bovino (BSA, Serva, Alemania) como patrón.

La actividad de los inhibidores de tripsina se determinó por espectrofotometría, siguiendo el método enzimático de Welham y Domoney (2000), basado a su vez en el de Kakade y col. (1974). Estos métodos permiten determinar la capacidad de la muestra para inhibir la actividad que la tripsina control ejerce sobre el sustrato sintético α -N-benzoil-DL-arginina-*p*-nitroanilida (BAPNA).

El sustrato cromogénico BAPNA (amida), al ser hidrolizado por la tripsina, libera un compuesto coloreado de *p*-nitroanilina (amina), cuya absorbancia se midió a una λ de 410 nm a los 10 min de incubación a 37°C en 10 mL de extracto. Por lo tanto, el valor de absorbancia de la *p*-nitroanilina liberada, está directamente relacionado con la absorbancia de la tripsina. Una *unidad de tripsina* (UT) se define arbitrariamente como el incremento de 0,01 unidades de absorbancia en las condiciones de ensayo anteriormente señaladas. La absorbancia del control de tripsina debe ser próxima a 0,4, que por definición es el valor que

se obtiene cuando el 100% de la tripsina es inhibida por la muestra. Este valor se tomó por convenio con objeto de estandarizar el método y que los resultados pudieran ser comparables.

La actividad de los inhibidores de tripsina se expresó en términos de unidades de tripsina inhibidas, de manera que una *unidad de inhibidor de tripsina* (UIT) es la cantidad de inhibidor que reduce 0,01 unidades de absorbancia, en relación con la reacción control de tripsina y en las condiciones anteriormente definidas. El inhibidor de tripsina presente en la muestra, se unió al lugar activo de la tripsina produciendo una inhibición competitiva, limitando así las posibilidades de actuación de esta enzima sobre el sustrato de la reacción, liberándose así menos *p*-nitroanilina y desarrollándose menos color que en la reacción control de tripsina. De manera que, los valores de absorbancia de las muestras fueron inferiores a 0,4. Por tanto:

$$\text{UIT} = \frac{\text{Absorbancia control tripsina} - \text{Absorbancia muestra}}{0,01}$$

Valoración del control de tripsina

El procedimiento seguido en la valoración del control de tripsina se muestra en la Figura 38. En primer lugar, en los tubos eppendorf mantenidos a 37°C (bloque termostatzado, Grant Boekel, Inglaterra), se introdujeron 200 µL de una solución tampón Tris-HCl 0,05 M, a pH 7,5 [Tris (hidroximetil) aminometano, Sigma, EEUU] y a continuación, se añadieron 200 µL de solución de tripsina [tripsina de páncreas bovino (Sigma, Alemania) en HCl 1 mM; 0,001/50, p/v]. Esta solución de tripsina, debe almacenarse a 5°C durante un máximo de una semana, para que no se produzcan pérdidas de actividad.

Pasados 2 min, se añadieron 500 µL de una solución denominada BTC, preparada con 100 µL de la solución de BAPNA [40 mg de BAPNA (Sigma, Alemania) diluidos en 1 mL de dimetil sulfóxido (Sigma, Alemania)], a la que se añadió una mezcla, precalentada a 37°C, de 10 mL de tampón Tris-HCl 0,05 M de pH 8,2 y 200 µL de cloruro cálcico 1 M (Panreac, España). El ión calcio es necesario para evitar la inactivación autolítica de la tripsina. La solución de BAPNA se mantiene estable durante 4 horas, por lo que ha de prepararse diariamente.

Tras un proceso de incubación de 10 min, la reacción enzimática se detuvo con la adición de 100 µL de ácido acético al 30% (Panreac, España). A continuación, la solución se centrifugó a 6.600 g (Sorvall Microspin 24S, EEUU) durante 4 min y se midió su absorbancia

a una longitud de onda de 410 nm en un espectrofotómetro (Beckman DU-7, EEUU). Este valor debe ser o estar muy próximo a 0,4 unidades de absorbancia.

Para la determinación del blanco del ensayo, se procedió de igual forma que en el control, pero después de la adicción de los 200 μ L de solución de tripsina y al cabo de 1 min de reacción, se añadieron 100 μ L de ácido acético al 30%. Pasado otro minuto, se añadieron 500 μ L de solución BTC. De esta manera, se evita la hidrólisis del BAPNA por actuación de la tripsina (Figura 38).

Extracción y valoración de los inhibidores de tripsina

Para llevar a cabo la extracción de los inhibidores de tripsina de la muestra, se tomaron 0,025 g de harina a los que se añadieron 1 mL de HCl 0,05 M, y se mantuvo en agitación (agitador magnético Agimatic-N, Selecta, España) durante 1 h a 4°C. El extracto se centrifugó (Sorvall Microspin 24S, EEUU) a 6.600 *g* durante 10 min, se recogió el sobrenadante y se mantuvo en un baño de hielo hasta el momento de su valoración (Figura 39). Se realizó una extracción para cada muestra.

Antes de comenzar la valoración de los inhibidores de tripsina, se llevaron a cabo pruebas con diferentes volúmenes de extracto, tanto de cotiledón como de eje embrionario, para obtener valores de absorbancia inferiores a 0,4. Una vez realizadas estas pruebas y conseguidos los volúmenes adecuados, éstos fueron identificados como *x* μ L (Tabla 3). A los eppendorf termostatzados a 37°C, se añadieron los *x* μ L de extracto y a continuación el volumen de tampón Tris-HCl 0,05 M pH 7,5 (*y* μ L) necesario para obtener un volumen final de 200 μ L.

Posteriormente, se añadieron 200 μ L de solución de tripsina, y pasado el tiempo de inhibición enzimática (2 min), se introdujeron 500 μ L de solución BTC previamente calentada a 37°C. Al cabo de 10 min de incubación, la reacción enzimática se detuvo con 100 μ L de ácido acético al 30%. La muestra se centrifugó a 6.600 *g* durante 4 min y se midió la absorbancia a una longitud de onda de 410 nm (Figura 39). Se realizaron cuatro valoraciones de cada extracto.

En el blanco del ensayo se procedió de igual forma que en la muestra, pero los 200 μ L de solución de tripsina fueron sustituidos por 200 μ L de HCl 1mM.

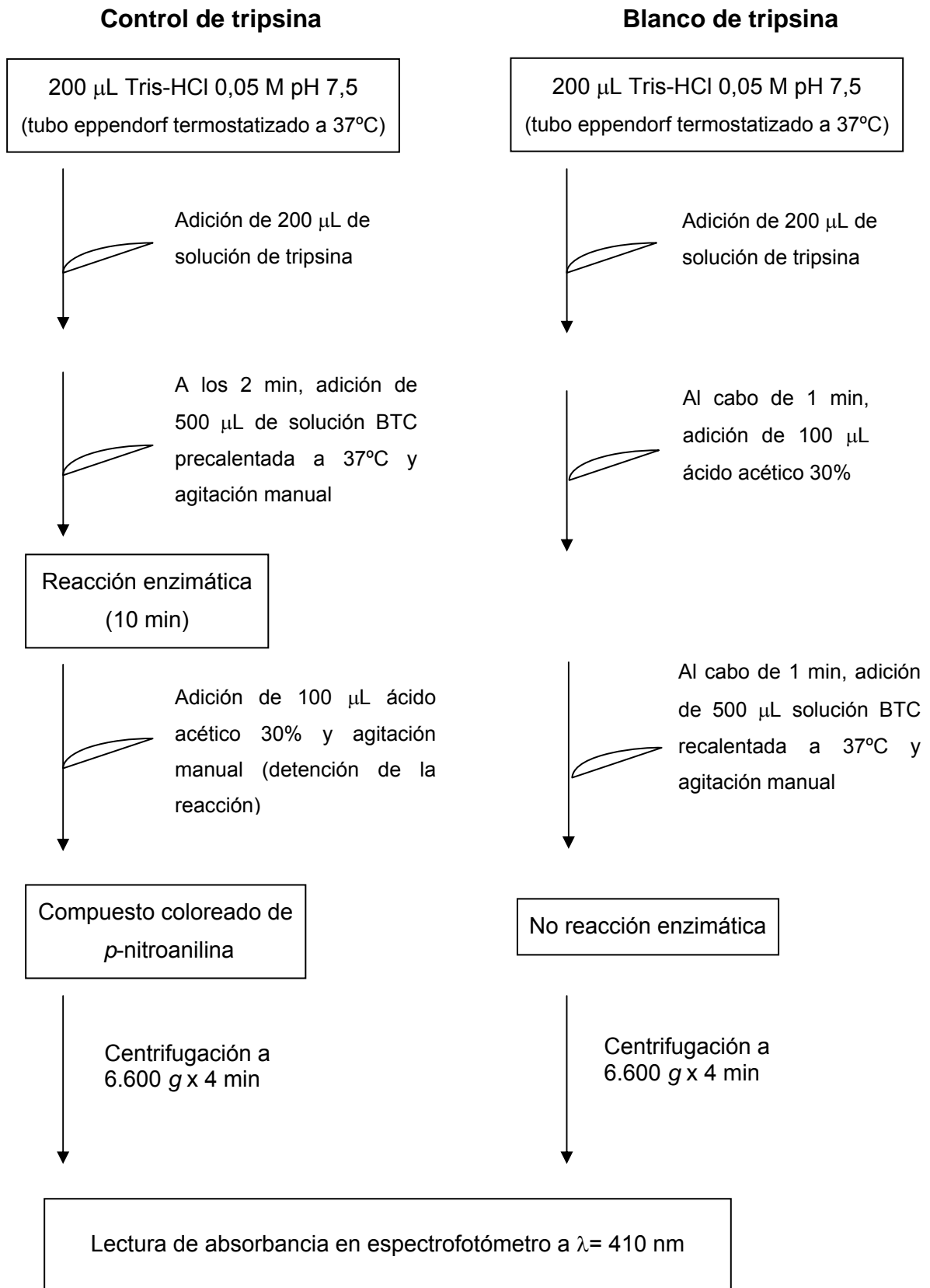


Figura 38.- Esquema de valoración de la solución control de tripsina.

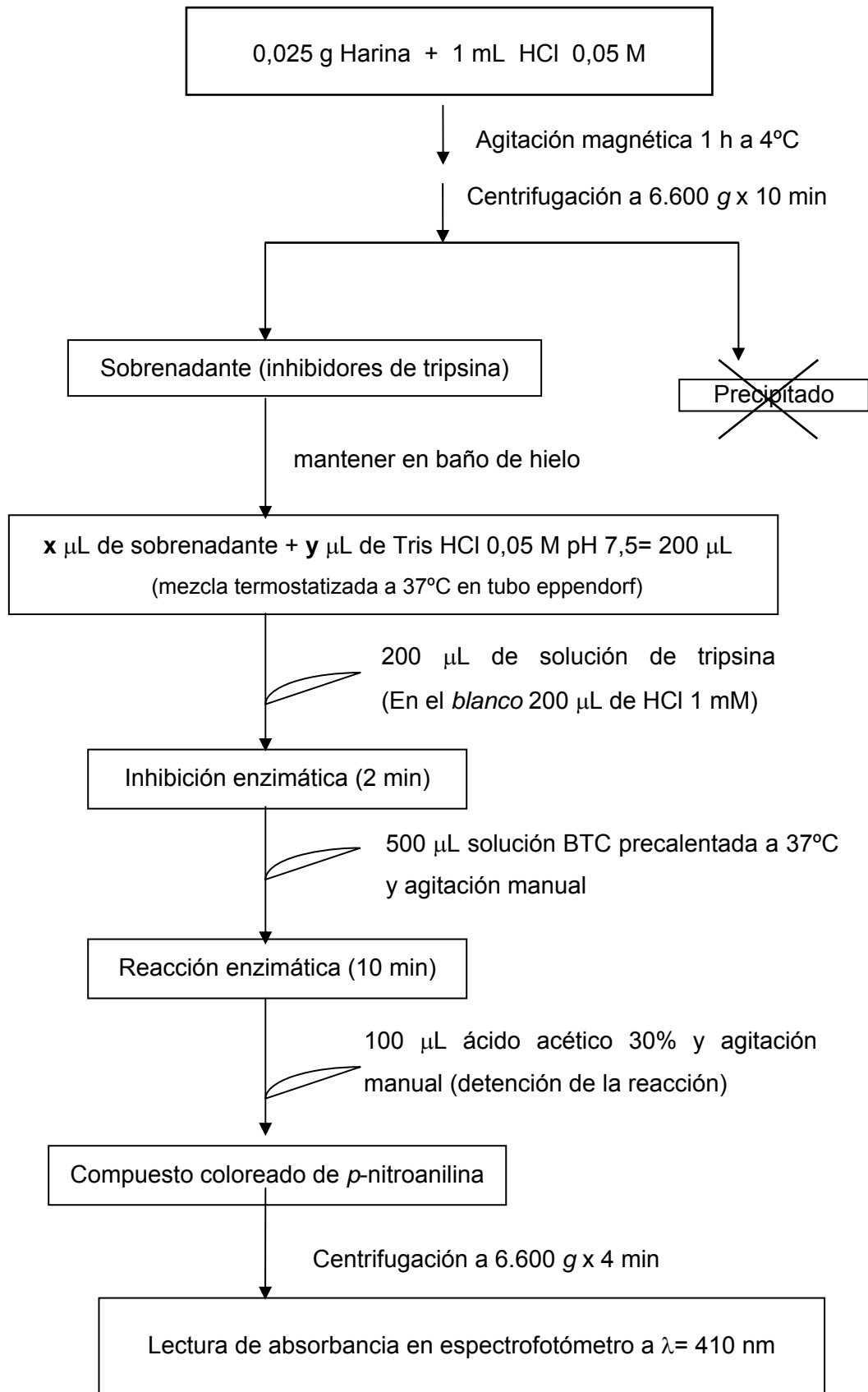


Figura 39.- Esquema de valoración de los inhibidores de tripsina.

Tabla 3.- Volumen de extracto de cotiledón y eje embrionario de *V. faba*, necesario para dar una reacción de color con valores de absorbancia inferiores a 0,4.

Horas de germinación	Extracto de cotiledón (x μ L)	Extracto de eje embrionario (x μ L)
0	12	3
12	9	--
24	9	3
48	9	3
72	8	5
96	8	10
120	7	20
144	7	35
168	6	60
192	6	75
216	6	100

5. PRUEBAS EXPERIMENTALES EN RATAS

5.1. ELABORACIÓN DE LAS RACIONES Y ANÁLISIS QUÍMICOS

La correcta elaboración de las raciones es muy importante a la hora de diseñar un experimento nutricional. Para ello, en primer lugar han de conocerse las necesidades nutricionales del animal. En el caso de la rata, aunque existen otras tablas, generalmente se siguen las recomendaciones contenidas en Nutrient Requirements of Laboratory Animals (NRC, 1995).

Como se refleja en Tabla 4, las harinas de semillas de *V. faba* var. Alameda no germinadas (VF) y germinadas durante 72 h (VFG) se incorporaron como única fuente de proteína en las raciones problema. La lactoalbúmina (Sigma, UK) fue utilizada como fuente de proteína en la ración testigo (LA).

Todas las raciones se suplementaron con vitaminas y minerales hasta alcanzar los niveles requeridos por cada especie animal (Tabla 4). Para el caso de la rata, en este trabajo se utilizaron las indicadas por Grant y col. (1993). Además, fue añadido óxido crómico (Cr_2O_3) como marcador indigestible, ya que a mayor grado de digestibilidad de la ración, este compuesto alcanza mayores concentraciones en el contenido ileal o fecal, y a través de él pueden determinarse distintos parámetros nutricionales.

Las raciones problema (VF y VFG) se igualaron a la ración testigo en energía digestible y en proteína, de modo que fueran comparables desde un punto de vista nutricional. Para ello fue necesario añadir a las raciones VF y VFG, cantidades suficientes de aminoácidos esenciales deficitarios, hasta igualar o incluso sobrepasar los valores de proteína de la ración testigo. Con esto se evita el efecto nocivo producido por una deficiencia en aminoácidos esenciales, ya que el contenido proteico del haba está por debajo de lo requerido para raciones con 100 g proteína/Kg (NRC, 1995). Con este suplemento aminoacídico se alcanzaron valores de proteína de 106,3 g/Kg en las raciones VF y VFG.

La energía digestible se calculó de acuerdo a la composición y valores de digestibilidad procedentes de estudios previos (Church y Pond, 1987). Esta energía es suministrada por:

Proteínas: g proteína digerida x 5,65 Kcal/g

Carbohidratos: g carbohidratos digeridos x 4,10 Kcal/g

Lípidos: g lípidos digeridos x 9,45 Kcal/g

(1 cal= 4,18 Julios)

El nitrógeno de las raciones se cuantificó por el método de Kjeldahl (AOAC, 1984). Tras la digestión de la muestra con ácido sulfúrico en presencia de un catalizador, el nitrógeno se transforma en sulfato amónico. Este último, en medio alcalino produce amoniaco, que es arrastrado por vapor de agua y recogido en un ácido débil. A continuación se libera amonio, que se valora con ácido clorhídrico en presencia de un indicador, lo que permite establecer la cantidad de nitrógeno que había originariamente en la muestra. Por tanto, el contenido en nitrógeno se calculó a partir del gasto de HCl mediante la siguiente expresión:

$$\text{Nitrógeno muestra (\%)} = \frac{\text{mL HCl} \times \text{Normalidad HCl} \times 0,014}{\text{Peso de la muestra}} 100$$

El contenido en proteína se calculó a partir del nitrógeno presente en la muestra, aplicando un factor de conversión. Para la lactoalbúmina fue utilizado el factor general de 6,25 y para la proteína del haba se utilizó un factor de 5,4, ya que según Mossé (1990) el otro factor no es válido para valorar proteína en material vegetal.

$$\text{Proteína}_{\text{Lactoalbúmina}} (\%) = \text{Nitrógeno (\%)} \times 6,25$$

$$\text{Proteína}_{\text{haba}} (\%) = \text{Nitrógeno (\%)} \times 5,4$$

La valoración de los aminoácidos de las raciones (Tabla 5) se realizó por el método Pico Tag, en un equipo de cromatografía líquida de alta resolución (Waters, Milfold, EEUU).

Para ello, la muestra se hidroliza en HCl 6 M (2 mL HCl/5 mg proteína) a 110°C durante 18 h. En el caso de los aminoácidos azufrados, éstos previamente se oxidan con ácido per fórmico, para evitar su destrucción parcial en la hidrólisis posterior con HCl 6 M. A continuación, los aminoácidos son derivatizados con fenilisotiocianato y se separan a través de una columna de fase reversa (NovaPak C₁₈, Waters). Finalmente se detectan espectrofotométricamente a 254 nm (Rubio, 2002).

El contenido en fibra se calculó a partir de los polisacáridos no amiláceos (PNA) y de la lignina, presentes en las raciones de haba. Los PNA se determinaron siguiendo el método de Englyst y col. (1992) y para ello, en primer lugar fue necesario eliminar el almidón mediante hidrólisis enzimática. A continuación, los PNA se precipitaron con etanol, y posteriormente se hidrolizaron con ácido sulfúrico durante 2 h. Una vez obtenido el hidrolizado, los azúcares neutros ahí presentes se valoraron por cromatografía de gases y los ácidos urónicos colorimétricamente a 400 y 450 nm. El contenido en PNA (g/100g de muestra) se calculó como:

$$\text{PNA (\%)} = \text{azúcares neutros} + \text{ácidos urónicos}$$

La lignina se valoró gravimétricamente en la fracción de fibra ácido detergente siguiendo el método desarrollado por Theander y col. (1994). Esta fracción, se hidrolizó con 7,35 mol/L H₂SO₄, y el hidrolizado se filtró a través de un crisol filtrante, donde quedó retenido el residuo insoluble de lignina, que se secó a 105°C durante 18 h y que finalmente fue pesado.

$$\text{Fibra (\%)} = \text{PNA} + \text{Lignina}$$

Como se refleja en la Tabla 4, el valor de fibra de la ración testigo quedó referido a la digestibilidad del almidón de patata. Este almidón es digestible en el ileon aproximadamente en un 50%, por lo que fue utilizado como material indigestible para favorecer la fisiología digestiva en los animales (Fleming y Vose, 1979).

La determinación del contenido lipídico en las raciones se llevó a cabo utilizando el método de Folch y col. (1957). Para ello, a 1 g de muestra se añadieron 100 mL de cloroformo/metanol (2/1 v/v) y se realizó una extracción en continuo durante 24 h. La diferencia entre el peso de la muestra antes y después de la extracción se tomó como el contenido lipídico:

$$\text{Lípidos (\%)} = \text{Peso muestra} - \text{Peso residuo}$$

Tabla 4.- Composición química (g/Kg) de las raciones de lactoalbúmina (LA), habas sin germinar (VF) y habas germinadas (VFG) utilizadas en ratas.

	LA	VF y VFG
Almidón de maíz	422,6	121,3
Almidón de patata	150	-
Aceite de maíz	50	110
Glucosa	150	150
Mezcla Vit + Min ^a	100	100
Ácido silícico	0,4	0,4
Oxido crómico	2	2
Lactoalbúmina	125	-
Haba	-	510
Aminoácidos esenciales añadidos		
Histidina	-	0,3
Isoleucina	-	1,4
Metionina	-	2,1
Fenilalanina	-	0,6
Triptófano	-	0,6
Tirosina	-	0,2
Valina	-	1,1
Composición calculada ^b		
Energía digestible (kJ/g) ^c	15,5	15,5
Proteína ^d	100	106,3
Fibra	75	84,7
Grasa	50	116,6

^a Como en Grant y col. (1993).

^b Calculada de acuerdo a la composición de los ingredientes analizados.

^c Energía digestible de los ingredientes calculada según su composición química. Haba: 12,4 KJ/g.

^d N x 6,25 para LA y N x 5,4 + aminoácidos sintéticos para VF y VFG.

Tabla 5.- Análisis de los aminoácidos y nitrógeno total (g/Kg) de las raciones de lactoalbúmina (LA), habas sin germinar (VF) y habas germinadas (VFG) utilizadas en ratas.

	LA	VF	VFG
Aminoácidos esenciales			
Arginina	3,1	10,1	10,5
Histidina	2,0	2,5	2,6
Isoleucina	4,2	5,0	4,7
Leucina	7,1	7,2	7,0
Lisina	7,0	6,9	6,4
Metionina+cisteína	4,2	4,8	4,6
Fenilalanina+tirosina	8,1	10,3	10,6
Treonina	4,4	4,0	3,9
Valina	5,4	6,0	5,9
Aminoácidos no-esenciales			
Alanina	5,1	3,8	3,9
Aspartéina	11,2	13,4	15,2
Glutamato	16,9	18,1	18,3
Glicina	2,2	4,5	4,4
Prolina	6,7	7,5	7,7
Serina	5,6	6,6	7,0
Total	93,2	110,7	112,7
N Total	16,0	18,9	20,5

5.2. ANIMALES Y CONDICIONES EXPERIMENTALES

Para la realización de los ensayos nutricionales, fue seleccionado como animal de experimentación la rata (*Rattus norvegicus*) macho albina de la estirpe Wistar. Es un animal comúnmente utilizado para este tipo de experimentos, ya que ha demostrado ser un buen modelo para otros monogástricos en el estudio de los parámetros nutricionales y de los efectos fisiológicos producidos por la ingestión de diferentes materias primas.

Las ratas macho recién destetadas (3-4 semanas de vida) se alojaron de forma individual en una jaula metabólica, en unas condiciones concretas: 25°C de temperatura, humedad relativa del 50% y fotoperiodo de 12 h de iluminación artificial y 12 h de oscuridad. Estos animales tuvieron que adaptarse a estas condiciones experimentales durante 5 días

antes del ensayo, periodo en el que fueron alimentadas con la ración control de lactoalbúmina.

El peso vivo de los animales al inicio del ensayo fue de 60 ± 1 g y se utilizaron 6 ratas por tratamiento durante 9 días. La ración de alimento (LA, VF o VFG) administrada a cada rata fue de 12 g/día, cantidad similar a la ingerida *ad libitum* por animales de esta edad y peso. El agua de bebida se administró *ad libitum*, y diariamente se pesaron las ratas y se recogieron las heces y la orina.

5.3. ENSAYOS NUTRICIONALES

Obtención de las muestras biológicas

Un grupo de ratas macho con un peso de 60 ± 1 g fue sacrificado, y una vez eliminado el contenido gastrointestinal, el animal completo se liofilizó y se molió.

Las ratas utilizadas en los experimentos, se alimentaron al final del ensayo (día 10) únicamente con 5 g de la ración correspondiente, y fueron sacrificadas exactamente 2 h después. Se anestesiaron con pentotal sódico mediante inyección intraperitoneal (40 mg/Kg peso corporal) y se tomaron inmediatamente muestras de sangre circulante en agujas heparinizadas.

Posteriormente, estos animales se sacrificaron mediante la apertura de la cavidad abdominal y torácica, y se extrajeron los diferentes órganos digestivos y del sistema inmunitario. El tubo gastrointestinal fue vaciado, pero el contenido ileal (0-25 cm de la unión ileocecal) se recogió en viales de plástico, para su congelación (-20°C) y posterior liofilización.

También se pesaron los distintos órganos y la canal, que se congelaron a -20°C y se liofilizaron. Las heces se congelaron (-20°C), liofilizaron y molieron en un mortero y la orina fue recogida sobre una solución de HCl al 1% para evitar pérdidas de nitrógeno.

Métodos de evaluación del estado nutricional del animal

Para la correcta valoración de la utilización digestiva y metabólica de la proteína por parte del animal de experimentación, se realizaron una serie de análisis químicos, a partir de los cuales fueron determinados parámetros como la utilización neta de la proteína o la digestibilidad aparente de aminoácidos.

En el contenido ileal fue analizado el óxido crómico espectrofotométricamente de acuerdo con Aguilera y col. (1988), utilizando un micrométodo por vía seca basado en la obtención de cenizas a partir de la muestra. Las cenizas se trataron con un fundente alcalino, con lo que el óxido crómico se transformó en cromato, y posteriormente el material fundido se disolvió en agua y se determinó la absorbancia de la solución a 372 nm.

En las heces se valoró el nitrógeno por el método de destilación de Kjeldahl (AOAC, 1984) y en los cuerpos secos de las ratas fue determinada la grasa corporal siguiendo el método de Folch y col. (1957).

Además, la valoración de los aminoácidos del contenido ileal y libres en plasma, se llevó a cabo por el método Pico Tag (Rubio, 2002). La muestra ileal, se hidrolizó previamente en HCl 6 M a 110°C durante 18 h. En cambio, los aminoácidos libres en plasma se determinaron en el sobrenadante, tras la precipitación de las proteínas plasmáticas con ácido tricloroacético al 10% (0,5 mL plasma + 0,5 mL TCA 20%) utilizando norleucina como patrón interno (Rubio y col., 1998).

Una vez finalizados estos análisis, se obtuvieron los datos necesarios para valorar la calidad proteica de la ración con métodos tanto directos como indirectos.

La valoración indirecta de la proteína se realizó a través de parámetros de productividad como la ganancia de peso corporal o la relación ganancia/alimento.

Los métodos directos utilizados, fueron entre otros, el ensayo de balance de nitrógeno, para el que se sacrificaron inicialmente (día 0) un grupo de 12 ratas, a partir de las cuales se determinó el contenido de nitrógeno total inicial (N_{inicial}). Al final del experimento (día 10) fue sacrificado otro grupo de ratas para determinar el nitrógeno total final (N_{final}). Una vez obtenidos estos valores, el nitrógeno retenido (g) se calculó a través de la siguiente expresión:

$$N_{\text{retenido}} \text{ (g)} = N_{\text{final}} - N_{\text{inicial}}$$

La utilización neta de la proteína (%) fue calculada a partir del nitrógeno ingerido y del nitrógeno retenido, mediante la siguiente fórmula:

$$\text{UNP (\%)} = \frac{N_{\text{retenido}}}{N_{\text{ingerido}}} \cdot 100$$

La digestibilidad ileal aparente (DIA) para cada uno de los aminoácidos se calculó a partir de la concentración de aminoácido (g/100g) en la ración y en el contenido ileal, y también fue necesario conocer la concentración de óxido crómico (g/100g). Para ello se utilizó la expresión:

$$DIA = \frac{\frac{(AA)_{\text{alimento}}}{(Cr_2O_3)_{\text{alimento}}} - \frac{(AA)_{\text{contenido ileal}}}{(Cr_2O_3)_{\text{contenido ileal}}}{\frac{(AA)_{\text{alimento}}}{(Cr_2O_3)_{\text{alimento}}}}$$

6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Con los datos experimentales de los pesos frescos y secos de las semillas de *V. faba* var. Alameda y var. Brocal recogidas a las 0, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192 y 216 horas de germinación, se realizaron análisis descriptivos (representaciones gráficas, medias y errores) y análisis de regresión lineal y no lineal, utilizando los programas de Statgraphics Plus versión 4.1 (1999) y de Maximum Likelihood Program (Ross, 1987). Con el análisis de regresión realizado a partir de la variable dependiente “peso fresco” y la variable independiente “horas de germinación”, los datos se ajustaron a diferentes modelos. Para aquellos casos donde las variedades Alameda y Brocal se ajustaron al mismo modelo, se realizó un estudio de paralelismo necesario para comprobar la existencia de diferencias significativas entre ambas variedades.

Con los datos de los factores no-nutritivos obtenidos de las semillas sin germinar de la var. Alameda y de la var. Brocal, se llevó a cabo un análisis de varianza unifactorial con el programa de Statgraphics Plus versión 4.1 (1999). Para cada uno de los compuestos analizados, se comprobó si existían diferencias significativas entre las variedades Alameda y Brocal, con un nivel de confianza del 95%.

Con los valores de los factores no-nutritivos procedentes de las habas sin germinar (0 horas) y germinadas durante 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192 y 216 horas, se realizó para cada variedad, un análisis de varianza unifactorial utilizando el programa de Statgraphics Plus versión 4.1 (1999). Este estudio estadístico estaba orientado a evaluar la influencia del tiempo de germinación en el contenido de un determinado compuesto antinutritivo, y cuando los resultados obtenidos presentaron diferencias significativas ($P < 0,05$), la comparación entre grupos se realizó mediante la prueba de rango múltiple de Duncan.

—

Con los resultados de los ensayos realizados en ratas alimentadas con habas sin germinar y germinadas, se llevó a cabo un análisis de varianza unifactorial, aplicando en caso de existir diferencias significativas entre los datos, la prueba de comparación múltiple de Tukey para establecer los grupos independientes (Minitab Statistical Software Package, Minitab, NY, EEUU).

RESULTADOS

IV. RESULTADOS

1. GERMINACIÓN DEL MATERIAL VEGETAL

De acuerdo con las Normas Internacionales para el Ensayo de Semillas (ISTA, 1999), se eligieron papel y arena para germinar las semillas de *V. faba* var. Alameda y var. Brocal. En ambos sustratos se controlaron la longitud del eje embrionario y el porcentaje de germinación (plántulas viables) a lo largo de 12 días de ensayo.

En la Tabla 6 se presentan las longitudes medias de los ejes embrionarios y el porcentaje de germinación de las 60 semillas ensayadas en papel toalla y de las 20 germinadas en arena, a los 4, 8 y 12 días de experimento.

Tabla 6.- Longitud del eje embrionario (cm) y porcentaje de germinación en *V. faba* var. Alameda y var. Brocal a lo largo de la germinación en dos sustratos diferentes.

		Longitud eje embrionario (cm, X±DE)					
		Papel	Arena	Papel	Arena	Papel	Arena
		4 días		8 días		12 días	
<i>Vicia faba</i>	var. Alameda	0,2 ± 0,0	6,3 ± 1,6	3,9 ± 1,1	14,2 ± 4,8	5,7 ± 1,4	28,4 ± 7,9
	var. Brocal	0,0 ± 0,0	5,5 ± 1,3	3,7 ± 1,6	10,0 ± 1,6	5,6 ± 1,4	20,7 ± 7,3
		% de germinación					
		Papel	Arena	Papel	Arena	Papel	Arena
		4 días		8 días		12 días	
<i>Vicia faba</i>	var. Alameda	8	95	98	98	90	100
	var. Brocal	2	96	95	97	92	100

Papel: X= valor medio (n=60)

Arena: X= valor medio (n=20)

D.E.= desviación estándar (n-1)

Entre los 4 y 12 días de germinación, el eje embrionario presentó un rango de longitud en papel de 0,2-5,7 cm para la var. Alameda y de 0,0-5,6 cm para la var. Brocal, mientras que en arena fue de 6,3-28,4 cm en Alameda y de 5,5-20,7 cm en Brocal. Por lo tanto, a un tiempo de germinación concreto, los ejes embrionarios desarrollados en papel alcanzaron menores longitudes que los desarrollados en arena.

Con relación al porcentaje de germinación, a los 4 días de incubación muy pocas semillas habían germinado en papel, mientras que en arena había germinado prácticamente el 95% de las semillas de ambas variedades, ya que al 2º día de ensayo se había producido la emergencia de la radícula en la mayoría de ellas.

A los 8 días, la proporción de semillas germinadas en papel y en arena fue semejante, ya que a partir del 5º día de experimento en papel, pudo observarse la radícula en ambas variedades.

A los 12 días, el porcentaje de germinación se redujo en papel, debido a la elevada contaminación por hongos, que produjo entre otros daños, necrosis en los tejidos de las plántulas, haciéndolas inviables. Mientras que en arena, a pesar de observarse una ligera contaminación, todas las plántulas permanecieron sanas y viables.

2. PESO FRESCO Y SECO DEL MATERIAL VEGETAL

Variación del peso fresco durante la germinación

Los pesos frescos de 80 semillas germinadas y los de sus partes constituyentes: par de cotiledones, eje embrionario y cascarilla, se ajustaron a través del análisis de regresión a diferentes modelos, que se representan en las Figuras 40 (var. Alameda) y 41 (var. Brocal). Dichos modelos, recogen los pesos frescos estimados de este material vegetal a lo largo de la germinación (Figura 42).

Los valores de peso fresco de los cotiledones de la var. Alameda (Figura 40a) se ajustaron a un modelo no lineal diferente al de la var. Brocal (Figura 41a). En ambos casos, el coeficiente de determinación fue muy bajo, aunque la F del modelo fue muy significativa ($P < 0,05$). Esta aparente contradicción, se puede explicar porque el peso fresco se incrementó rápidamente durante las primeras 48 h, y porque además existía una gran variabilidad en el peso para cada tiempo.

Los datos de peso fresco de los ejes embrionarios de las dos variedades se ajustaron a un modelo no lineal (Figuras 40b y 41b) y el ajuste de la curva fue muy significativo ($P < 0,05$), con valores de F y coeficiente de determinación elevados. En estas gráficas, se observó un crecimiento exponencial del peso del eje embrionario a lo largo de 216 h de germinación.

Los valores de la cascarilla de las variedades estudiadas, se ajustaron a un modelo no lineal (Figuras 40c y 41c), donde al igual que en cotiledones, el coeficiente de determinación fue aparentemente mínimo, aunque la F del modelo fue muy significativa ($P < 0,05$).

Los pesos frescos de las semillas y plántulas enteras de ambas variedades se ajustaron a un polinomio de 3^{er} grado (Figuras 40d y 41d). El ajuste de esta curva fue muy significativo ($P < 0,05$), con valores del estadístico F y coeficiente de determinación (R^2) elevados. Las plántulas enteras mostraron un crecimiento progresivo a lo largo del periodo germinativo.

Posteriormente, se realizó un estudio de paralelismo para aquellos casos donde Alameda y Brocal se ajustaron al mismo modelo, es decir, para los pesos frescos estimados del eje embrionario, la cascarilla y la semilla o plántula entera. En el eje (Figura 42b) y en la semilla/plántula entera (Figura 42d), a pesar de que las dos variedades en estudio se ajustaron al mismo modelo, los parámetros no lineales de la ecuación fueron significativamente diferentes, con valores de $P = 0,0007$ para la semilla/plántula entera y de $P = 0,0008$ para el eje. Por lo que en ambos casos, se demostró que existían diferencias significativas entre los dos modelos, y por tanto entre Alameda y Brocal. Los pesos frescos de la cascarilla (Figura 42c), que también se ajustaron al mismo modelo, no mostraron diferencias significativas entre los parámetros no lineales ($P = 0,56$), pero sí en el desplazamiento ($P < 0,0001$). De manera que, los modelos fueron significativamente diferentes y en consecuencia, también las dos variedades.

Para las variedades Alameda y Brocal, se representaron en las Figuras 43a y 44a, respectivamente, los valores medios de los pesos frescos de 40 semillas y de sus partes constituyentes a lo largo de 216 horas de incubación. Se realizaron dos ensayos de germinación por variedad.

El peso fresco medio de las semillas de Alameda (media de los dos ensayos) aumentó prácticamente 4 veces con la germinación: 971-3.653 mg y su contenido en humedad se incrementó 7 veces, ya que pasó de un 11% inicial a un 78% al final del ensayo. El peso de los cotiledones se duplicó a las 48 h de germinación (839-1.611 mg) y posteriormente se mantuvieron valores cercanos a 1.520 mg, con un porcentaje inicial de agua del 11% que alcanzó a las 216 h niveles del 66%. El peso inicial del eje fue de 7 mg y al final del ensayo se detectaron valores 255 veces superiores (1.863 mg), además, el contenido de humedad se incrementó 13 veces a las 72 h (87%) y no se modificó durante las posteriores horas de incubación. El peso fresco de la cascarilla se duplicó a las 216 h, obteniéndose a ese tiempo valores de 258 mg, y el contenido en agua aumentó 7 veces (9-60%).

El peso fresco medio de las semillas de Brocal (media de los dos ensayos de germinación) se incrementó 4 veces al cabo de las 216 h de ensayo: 881-3.400 mg. El peso de los cotiledones aumentó un 44% a las 72 h, alcanzando a ese tiempo un valor máximo de 1.362 mg, y a continuación se mantuvieron valores próximos a 1.300 mg. El peso inicial del

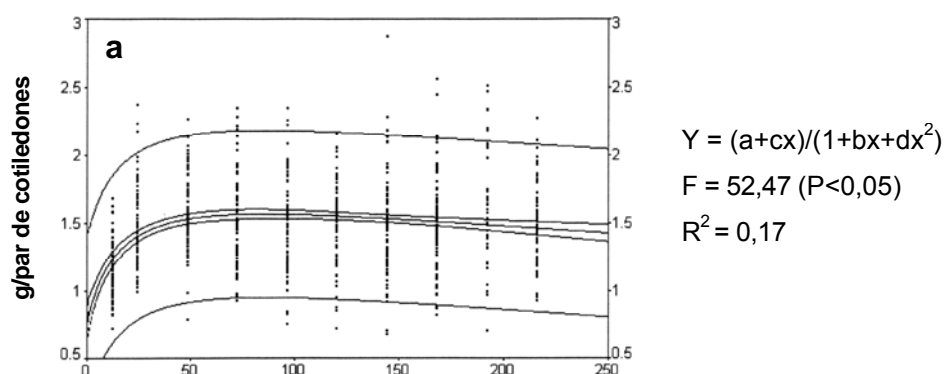
eje fue de 6 mg y se incrementó 300 veces, y el de la cascarilla, que presentó valores al comienzo de la germinación de 115 mg, prácticamente se duplicó al final del proceso. Los porcentajes de humedad detectados en esta variedad, fueron semejantes a los de Alameda.

Evolución del peso seco a lo largo de la germinación

En las Figuras 43b y 44b, se representan los pesos secos medios de 40 semillas y de cada una de sus partes, obtenidos durante el ensayo de germinación.

En la var. Alameda, el peso seco medio de las semillas germinadas y plántulas en desarrollo (media de los dos ensayos realizados con esta variedad) mostró ligeras oscilaciones a lo largo del proceso germinativo, con valores iniciales de 867 mg y finales de 813 mg. El peso inicial de los cotiledones disminuyó gradualmente, obteniéndose al final del ensayo reducciones del 31% (747-519 mg). En el eje embrionario, los valores medios detectados antes de comenzar la germinación (7 mg) se incrementaron 28 veces, alcanzándose a las 216 h, pesos de 190 mg. El peso de la cascarilla se mantuvo prácticamente constante durante todo el proceso, con valores de 106 mg aproximadamente.

En la var. Brocal, los pesos secos medios de las semillas y plántulas enteras (media de los dos ensayos) mostraron ligeras variaciones durante la germinación, de manera que, inicialmente fueron detectados 756 mg, y a las 216 h valores muy similares (718 mg). El peso medio de los cotiledones se redujo un 34% (651-427 mg) y el peso del eje, que al inicio de la germinación fue de 6 mg, aumentó gradualmente hasta alcanzar incrementos del 97% al final del ensayo (199 mg). En la cascarilla se mantuvieron a lo largo del ensayo valores medios cercanos a 93 mg.



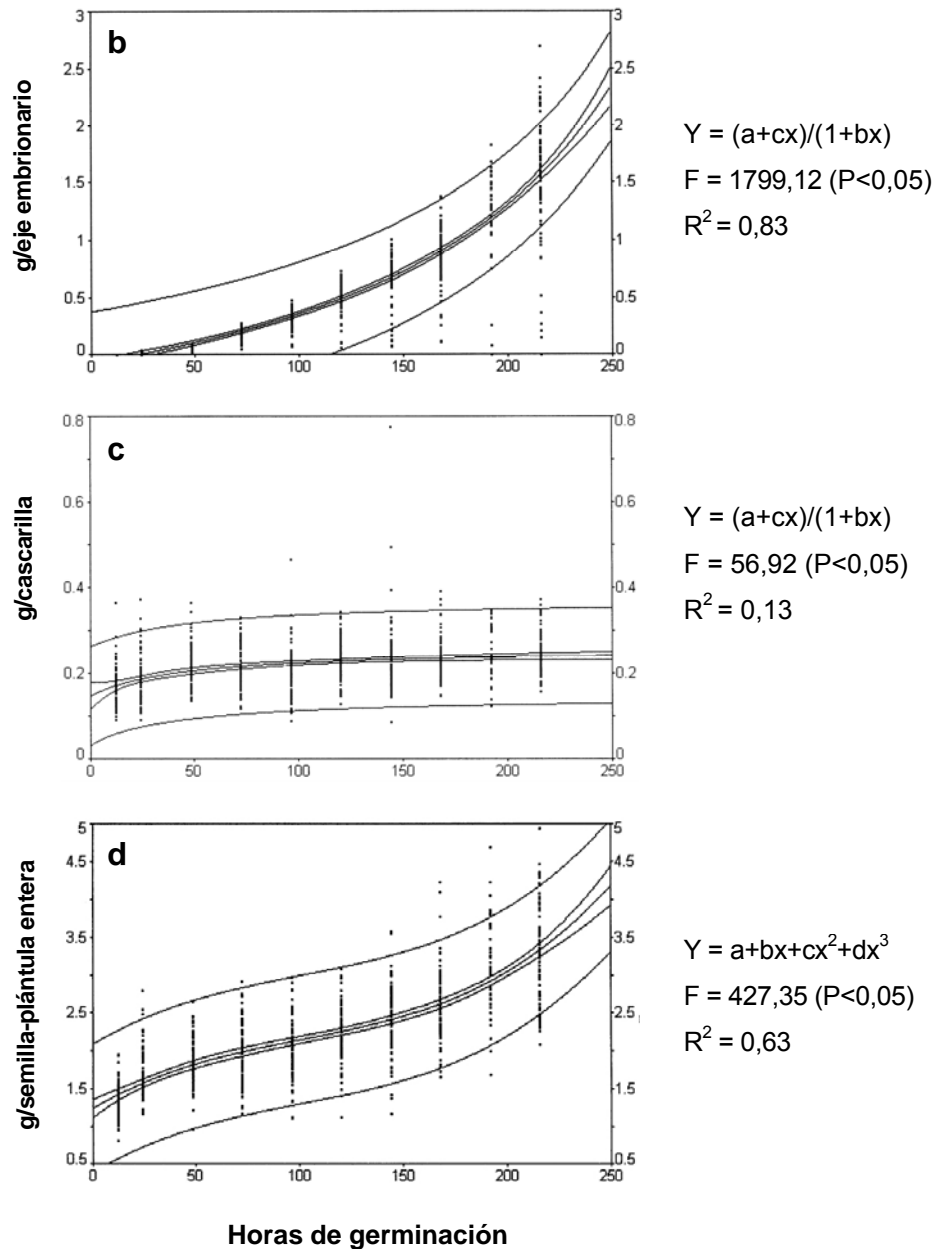
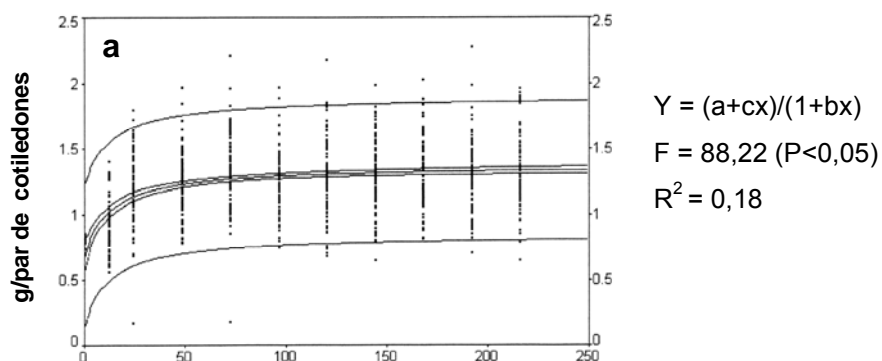


Figura 40.- Pesos frescos (g) del par de cotiledones (a), eje embrionario (b), cascarilla (c) y semilla/plántula entera (d) de *V. faba* var. Alameda a lo largo de la germinación.



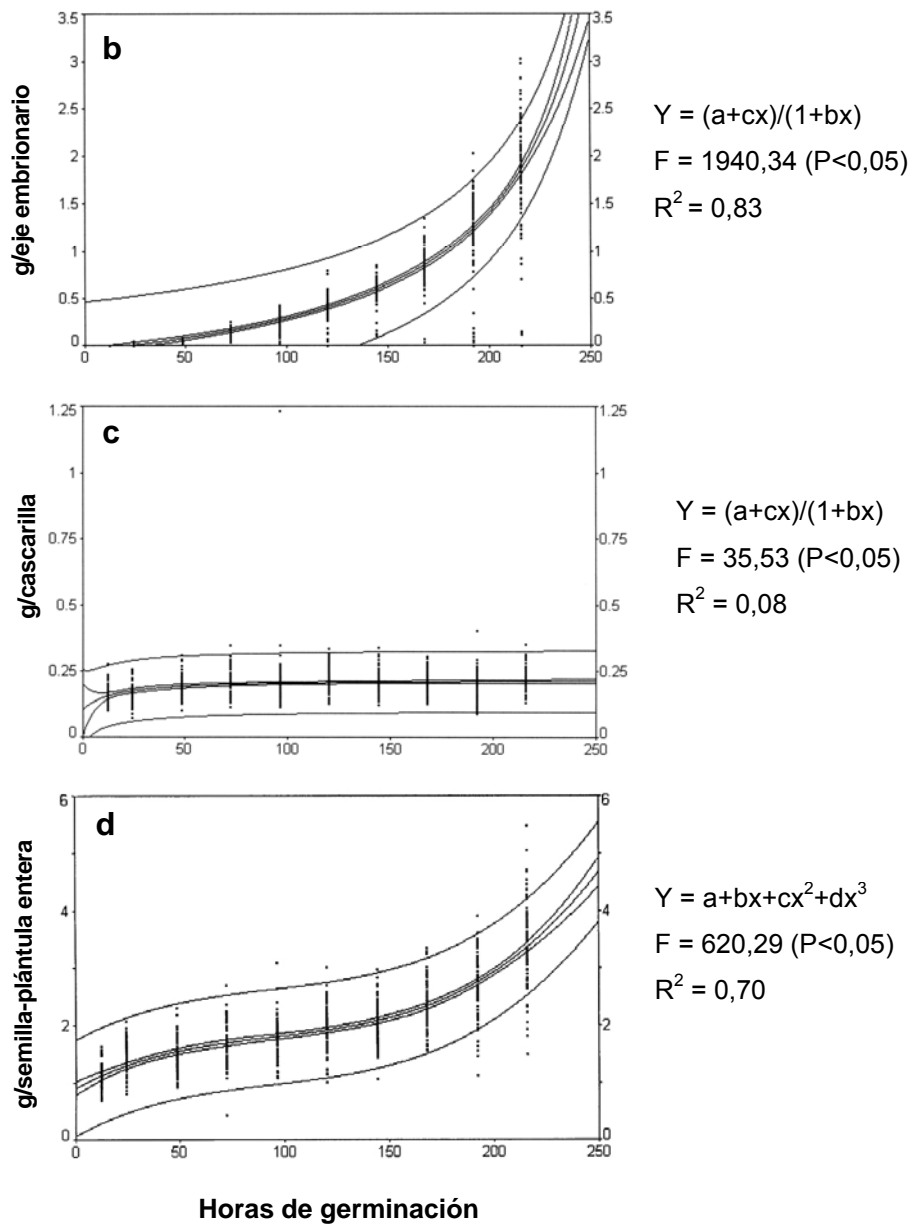
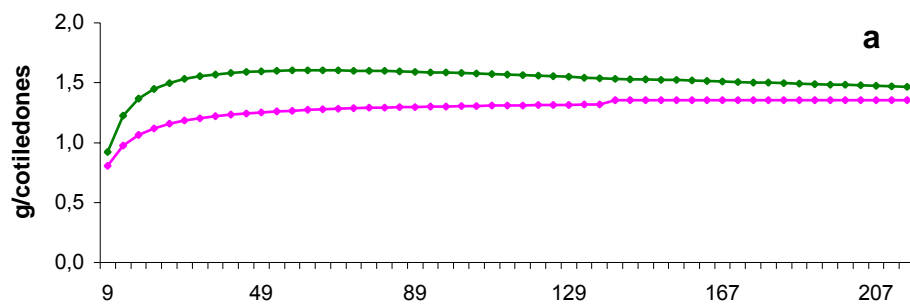


Figura 41.- Pesos frescos (g) del par de cotiledones (a), eje embrionario (b), cascarilla (c) y semilla/plántula entera (d) de *V. faba* var. Brocal a lo largo de la germinación.



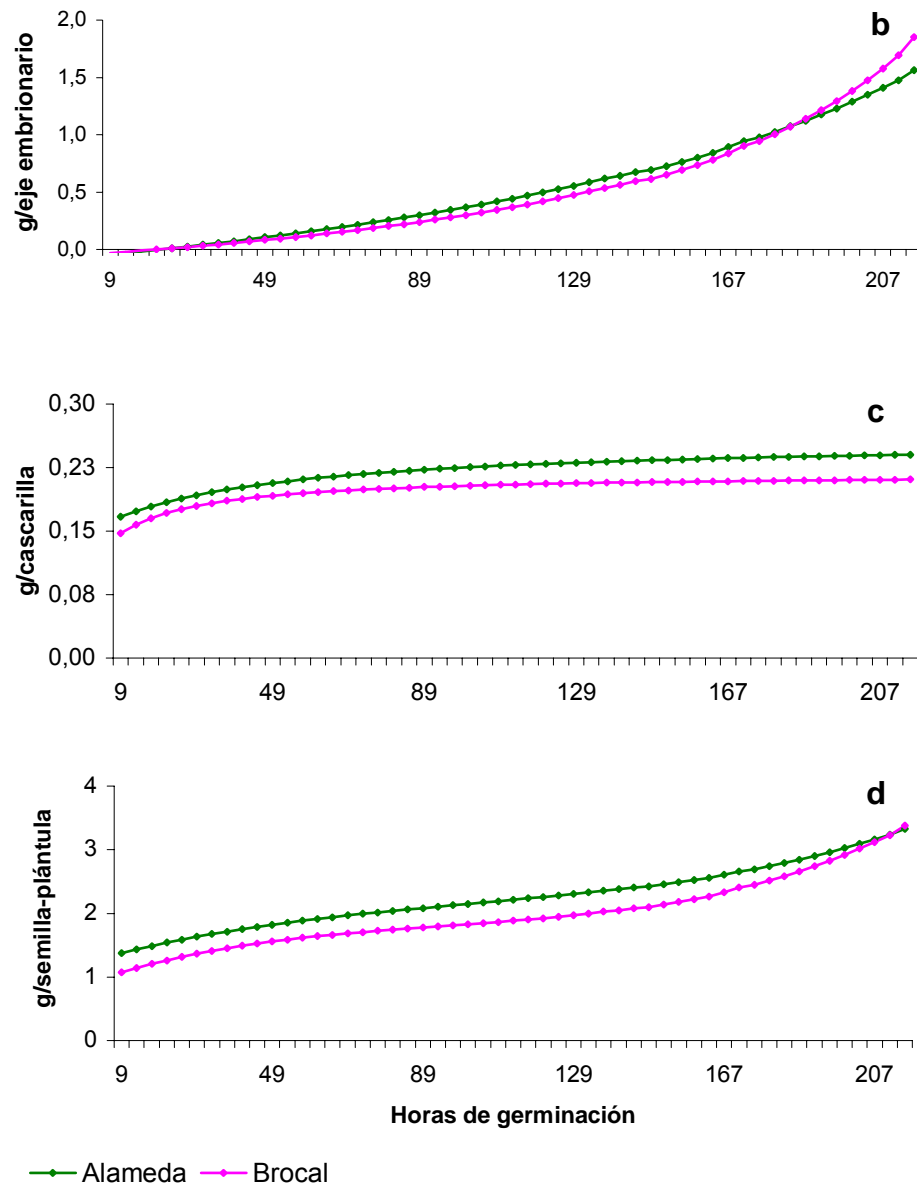


Figura 42.- Pesos frescos estimados (g) del par de cotiledones (a), eje embrionario (b), cascarilla (c) y semilla/plántula entera (d) de *V. faba* var. Alameda y var. Brocal a lo largo de la germinación.

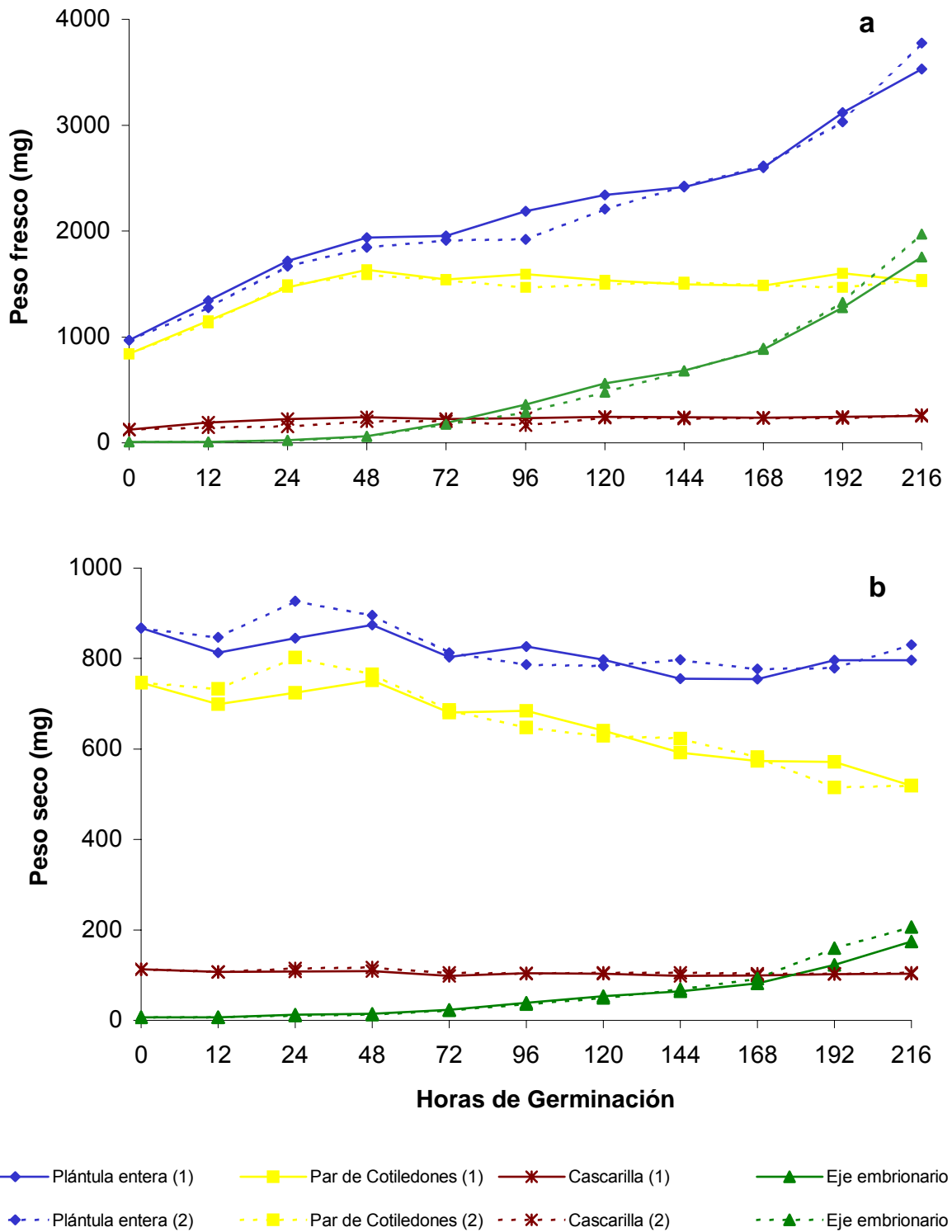


Figura 43.- Valores medios del peso fresco (a) y seco (b) del par de cotiledones, eje embrionario, cascarilla y semilla/plántula entera de *V. faba* var. Alameda a lo largo de la germinación.

(1) 1ª germinación: Línea continua y (2) 2ª germinación: Línea discontinua

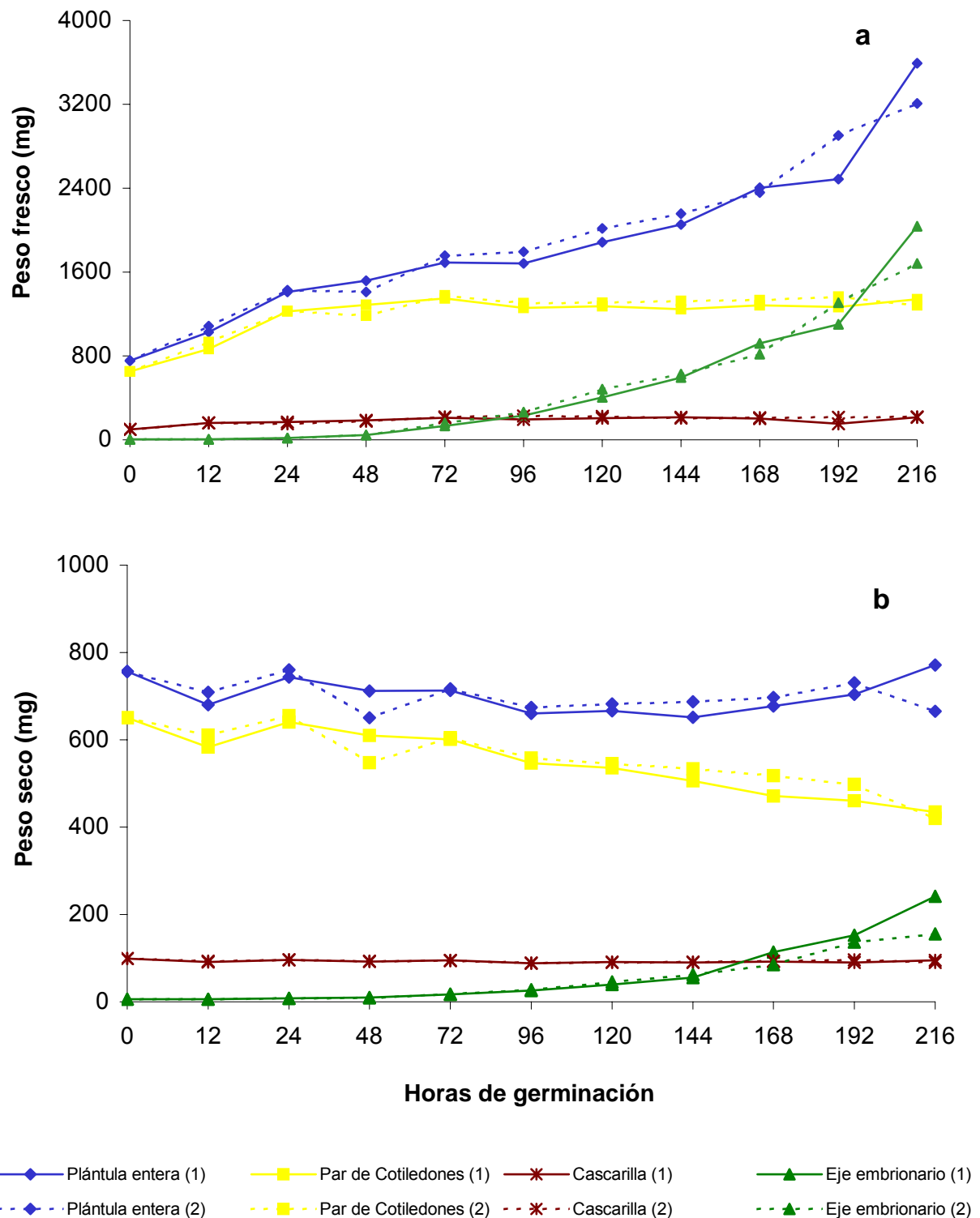


Figura 44.- Valores medios del peso fresco (a) y seco (b) del par de cotiledones, eje embrionario, cascarilla y semilla/plántula entera de *V. faba* var. Brocal a lo largo de la germinación.

(1) 1ª germinación: Línea continua y (2) 2ª germinación: Línea discontinua

3. FACTORES NO-NUTRITIVOS

Cuando se analizan los distintos factores no-nutritivos en cada una de las partes constituyentes de la semilla de *V. faba* a lo largo de la germinación, hay que tener en cuenta que al inicio del ensayo el par de cotiledones representa el 86% del peso total de la semilla, la cascarilla el 13% y el eje embrionario tan sólo el 1%. Pero estas proporciones se van modificando a medida que el tiempo de germinación va transcurriendo, ya que el eje embrionario va teniendo un peso seco cada vez mayor, mientras que los cotiledones van reduciéndose. Por lo tanto, en esta Memoria se ha creído conveniente presentar el contenido de cada compuesto no-nutritivo, expresado de dos maneras distintas: en “mg de compuesto presentes en 1 g de harina” y en “mg de compuesto presentes en una semilla entera (o plántula entera, dependiendo del tiempo de germinación) y en cada una de sus partes constituyentes”. Esta segunda forma de presentar los resultados, se obtuvo a partir del contenido de cada compuesto expresado en mg/g y del peso seco medio (g) de los cotiledones, eje embrionario y cascarilla. Se eligieron estas dos maneras de expresar los resultados, porque al tener en cuenta la contribución del peso seco de cada una de las partes de la semilla o plántula entera, se observan comportamientos diferentes de alguno de los compuestos a lo largo de la germinación. De esta manera, podemos tener una visión más completa de la evolución y distribución de cada factor no-nutritivo en los cotiledones, en el eje embrionario y en la cascarilla de las semillas germinadas a lo largo de 216 h de ensayo.

3.1. MONO-, DI- Y OLIGOSACÁRIDOS

La detección y cuantificación de mono-, di- y oligosacáridos en las muestras de *V. faba* var. Alameda y var. Brocal, se llevó a cabo por cromatografía líquida de alta resolución y detector de índice de refracción.

Los análisis cromatográficos realizados, permitieron la identificación de nueve carbohidratos solubles mediante comparación de sus tiempos de retención con los patrones correspondientes. Además, fue detectado otro compuesto que eluyó después del pentasacárido verbascosa, que probablemente se tratase de ajucosa, aunque al no disponer de un patrón externo no pudo ser confirmado. Por lo tanto, los azúcares solubles identificados en los extractos de ambas variedades fueron los monosacáridos: fructosa, glucosa y galactosa, los disacáridos: melibiosa y sacarosa, y los α -galactósidos: rafinosa (trisacárido), ciceritol (trisacárido), estaquiosa (tetrasacárido), verbascosa (pentasacárido) y probablemente ajucosa (hexasacárido).

En la elaboración de la fase móvil se utilizaron diferentes porcentajes de acetonitrilo. Para poder cuantificar los monosacáridos, fue necesario incrementar el porcentaje de acetonitrilo y reducir así la polaridad de la fase, consiguiendo con ello alargar los tiempos de retención y proporcionar una mejor separación y resolución de los picos. Mientras que para facilitar la cuantificación de los disacáridos y α -galactósidos, se utilizó un menor porcentaje de acetonitrilo, con el que se redujo la anchura de los picos, mejorando así su resolución.

Los perfiles cromatográficos de los azúcares solubles de *V. faba* se muestran en la Figura 45. En estos cromatogramas podemos observar que los compuestos de mayor peso molecular, fueron retenidos durante periodos de tiempo más largos dentro de la columna en fase amino.

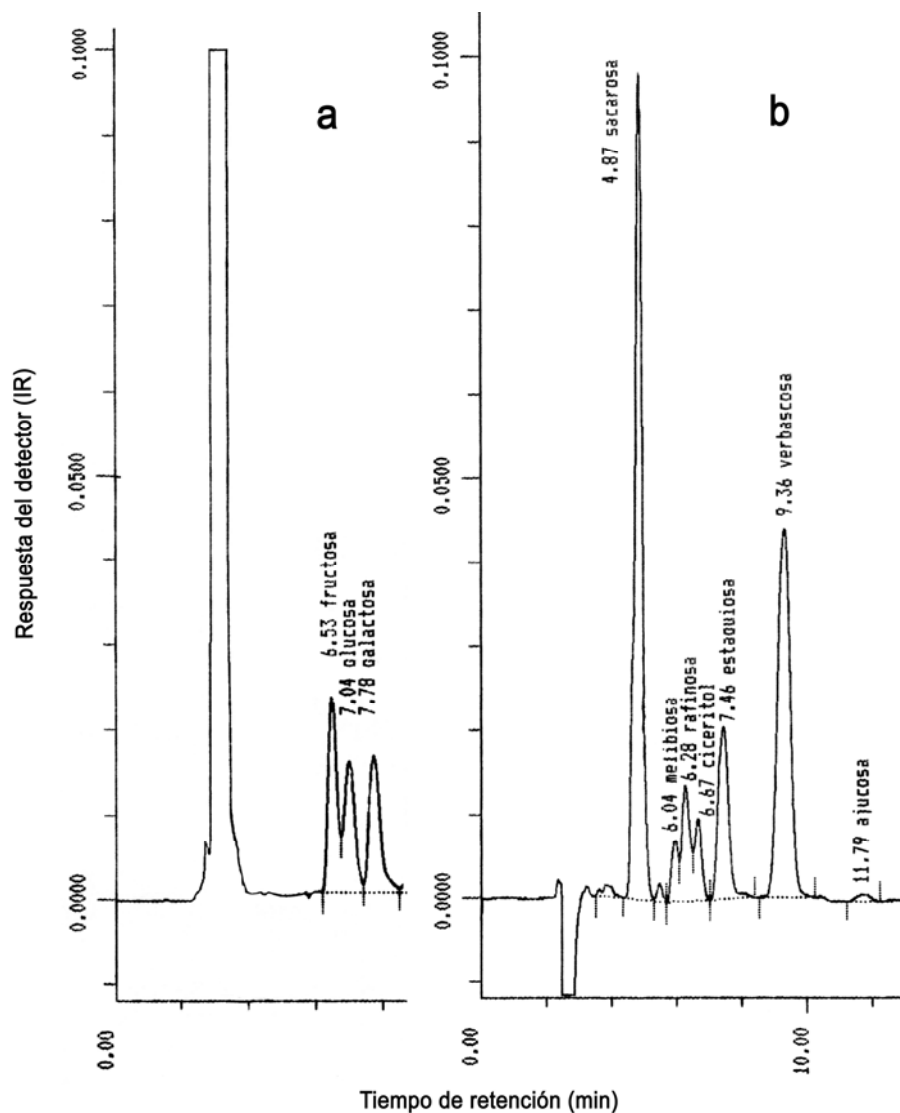


Figura 45.- Perfil cromatográfico de los monosacáridos eluidos con acetonitrilo/agua en proporción 75/25 (a) y perfil cromatográfico de los di- y oligosacáridos eluidos con acetonitrilo/agua en proporción 60/40 (b).

Azúcares solubles en semillas sin germinar

- Contenido en mg por g

En la Tabla 7, se muestran en mg/g de m.s. los valores medios de cada uno de los azúcares solubles detectados en la semilla entera, cotiledones, eje embrionario y cascarilla de las variedades de haba analizadas.

En la semilla entera, se obtuvo un contenido total de carbohidratos solubles de 95 mg/g para Alameda y de 79 mg/g para Brocal. Únicamente el 10% del contenido total de los azúcares solubles de ambas variedades fueron monosacáridos y alrededor del 35% disacáridos. Con relación a estos últimos, sacarosa (31,1 mg/g en Alameda y 24,5 mg/g en Brocal) fue detectada en una proporción muy superior a la de melibiosa. Alrededor del 50% de los carbohidratos solubles fueron oligosacáridos de la rafinosa, con un porcentaje de verbascosa (29 mg/g para ambas variedades) de aproximadamente un 66% respecto al total de estos oligosacáridos.

En los cotiledones, se detectó una cantidad total de carbohidratos solubles de 107 mg/g para la var. Alameda y de 89 mg/g para la var. Brocal. La proporción de mono-, di- y oligosacáridos en los cotiledones, fue semejante a la obtenida en la semilla entera, ya que como acabamos de señalar, el par de cotiledones constituye el 86% del peso total de la semilla.

En el eje embrionario, las concentraciones de azúcares solubles fueron más elevadas que en la semilla entera y en los cotiledones. Se detectaron valores totales de 362 mg/g en Alameda y de 292 mg/g en Brocal. Del total de los carbohidratos solubles, el contenido en monosacáridos fue del 40% en Alameda y del 25% en Brocal, con un porcentaje de galactosa (138,8 mg/g en Alameda y 71,9 mg/g en Brocal) del 98% frente al total de monosacáridos. La proporción de disacáridos, con relación al total de azúcares solubles, fue del 18%, con niveles de sacarosa 11 veces superiores a los de melibiosa en la var. Alameda, mientras que en la var. Brocal únicamente fue detectado sacarosa. El porcentaje de oligosacáridos de rafinosa, fue muy parecido al de semilla entera y cotiledones, con verbascosa como oligosacárido mayoritario (94,7 mg/g y 100,4 mg/g en Alameda y Brocal respectivamente).

En la cascarilla, los niveles totales de carbohidratos solubles fueron bajos, de 8 mg/g para Alameda y 3 mg/g para Brocal. Como se refleja en la Tabla 7, el contenido individual de cada uno de ellos fue muy pequeño o incluso nulo.

Tabla 7.- Contenido medio de azúcares solubles (mg/g de m.s.) en semilla entera, cotiledones, eje embrionario y cascarilla de *V. faba* var. Alameda y var. Brocal.

	Fructosa	Glucosa	Galactosa	Sacarosa	Melibiosa	Rafinosa	Ciceritol	Estaquiosa	Verbascosa	Ajucosa
Semilla entera (X±E.E.)										
<i>V. faba</i> var. Alameda	0,32 ± 0,05 ^a	0,16 ± 0,07 ^a	12,12 ± 0,16 ^a	31,13 ± 0,21 ^a	4,95 ± 0,28 ^a	5,03 ± 0,12 ^a	1,08 ± 0,10 ^a	9,22 ± 0,38 ^a	29,60 ± 0,31 ^a	1,64 ± 0,04 ^a
<i>V. faba</i> var. Brocal	0,04 ± 0,01 ^b	0,16 ± 0,09 ^a	5,51 ± 0,29 ^b	24,51 ± 0,54 ^b	1,67 ± 0,06 ^b	4,03 ± 0,08 ^b	4,34 ± 0,15 ^b	9,43 ± 0,19 ^a	28,69 ± 0,73 ^a	0,22 ± 0,01 ^b
Cotiledones (X±E.E.)										
<i>V. faba</i> var. Alameda	0,34 ± 0,04 ^a	0,16 ± 0,02 ^a	12,77 ± 0,11 ^a	35,55 ± 0,38 ^a	5,69 ± 0,23 ^a	5,72 ± 0,05 ^a	1,22 ± 0,12 ^a	10,34 ± 0,10 ^a	33,47 ± 0,73 ^a	1,90 ± 0,05 ^a
<i>V. faba</i> var. Brocal	0,04 ± 0,00 ^b	0,19 ± 0,01 ^a	5,74 ± 0,03 ^b	28,00 ± 0,29 ^b	1,93 ± 0,07 ^b	4,40 ± 0,10 ^b	5,04 ± 0,24 ^b	10,60 ± 0,50 ^a	32,40 ± 0,30 ^a	0,26 ± 0,03 ^b
Eje embrionario (X±E.E.)										
<i>V. faba</i> var. Alameda	3,24 ± 0,06 ^a	2,25 ± 0,00	138,80 ± 0,61 ^a	62,70 ± 0,37 ^a	5,85 ± 0,06	12,03 ± 0,22 ^a	4,03 ± 0,29	38,73 ± 0,24 ^a	94,70 ± 0,84 ^a	nd
<i>V. faba</i> var. Brocal	0,80 ± 0,13 ^b	nd	71,94 ± 0,41 ^b	49,32 ± 1,35 ^b	nd	30,38 ± 1,09 ^b	nd	37,80 ± 0,23 ^b	100,40 ± 1,59 ^b	0,95 ± 0,28
Cascarilla (X±E.E.)										
<i>V. faba</i> var. Alameda	0,37 ± 0,02 ^a	1,09 ± 0,12 ^a	1,85 ± 1,07 ^a	1,11 ± 0,29 ^a	0,60 ± 0,16 ^a	0,50 ± 0,11 ^a	1,80 ± 0,38	0,74 ± 0,26 ^a	0,18 ± 0,04	nd
<i>V. faba</i> var. Brocal	0,11 ± 0,00 ^b	0,25 ± 0,01 ^b	0,03 ± 0,00 ^b	0,73 ± 0,03 ^b	0,78 ± 0,01 ^b	0,10 ± 0,02 ^b	nd	1,12 ± 0,15 ^b	nd	nd

Medias dentro de una misma columna seguidas de distintas letras difieren significativamente (P<0,05).

X = valor medio (n=4). Dos extractos de cada muestra analizados por duplicado.

E.E. = error estándar

nd = no detectado

OFR= Oligosacáridos de la Familia de la Rafinosa

- Contenido en mg por semilla

En la Tabla 8, se presenta en mg, la cantidad media de monosacáridos, sacarosa, oligosacáridos de la familia de la rafinosa y ciceritol, contenidos en una semilla entera, un par de cotiledones, un eje embrionario y una cascarilla.

Tabla 8.- Contenido medio de azúcares solubles (mg) en la semilla entera, el par de cotiledones, el eje embrionario y la cascarilla de *V. faba* var. Alameda y var. Brocal.

	Monosacáridos	Sacarosa	OFR	Ciceritol
	Semilla entera			
<i>V. faba</i> var. Alameda	11,30	27,12	39,60	1,14
<i>V. faba</i> var. Brocal	4,36	18,60	32,17	3,28
	Par de cotiledones			
<i>V. faba</i> var. Alameda	9,91 (87,7%)	26,55 (97,9%)	38,42 (97,0%)	0,91 (97%)
<i>V. faba</i> var. Brocal	3,88 (89,0%)	18,23 (98,0%)	31,02 (96,4%)	3,28 (100%)
	Eje embrionario			
<i>V. faba</i> var. Alameda	1,01 (8,9%)	0,44 (1,6%)	1,02 (2,6%)	0,03 (3%)
<i>V. faba</i> var. Brocal	0,44 (10,1%)	0,30 (1,6%)	1,02 (3,2%)	nd
	Cascarilla			
<i>V. faba</i> var. Alameda	0,38 (3,4%)	0,13 (0,5%)	0,16 (0,4%)	nd
<i>V. faba</i> var. Brocal	0,04 (0,9%)	0,08 (0,4%)	0,13 (0,4%)	nd

Los valores entre paréntesis muestran el porcentaje de azúcares solubles en cada una de las partes de la semilla, respecto al contenido total de la misma.

nd = no detectado

OFR= Oligosacáridos de la Familia de la Rafinosa

El contenido total de monosacáridos detectado en la semilla entera de la var. Alameda fue de 11,3 mg y el de la var. Brocal de 4,4 mg, con una distribución irregular en ambas: un 89% en los cotiledones, un 9% en el eje embrionario y aproximadamente un 2% en la cascarilla. La cantidad de sacarosa presente en la semilla entera fue de 27,1 mg en la var. Alameda y de 18,6 mg en la var. Brocal y el 98% de este disacárido se localizó en los cotiledones. Los valores de los OFR en la semilla fueron de 39,6 mg y 32,2 mg para las variedades Alameda y Brocal, respectivamente, encontrándose la mayor parte en los cotiledones (97%). El contenido en ciceritol de la semilla fue bajo (1,1 mg en Alameda y 3,3 mg en Brocal) y la práctica totalidad de este compuesto fue encontrado en los cotiledones.

Evolución de los azúcares solubles a lo largo de la germinación

- Contenido en mg por g

Cotiledones

El contenido de azúcares reductores (monosacáridos y melibiosa) detectado en los cotiledones de las dos variedades en estudio se muestra en la Tabla 9 expresado en mg/g de m.s., y su evolución a lo largo del proceso germinativo queda representada en la Figura 46.

El contenido total de monosacáridos no se modificó a lo largo de la germinación. En la var. Brocal se detectaron valores prácticamente constantes de unos 6 mg/g y en la var. Alameda de algo más del doble (13 mg/g). La evolución de fructosa, glucosa y galactosa fue parecida en ambas variedades. Con relación al contenido en fructosa, observamos que durante las primeras 120 h de germinación los valores medios iban aumentando lentamente, pero posteriormente se produjo un rápido incremento, alcanzándose al final del ensayo valores 4 veces superiores a los detectados a las 120 h. Los niveles de glucosa aumentaron un 88% con la germinación. Galactosa, el monosacárido detectado en mayor proporción durante todo el proceso, mostró pequeñas oscilaciones y su contenido se redujo un 27% en la var. Alameda y un 13% en la var. Brocal, una vez concluida la germinación.

Melibiosa, es un disacárido cuya evolución fue diferente para las dos variedades en estudio. En los cotiledones de la var. Alameda, su contenido se mantuvo significativamente constante durante las primeras 24 h, alcanzando los niveles máximos entre las 48-72 h, y posteriormente se redujo gradualmente, mostrando a las 216 h valores 2 veces inferiores a los iniciales. En los cotiledones de la var. Brocal, la cantidad de melibiosa no se modificó durante las primeras 96 h y a continuación, fue incrementándose hasta alcanzar al final de la germinación niveles 3 veces superiores.

En la Tabla 10, se muestran los valores medios de la sacarosa y de los α -galactósidos en los cotiledones de las dos variedades analizadas a lo largo de las 216 h de germinación y en la Figura 47 se presenta su evolución.

En ambas variedades, el contenido en sacarosa fue elevado a lo largo de todo el proceso germinativo. En Alameda, este disacárido fue aumentando gradualmente durante las primeras horas, hasta alcanzar un valor máximo de 79,8 mg/g a las 48 h. A continuación, se produjo una disminución (42,4 mg/g a las 120 h) y a partir de las 144 h comenzó a incrementarse de nuevo, obteniéndose al final del ensayo 63,3 mg/g. En Brocal, se detectaron valores muy elevados entre las 48 y 72 h (52 mg/g), luego fueron reduciéndose hasta las 144 h y finalmente se observó un aumento, obteniéndose a las 216 h valores de 68,6 mg/g.

El contenido total de OFR se redujo a las 72 h de germinación un 90% en la var. Alameda (51,4-5,2 mg/g) y un 91% en la var. Brocal (47,7-4,1 mg/g) y a continuación permaneció prácticamente constante hasta el final del ensayo. La cantidad media de rafinosa fue reduciéndose suavemente a lo largo de la germinación. Estaquiosa se encontró en elevada proporción durante las primeras 24 h (aproximadamente 12 mg/g para ambas variedades), pero a las 48 h sufrió un importante descenso, reduciéndose su contenido un 73% en Alameda y un 60% en Brocal. A continuación, estos bajos niveles se mantuvieron constantes hasta el final del ensayo en la var. Alameda, mientras que en la var. Brocal, no fue detectado este azúcar desde las 72 h. El contenido inicial de verbascosa (33 mg/g) se redujo a las 48 h de germinación un 95% en la var. Alameda y un 92% en la var. Brocal, y a partir de las 72 h ya no fue detectado en ninguna de las dos variedades. La concentración de ajucosa fue muy inferior a los de sus homólogos de menor peso molecular y únicamente se detectó durante las primeras 24 h de germinación.

El ciceritol, es un α -galactósido de inositol cuya evolución a lo largo de la germinación fue muy diferente a la de los α -galactósidos de sacarosa. Durante las primeras 48 h se obtuvieron valores significativamente iguales de aproximadamente 1,8 mg/g para Alameda y de 3,9 mg/g para Brocal, incrementándose posteriormente hasta alcanzar a las 216 h un contenido medio 6 y 7,5 veces superior al inicial en Alameda y Brocal, respectivamente.

Eje embrionario

Los valores de los azúcares reductores del eje embrionario se recogen en la Tabla 11 y su variación a lo largo de la germinación se muestra en la Figura 48.

La cantidad total de monosacáridos se redujo con la germinación un 39% en la var. Alameda (144,3-88,2 mg/g) y un 38% en la var. Brocal (72,7-45,3 mg/g). En ambas variedades, el nivel de fructosa fue aumentando durante las primeras horas de germinación y alcanzó su valor máximo a las 72 h. Posteriormente, su contenido fue disminuyendo gradualmente, observándose al final de la germinación una reducción del 61% en la var. Alameda y del 42% en la var. Brocal.

En la var. Alameda, las cantidades iniciales de glucosa se incrementaron un 96% a las 96 h, y posteriormente presentaron ligeras oscilaciones hasta final de la germinación. En la var. Brocal, su contenido aumentó rápidamente durante las primeras horas, alcanzando a las 72 h valores de 23,5 mg/g. A continuación, se observaron pequeñas variaciones, obteniéndose a las 216 h valores iguales a los detectados a las 72 h.

El contenido de galactosa fue muy superior al de fructosa y glucosa, y los valores de Alameda fueron aproximadamente del doble que los de Brocal a lo largo de todo el periodo

germinativo. Sus niveles descendieron gradualmente y al final del ensayo las reducciones fueron del 82% aproximadamente en ambas variedades.

Los valores de melibiosa fueron aumentando a lo largo de las primeras horas de germinación, incrementándose en Alameda entre las 144 y 168 h un 92% y en Brocal a las 144 h un 100%. Posteriormente se observó una ligera reducción.

En la Tabla 12, se presentan los datos de los azúcares no-reductores del eje embrionario a lo largo de la germinación y en la Figura 49 se muestra su evolución.

El contenido medio de sacarosa mostró oscilaciones durante el periodo germinativo en ambas variedades. Los valores iniciales de 62,7 mg/g para Alameda y de 49,3 mg/g para Brocal, se redujeron ligeramente durante las primeras horas de ensayo. Posteriormente, fueron incrementándose hasta alcanzar a las 96 h valores de 54,6 mg/g para Alameda y de 50,9 mg/g para Brocal, que a continuación se redujeron hasta obtener a las 216 h niveles 3 y 2 veces inferiores a los detectados a las 96 h en las variedades Alameda y Brocal, respectivamente.

El contenido total de oligosacáridos de rafinosa descendió con la germinación un 94% en la var. Alameda (152,9-9,1 mg/g) y un 79% en la var. Brocal (168,6-34,8 mg/g), aunque el porcentaje reducido a las 48 h fue muy parecido. La cantidad de rafinosa detectada en Brocal fue siempre de más del doble que la de Alameda y varió ligeramente a lo largo del ensayo, alcanzándose los valores máximos entre las 96 y 144 h en ambas variedades.

En el eje embrionario de las dos variedades analizadas, al inicio de la germinación se detectaron cantidades de verbascosa de 100 mg/g y de estaquiosa de unos 39 mg/g. El contenido se redujo drásticamente, de manera que a las 48 h estos azúcares ya no se detectaron.

La evolución del ciceritol fue muy diferente a la de los otros α -galactósidos analizados, ya que su contenido fue aumentando gradualmente a lo largo de la germinación. El incremento alcanzado a las 216 h fue del 97% para la var. Alameda y del 100% para la var. Brocal.

Cascarilla

Los valores de cascarilla no se muestran porque fueron muy bajos durante todo el periodo germinativo.

- Contenido en mg por semilla o plántula

El contenido medio de los monosacáridos, sacarosa, OFR y ciceritol obtenido a lo largo de la germinación, se representa en las Figuras 50 y 51 expresado en mg/par de cotiledones (a), mg/eje embrionario (b) y mg/cascarilla (valores no mostrados por su bajo o nulo contenido). Los valores de la semilla o plántula entera (c) se obtuvieron a partir de la suma de los datos de los cotiledones, del eje embrionario y de cascarilla.

Los niveles de monosacáridos presentes en los cotiledones al comienzo de la germinación fueron de 9,9 mg para Alameda y de 3,9 mg para Brocal, y a las 216 h de ensayo se detectaron valores ligeramente inferiores. En el eje embrionario, estos azúcares se incrementaron con la germinación un 94% en Alameda (1,0-16,8 mg) y un 96% en Brocal (0,4-9,0 mg). Por lo tanto, inicialmente el 89% de los monosacáridos estaban en los cotiledones y el 10% en el eje, pero al final del proceso sólo el 29% permaneció en cotiledones y el 70% se encontró en el eje. Con la suma del contenido en monosacáridos de cotiledones y eje, se obtuvo la cantidad presente en la semilla o plántula entera, que fue incrementándose gradualmente a medida que transcurría el tiempo de germinación.

En cuanto al contenido total de sacarosa en la semilla, el 98% estaba inicialmente en los cotiledones y el 2% en el eje embrionario. Al final de la germinación, esta proporción varió muy poco, encontrándose un 89% en los cotiledones y un 10% en el eje. En los cotiledones, los niveles de este disacárido presentaron oscilaciones a lo largo de todo el proceso, alcanzando valores máximos en la var. Alameda a las 48 h (60,5 mg) y en la var. Brocal a las 72 h (31,8 mg). En el eje, los niveles iniciales fueron muy bajos y se incrementaron al final del ensayo 7 veces en la var. Alameda (3,1 mg) y algo más de 15 veces en la var. Brocal (4,6 mg). El contenido en sacarosa de las semillas germinadas y de las plántulas enteras en desarrollo, fue muy similar al detectado en los cotiledones, debido a la escasa cantidad presente en el eje embrionario.

Al inicio del proceso germinativo, el 97% de los OFR estaba localizado en los cotiledones y el 2% en el eje embrionario. A las 216 h de ensayo, el contenido era muy bajo y estaba distribuido entre los cotiledones y el eje. En los cotiledones, la cantidad de estos compuestos fue elevada durante las primeras 24 h (39 mg en Alameda y 28 mg en Brocal), pero se redujo aproximadamente un 80% a las 48 h. Posteriormente, se obtuvieron valores prácticamente constantes, de unos 3 mg para la var. Alameda y 1,7 mg para la var. Brocal. En el eje embrionario, los niveles iniciales de estos azúcares fueron de 1 mg para ambas variedades y al finalizar la germinación de 1,7 mg para Alameda y de 6,9 mg para Brocal. Los valores de los OFR obtenidos a partir de las 48 h de ensayo en el eje, procedían exclusivamente de la rafinosa, porque la estaquiosa y la verbascosa ya no se detectaron a ese tiempo. Como consecuencia del bajo contenido de OFR en el eje, los resultados de las

— semillas germinadas y de las plántulas enteras en desarrollo fueron muy similares a los de los cotiledones.

El bajo contenido en ciceritol de la semilla, estaba inicialmente en los cotiledones, pero fue incrementándose tanto en los cotiledones como en el eje, alcanzándose al final de la germinación valores de 8,5 mg en los cotiledones de Alameda y de 11,0 mg en los de Brocal, mientras que en el eje se obtuvieron valores superiores (24,5 mg en Alameda y 30,1 mg en Brocal). Por lo tanto, la distribución a las 216 h de ensayo fue del 27% en los cotiledones y del 74% en el eje. Este aumento gradual del ciceritol en ambas partes, se refleja en la plántula entera, donde se alcanzaron elevadas cantidades al final de la germinación.

Tabla 9.- Contenido medio de azúcares reductores (mg/g de m.s.) en los cotiledones de *V. faba* var. Alameda y var. Brocal a lo largo de la germinación.

Horas de germinación	Fructosa (X±E.E.)	Glucosa (X±E.E.)	Galactosa (X±E.E.)	Melibiosa (X±E.E.)
<i>Vicia faba</i> var. Alameda				
0	0,34±0,04 ^a	0,16±0,02 ^a	12,77±0,11 ^{a,b}	5,69±0,23 ^b
12	0,26±0,01 ^a	0,12±0,03 ^a	13,27±0,22 ^a	5,53±0,33 ^{b,c}
24	0,41±0,07 ^a	0,12±0,03 ^a	12,27±0,15 ^{b,c}	5,73±0,14 ^b
48	0,69±0,12 ^b	0,14±0,03 ^a	11,89±0,16 ^{c,d}	6,76±0,28 ^a
72	0,61±0,05 ^b	0,35±0,05 ^b	11,54±0,19 ^{d,e}	6,14±0,36 ^{a,b}
96	1,10±0,03 ^c	0,44±0,04 ^b	12,12±0,16 ^{c,d}	4,82±0,17 ^{c,d}
120	1,11±0,05 ^c	0,42±0,04 ^b	11,13±0,23 ^{e,f}	3,88±0,15 ^d
144	1,90±0,04 ^d	0,77±0,03 ^c	10,71±0,10 ^{f,g}	3,77±0,06 ^{d,e}
168	2,16±0,07 ^e	0,78±0,02 ^c	10,39±0,05 ^g	3,62±0,34 ^{d,e}
192	2,71±0,06 ^f	0,80±0,11 ^c	9,32±0,26 ^h	3,07±0,27 ^{e,f}
216	4,31±0,09 ^g	1,42±0,08 ^d	9,31±0,35 ^h	2,44±0,25 ^f
<i>Vicia faba</i> var. Brocal				
0	0,04±0,00 ^a	0,19±0,01 ^a	5,74±0,03 ^a	1,93±0,07 ^{a,b,c}
12	0,14±0,01 ^{a,b}	0,12±0,02 ^a	6,03±0,19 ^a	1,56±0,29 ^{a,b}
24	0,16±0,03 ^{a,b}	0,19±0,03 ^a	4,69±0,04 ^{b,c}	1,86±0,35 ^{a,b,c}
48	0,16±0,01 ^{a,b}	0,29±0,03 ^a	4,98±0,08 ^b	1,38±0,07 ^a
72	0,30±0,02 ^c	0,52±0,05 ^{b,c}	4,73±0,04 ^{b,c}	1,76±0,04 ^{a,b,c}
96	0,22±0,02 ^{b,c}	0,28±0,01 ^a	4,52±0,10 ^c	1,94±0,09 ^{a,b,c}
120	0,30±0,06 ^c	0,48±0,02 ^b	3,19±0,06 ^e	2,24±0,04 ^{b,c}
144	0,67±0,06 ^d	0,52±0,00 ^{b,c}	4,56±0,27 ^{b,c}	2,54±0,15 ^{c,d}
168	0,90±0,03 ^e	0,70±0,04 ^c	3,93±0,11 ^d	3,01±0,19 ^d
192	0,99±0,04 ^{e,f}	1,13±0,06 ^d	4,60±0,23 ^{b,c}	4,38±0,07 ^e
216	1,05±0,01 ^f	1,55±0,12 ^e	4,99±0,13 ^b	5,62±0,16 ^f

Medias dentro de una misma columna seguidas de distintas letras difieren significativamente ($P < 0,05$).

X= valor medio (n=8). Dos extractos de cada muestra analizados por duplicado.

E.E.= error estándar

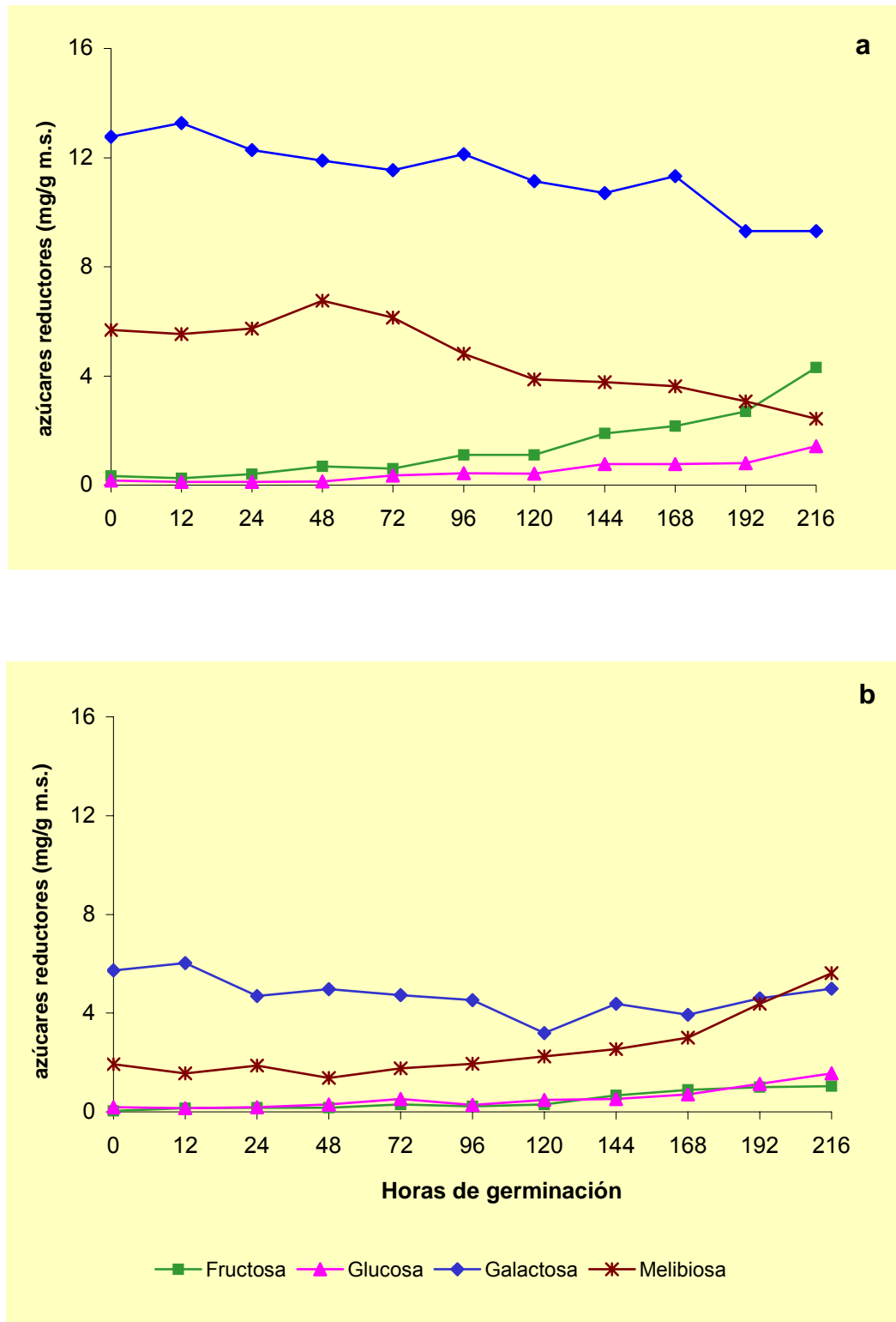


Figura 46.- Variación del contenido medio de azúcares reductores (mg/g de m.s.) a lo largo de la germinación en los cotiledones de *V. faba* var. Alameda (a) y var. Brocal (b).

Tabla 10.- Contenido medio de azúcares no-reductores (mg/g de m.s.) en los cotiledones de *V. faba* var. Alameda y var. Brocal lo largo de la germinación.

Horas de germinación	Sacarosa (X±E.E.)	Rafinosa (X±E.E.)	Ciceritol (X±E.E.)	Estaquiosa (X±E.E.)	Verbascosa (X±E.E.)	Ajucosa (X±E.E.)
<i>Vicia faba</i> var. Alameda						
0	35,55±0,38 ^a	5,72±0,05 ^a	1,22±0,12 ^a	10,34±0,10 ^a	33,47±0,73 ^a	1,90±0,05 ^a
12	40,06±2,52 ^{a,b}	4,66±0,22 ^b	1,73±0,06 ^a	13,99±0,79 ^b	38,00±2,99 ^a	2,44±0,17 ^b
24	45,33±1,26 ^{c,d}	4,56±0,19 ^b	1,58±0,13 ^a	14,80±0,59 ^b	26,18±1,44 ^b	2,28±0,08 ^{a,b}
48	79,79±4,30 ^h	4,75±0,27 ^b	2,61±0,19 ^a	2,76±0,17 ^c	1,62±0,13 ^c	nd
72	62,58±1,38 ^g	3,50±0,30 ^{c,d}	5,60±0,66 ^b	1,72±0,18 ^c	nd	nd
96	53,41±0,37 ^f	3,68±0,08 ^c	9,74±0,09 ^c	1,58±0,12 ^c	nd	nd
120	42,39±1,24 ^{b,c}	3,14±0,10 ^{c,d}	11,01±0,80 ^c	1,65±0,20 ^c	nd	nd
144	46,77±0,89 ^{c,d,e}	3,48±0,18 ^{c,d}	13,44±0,46 ^d	1,70±0,19 ^c	nd	nd
168	48,63±1,27 ^{d,e,f}	3,43±0,11 ^{c,d}	15,51±0,40 ^{e,f}	1,46±0,13 ^c	nd	nd
192	51,88±0,96 ^{e,f}	3,43±0,17 ^{c,d}	14,27±0,17 ^{d,e}	1,71±0,24 ^c	nd	nd
216	63,29±1,63 ^g	3,02±0,16 ^d	16,39±0,87 ^f	1,97±0,33 ^c	nd	nd
<i>Vicia faba</i> var. Brocal						
0	28,00±0,29 ^a	4,40±0,11 ^{a,b}	5,04±0,24 ^{a,b}	10,60±0,51 ^a	32,40±0,30 ^a	0,26±0,03 ^a
12	28,41±1,60 ^a	4,80±0,27 ^a	3,82±0,64 ^a	10,40±0,82 ^a	29,23±1,32 ^b	0,25±0,07 ^a
24	32,27±0,65 ^b	4,20±0,20 ^b	3,48±0,66 ^a	12,30±0,81 ^a	24,79±0,98 ^c	0,37±0,05 ^a
48	51,74±0,91 ^e	3,86±0,06 ^{b,c}	3,45±0,56 ^a	4,23±0,32 ^b	2,55±0,14 ^d	nd
72	52,75±1,66 ^e	4,10±0,13 ^{b,c}	6,34±0,23 ^b	nd	nd	nd
96	47,70±1,34 ^d	3,58±0,27 ^c	10,74±0,50 ^c	nd	nd	nd
120	41,62±0,76 ^c	2,99±0,10 ^d	17,34±0,64 ^d	nd	nd	nd
144	38,20±1,30 ^c	3,00±0,11 ^d	18,10±1,80 ^e	nd	nd	nd
168	41,03±0,29 ^c	2,62±0,05 ^d	19,74±0,30 ^f	nd	nd	nd
192	50,99±1,01 ^{d,e}	2,85±0,08 ^d	23,77±0,51 ^g	nd	nd	nd
216	68,57±2,21 ^f	3,05±0,00 ^d	25,78±0,24 ^h	nd	nd	nd

Medias dentro de una misma columna seguidas de distintas letras difieren significativamente ($P < 0,05$).

X= valor medio (n=8). Dos extractos de cada muestra analizados por duplicado.

E.E.= error estándar

nd= no detectado

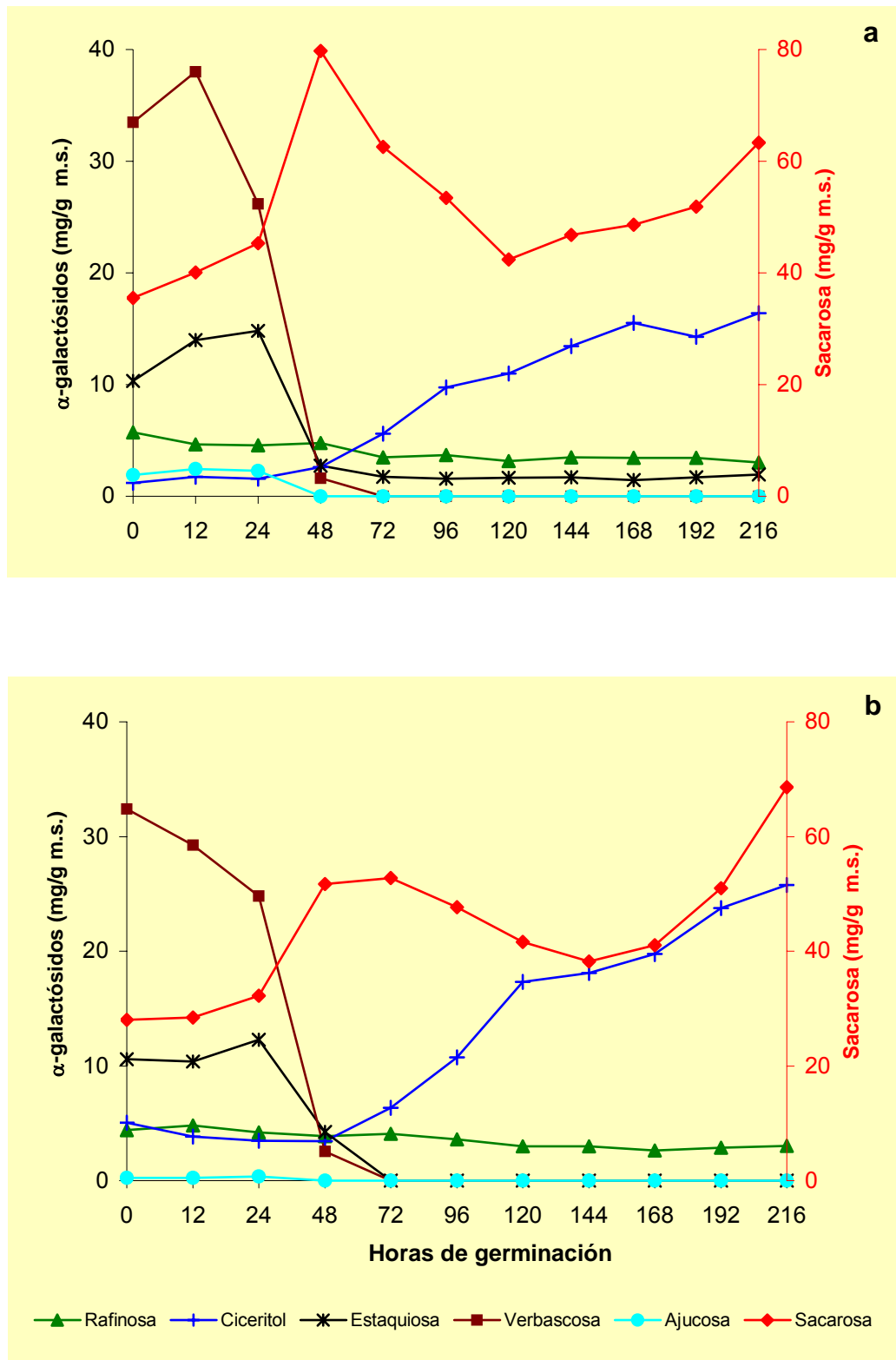


Figura 47.- Variación del contenido medio de azúcares no-reductores (mg/g de m.s.) a lo largo de la germinación en los cotiledones de *V. faba* var. Alameda (a) y var. Brocal (b).

Tabla 11.- Contenido medio de azúcares reductores (mg/g de m.s.) en el eje embrionario de *V. faba* var. Alameda y var. Brocal a lo largo de la germinación.

Horas de germinación	Fructosa (X±E.E.)	Glucosa (X±E.E.)	Galactosa (X±E.E.)	Melibiosa (X±E.E.)
<i>Vicia faba</i> var. Alameda				
0	3,24±0,06 ^a	2,25±0,00 ^a	138,80±0,61 ^a	5,84±0,06 ^a
48	14,12±0,29 ^b	16,48±0,82 ^b	119,63±0,55 ^b	13,17±0,38 ^a
72	35,18±0,50 ^f	43,60±4,09 ^{c,d}	65,80±0,89 ^c	26,30±0,68 ^b
96	28,10±2,37 ^e	61,59±3,03 ^{e,f}	53,51±1,00 ^d	62,41±0,80 ^{c,d}
120	23,77±2,62 ^{d,e}	47,83±4,55 ^{c,d}	49,65±1,00 ^d	66,70±1,84 ^{d,e}
144	22,26±2,21 ^{c,d}	63,85±2,09 ^f	39,14±1,88 ^e	72,33±2,00 ^e
168	17,58±0,50 ^{b,c}	44,80±0,35 ^{c,d}	34,35±0,46 ^f	72,07±1,73 ^e
192	15,21±0,47 ^b	37,55±4,08 ^c	27,59±0,79 ^g	56,99±5,74 ^c
216	13,67±0,26 ^b	51,13±2,27 ^{de}	23,44±1,77 ^h	56,64±4,61 ^c
<i>Vicia faba</i> var. Brocal				
0	0,80±0,13 ^a	0,00±0,00	71,94±0,41 ^a	nd
48	7,26±0,16 ^c	11,03±0,36 ^a	50,82±1,02 ^b	12,00±2,29 ^a
72	19,90±0,37 ^f	23,48±1,40 ^{c,d}	35,01±1,17 ^c	24,37±4,01 ^b
96	12,17±0,21 ^e	19,95±0,21 ^{bc}	27,99±1,26 ^d	41,50±1,14 ^c
120	10,82±0,32 ^d	18,49±1,16 ^b	24,35±1,08 ^e	60,52±2,82 ^{e,f}
144	5,11±0,11 ^b	24,46±1,57 ^d	23,68±1,26 ^e	65,82±1,54 ^f
168	4,28±0,20 ^b	26,49±1,58 ^d	16,85±0,51 ^f	56,91±2,99 ^e
192	5,15±0,57 ^b	20,31±0,87 ^{b,c}	14,27±0,60 ^f	50,06±0,85 ^d
216	8,34±0,71 ^c	23,24±1,39 ^{c,d}	13,70±0,90 ^g	56,44±1,91 ^{d,e}

Medias dentro de una misma columna seguidas de distintas letras difieren significativamente (P<0,05).

X = valor medio (n=8). Dos extractos de cada muestra analizados por duplicado.

E.E. = error estándar

nd = no detectado

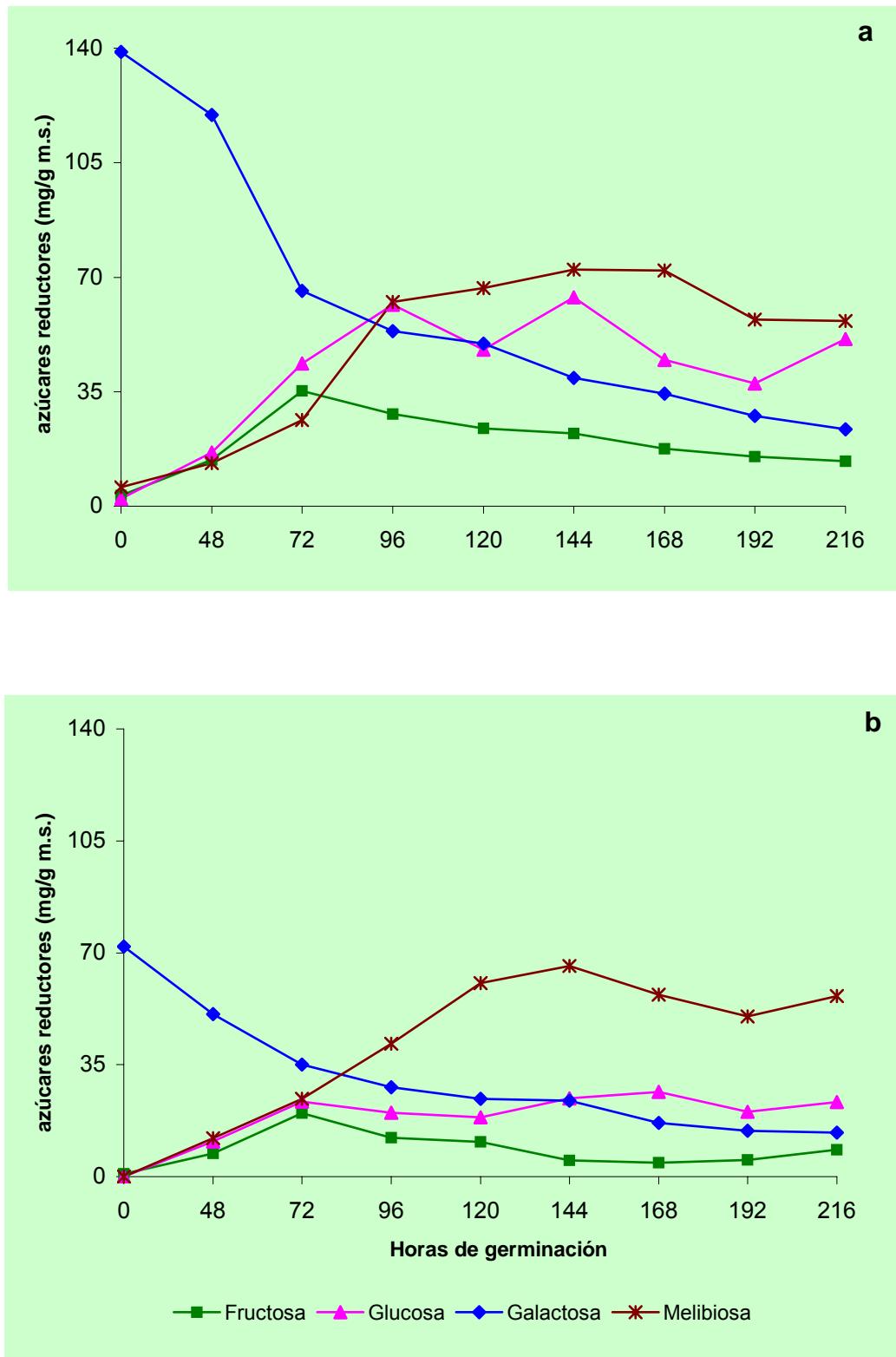


Figura 48.- Variación del contenido medio de azúcares reductores (mg/g de m.s.) a lo largo de la germinación en el eje embrionario de *V. faba* var. Alameda (a) y var. Brocal (b).

Tabla 12.- Contenido medio de azúcares no-reductores (mg/g de m.s.) en el eje embrionario de *V. faba* var. Alameda y var. Brocal a lo largo de la germinación.

Horas de germinación	Sacarosa (X±E.E.)	Rafinosa (X±E.E.)	Ciceritol (X±E.E.)	Estaquiosa (X±E.E.)	Verbascosa (X±E.E.)
<i>Vicia faba</i> var. Alameda					
0	62,70±0,37 ^a	12,02±0,22 ^a	4,03±0,10 ^a	40,90±0,24	100,00±0,84
48	41,59±0,86 ^c	7,39±0,19 ^b	23,10±0,21 ^b	nd	nd
72	44,55±0,50 ^c	13,65±0,31 ^c	57,82±0,77 ^c	nd	nd
96	54,59±3,23 ^b	15,40±0,21 ^d	88,51±1,10 ^d	nd	nd
120	44,40±0,93 ^c	15,87±0,33 ^d	101,33±0,86 ^e	nd	nd
144	36,58±2,05 ^d	15,13±0,10 ^d	110,95±2,81 ^f	nd	nd
168	29,68±1,58 ^e	9,26±0,29 ^e	111,94±1,73 ^f	nd	nd
192	19,99±1,13 ^f	8,70±0,24 ^f	116,98±3,51 ^f	nd	nd
216	16,26±0,56 ^f	9,06±0,31 ^e	129,00±2,67 ^g	nd	nd
<i>Vicia faba</i> var. Brocal					
0	49,32±1,35 ^b	30,38±1,09 ^{a,b}	0,00±0,00	37,80±0,23	100,40±1,59
48	46,31±0,26 ^a	29,45±0,54 ^a	25,39±0,93 ^a	nd	nd
72	44,48±0,26 ^a	43,39±1,69 ^d	62,27±0,92 ^b	nd	nd
96	50,90±0,46 ^b	49,79±0,80 ^e	91,01±1,38 ^c	nd	nd
120	49,12±1,31 ^b	51,35±1,38 ^e	117,42±1,49 ^d	nd	nd
144	40,05±0,41 ^c	49,08±0,83 ^e	125,38±0,88 ^e	nd	nd
168	27,06±1,36 ^d	35,36±1,04 ^c	122,81±3,14 ^e	nd	nd
192	18,81±0,49 ^e	33,35±1,07 ^{b,c}	135,83±2,63 ^f	nd	nd
216	22,92±1,38 ^f	34,79±0,48 ^c	151,02±1,72 ^g	nd	nd

Medias dentro de una misma columna seguidas de distintas letras difieren significativamente (P<0,05).

X = valor medio (n=8). Dos extractos de cada muestra analizados por duplicado.

E.E. = error estándar

nd = no detectado

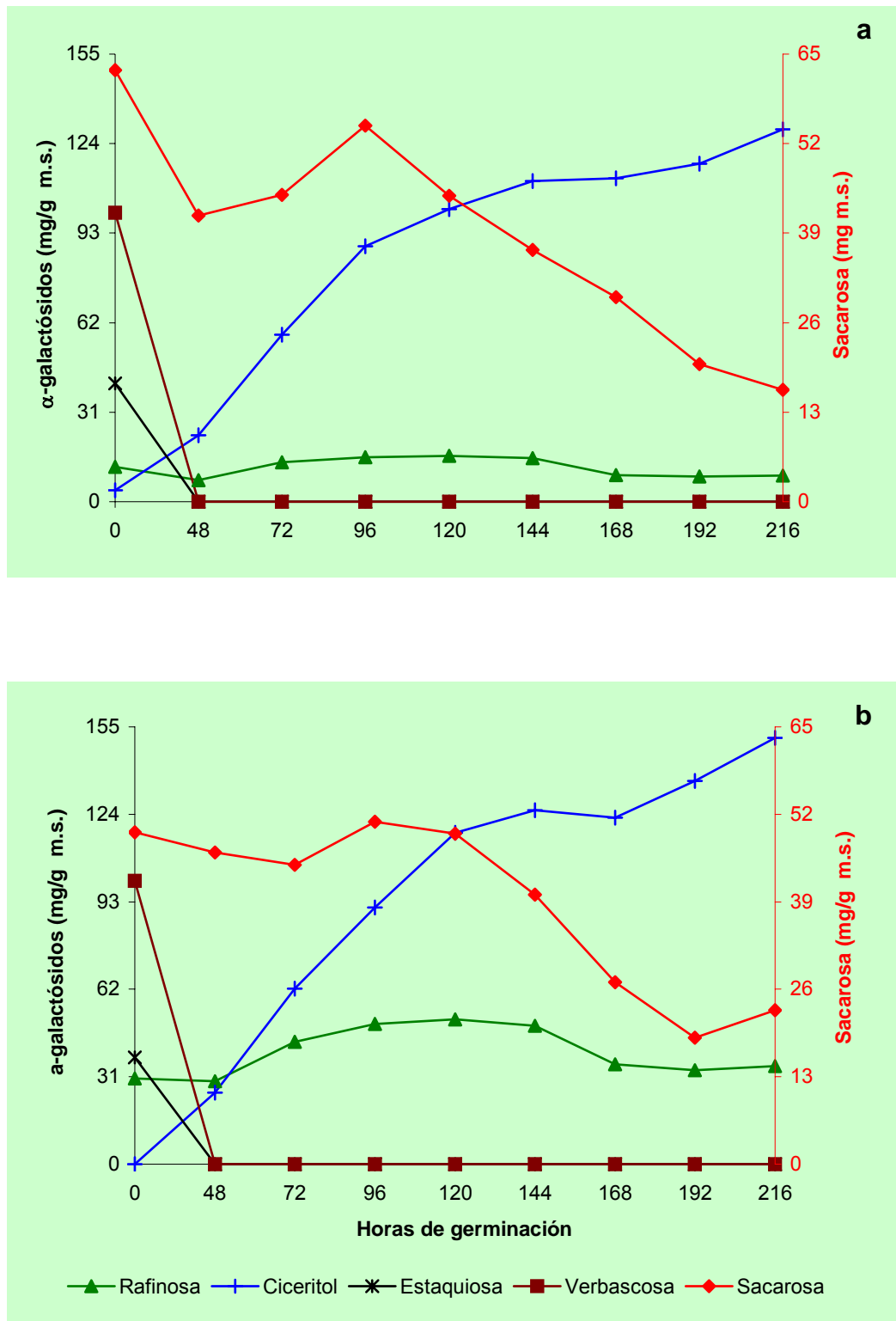


Figura 49.- Variación del contenido medio de azúcares no-reductores (mg/g de m.s.) a lo largo de la germinación en el eje embrionario de *V. faba* var. Alameda (a) y var. Brocal (b).

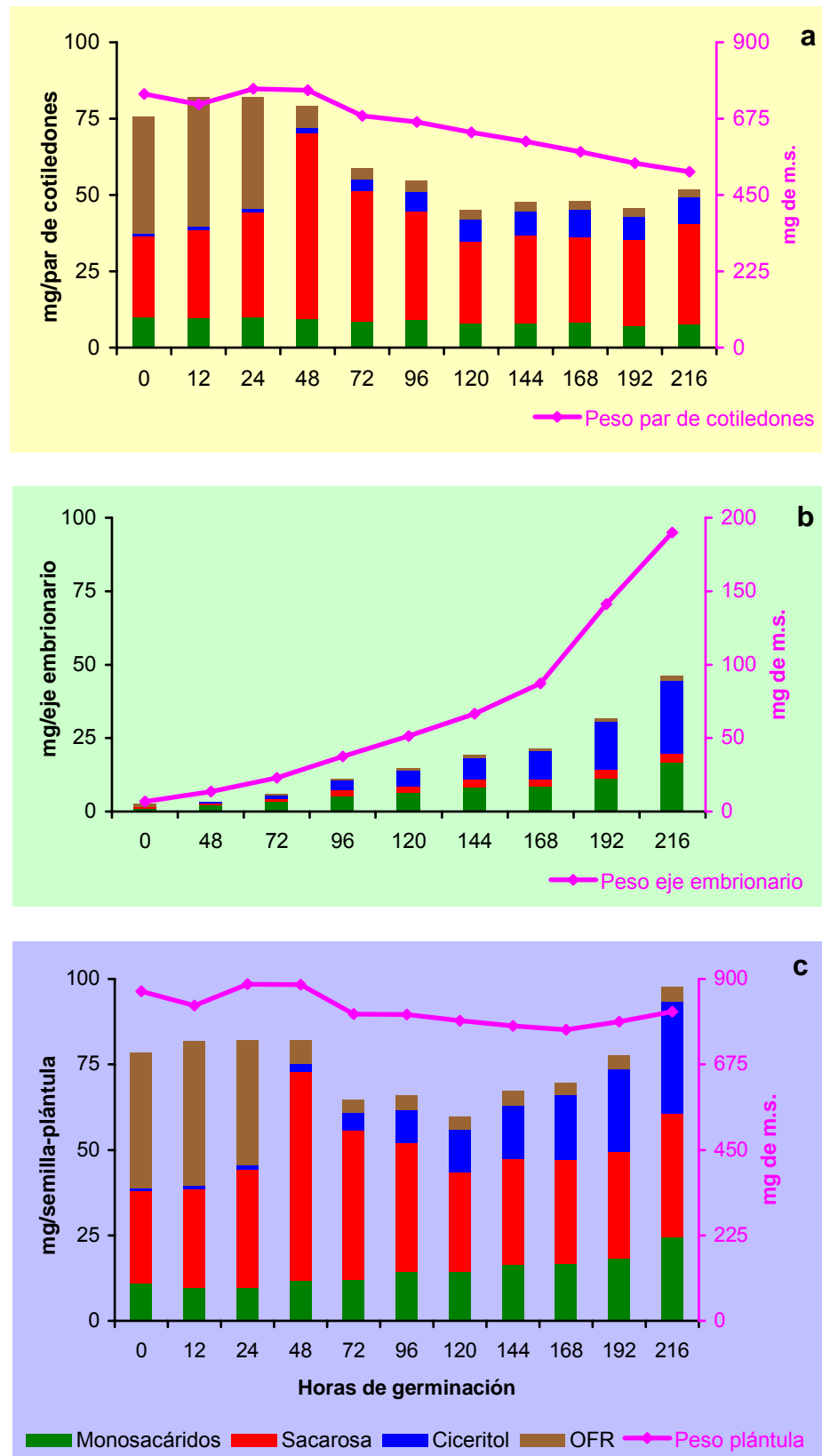


Figura 50.- Variación del contenido medio de azúcares solubles (mg) a lo largo de la germinación en el par de cotiledones (a), el eje embrionario (b) y la semilla/plántula entera (c) de *V. faba* var. Alameda.

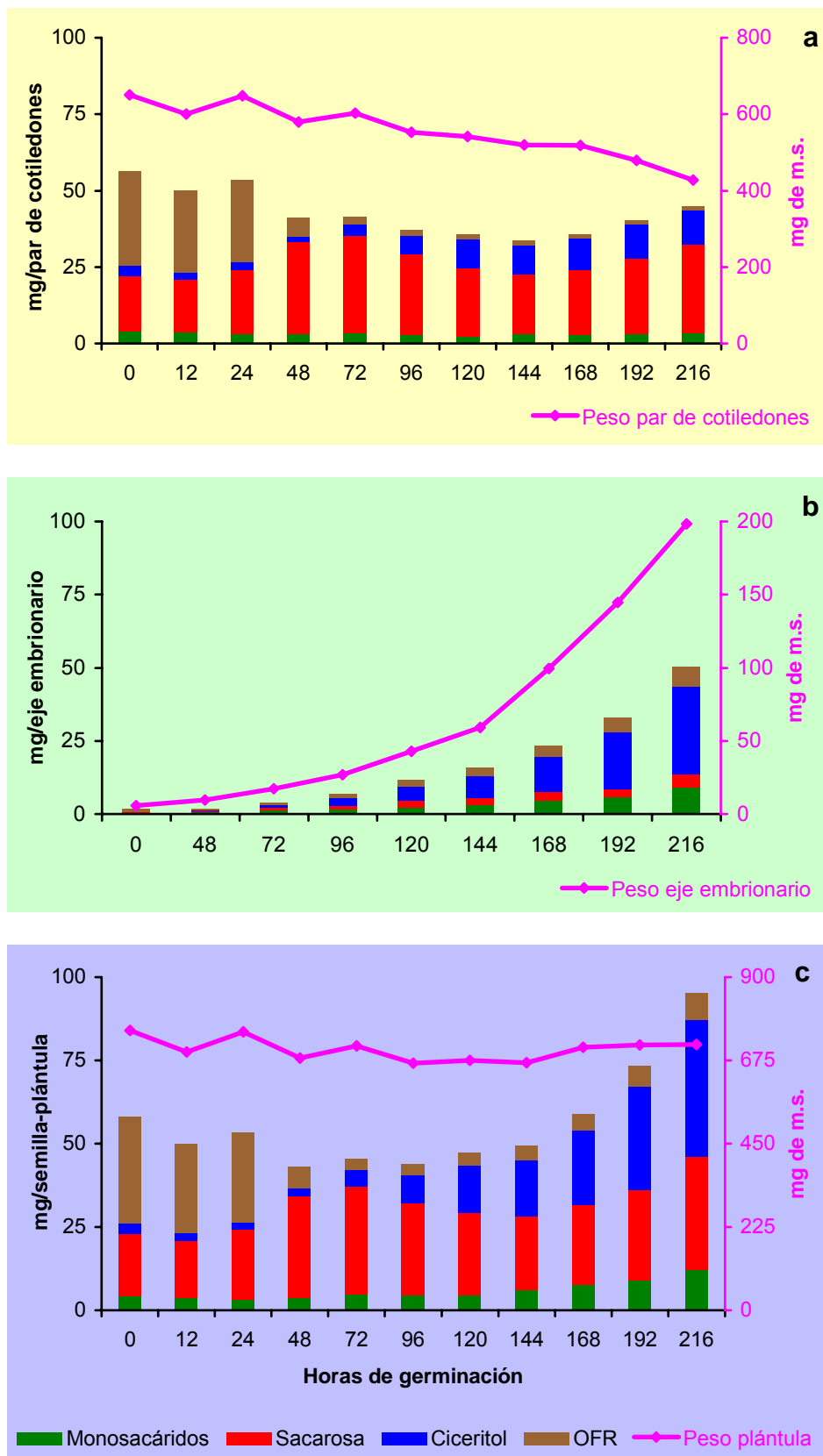


Figura 51.- Variación del contenido medio de azúcares solubles (mg) a lo largo de la germinación en el par de cotiledones (a), el eje embrionario (b) y la semilla/plántula entera (c) de *V. faba* var. Brocal.

3.2. VICINA, CONVICINA Y L-DOPA

La determinación de glucósidos pirimidínicos y L-DOPA en las muestras procedentes de *V. faba* var. Alameda y var. Brocal se realizó por cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa utilizando un detector UV-visible.

En la Figura 52, se muestra un ejemplo del perfil cromatográfico de vicina, convicina y L-DOPA en un extracto de habas. La fase móvil utilizada para la separación y elución de los analitos a través de la columna C₁₈ fue una solución tampón de fosfato amónico, y el tiempo requerido para llevar a cabo estos análisis fue de 12 minutos.

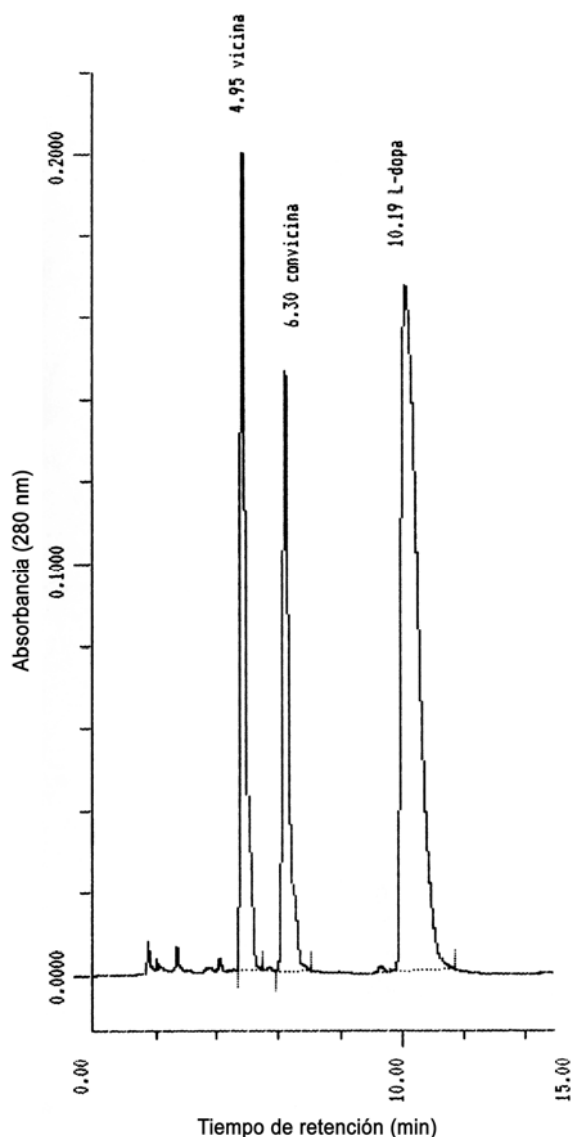


Figura 52.- Perfil cromatográfico de vicina, convicina y L-DOPA en el eje embrionario de *V. faba* var. Alameda germinada durante 216 h.

Glucósidos pirimidínicos y L-DOPA en semillas sin germinar

- Contenido en mg por g

Los valores medios de vicina, convicina y L-DOPA obtenidos en la semilla entera, cotiledones, eje embrionario y cascarilla expresados en “mg de compuesto por gramo de materia seca”, se muestran en la Tabla 13.

Tabla 13.- Contenido medio de glucósidos pirimidínicos y L-DOPA (mg/g de m.s.) en semilla entera, cotiledones, eje embrionario y cascarilla de *V. faba* var. Alameda y var. Brocal.

	Vicina	Convicina	L-DOPA
	Semilla entera (X±E.E.)		
<i>V. faba</i> var. Alameda	4,51 ± 0,05 ^a	2,47 ± 0,03 ^a	0,02 ± 0,00 ^a
<i>V. faba</i> var. Brocal	4,03 ± 0,04 ^b	1,77 ± 0,02 ^b	0,02 ± 0,00 ^a
	Cotiledones (X±E.E.)		
<i>V. faba</i> var. Alameda	4,74 ± 0,05 ^a	2,82 ± 0,04 ^a	nd
<i>V. faba</i> var. Brocal	4,16 ± 0,04 ^b	2,03 ± 0,02 ^b	nd
	Eje embrionario (X±E.E.)		
<i>V. faba</i> var. Alameda	51,17 ± 0,37 ^a	3,60 ± 0,06 ^a	1,93 ± 0,02 ^a
<i>V. faba</i> var. Brocal	56,65 ± 1,28 ^b	2,86 ± 0,03 ^b	2,60 ± 0,18 ^a
	Cascarilla (X±E.E.)		
<i>V. faba</i> var. Alameda	0,23 ± 0,01 ^a	0,16 ± 0,01 ^a	0,57 ± 0,03 ^a
<i>V. faba</i> var. Brocal	0,25 ± 0,02 ^a	0,09 ± 0,00 ^b	1,07 ± 0,06 ^b

Medias dentro de una misma columna seguidas de distintas letras difieren significativamente (P<0,05).

X= valor medio (n=4). Dos extractos de cada muestra analizados por duplicado.

E.E.= error estándar

nd= no detectado

En la semilla entera de la var. Alameda, el contenido de vicina y el de convicina fue significativamente superior al de la var. Brocal. En Alameda, la proporción de vicina fue del 64% (4,5 mg/g), la de convicina del 35% (2,5 mg/g) y la de L-DOPA únicamente del 0,2%. De manera similar, Brocal presentó un porcentaje de vicina del 69% (4,0 mg/g), de convicina del 30% (1,8 mg/g) y de L-DOPA del 0,3%.

En los cotiledones, los niveles de ambos glucósidos fueron ligeramente superiores a los de la semilla entera. En las dos variedades se obtuvo un contenido de vicina prácticamente del doble que el de convicina, mientras que L-DOPA no fue detectada.

El compuesto mayoritario del eje embrionario fue vicina, que se encontró en una proporción del 90% aproximadamente para ambas variedades, con valores muy superiores a los

detectados en la semilla entera y en los cotiledones (51,2 mg/g en Alameda y 56,7 mg/g en Brocal). En cambio, el contenido en convicina fue de 3,6 mg/g para Alameda y de 2,9 mg/g para Brocal, y los niveles de L-DOPA fueron para Alameda de 1,9 mg/g y para Brocal de 2,6 mg/g.

Como quedó reflejado en esta tabla, el contenido en glucósidos de la cascarilla fue muy bajo y el de L-DOPA ligeramente superior.

- Contenido en mg por semilla

En la Tabla 14, se muestra en mg, la cantidad media de vicina, convicina y L-DOPA, que contiene una semilla entera, un par de cotiledones, un eje embrionario y una cascarilla.

Tabla 14.- Contenido medio de glucósidos pirimidínicos y L-DOPA (mg) en la semilla entera, el par de cotiledones, el eje embrionario y la cascarilla de *V. faba* var. Alameda y var. Brocal.

	Vicina	Convicina	L-DOPA
	Semilla entera		
<i>V. faba</i> var. Alameda	3,94	2,16	0,08
<i>V. faba</i> var. Brocal	3,07	1,34	0,12
	Par de cotiledones		
<i>V. faba</i> var. Alameda	3,55 (90%)	2,12 (98%)	nd
<i>V. faba</i> var. Brocal	2,71 (88%)	1,32 (98%)	nd
	Eje embrionario		
<i>V. faba</i> var. Alameda	0,36 (9%)	0,03 (1%)	0,01 (18%)
<i>V. faba</i> var. Brocal	0,34 (11%)	0,02 (1%)	0,02 (13%)
	Cascarilla		
<i>V. faba</i> var. Alameda	0,03 (1%)	0,02 (1%)	0,06 (82%)
<i>V. faba</i> var. Brocal	0,03 (1%)	0,01 (1%)	0,11 (87%)

Los valores entre paréntesis muestran el porcentaje de compuesto en cada una de las partes de la semilla, respecto al contenido total de la misma.

nd= no detectado

De un contenido total de vicina en la semilla de 3,9 mg para Alameda y de 3,1 mg para Brocal, aproximadamente el 89% fue detectado en los cotiledones, el 10% en el eje embrionario y el 1% en la cascarilla.

Los niveles de convicina de la semilla entera fueron de 2,2 mg en la var. Alameda y de 1,3 mg en la var. Brocal, encontrándose el 98% en los cotiledones.

Los valores de L-DOPA en la semilla, fueron de 0,08 mg para Alameda y de 0,12 mg para Brocal, de los cuales, aproximadamente un 16% se localizó en el eje y alrededor del 84% en la cascarilla.

Evolución de los glucósidos pirimidínicos y L-DOPA durante la germinación

- Contenido en mg por g

Cotiledones

En la Tabla 15, se muestra el contenido medio de vicina y de convicina en los cotiledones de las variedades Alameda y Brocal, y su evolución a lo largo de germinación queda representada en la Figura 53.

En los cotiledones de las dos variedades analizadas, los valores de vicina fueron prácticamente del doble que los de convicina durante todo el ensayo de germinación.

En la var. Alameda, el contenido inicial de vicina se redujo ligeramente a las 24 h, manteniendo valores significativamente iguales hasta las 120 h y posteriormente los niveles descendieron suavemente, obteniéndose al final de la germinación reducciones del 28% (3,4 mg/g a las 216 h). En la var. Brocal, se obtuvo un valor máximo a las 12 h y a continuación se observó una disminución gradual hasta llegar a valores cercanos a la mitad a las 216 h (2,5 mg/g).

En ambas variedades, el contenido medio de convicina fue descendiendo paulatinamente, obteniéndose al final de la germinación una reducción del 50%: 1,4 mg/g en Alameda y 1,0 mg/g en Brocal.

Eje embrionario

En la Tabla 16, se muestra el contenido medio de vicina, convicina y L-DOPA en el eje embrionario de las dos variedades analizadas a lo largo de la germinación, y en la Figura 54 se observa la evolución de los mismos.

El contenido inicial de vicina detectado en el eje fue muy superior al de los cotiledones. Este glucósido se redujo rápidamente durante las primeras 96 h de germinación, obteniéndose a ese tiempo valores tres veces inferiores a los encontrados a 0 h. Posteriormente su descenso fue más lento y al final de la germinación se observaron reducciones del 81% (9,8 mg/g en Alameda y 10,4 mg/g en Brocal a las 216 h).

El contenido en convicina de ambas variedades, no mostró variaciones significativamente durante las primeras 24 h de germinación. Pero a partir de las 48 h, sus niveles fueron incrementándose paulatinamente, hasta alcanzar a las 216 h de germinación valores de algo más del doble que los detectados inicialmente.

La L-DOPA presentó una evolución diferente a la de los glucósidos pirimidínicos. Durante las primeras 24 h de ensayo se detectaron valores de aproximadamente 2 mg/g para ambas variedades. A continuación, el contenido de la var. Alameda se incrementó bruscamente, alcanzando a las 120 h valores 37 veces superiores a los detectados al comienzo de la germinación, no modificándose posteriormente. En la var. Brocal los niveles fueron aumentando y a las 144 h se obtuvo un valor máximo de 84 mg/g, 33 veces superior al detectado al inicio del proceso, que posteriormente se redujo un 13%.

Cascarilla

Los datos de cascarilla no se muestran, porque las bajas cantidades de vicina, convicina y L-DOPA obtenidas inicialmente en esta cubierta, ya no se detectaron durante el proceso germinativo.

- Contenido en mg por semilla o plántula

En las Figuras 55 y 56, queda representada la evolución de vicina, convicina y L-DOPA a lo largo de la germinación, en los cotiledones (a), el eje embrionario (b) y la semilla/plántula entera (c). En dichas figuras se muestra también la variación de su peso seco.

La proporción de vicina localizada en los cotiledones al inicio de la germinación fue del 89% y en el eje del 10% aproximadamente. En los cotiledones, el contenido de este compuesto descendió lentamente a lo largo de la germinación, obteniéndose a las 216 h valores de la mitad (1,8 mg en Alameda y 1,1 mg en Brocal). Mientras que en el eje embrionario, los niveles iniciales (0,4 mg para Alameda y 0,3 mg para Brocal) fueron aumentando gradualmente, alcanzándose al final del ensayo valores 5 y 6 veces superiores en las variedades Alameda y Brocal, respectivamente. Por lo tanto, a las 216 h de germinación, en los cotiledones fue detectada alrededor del 40% de la vicina total y en el eje el 60%.

En relación con la distribución de convicina en la semilla, pudimos observar que el 98% de este compuesto estaba inicialmente en los cotiledones y el 1% en el eje, pero al final de la germinación el porcentaje detectado en los cotiledones fue del 28% y en el eje del 72%. Respecto a la evolución de este glucósido durante el proceso germinativo, habría que señalar que el contenido inicial detectado en los cotiledones se redujo un 67% (0,7 mg en

Alameda y 0,4 mg en Brocal a las 216 h), mientras que el del eje se incrementó un 98% (1,6 mg en Alameda y 1,3 mg en Brocal a las 216 h).

En la semilla o plántula entera, el contenido de vicina y convicina no se modificó prácticamente a lo largo de la germinación, debido al descenso gradual de estos compuestos en los cotiledones, que fue compensado con el incremento de los mismos en el eje embrionario.

En cuanto a la localización y evolución de L-DOPA a lo largo de la germinación, se observó que inicialmente el 15% del contenido total de este aminoácido estaba en el eje y el porcentaje restante en la cascarilla. Pero al final del proceso, prácticamente el 100% de la L-DOPA se encontró en el eje embrionario, ya que su contenido fue aumentando gradualmente hasta alcanzar a las 216 h de ensayo valores 1.000 veces superiores a los detectados inicialmente (0,015-15 mg). Este comportamiento quedó reflejado en la plántula entera.

Tabla 15.- Contenido medio de glucósidos pirimidínicos y de L-DOPA (mg/g de m.s.) en los cotiledones de *V. faba* var. Alameda y var. Brocal a lo largo de la germinación.

Horas de germinación	Vicina (X±E.E.)	Convicina (X±E.E.)
<i>Vicia faba</i> var. Alameda		
0	4,74 ± 0,05 ^a	2,82 ± 0,04 ^a
12	4,87 ± 0,08 ^a	2,73 ± 0,04 ^{a,b}
24	4,17 ± 0,09 ^b	2,62 ± 0,05 ^{b,c}
48	4,21 ± 0,05 ^b	2,73 ± 0,05 ^{a,b}
72	4,13 ± 0,08 ^b	2,52 ± 0,05 ^c
96	3,99 ± 0,11 ^{b,c}	2,39 ± 0,05 ^d
120	4,19 ± 0,06 ^b	2,25 ± 0,04 ^e
144	3,85 ± 0,05 ^c	2,12 ± 0,01 ^f
168	3,88 ± 0,06 ^c	1,91 ± 0,02 ^g
192	3,41 ± 0,05 ^d	1,17 ± 0,03 ^h
216	3,39 ± 0,09 ^d	1,39 ± 0,05 ⁱ
<i>Vicia faba</i> var. Brocal		
0	4,16 ± 0,04 ^a	2,03 ± 0,02 ^{a,b}
12	4,57 ± 0,05 ^b	2,08 ± 0,08 ^a
24	3,67 ± 0,03 ^d	1,92 ± 0,05 ^{b,c}
48	3,89 ± 0,04 ^c	1,99 ± 0,02 ^{a,b}
72	3,86 ± 0,05 ^c	1,85 ± 0,02 ^c
96	3,66 ± 0,03 ^d	1,80 ± 0,02 ^c
120	3,302 ± 0,07 ^e	1,54 ± 0,02 ^d
144	3,19 ± 0,12 ^e	1,35 ± 0,02 ^e
168	2,78 ± 0,02 ^f	1,21 ± 0,01 ^f
192	2,79 ± 0,06 ^f	1,08 ± 0,02 ^g
216	2,49 ± 0,08 ^g	0,99 ± 0,08 ^g

Medias dentro de una misma columna seguidas de distintas letras difieren significativamente (P<0,05).

X= valor medio (n=8). Dos extractos de cada muestra analizados por duplicado.

E.E.= error estándar

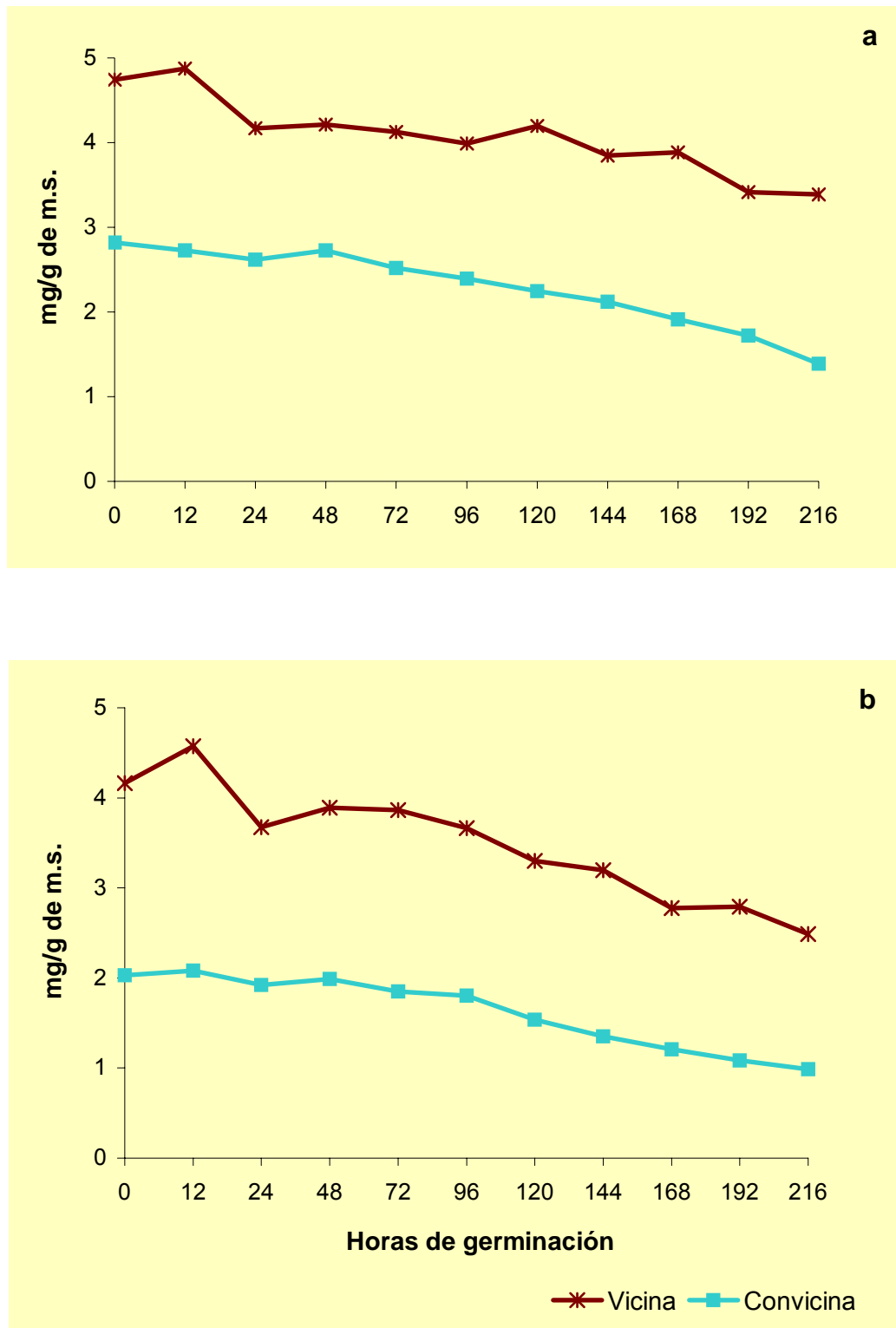


Figura 53.- Variación del contenido medio de vicina y convicina (mg/g de m.s.) a lo largo de la germinación en los cotiledones de *V. faba* var. Alameda (**a**) y var. Brocal (**b**).

Tabla 16.- Contenido medio de glucósidos pirimidínicos y de L-DOPA (mg/g de m.s.) en el eje embrionario de *V. faba* var. Alameda y var. Brocal a lo largo de la germinación.

Horas de germinación	Vicina (X±E.E.)	Convicina (X±E.E.)	L-DOPA (X±E.E.)
<i>Vicia faba</i> var. Alameda			
0	51,17 ± 0,37 ^a	3,60 ± 0,06 ^a	1,95 ± 0,00 ^a
24	45,74 ± 1,34 ^b	4,10 ± 0,13 ^a	1,53 ± 0,21 ^a
48	37,37 ± 0,62 ^c	5,33 ± 0,12 ^b	10,99 ± 0,13 ^b
72	21,61 ± 0,49 ^d	7,75 ± 0,26 ^c	31,99 ± 0,47 ^c
96	17,77 ± 0,34 ^e	11,16 ± 0,23 ^{f,g}	60,42 ± 1,37 ^d
120	15,57 ± 0,51 ^f	11,45 ± 0,14 ^g	71,74 ± 0,99 ^e
144	12,48 ± 0,78 ^g	10,43 ± 0,47 ^f	74,60 ± 2,68 ^e
168	11,55 ± 0,27 ^{g,h}	9,48 ± 0,18 ^e	77,50 ± 1,41 ^e
192	9,82 ± 0,34 ^h	8,90 ± 0,40 ^{d,e}	76,07 ± 1,68 ^e
216	9,81 ± 0,08 ^h	8,37 ± 0,69 ^{c,d}	77,44 ± 1,69 ^e
<i>Vicia faba</i> var. Brocal			
0	56,65 ± 1,28 ^a	2,86 ± 0,03 ^a	2,60 ± 0,18 ^a
24	49,79 ± 0,23 ^b	2,62 ± 0,01 ^a	1,53 ± 0,03 ^a
48	36,95 ± 1,47 ^c	3,99 ± 0,05 ^b	16,51 ± 0,21 ^b
72	26,81 ± 0,45 ^d	7,26 ± 0,03 ^d	40,66 ± 0,96 ^c
96	21,65 ± 0,38 ^e	9,88 ± 0,38 ^f	60,49 ± 1,50 ^d
120	19,29 ± 0,12 ^f	10,55 ± 0,10 ^g	73,88 ± 1,42 ^{e,f}
144	17,69 ± 0,21 ^g	10,18 ± 0,01 ^{f,g}	84,39 ± 0,21 ^g
168	13,70 ± 0,18 ^h	7,93 ± 0,04 ^e	77,96 ± 1,56 ^f
192	10,90 ± 0,35 ⁱ	6,51 ± 0,33 ^c	71,38 ± 2,08 ^e
216	10,40 ± 0,58 ⁱ	6,29 ± 0,30 ^c	73,84 ± 3,22 ^{e,f}

Medias dentro de una misma columna seguidas de distintas letras difieren significativamente (P<0,05)

X= valor medio (n=8). Dos extractos de cada muestra analizados por duplicado.

E.E.= error estándar

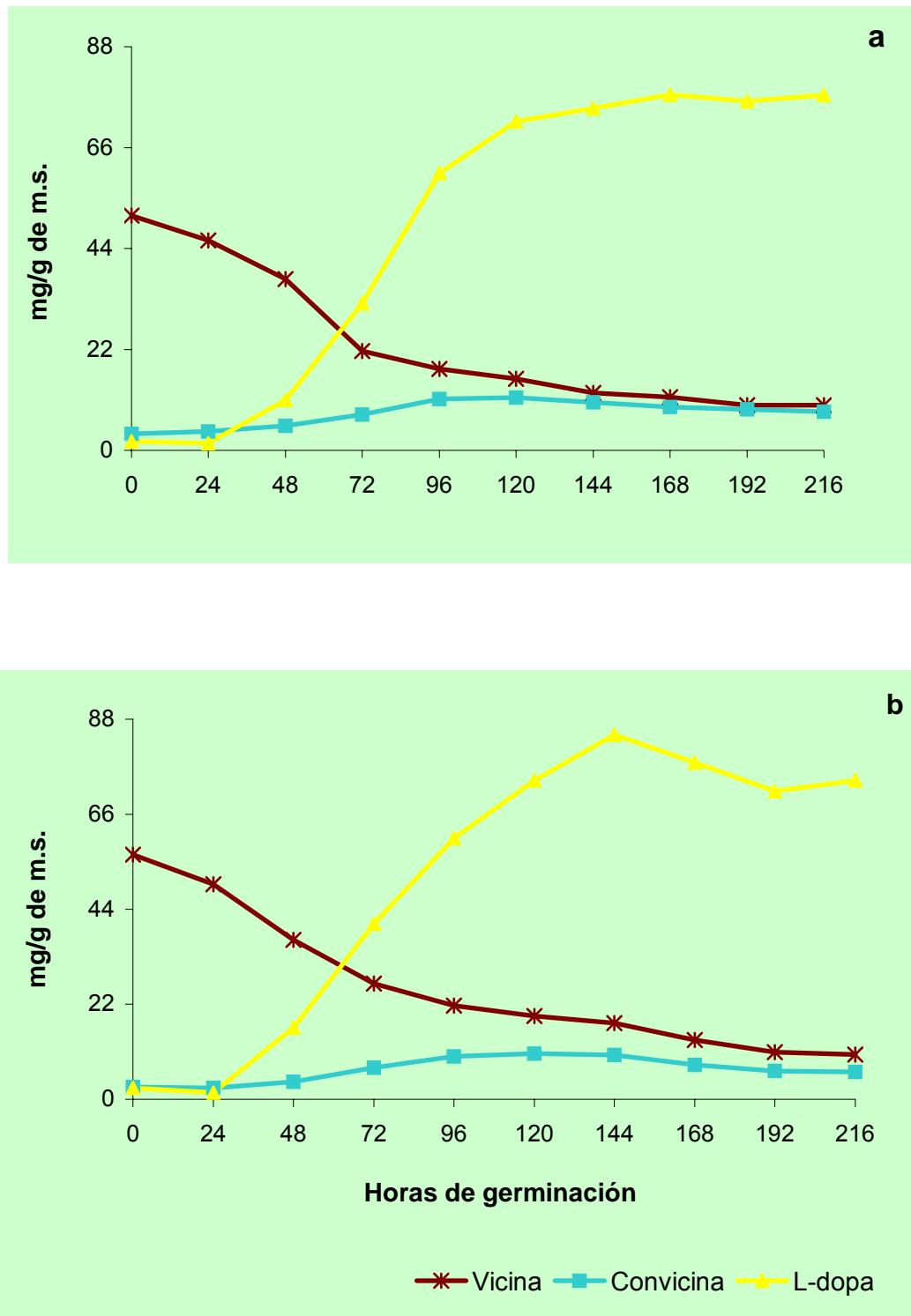


Figura 54.- Variación del contenido medio de vicina, convicina y L-DOPA (mg/g de m.s.) a lo largo de la germinación en el eje embrionario de *V. faba* var. Alameda (a) y var. Brocal (b).

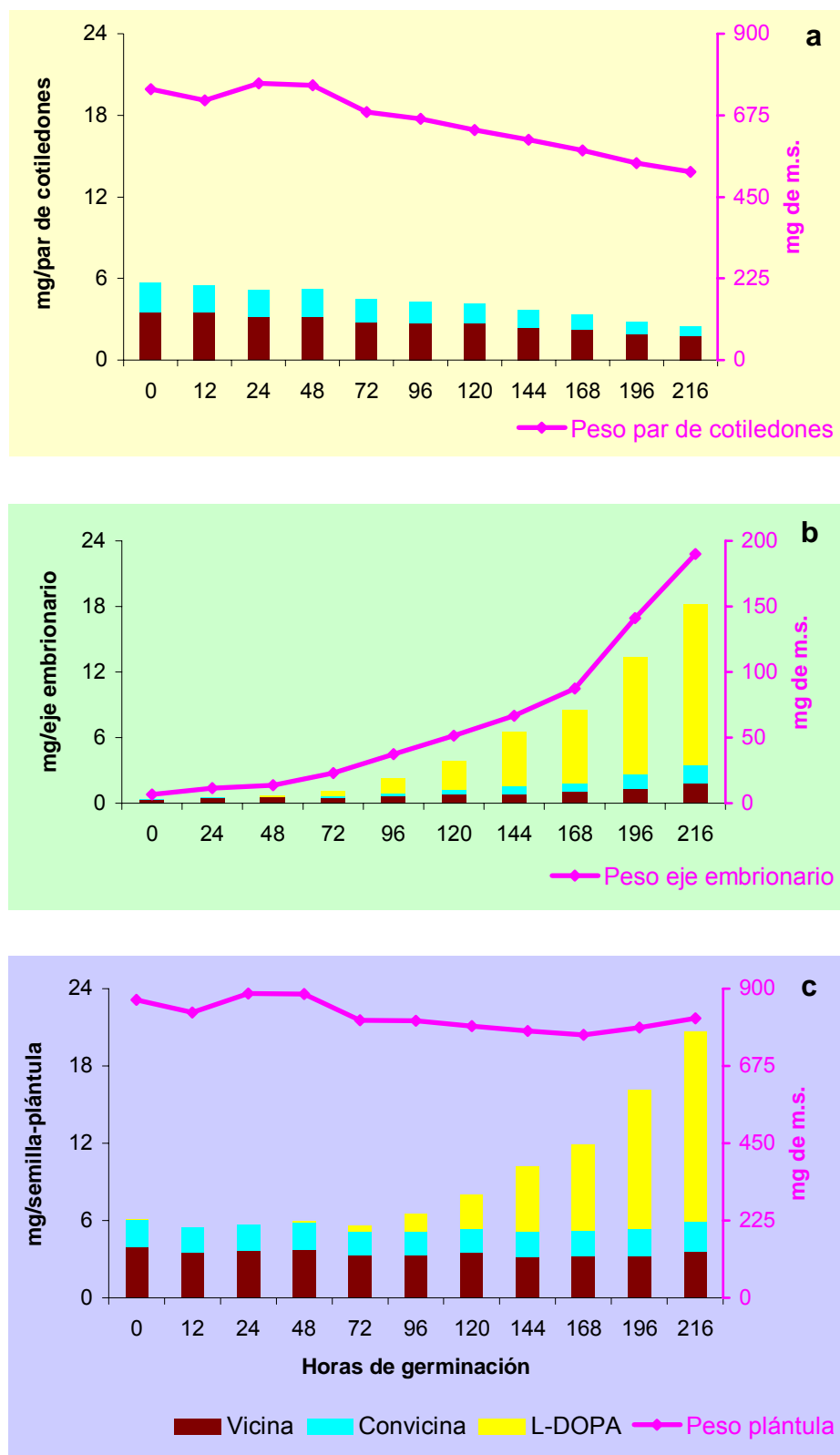


Figura 55.- Variación del contenido medio de vicina, convicina y L-DOPA (mg) a lo largo de la germinación en el par de cotiledones (a), el eje embrionario (b) y la semilla/plántula entera (c) de *V. faba* var. Alameda.

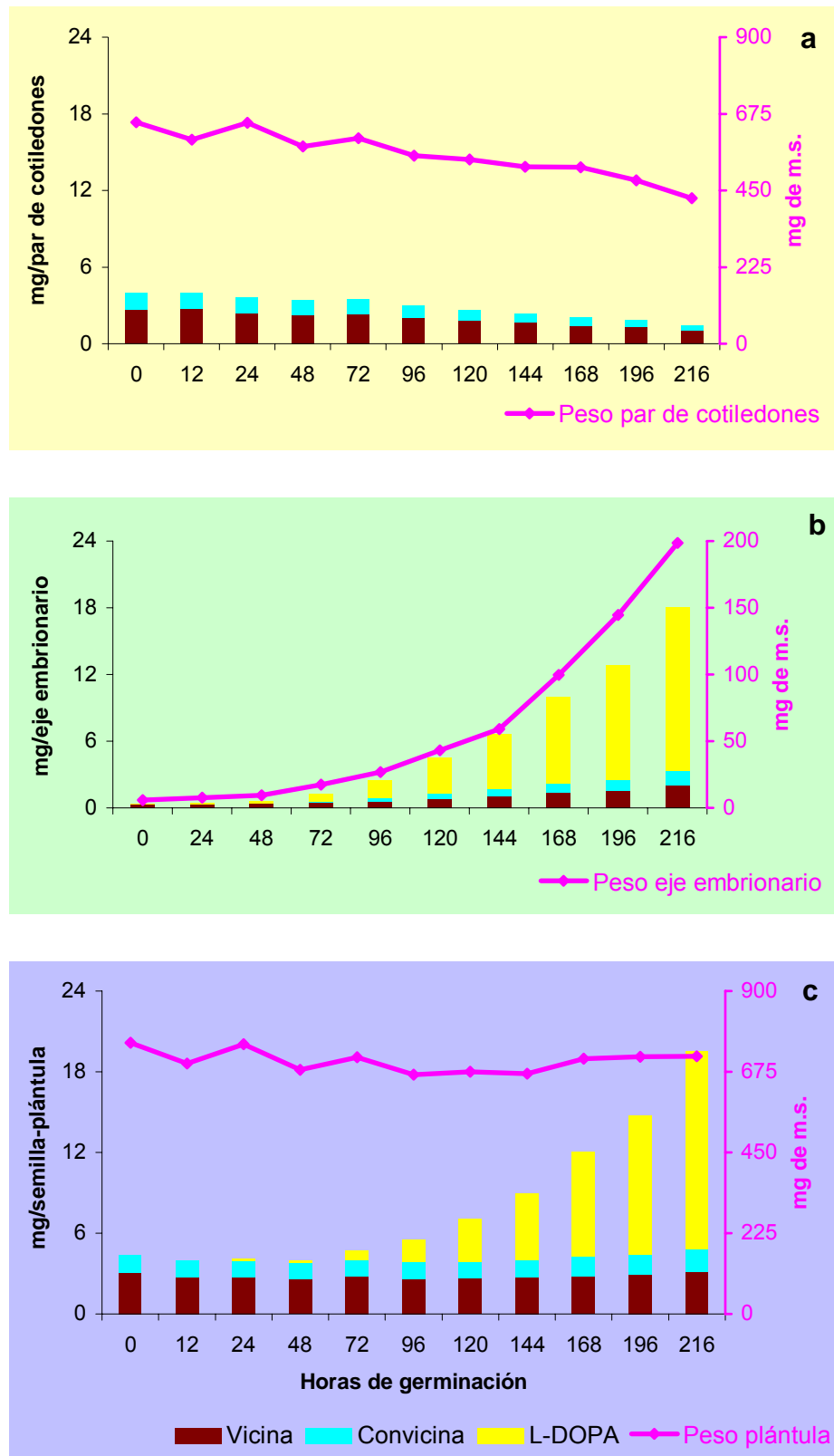


Figura 56.- Variación del contenido medio de vicina, convicina y L-DOPA (mg) a lo largo de la germinación en el par de cotiledones (a), el eje embrionario (b) y la semilla/plántula entera (c) de *V. faba* var. Brocal.

3.3. INOSITOLES FOSFATO

La determinación de los inositoles fosfato: IP6 (ácido fítico), IP5, IP4 e IP3, en las muestras procedentes de *V. faba* var. Alameda y var. Brocal, se realizó por cromatografía líquida de alta resolución de par iónico en fase reversa y detector de índice de refracción.

En la Figura 57, se muestra como ejemplo un perfil cromatográfico de los inositoles fosfato en un extracto de semillas de *V. faba* y se observa la separación del IP6 de sus derivados menos fosforilados IP5, IP4 e IP3 en 7 min. El orden de elución de los compuestos está directamente relacionado con su polaridad, de manera que el inositol fosfato más hidrófilo, IP3, es retenido en la columna durante un periodo de tiempo más corto, y por tanto es el primero en eluir.

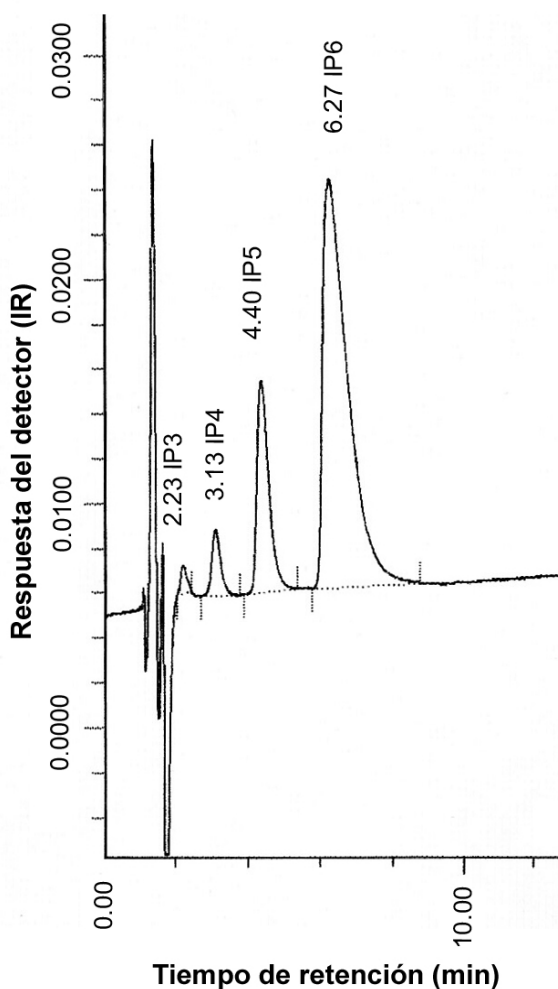


Figura 57.- Perfil cromatográfico de los inositoles fosfato IP3, IP4, IP5 e IP6 en la semilla madura y seca de *V. faba* var. Alameda.

Inositoles fosfato en semillas sin germinar

- Contenido en mg por g

Los resultados de los diferentes inositoles fosfato presentes en la semilla entera, los cotiledones y el eje embrionario, quedan reflejados en la Tabla 17 expresados en mg/g de m.s. Los datos de la cascarilla no se muestran debido a que únicamente fue detectado IP5 en ambas variedades, en cantidades inferiores a 0,15 mg/g.

Tabla 17.- Contenido medio de inositoles fosfato (mg/g de m.s.) en la semilla entera, cotiledones y eje embrionario de *V. faba* var. Alameda y var. Brocal.

	IP3	IP4	IP5	IP6	IP total
	Semilla entera (X±E.E.)				
<i>V. faba</i> var. Alameda	0,25 ± 0,01 ^a	0,63 ± 0,02 ^a	2,15 ± 0,04 ^a	5,54 ± 0,06 ^a	8,56 ± 0,11^a
<i>V. faba</i> var. Brocal	0,15 ± 0,00 ^b	0,44 ± 0,00 ^b	1,69 ± 0,03 ^b	4,21 ± 0,10 ^b	6,49 ± 0,08^b
	Cotiledones (X±E.E.)				
<i>V. faba</i> var. Alameda	0,28 ± 0,01 ^a	0,70 ± 0,01 ^a	2,27 ± 0,01 ^a	6,18 ± 0,10 ^a	9,43 ± 0,09^a
<i>V. faba</i> var. Brocal	0,16 ± 0,00 ^b	0,47 ± 0,00 ^b	1,82 ± 0,01 ^b	4,50 ± 0,03 ^b	6,95 ± 0,03^b
	Eje embrionario (X±E.E.)				
<i>V. faba</i> var. Alameda	nd	0,58 ± 0,09 ^a	0,86 ± 0,01 ^a	6,91 ± 0,11 ^a	8,34 ± 0,04^a
<i>V. faba</i> var. Brocal	0,10 ± 0,00	0,16 ± 0,00 ^b	0,56 ± 0,02 ^b	5,52 ± 0,04 ^b	6,33 ± 0,06^b

Medias dentro de una misma columna seguidas de distintas letras difieren significativamente (P<0,05).

X= valor medio (n=4). Dos extractos de cada muestra analizados por duplicado.

E.E.= error estándar

nd= no detectado

En la semilla entera, los cotiledones y el eje embrionario de la variedad Alameda, el contenido total de inositoles fosfato, así como los valores de cada uno de ellos individualmente, fueron significativamente superiores a los de la var. Brocal.

El ácido fítico (IP6), fue el compuesto mayoritario de las dos variedades analizadas. Su proporción frente al total de los inositoles fosfato en la semilla entera (5,5 mg/g en Alameda y 4,2 mg/g en Brocal) y en los cotiledones fue del 65% y en el eje embrionario (6,9 mg/g en Alameda y 5,5 mg/g en Brocal) del 85% aproximadamente.

Los valores medios de IP5 fueron 2,5 veces inferiores a los de IP6 tanto en la semilla entera como en los cotiledones, y su proporción frente al contenido total de inositoles fue del 25%. Sin embargo, en el eje la cantidad detectada de IP5 fue aproximadamente 9 veces menor que la de IP6, y su representación dentro de los inositoles fosfato totales fue del 10%.

Los inositoles fosfato más desfosforilados, el IP4 y el IP3, se encontraron en menor proporción que los compuestos anteriormente citados. En la semilla entera y en los cotiledones de las dos variedades analizadas y en eje de Alameda, el porcentaje de IP4 fue del 7%, mientras que la proporción encontrada en el eje de Brocal fue del 3%. El porcentaje de IP3, frente a la cantidad total de inositoles fosfato, fue aproximadamente del 3% en la semilla entera y en los cotiledones, y del 2% en el eje de la var. Brocal. En el eje de la var. Alameda este compuesto no fue detectado.

- Contenido en mg por semilla

En la Tabla 18, se muestra en mg, el contenido medio de cada uno de los inositoles fosfato presentes en una semilla entera, un par de cotiledones, un eje embrionario y una cascarilla.

Tabla 18.- Contenido medio de inositoles fosfato (mg) en la semilla entera, el par de cotiledones, el eje embrionario y la cascarilla de *V. faba* var. Alameda y var. Brocal.

	IP3	IP4	IP5	IP6	IP total
	Semilla entera				
<i>V. faba</i> var. Alameda	0,21	0,54	1,87	4,80	7,42
<i>V. faba</i> var. Brocal	0,11	0,33	1,36	3,19	4,98
	Par de cotiledones				
<i>V. faba</i> var. Alameda	0,21 (100%)	0,54 (100%)	1,75 (94%)	4,76 (99%)	7,26 (98%)
<i>V. faba</i> var. Brocal	0,11 (100%)	0,33 (100%)	1,27 (94%)	3,15 (99%)	4,87 (98%)
	Eje embrionario				
<i>V. faba</i> var. Alameda	nd	tr	tr	0,05 (1%)	0,06 (0,8%)
<i>V. faba</i> var. Brocal	tr	tr	tr	0,03 (1%)	0,04 (0,8%)
	Cascarilla				
<i>V. faba</i> var. Alameda	nd	nd	0,11 (6%)	nd	0,11 (1,5%)
<i>V. faba</i> var. Brocal	nd	nd	0,08 (6%)	nd	0,08 (1,6%)

Los valores entre paréntesis muestran el porcentaje de inositoles fosfato en cada una de las partes de la semilla, respecto al contenido total de la misma.

nd = no detectado

tr= trazas

Como se refleja en esta tabla, la distribución de los inositoles fosfato en la semilla fue irregular. Con relación a los inositoles fosfato totales, en los cotiledones fue detectado el 98% de estos compuestos (7,3 mg en Alameda y 4,9 mg en Brocal), en el eje únicamente se localizó el 0,8% y en la cascarilla el 1,5%.

De un contenido total de IP6 en la semilla entera de 4,8 mg y 3,2 mg en Alameda y Brocal, respectivamente, el 99% fue encontrado en los cotiledones y el 1% restante en el eje.

La mayor parte del IP5 también se acumuló en los cotiledones (94%), aunque un 6% estaba en la cascarilla. La pequeña cantidad de IP3 y de IP4 se localizó en los cotiledones.

Evolución de los inositoles fosfato durante la germinación

Los datos de la cascarilla no se presentaron, porque el contenido inicial de los inositoles fosfato en esta cubierta fue muy bajo y prácticamente no se modificó con la germinación.

- Contenido en mg por g

Cotiledones

En la Tabla 19, se muestran los valores medios de los inositoles fosfato detectados en los cotiledones a lo largo de 216 h de germinación, mientras que en la Figura 58 se observa la evolución de los mismos.

El contenido de los inositoles fosfato totales mostró ligeras oscilaciones durante la germinación, reduciéndose a las 216 h un 14% en la var. Alameda y un 8% en la var. Brocal.

El compuesto mayoritario de las dos variedades estudiadas, IP6, presentó variaciones a lo largo del proceso germinativo, pero los niveles iniciales prácticamente no se modificaron al finalizar el ensayo. En Alameda, su contenido se fue incrementando en los primeros estadíos, hasta alcanzar a las 96 h un valor de 8,0 mg/g, significativamente más alto que el detectado inicialmente, pero posteriormente los niveles descendieron ligeramente. En Brocal, su contenido aumentó hasta las 48 h, obteniéndose valores de 6,8 mg/g que permanecieron constantes hasta las 192 h, y a las 216 h se detectaron niveles algo más bajos.

Las cantidades de los inositoles fosfato menos fosforilados, fueron muy inferiores a las del ácido fítico. En ambas variedades, los valores de IP5 fueron descendiendo gradualmente a lo largo de la germinación, reduciéndose un 50% a las 216 h. El porcentaje de IP4 reducido, fue del 57% en Alameda y del 64% en Brocal.

El inositol fosfato minoritario, IP3, presentó ligeras variaciones, reduciéndose al final de la germinación un 29% y un 13% en las variedades Alameda y Brocal, respectivamente.

Eje embrionario

El contenido medio de los inositoles fosfato presentes en el eje embrionario a lo largo de 216 h de germinación se muestra en la Tabla 20 y su variación a lo largo del tiempo se representa en la Figura 59.

Los niveles iniciales de los inositoles fosfato totales se redujeron en la var. Alameda al cabo de 120 h de germinación un 86%, y en la var. Brocal a las 144 h un 95%. A continuación, los niveles se mantuvieron constantes hasta el final de la germinación.

El contenido medio de IP6 se redujo a las 120 h de germinación un 89% en Alameda y un 93% en Brocal, pero posteriormente sus valores no se modificaron.

Las cantidades de IP5, de IP4 y de IP3 fueron muy inferiores a las de IP6. Los valores medios de IP5 se redujeron un 77% a las 72 h en la var. Alameda y un 86% a las 120 h en la var. Brocal, pero posteriormente permanecieron constantes. El contenido medio de IP4 se redujo en Alameda un 67% a las 72 h y en Brocal un 69% a las 144 h, detectándose a continuación valores parecidos. En el eje embrionario en desarrollo, únicamente se detectaron cantidades traza de IP3.

- Contenido en mg por semilla o plántula

En las Figuras 60 y 61, se refleja la evolución y localización de los inositoles fosfato durante la germinación en los cotiledones (a), el eje embrionario (b) y la semilla o plántula entera (c).

El contenido inicial de los inositoles fosfato totales de los cotiledones (7,3 mg en Alameda y 4,9 mg en Brocal) se redujo con la germinación un 43%. En el eje embrionario, el bajo contenido detectado inicialmente, mostró ligeras oscilaciones durante el ensayo, pero a las 216 h se duplicó en la var. Alameda (0,06-0,12 mg), mientras que en la var. Brocal se obtuvieron las mismas cantidades que a las 0 h (0,04 mg).

Los niveles de IP6 se redujeron un 28% en los cotiledones de Alameda (4,8-3,4 mg) y un 27% en los de Brocal (3,2-2,3 mg), mientras que en el eje embrionario mostraron variaciones a lo largo de toda la germinación.

El porcentaje de reducción del IP5 en los cotiledones de Alameda fue del 70% (1,8-0,5 mg) y en Brocal del 75% (1,3-0,3 mg), mientras que el IP4 se redujo un 71% en Alameda (0,5-0,2 mg) y un 77% en Brocal (0,3-0,1 mg). En el eje embrionario, los bajos niveles iniciales de IP5 y de IP4, se incrementaron ligeramente durante el ensayo.

Los valores del inositol fosfato minoritario, IP3, disminuyeron aproximadamente un 48% en los cotiledones de ambas variedades, mientras que en el eje únicamente se detectaron trazas de este compuesto durante el proceso germinativo.

En las semillas y plántulas enteras, el contenido y evolución de cada uno de los inositoles fosfato a lo largo de las 216 h de ensayo, fue prácticamente igual a la de los cotiledones, ya que los niveles detectados en el eje y en la cascarilla fueron muy bajos. Por lo tanto, la distribución de los inositoles fosfato totales no se modificó durante el proceso de germinación: en los cotiledones se localizó aproximadamente el 98% de estos compuestos, en el eje menos del 1% y en la cascarilla también un porcentaje inferior al 1%.

Tabla 19.- Contenido medio de inositoles fosfato (mg/g de m.s.) en los cotiledones de *V. faba* var. Alameda y var. Brocal a lo largo de la germinación.

Horas de germinación	IP3 (X±E.E.)	IP4 (X±E.E.)	IP5 (X±E.E.)	IP6 (X±E.E.)	IP total (X±E.E.)
<i>Vicia faba</i> var. Alameda					
0	0,28±0,01 ^a	0,70±0,01 ^a	2,27±0,01 ^a	6,18±0,10 ^a	9,43±0,09^{b,c}
12	0,28±0,01 ^a	0,68±0,02 ^a	2,26±0,06 ^a	6,62±0,10 ^b	9,84±0,19^{d,e}
24	0,28±0,00 ^a	0,60±0,02 ^b	1,99±0,05 ^b	6,55±0,05 ^b	9,42±0,06^{b,c}
48	0,30±0,01 ^b	0,56±0,02 ^b	1,80±0,07 ^c	7,57±0,06 ^{c,d}	10,23±0,11^{e,f}
72	0,25±0,00 ^c	0,45±0,02 ^c	1,71±0,03 ^{c,d}	7,45±0,10 ^{c,d}	9,87±0,14^{d,e}
96	0,24±0,00 ^d	0,42±0,02 ^c	1,73±0,01 ^{c,d}	8,02±0,05 ^e	10,40±0,07^f
120	0,22±0,00 ^{e,f}	0,36±0,01 ^d	1,55±0,09 ^e	7,46±0,06 ^{c,d}	9,59±0,07^{c,d}
144	0,23±0,00 ^{de}	0,36±0,01 ^d	1,59±0,03 ^{d,e}	7,68±0,10 ^d	9,86±0,09^{d,e}
168	0,21±0,00 ^{f,g}	0,34±0,00 ^{d,e}	1,59±0,02 ^{d,e}	7,54±0,06 ^{c,d}	9,67±0,08^{c,d}
192	0,20±0,00 ^g	0,32±0,00 ^{d,e}	1,33±0,01 ^f	7,31±0,09 ^c	9,16±0,09^b
216	0,20±0,00 ^g	0,30±0,00 ^e	1,00±0,00 ^g	6,60±0,04 ^b	8,11±0,04^a
<i>Vicia faba</i> var. Brocal					
0	0,16±0,00 ^{b,c}	0,47±0,00 ^a	1,82±0,01 ^a	4,50±0,03 ^a	6,95±0,03^b
12	0,16±0,01 ^{a,b,c}	0,41±0,02 ^b	1,82±0,05 ^a	5,62±0,29 ^{b,c}	8,01±0,21^{c,d}
24	0,16±0,00 ^{b,c}	0,36±0,01 ^c	1,64±0,01 ^b	5,91±0,29 ^{b,c,d}	8,07±0,27^{c,d}
48	0,20±0,00 ^e	0,35±0,00 ^c	1,53±0,02 ^b	6,83±0,35 ^e	8,91±0,34^e
72	0,20±0,00 ^e	0,28±0,01 ^d	1,37±0,05 ^c	6,87±0,18 ^e	8,73±0,14^e
96	0,18±0,00 ^d	0,23±0,01 ^e	1,27±0,05 ^{c,d}	6,44±0,19 ^{d,e}	8,12±0,14^{c,d}
120	0,17±0,00 ^c	0,21±0,01 ^{e,f}	1,16±0,04 ^{d,e}	6,65±0,20 ^e	8,18±0,16^d
144	0,16±0,00 ^{a,b,c}	0,21±0,01 ^{e,f}	1,10±0,08 ^{e,f}	6,53±0,09 ^{d,e}	7,99±0,03^{c,d}
168	0,15±0,00 ^{a,b}	0,20±0,01 ^{e,f}	1,02±0,06 ^{e,f}	6,18±0,04 ^{c,d,e}	7,55±0,05^c
192	0,15±0,00 ^{a,b,c}	0,19±0,01 ^{e,f}	0,97±0,04 ^f	6,26±0,17 ^{c,d,e}	7,58±0,11^c
216	0,14±0,00 ^a	0,17±0,01 ^f	0,75±0,06 ^g	5,32±0,12 ^b	6,39±0,04^a

Medias dentro de una misma columna seguidas de distintas letras difieren significativamente ($P < 0,05$).

X= valor medio (n=8). Dos extractos de cada muestra analizados por duplicado.

E.E.= error estándar

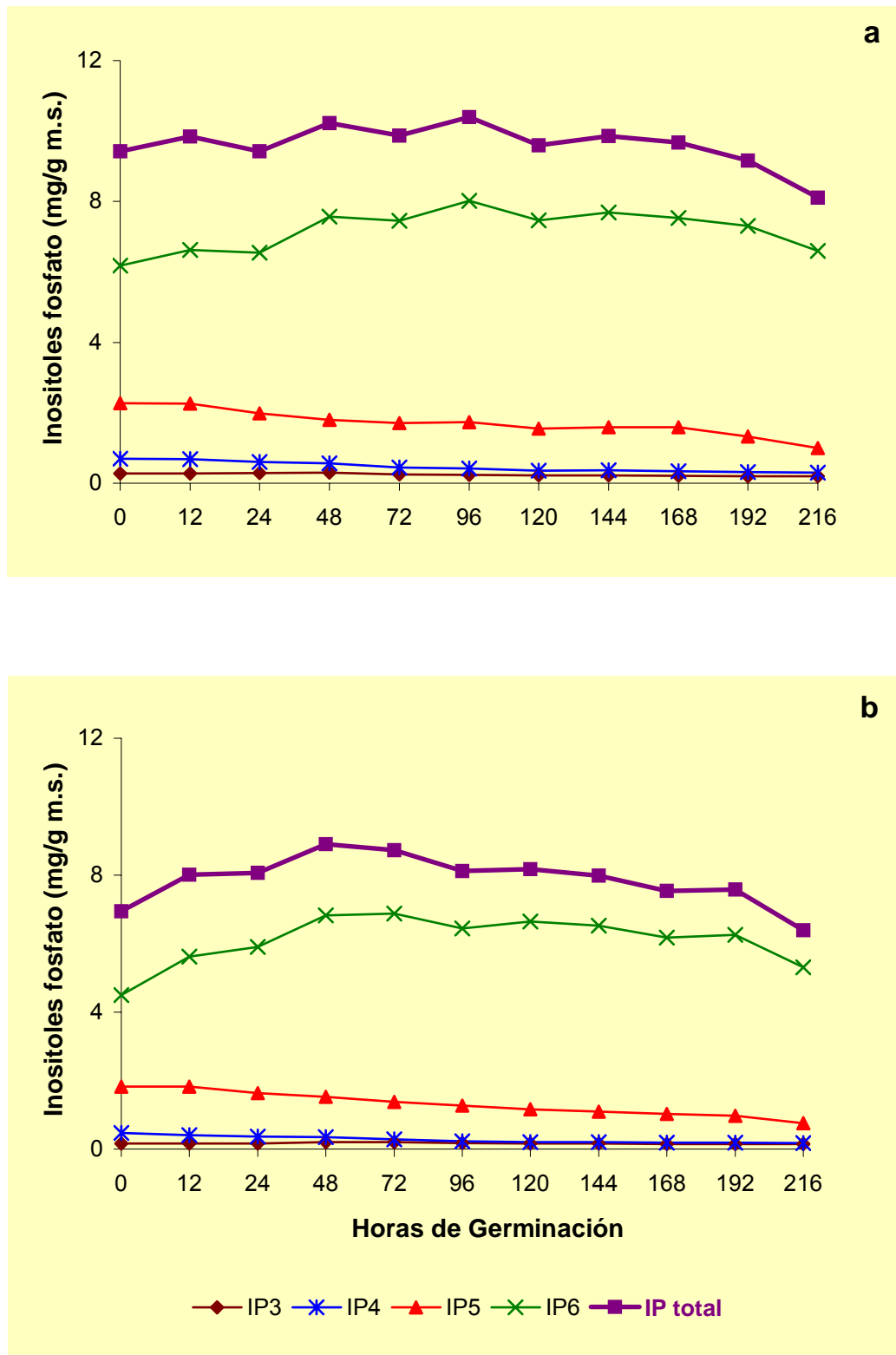


Figura 58.- Variación del contenido medio de inositoles fosfato (mg/g de m.s) a lo largo de la germinación en los cotiledones de *V. faba* var. Alameda (a) y var. Brocal (b).

Tabla 20.- Contenido medio de inositoles fosfato (mg/g de m.s.) en el eje embrionario de *V. faba* var. Alameda y var. Brocal a lo largo de la germinación.

Horas de germinación	IP3 (X±E.E.)	IP4 (X±E.E.)	IP5 (X±E.E.)	IP6 (X±E.E.)	IP total (X±E.E.)
<i>Vicia faba</i> var. Alameda					
0	tr	0,58±0,09 ^a	0,86±0,01 ^a	6,91±0,11 ^a	8,34±0,04^a
24	tr	0,33±0,02 ^b	0,70±0,05 ^b	6,63±0,44 ^{c,a}	7,72±0,48^b
48	tr	0,33±0,01 ^b	0,45±0,01 ^c	3,43±0,14 ^b	4,30±0,12^c
72	tr	0,19±0,02 ^c	0,20±0,01 ^d	1,85±0,04 ^c	2,23±0,03^d
96	tr	0,20±0,01 ^c	0,24±0,01 ^d	1,01±0,02 ^d	1,44±0,03^e
120	tr	0,20±0,00 ^c	0,22±0,02 ^d	0,78±0,04 ^{d,e}	1,20±0,06^{e,f}
144	tr	0,15±0,01 ^c	0,19±0,02 ^d	0,45±0,09 ^e	0,79±0,13^f
168	tr	0,17±0,02 ^c	0,19±0,02 ^d	0,41±0,07 ^e	0,74±0,12^f
192	tr	0,19±0,00 ^c	0,23±0,00 ^d	0,37±0,02 ^e	0,79±0,02^f
216	tr	0,16±0,01 ^c	0,18±0,03 ^d	0,27±0,03 ^e	0,61±0,08^f
<i>Vicia faba</i> var. Brocal					
0	tr	0,16±0,00 ^a	0,56±0,02 ^a	5,52±0,04 ^a	6,33±0,06^a
24	tr	0,16±0,02 ^a	0,44±0,06 ^b	3,85±0,30 ^b	4,55±0,28^b
48	tr	0,15±0,01 ^a	0,21±0,00 ^c	2,93±0,01 ^c	3,28±0,00^c
72	tr	0,10±0,01 ^b	0,14±0,01 ^d	1,09±0,07 ^d	1,32±0,08^d
96	tr	0,10±0,01 ^b	0,19±0,00 ^c	1,11±0,03 ^d	1,40±0,05^d
120	tr	0,09±0,03 ^b	0,08±0,01 ^e	0,35±0,01 ^e	0,52±0,04^e
144	tr	0,05±0,01 ^c	0,06±0,01 ^e	0,21±0,02 ^e	0,32±0,03^{e,f}
168	tr	0,05±0,01 ^c	0,05±0,00 ^e	0,14±0,02 ^e	0,24±0,02^f
192	tr	0,05±0,01 ^c	0,05±0,01 ^e	0,12±0,01 ^e	0,21±0,01^f
216	tr	0,05±0,01 ^c	0,05±0,01 ^e	0,11±0,01 ^e	0,21±0,01^f

Medias dentro de una misma columna seguidas de distintas letras difieren significativamente ($P < 0,05$).

X = valor medio (n=8). Dos extractos de cada muestra analizados por duplicado.

E.E. = error estándar

tr= trazas

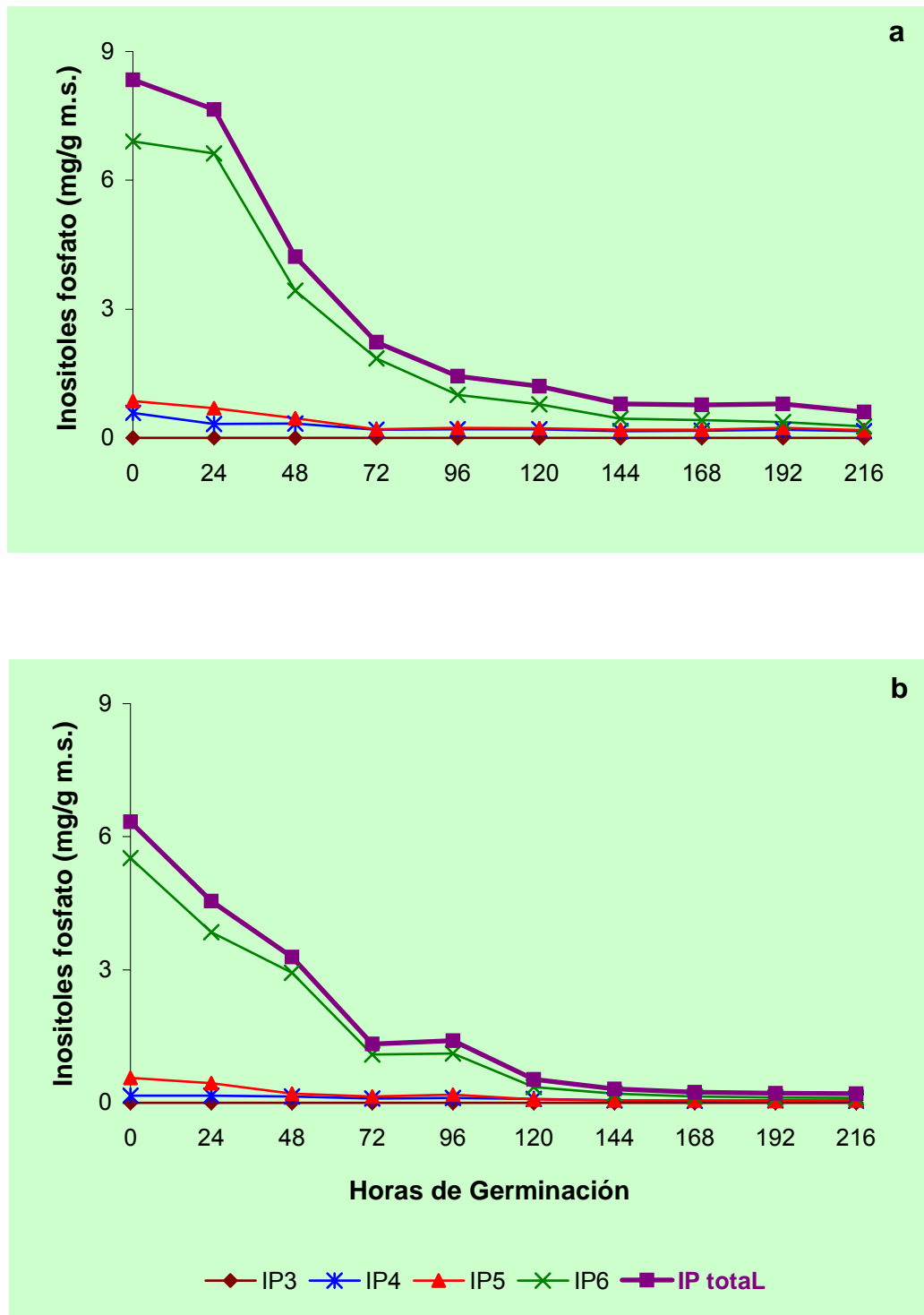


Figura 59.- Variación del contenido medio de inositoles fosfato (mg/g de m.s.) a lo largo de la germinación en el eje embrionario de *V. faba* var. Alameda (a) y var. Brocal (b).

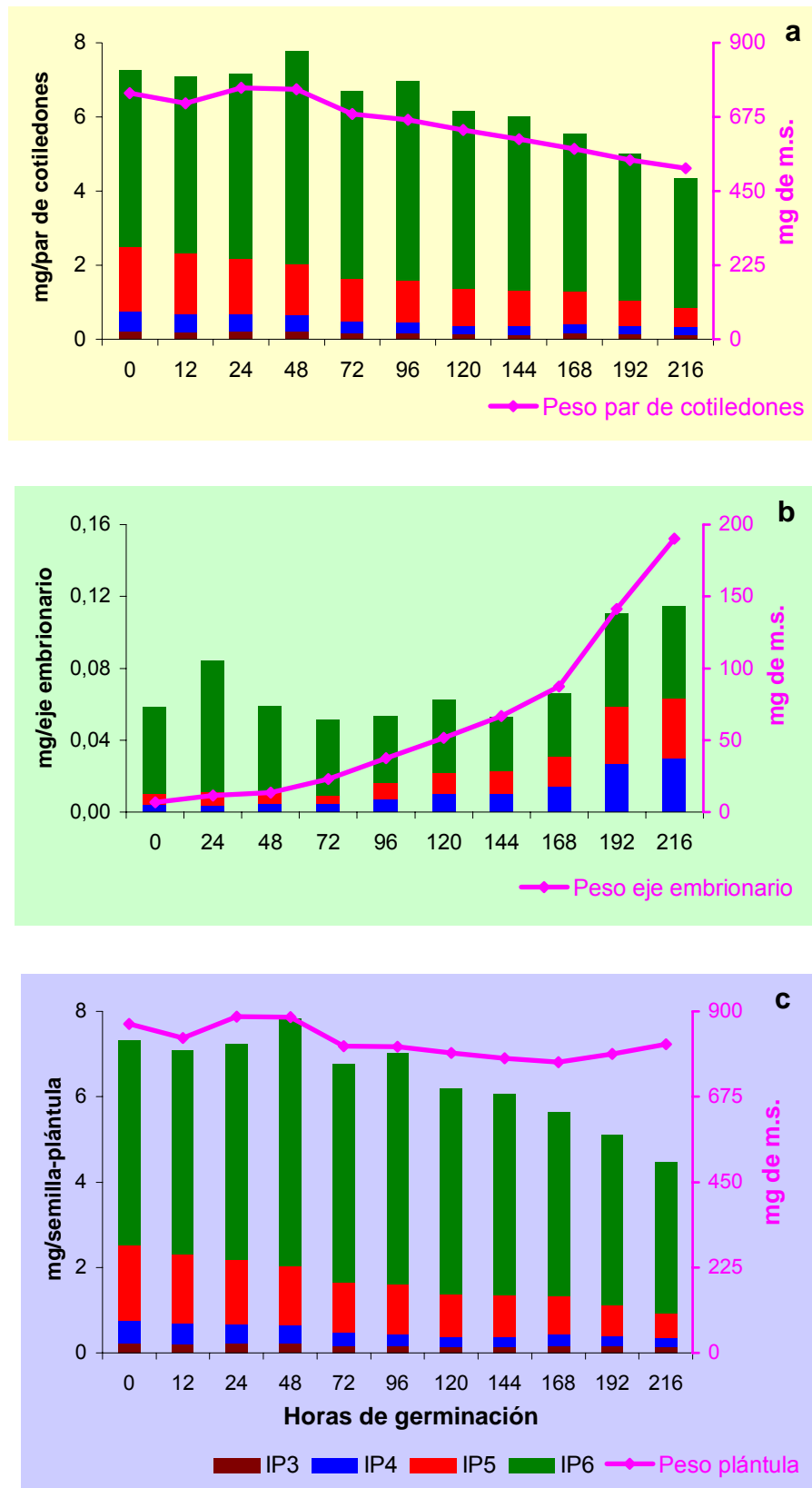


Figura 60.- Variación del contenido medio de inositoles fosfato (mg) lo largo de la germinación en el par de cotiledones (a), el eje embrionario (b) y la semilla/plántula entera (c) de *V. faba* var. Alameda.

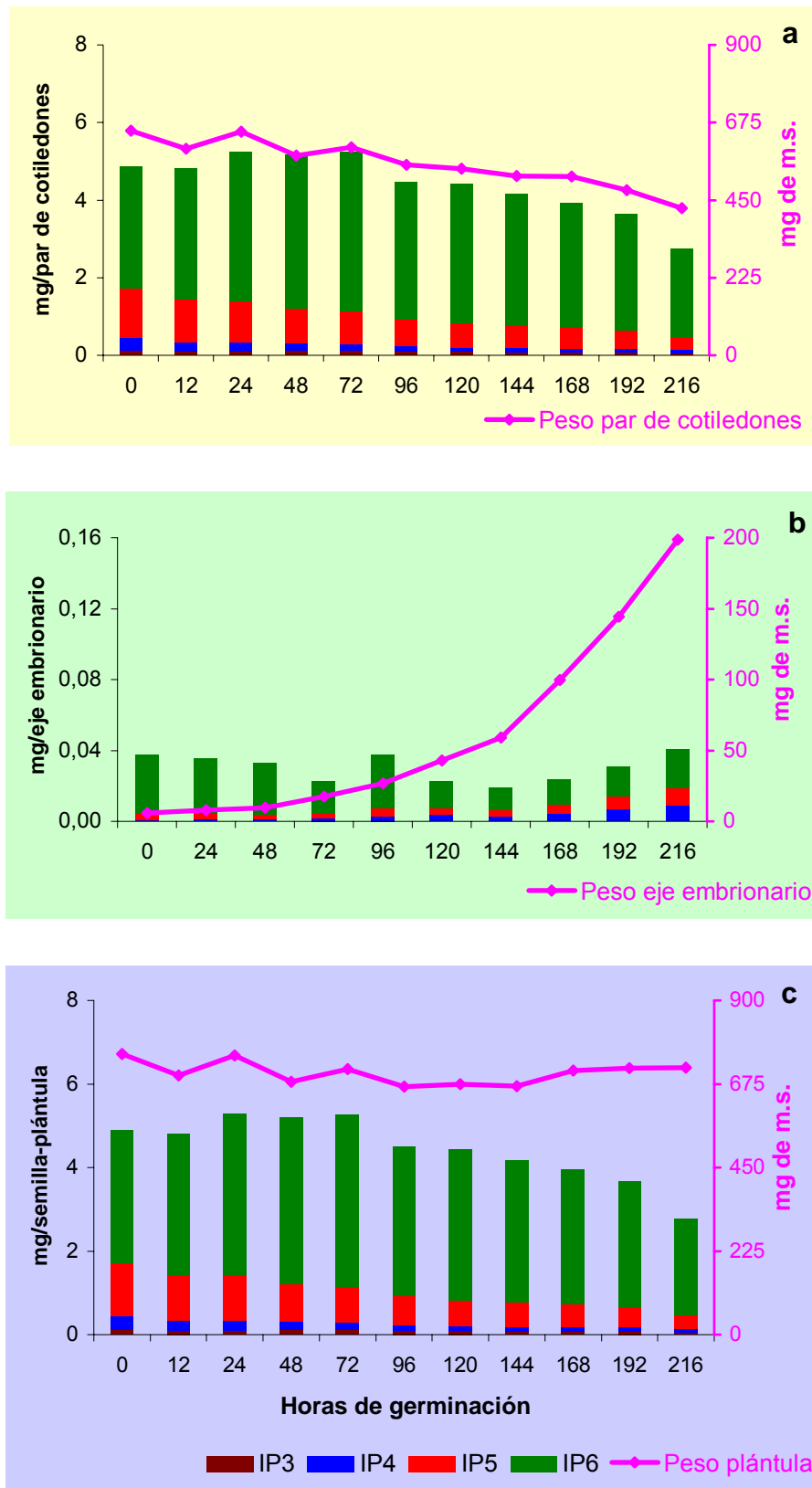


Figura 61.- Variación del contenido medio de inositoles fosfato (mg) a lo largo de la germinación en el par de cotiledones (a), el eje embrionario (b) y la semilla/plántula entera (c) de *V. faba* var. Brocal.

3.4. TANINOS CONDENSADOS O PROANTOCIANIDINAS

Las proantocianidinas se valoraron con un método colorimétrico en los cotiledones y en la cascarilla de las variedades Alameda y Brocal sin germinar, y los datos obtenidos se muestran en la Tabla 21.

Tabla 21.- Contenido medio de proantocianidinas en los cotiledones y en la cascarilla de *V. faba* var. Alameda y var. Brocal.

	Proantocianidinas	
	mg/g de m.s.	mg/semilla o parte constituyente
	Cotiledones (X±E.E.)	
<i>V. faba</i> var. Alameda	nd	nd
<i>V. faba</i> var. Brocal	nd	nd
	Cascarilla (X±E.E.)	
<i>V. faba</i> var. Alameda	6,07 ± 0,11 ^a	0,69
<i>V. faba</i> var. Brocal	6,99 ± 0,21 ^b	0,70

Medias dentro de una misma columna seguidas de distintas letras difieren significativamente (P<0,05).

X= valor medio (n=4). Dos extractos de cada muestra y dos lecturas.

E.E.= error estándar

nd= no detectado

En los cotiledones, no se detectaron taninos condensados y en la cascarilla, el contenido medio de estos compuestos polifenólicos, referido a equivalentes de cianidina, fue de 6,07 mg/g para la var. Alameda y de 6,99 mg/g para la var. Brocal, con diferencias significativas entre ambas variedades (P<0,05).

Cuando los resultados se expresaron en mg/cascarilla los valores fueron inferiores, ya que la cascarilla representa el 13% del peso total de la semilla de *V. faba*. De manera que, la cantidad de proantocianidinas detectada en esta cubierta fue de 0,69 mg para Alameda y de 0,70 mg para Brocal.

3.5. INHIBIDORES DE TRIPSINA

En la semilla entera, los cotiledones y el eje embrionario de *V. faba* var. Alameda y var. Brocal, fue valorado espectrofotométricamente el contenido total de proteína y la actividad de los inhibidores de tripsina. En la cascarilla no se detectaron inhibidores de tripsina.

Actividad de los inhibidores de tripsina en semillas sin germinar

En la Tabla 22, se muestra el contenido medio de la proteína total y la actividad media de los inhibidores de tripsina de las semillas maduras de las dos variedades en estudio.

Tabla 22.- Valores medios de proteína total y de actividad de inhibidores de tripsina en la semilla entera, los cotiledones y el eje embrionario de *V. faba* var. Alameda y var. Brocal.

	Proteína total	Inhibidores de tripsina		
	µg proteína/mg muestra	UIT/mg proteína	UIT/mg muestra	UIT/semilla o parte constituyente
	Semilla entera (X±E.E.)			
var. Alameda	161,47 ± 2,69	44,34 ± 2,02 ^a	7,16 ± 0,31	6.212,82
var. Brocal	169,60 ± 9,83	43,46 ± 0,98 ^a	7,37 ± 0,16	5.568,39
	Cotiledones (X±E.E.)			
var. Alameda	234,46 ± 4,20	35,80 ± 0,49 ^a	7,98 ± 0,11	5.959,51 (96%)
var. Brocal	210,51 ± 10,62	41,03 ± 0,98 ^a	8,22 ± 0,20	5.351,46 (96%)
	Eje embrionario (X±E.E.)			
var. Alameda	276,85 ± 4,24	108,33 ± 6,03 ^a	28,40 ± 1,58	253,31(4%)
var. Brocal	261,09 ± 1,14	152,31 ± 7,91 ^b	38,06 ± 1,98	216,92 (4%)

Medias dentro de una misma columna seguidas de distintas letras difieren significativamente (P<0,05).

Los valores entre paréntesis muestran el porcentaje de inhibidores de tripsina en cada una de las partes de la semilla, respecto al contenido total de la misma.

X= valor medio (n=4). Una extracción y cuatro valoraciones.

E.E.= error estándar

El contenido en proteína de la semilla entera fue muy semejante en ambas variedades (161,5 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de m.s. en Alameda y 169,6 $\mu\text{g}/\text{mg}$ en Brocal) e inferior al detectado en los cotiledones y en el eje embrionario.

Con el análisis estadístico realizado a partir de los datos de los inhibidores de tripsina mostrados en UIT/mg de proteína, se observó tanto para la semilla entera como para los cotiledones, valores significativamente iguales entre variedades. Sin embargo, en el eje embrionario los datos obtenidos en la var. Alameda fueron inferiores a los de la var. Brocal.

La actividad de los inhibidores de tripsina expresada en UIT/mg de proteína y en UIT/mg muestra, fue para la semilla entera y los cotiledones de ambas variedades aproximadamente 4 veces inferior a la del eje embrionario.

Al presentar los resultados en UIT/parte constituyente de la semilla, observamos que la actividad inhibitoria de la semilla entera y de los cotiledones era 25 veces superior a la del eje (253,3 UIT en Alameda y 216,9 UIT en Brocal), ya que este último representa únicamente el 1% del peso total de la semilla. A partir de estos datos, pudo conocerse la distribución de los inhibidores de tripsina en la semilla, que fue irregular, ya que el 96% de estos compuestos se detectaron en los cotiledones y el 4% restante en el eje embrionario.

Evolución de los inhibidores de tripsina a lo largo de la germinación

En los cotiledones, el eje embrionario y la semilla o plántula entera de las variedades Alameda y Brocal, fue analizado el contenido total de proteína y la actividad de los inhibidores de tripsina a lo largo de 216 h de germinación.

- Contenido proteico y actividad antitripsina en UIT por mg

Cotiledones

Como se refleja en la Tabla 23, los niveles de proteína no mostraron grandes cambios a lo largo de la germinación, ya que el contenido inicial se redujo a las 216 h un 14% en la var. Alameda y un 7% en la var. Brocal. La actividad de los inhibidores de tripsina, presentada en esta misma tabla en UIT/mg muestra, fue aumentando paulatinamente con la germinación, alcanzando al final del ensayo incrementos del 28% en Alameda y del 22% en Brocal. Como consecuencia de las variaciones anteriores, cuando los datos se expresaron en UIT/mg proteína (Tabla 23 y Figura 62), no se observaron cambios relevantes durante las primeras 96 h de germinación y a continuación, los niveles se fueron incrementando, hasta alcanzar a las 216 h un aumento del 39% en Alameda y del 28% en Brocal.

Eje embrionario

El contenido total de proteína fue disminuyendo conforme el tiempo de germinación transcurría, obteniéndose al final del proceso reducciones del 76% en Alameda y del 68% en Brocal (Tabla 24).

Como se observa en la Tabla 24, los valores iniciales de actividad antitripsina presentados en UIT/mg muestra, se redujeron un 97% en la var. Alameda y un 98% en la var. Brocal.

En esta tabla, también se refleja la actividad de los inhibidores de tripsina en UIT/mg proteína y en la Figura 63 se muestra su evolución a lo largo de la germinación. Durante las primeras horas de ensayo se produjo un brusco descenso, de manera que a las 144 h se obtuvieron reducciones del 90% en Alameda y a las 168 h del 91% en Brocal, y a continuación esta actividad permaneció constante en ambas variedades.

- Actividad antitripsina en UIT por semilla o plántula

En las Figuras 64 y 65, se muestra la actividad inhibitoria de los cotiledones (a), del eje embrionario (b) y de la semilla o plántula entera (c) durante el proceso germinativo.

En los cotiledones, los inhibidores de tripsina presentaron ligeras oscilaciones a lo largo de la germinación y las 24 h se obtuvieron valores elevados de 6.040 UIT en la var. Alameda y de 5.941 UIT en la var. Brocal, mientras que el eje embrionario la actividad antitripsina fue muy baja y los niveles iniciales se redujeron en la var. Alameda a la mitad y en la var. Brocal 1,4 veces. Por lo tanto, la semilla o plántula entera presentó prácticamente la misma actividad inhibitoria que los cotiledones a lo largo de todo el proceso.

Tabla 23.- Valores medios de proteína total y de actividad de inhibidores de tripsina en los cotiledones de *V. faba* var. Alameda y var. Brocal a lo largo de la germinación.

Horas de germinación	μg proteína/mg muestra ($X \pm \text{E.E.}$)	UIT/mg muestra ($Y \pm \text{E.E.}$)	UIT/mg proteína ($Y \pm \text{E.E.}$)
<i>Vicia faba</i> var. Alameda			
0	234,46 \pm 4,20	7,98 \pm 0,11	35,80 \pm 0,49 ^a
12	227,75 \pm 9,72	8,15 \pm 0,32	37,66 \pm 1,48 ^a
24	239,05 \pm 4,89	7,92 \pm 0,46	34,86 \pm 2,04 ^a
48	232,00 \pm 15,78	7,33 \pm 0,06	33,27 \pm 0,27 ^a
72	238,02 \pm 12,76	7,84 \pm 0,53	34,66 \pm 2,33 ^a
96	224,90 \pm 11,55	7,73 \pm 0,44	36,17 \pm 2,04 ^a
120	203,06 \pm 1,84	8,49 \pm 0,45	43,99 \pm 2,35 ^b
144	208,11 \pm 6,06	8,60 \pm 0,29	43,52 \pm 1,48 ^b
168	208,53 \pm 6,45	8,70 \pm 0,28	43,90 \pm 1,42 ^b
192	194,37 \pm 6,32	10,11 \pm 0,69	54,74 \pm 3,72 ^c
216	200,85 \pm 11,50	11,10 \pm 0,46	58,20 \pm 2,41 ^c
<i>Vicia faba</i> var. Brocal			
0	210,51 \pm 10,61	8,22 \pm 0,20	41,03 \pm 0,98 ^{a,b,c}
12	225,03 \pm 4,45	8,82 \pm 0,22	41,18 \pm 1,03 ^{a,b,c}
24	219,24 \pm 10,26	9,17 \pm 0,24	43,92 \pm 1,15 ^{b,c,d}
48	215,27 \pm 4,42	8,37 \pm 0,35	40,84 \pm 1,69 ^{a,b}
72	232,93 \pm 4,31	8,80 \pm 0,12	39,68 \pm 0,54 ^{a,b}
96	225,97 \pm 5,20	7,88 \pm 0,16	36,62 \pm 0,72 ^a
120	215,43 \pm 5,12	9,41 \pm 0,20	45,85 \pm 0,95 ^{c,d}
144	243,12 \pm 18,73	9,72 \pm 0,24	41,98 \pm 1,05 ^{b,c}
168	232,31 \pm 8,02	10,43 \pm 0,19	47,18 \pm 0,85 ^d
192	232,21 \pm 1,51	10,75 \pm 0,28	48,61 \pm 1,26 ^d
216	195,35 \pm 10,10	10,59 \pm 0,69	56,94 \pm 3,71 ^e

Medias dentro de una misma columna seguidas de distintas letras difieren significativamente ($P < 0,05$).

X= valor medio de proteína (n=6). Una extracción y tres valoraciones.

Y= valor medio de inhibidores de tripsina (n=8). Una extracción y cuatro valoraciones.

E.E.= error estándar

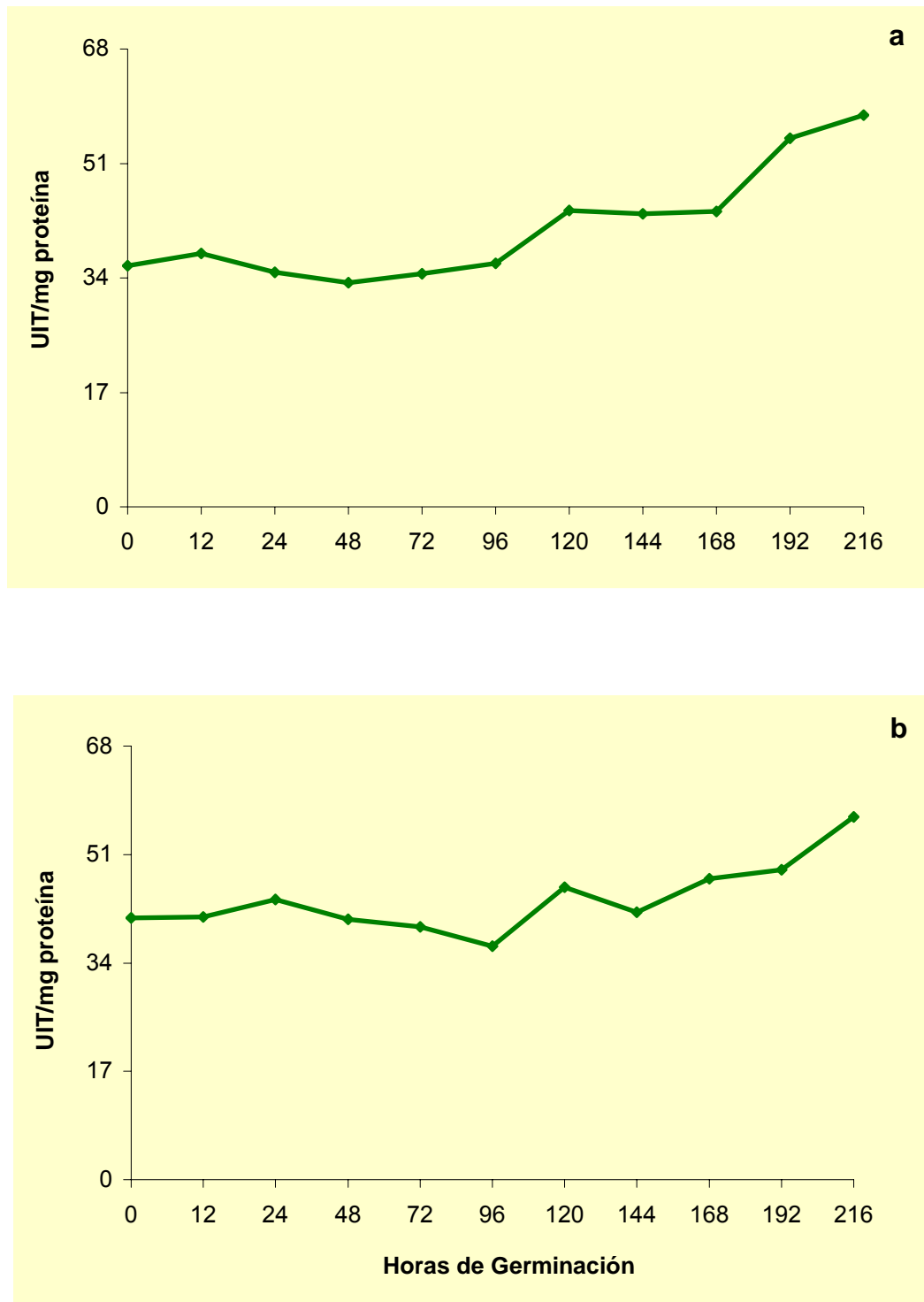


Figura 62.- Actividad de los inhibidores de tripsina (UIT/mg proteína) a lo largo de la germinación en los cotiledones de *V. faba* var. Alameda (a) y var. Brocal (b).

Tabla 24.- Valores medios de proteína total y de actividad de inhibidores de tripsina en el eje embrionario de *V. faba* var. Alameda y var. Brocal a lo largo de la germinación.

Horas de germinación	μg proteína/mg muestra ($X \pm \text{E.E.}$)	UIT/mg muestra ($Y \pm \text{E.E.}$)	UIT/mg proteína ($Y \pm \text{E.E.}$)
<i>Vicia faba</i> var. Alameda			
0	276,85 \pm 4,24	28,40 \pm 1,58	108,33 \pm 6,03 ^a
48	225,3 \pm 1,26	16,01 \pm 0,86	75,05 \pm 4,03 ^b
72	141,46 \pm 1,82	5,93 \pm 0,32	44,30 \pm 2,41 ^c
96	122,01 \pm 2,16	2,55 \pm 0,08	22,08 \pm 0,68 ^d
120	131,34 \pm 2,93	2,16 \pm 0,10	17,35 \pm 0,77 ^{d, e}
144	144,16 \pm 1,48	1,43 \pm 0,03	10,48 \pm 0,20 ^f
168	101,37 \pm 3,48	1,27 \pm 0,06	13,26 \pm 0,65 ^{e, f}
192	95,8 \pm 5,14	0,86 \pm 0,05	9,46 \pm 0,56 ^f
216	65,32 \pm 5,94	0,76 \pm 0,01	12,23 \pm 0,10 ^{e, f}
<i>Vicia faba</i> var. Brocal			
0	261,09 \pm 1,14	38,06 \pm 1,98	152,31 \pm 7,91 ^a
48	121,78 \pm 8,31	16,96 \pm 0,47	145,51 \pm 3,99 ^b
72	138,99 \pm 5,74	11,95 \pm 0,34	89,87 \pm 2,52 ^c
96	98,29 \pm 1,84	6,15 \pm 0,18	65,37 \pm 1,87 ^d
120	128,75 \pm 3,41	3,61 \pm 0,09	29,26 \pm 0,70 ^e
144	132,71 \pm 2,54	2,52 \pm 0,09	19,87 \pm 0,74 ^f
168	107,03 \pm 5,53	1,39 \pm 0,04	13,61 \pm 0,36 ^g
192	98,29 \pm 3,25	0,96 \pm 0,06	10,23 \pm 0,63 ^g
216	82,63 \pm 12,61	0,79 \pm 0,05	10,00 \pm 0,66 ^g

Medias dentro de una misma columna seguidas de diferentes letras difieren significativamente ($P < 0,05$).

X= valor medio de proteína (n=6). Una extracción y tres valoraciones.

Y= valor medio de IT (n=8). Una extracción y cuatro valoraciones.

E.E.= error estándar

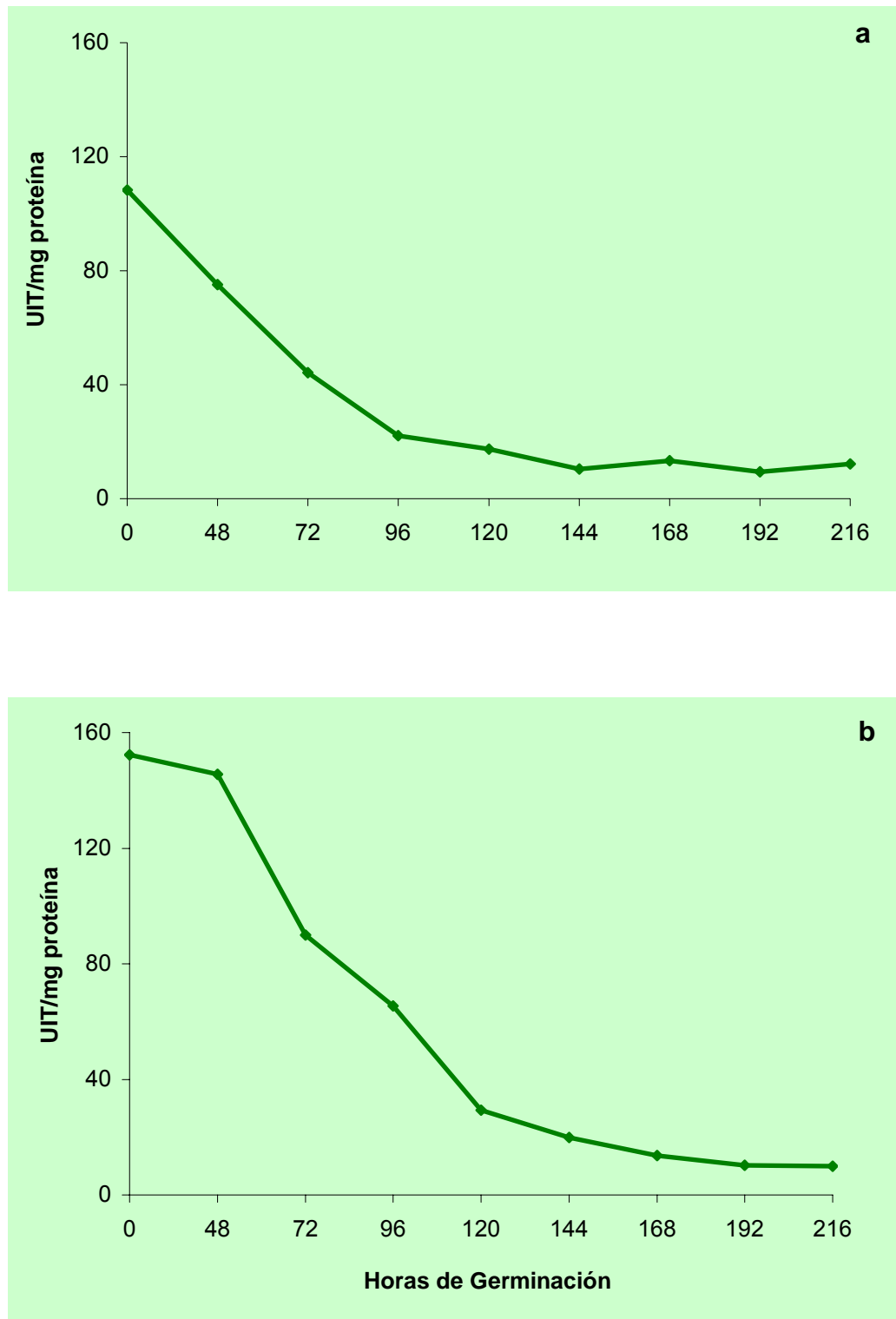


Figura 63.- Actividad de los inhibidores de tripsina (UIT/mg proteína) a lo largo de la germinación en el eje embrionario de *V. faba* var. Alameda (a) y var. Brocal (b).

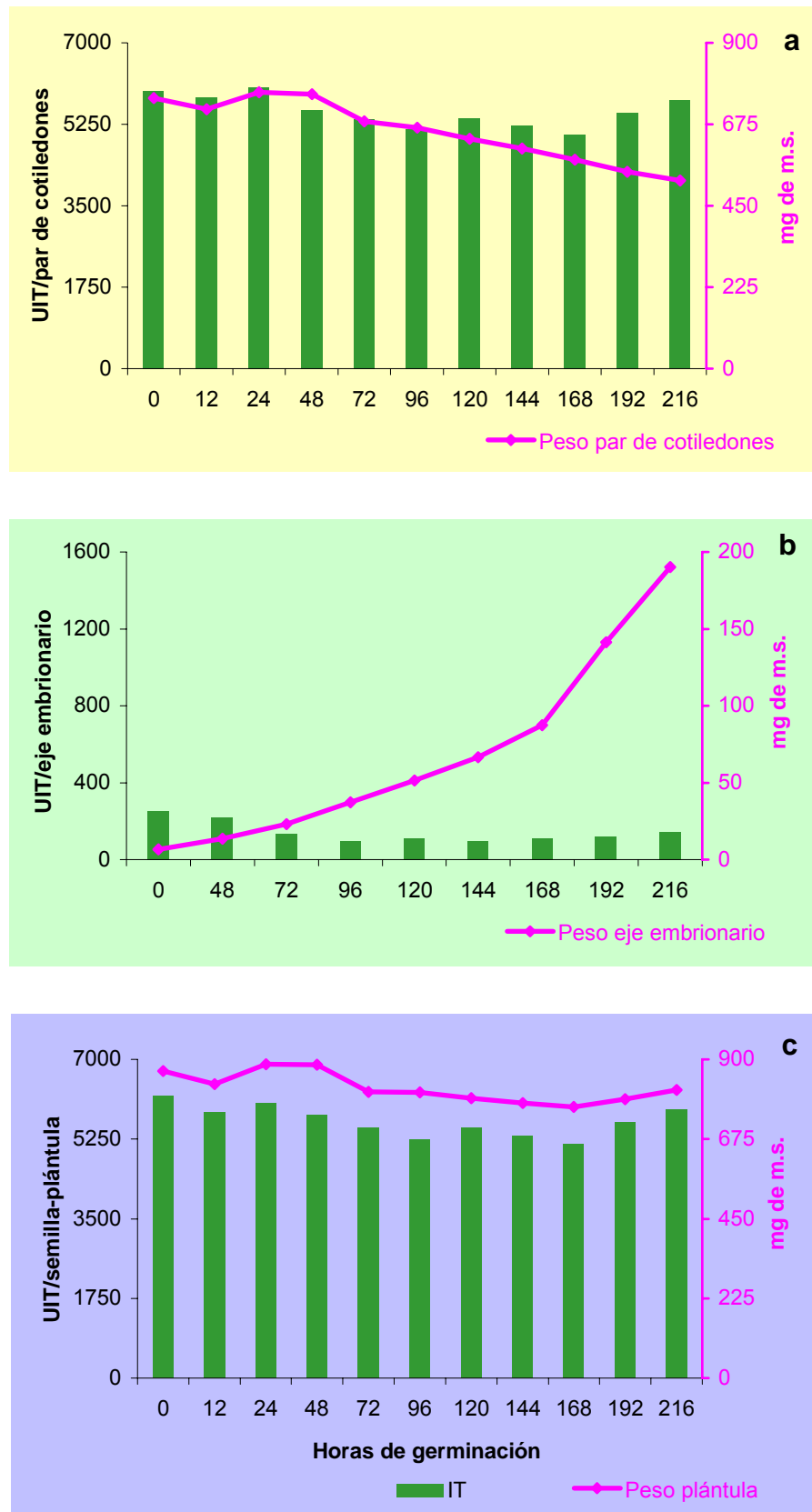


Figura 64.- Actividad de los inhibidores de tripsina (UIT) a lo largo de la germinación en el par de cotiledones (a), el eje embrionario (b) y la semilla/plántula entera (c) de *V. faba* var. Alameda.

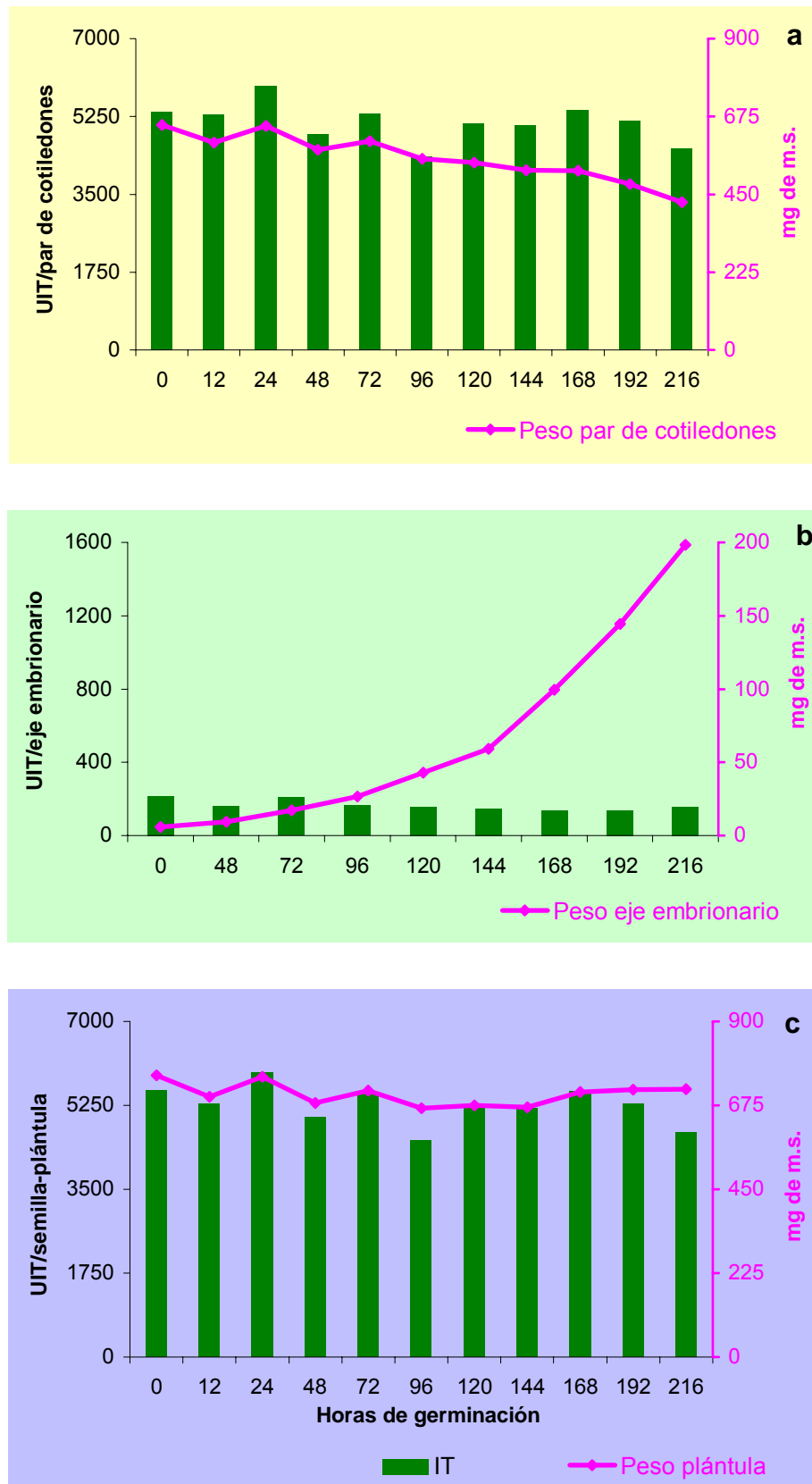


Figura 65.- Actividad de los inhibidores de tripsina (UIT) a lo largo de la germinación en el par de cotiledones (a), el eje embrionario (b) y la semilla/plántula entera (c) de *V. faba* var. Brocal.

4. PRUEBAS EXPERIMENTALES EN RATAS

Una vez determinado el contenido de los factores no-nutritivos en las semillas y en las plántulas de *V. faba* var. Alameda y var. Brocal a lo largo de 216 h de germinación, se eligió la var. Alameda para la realización de los experimentos nutricionales, tras comprobar que tanto el contenido como la evolución de estos compuestos había sido semejante a lo largo de todo el proceso en ambas variedades. El periodo de tiempo seleccionado para germinar las habas fue de 72 h, momento en el que contenido proteico de estas semillas seguía siendo elevado y el contenido de los factor no-nutritivos se había reducido en un rango de entre un 9%-90%, en función del compuesto analizado. Además, era importante que las semillas no hubieran alcanzado el estado de plántula, para poder incorporarlas en las raciones con las que alimentar a los animales monogástricos. En este trabajo, se estimó el valor nutritivo de las raciones de habas sin germinar y de habas germinada durante 72 h suplementadas con aminoácidos, en ratas macho en crecimiento.

4.1. PARÁMETROS PRODUCTIVOS Y BALANCE DE NITRÓGENO

En la Tabla 25, se muestra la productividad y el balance de nitrógeno en ratas alimentadas durante 9 días con la ración testigo de lactoalbúmina (LA) y con las raciones problema de habas sin germinar (VF) y habas germinadas (VFG).

La incorporación en raciones para ratas de las harinas de habas, dio lugar a una disminución significativa de la ganancia de peso y de la relación ganancia/alimento, respecto a los animales testigo alimentados con la ración de lactoalbúmina. La germinación de las semillas, no modificó significativamente los índices productivos.

La excreción fecal (peso seco y nitrógeno) fue significativamente mayor para los animales alimentados con VF y VFG, respecto a los alimentados con la ración testigo, pero significativamente menor para los animales que consumieron habas germinadas, que para los que fueron alimentados con habas sin germinar.

La utilización neta de la proteína (UNP) fue menor para las ratas alimentadas con la ración de habas que con la ración de lactoalbúmina, pero con el tratamiento de germinación estos valores se incrementaron ligeramente (Tabla 25).

En esta tabla, también se muestran las concentraciones de óxido crómico obtenidas en el contenido ileal de las ratas alimentadas con habas, que fueron muy inferiores a las detectadas en las alimentadas con LA, lo que indica una mayor proporción de materia indigestible en el contenido intestinal.

4.2. DIGESTIBILIDAD ILEAL APARENTE DE AMINOÁCIDOS

En la Tabla 26, se muestra la digestibilidad ileal aparente de aminoácidos (g/100g ingeridos) en ratas alimentadas durante 9 días con la ración testigo de LA, o con las raciones de VF o de VFG suplementadas con aminoácidos, como única fuente proteica.

Como se refleja en esta tabla, excepto para el ácido aspártico y prolina, en ratas alimentadas con habas sin germinar, la digestibilidad ileal aparente de los aminoácidos fue igual o incluso mayor que en aquellas alimentadas con la ración de lactoalbúmina.

En ratas que consumieron habas germinadas, la digestibilidad ileal de los aminoácidos fue significativamente superior a la de aquellas que se alimentaron con habas sin germinar.

4.3. AMINOÁCIDOS LIBRES EN PLASMA

Como se refleja en la Tabla 27, el perfil aminoacídico del plasma de las ratas alimentadas con habas, fue en algunos casos significativamente diferente del testigo. Pero para los aminoácidos glutamato, serina, glutamina, histidina, tirosina, valina, metionina, isoleucina y fenilalanina, no se observaron diferencias significativas.

En los animales alimentados con VF y VFG, las concentraciones de treonina, alanina, prolina, leucina, triptófano y lisina descendieron, mientras que las de glicina, arginina y ornitina alcanzaron un incremento significativo, en comparación con los animales alimentados con la ración de LA.

4.4. PESOS DE ÓRGANOS

La Tabla 28 recoge los datos relacionados con los efectos de la inclusión de habas sin germinar y germinadas en las raciones, sobre los pesos absolutos (g) y relativos (g/100 g peso vivo fresco) de órganos.

Los pesos frescos relativos de intestino delgado, ciego y colon fueron para los animales alimentados con habas sin germinar significativamente superiores que los de la ración testigo. Los del intestino delgado fueron iguales en ratas que consumieron VF y VFG. Los del ciego y colon de los animales alimentados con habas germinadas fueron significativamente iguales a los de aquellos alimentados con LA.

Los pesos absolutos y relativos de hígado y timo fueron menores en los animales alimentados con habas, comparado con los testigos. Pero en el caso del bazo, no se produjeron diferencias significativas.

El contenido en humedad del hígado de ratas alimentadas con habas, fue ligeramente inferior que el de las alimentadas con la ración de LA, mientras que en bazo y timo no se observaron diferencias significativas.

Tabla 25.- Productividad y balance de nitrógeno en ratas alimentadas durante 9 días con raciones de lactoalbúmina (LA), habas sin germinar (VF) o habas germinadas (VFG).

	LA	VF	VFG
Ingestión total de pienso (g)	106	107	107
Pienso ingerido (g/día)	11,8	11,9	11,9
Ganancia de peso corporal (g)	49,4 ^a	40,5 ^b	44,3 ^b
Ganancia/alimento	0,46 ^a	0,38 ^b	0,41 ^b
Grasa del cuerpo seco (%)	30,6 ^a	36,2 ^b	34,8 ^{a,b}
Heces			
Peso seco (g)	3,9 ^a	15,1 ^b	12,1 ^c
N total (g)	0,14 ^a	0,89 ^b	0,80 ^c
Digestibilidad aparente del N (%)	92,0 ^a	53,6 ^b	58,3 ^c
Digestibilidad de la materia seca (%)	96,3 ^a	85,8 ^b	88,7 ^c
N retenido (g)	1,7 ^a	1,2 ^b	1,4 ^c
UNP (%)	96 ^a	61 ^b	75 ^c
Cr₂O₃ en contenido ileal (g/Kg)	19,7 ^a	6,4 ^b	9,2 ^c

Medias dentro de una misma fila seguidas de diferentes letras difieren significativamente (P<0,01).

Tabla 26.- Digestibilidad ileal aparente de aminoácidos (g/100g ingeridos) en ratas alimentadas durante 9 días con raciones de lactoalbúmina (LA), habas sin germinar (VF) o habas germinadas (VFG).

	LA	VF	VFG
Aminoácidos esenciales			
Arginina	71 ^a	87 ^b	92 ^b
Histidina	65 ^a	60 ^a	77 ^b
Isoleucina	75 ^a	83 ^b	90 ^c
Leucina	74 ^a	75 ^a	85 ^b
Lisina	76 ^a	77 ^a	86 ^b
Metionina+cisteína	78 ^a	82 ^b	88 ^c
Fenilalanina	77 ^a	79 ^a	87 ^b
Treonina	62 ^a	65 ^a	76 ^b
Tirosina	75	82	84
Valina	70 ^a	75 ^b	85 ^c
Aminoácidos no-esenciales			
Alanina	69 ^a	69 ^a	82 ^b
Aspartato	91 ^a	88 ^b	94 ^c
Glutamato	87 ^a	85 ^a	92 ^b
Glicina	55	46	60
Prolina	80 ^a	73 ^b	87 ^c
Serina	63 ^a	67 ^b	80 ^b

Medias dentro de una misma fila seguidas de diferentes letras difieren significativamente ($P < 0,01$).

Tabla 27.- Efecto de la inclusión en la ración como única fuente proteica lactoalbúmina (LA), habas sin germinar (VF) o habas germinadas (VFG) sobre la concentración de aminoácidos libres en plasma ($\mu\text{M/L}$), en ratas a los 9 días de ensayo.

	LA	VF	VFG
Glutamato	104	102	77
Serina	138	157	134
Glicina	104 ^a	169 ^b	138 ^{a,b}
Glutamina	169	156	103
Histidina	45	52	48
Treonina	100 ^a	38 ^b	34 ^b
Alanina	404 ^a	277 ^b	313 ^b
Arginina	108 ^a	165 ^b	146 ^{a,b}
Prolina	131 ^a	89 ^b	90 ^b
Tirosina	23	29	28
Valina	52	51	57
Metionina	36	41	46
Isoleucina	37	41	38
Leucina	85 ^a	27 ^b	26 ^b
Fenilalanina	20	18	16
Triptófano	51 ^a	22 ^b	23 ^b
Ornitina	21 ^a	47 ^b	33 ^{a,b}
Lisina	569 ^a	297 ^b	303 ^b

Medias dentro de una misma fila seguidas de diferentes letras difieren significativamente ($P < 0,05$).

Tabla 28.- Efecto de la lactoalbúmina (LA), habas sin germinar (VF) o habas germinadas (VFG), sobre los pesos frescos y secos absolutos (g) y los pesos frescos relativos (g/100 g peso fresco) de órganos, en ratas a los 9 días de ensayo.

	LA	VF	VFG
Peso fresco absoluto			
Hígado	5,2 ^a	4,3 ^b	4,4 ^b
Bazo	0,43	0,37	0,39
Timo	0,49 ^a	0,37 ^b	0,33 ^b
Estómago	0,95	1,00	0,98
Intestino delgado	5,03	5,30	5,45
Ciego	0,53 ^a	0,79 ^b	0,59 ^a
Colon	0,66 ^a	0,86 ^b	0,75 ^{a,b}
Peso fresco relativo			
Hígado	4,75 ^a	4,13 ^b	4,17 ^b
Bazo	0,39	0,36	0,37
Timo	0,47 ^a	0,36 ^b	0,32 ^b
Estómago	0,87	0,98	0,93
Intestino delgado	4,59 ^a	5,16 ^b	5,16 ^b
Ciego	0,48 ^a	0,77 ^b	0,56 ^a
Colon	0,60 ^a	0,84 ^b	0,71 ^{a,b}
Peso seco absoluto			
Hígado	1,52 ^a	1,14 ^b	1,21 ^b
Bazo	93,0	73,3	88,8
Timo	95,9 ^a	71,8 ^b	65,6 ^b
% humedad			
Hígado	32,0 ^a	27,6 ^b	29,0 ^b
Bazo	23,7	20,5	25,0
Timo	21,9	19,8	21,8

Medias dentro de una misma fila seguidas de diferentes letras difieren significativamente ($P < 0,01$).

DISCUSIÓN

V. DISCUSIÓN

1. GERMINACIÓN DEL MATERIAL VEGETAL

Con el fin de conocer cual era el mejor sustrato para germinar las semillas de *V. faba* var. Alameda y var. Brocal, se utilizaron tanto papel como arena, ya que según marcan las Normas de la ISTA (1999), son los materiales más apropiados para realizar ensayos de germinación con leguminosas.

Cuando la incubación se realizó en papel, se observó a lo largo de los 12 días de germinación, un crecimiento de las plántulas lento, heterogéneo y con elevada contaminación micótica, ya que las semillas no fueron esterilizadas previamente. Concretamente a los 4 días de ensayo, la contaminación todavía no era excesiva, pero en muy pocas semillas se había producido la emergencia de la radícula. A los 8 días, la mayoría de las semillas habían germinado, pero la contaminación ya fue elevada. Al final del proceso, 12 días, el porcentaje de germinación fue ligeramente inferior al observado a los 8 días, porque las plántulas sufrieron daños en los tejidos a causa de la contaminación y algunas se hicieron inviables (Tabla 6).

Son muchos los autores que parecen haber obtenido buenos resultados de germinación de habas y otras leguminosas utilizando el papel como sustrato, aunque generalmente durante periodos germinativos cortos (de unos 4 días) y en muchas ocasiones aplicando fungicidas y antibióticos, ya que a medida que el tiempo de ensayo se amplía, la contaminación micótica y bacteriana aumenta. Honke y col. (1998) y Bhatti (1977) utilizaron papel de filtro para la germinación de semillas de *V. faba* y este último, prolongó la incubación hasta 8 días, pero evitó la proliferación de hongos esterilizando previamente la superficie de las habas con una solución de hipoclorito sódico. Autores como de la Cuadra y col. (1994) o Chitra y col. (1996), utilizaron este mismo sustrato para germinar otras leguminosas como garbanzo, soja o lupino durante un breve periodo de tiempo. Machaiah y col. (1999) realizaron un ensayo de germinación con semillas de *Vigna radiata* durante 6 días, y para inhibir el crecimiento microbiano, esterilizaron las semillas con hipoclorito sódico y añadieron estreptomycin y penicilina al agua con la que humedecían el sustrato. Estos autores, obtuvieron a los 4 días de germinación una longitud del eje embrionario de 4,2 cm, mientras que en nuestro ensayo, a ese tiempo en muy pocas habas había emergido la radícula (Tabla 6). De y Kar (1995), también utilizaron semillas de *V. radiata* y alcanzaron porcentajes de germinación del 92% después de un día de germinación, y del 96% a partir del 2º día de ensayo.

Como quedó reflejado también en la Tabla 6, las semillas de Alameda y Brocal se germinaron a lo largo de 12 días en arena. Con este sustrato, el índice de contaminación fue escaso y el desarrollo de las plántulas rápido y homogéneo, a pesar de no realizarse ningún tratamiento de desinfección ni antes, ni durante el proceso de incubación. A los 4 días, se obtuvo un porcentaje de germinación del 95% y a partir del 8º día, la práctica totalidad de las semillas habían germinado.

Son pocas las referencias que muestran la germinación de leguminosas en arena. Autores como Kantar y col. (1996), Vered y col. (1997) o Kyriakidis y col. (1998) germinaron habas en este sustrato de acuerdo con las Normas de la ISTA y en condiciones similares a las aquí utilizadas. Los ensayos se realizaron generalmente durante largos periodos de tiempo (entre 8-12 días) y con resultados favorables. Concretamente, Kantar y col. (1996) obtuvieron un porcentaje de germinación entre un 91-98%, dependiendo de la variedad de haba ensayada. Este sustrato, también fue utilizado para la germinación de otras leguminosas como lenteja, garbanzo o judía (Opik y Simon, 1963; Simon y Meany, 1965; Kyriakidis y col., 1998).

Una vez comparados los resultados obtenidos en nuestros ensayos de germinación (Tabla 16), se eligió la arena como sustrato óptimo para incubar las semillas de las variedades Alameda y Brocal a lo largo de 9 días. En este material vegetal, se determinó el peso fresco y seco, así como los compuestos no-nutritivos. Es importante señalar, que el dato de referencia que tenemos para comparar nuestros resultados de factores no-nutritivos con los de otros autores es la emergencia de la radícula, ya que nos indica cuando se han iniciado los procesos metabólicos, algunos de los cuales están íntimamente relacionados con las variaciones que se producen en el contenido de dichos compuestos. El problema radica, en que muy pocos investigadores señalan a que tiempo de germinación aparece la radícula, por lo que en la mayoría de las ocasiones tenemos que utilizar el número de días de germinación como dato aproximado para realizar comparaciones.

2. PESO FRESCO Y SECO DEL MATERIAL VEGETAL

La determinación del peso fresco y seco de las habas germinadas y de cada una de sus partes constituyentes, fue importante para llevar a cabo una adecuada interpretación de los cambios morfológicos y fisiológicos que se fueron produciendo a lo largo del proceso germinativo.

En las Figuras 40 y 41, quedaron representados los pesos frescos de los cotiledones, ejes embrionarios, cascarillas y semillas enteras de las variedades Alameda y Brocal germinadas en arena.

Los pesos frescos de las semillas en germinación y de las plántulas enteras en desarrollo, mostraron una gran variabilidad a las 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192 y 216 h de ensayo, pero estas diferencias de peso fueron haciéndose mayores a medida que fue transcurriendo el tiempo de germinación (Figuras 40d y 41d). Para poder interpretar esta variación en el peso, es necesario explicar detenidamente las diferencias de peso de las distintas partes que conforman la semilla o plántula entera. El peso fresco de los cotiledones (Figuras 40a y 41a) presentó una gran variabilidad en función del tiempo de germinación, y esto pudo deberse a que las semillas eran de un tamaño inicial diferente y por lo tanto con distinta capacidad de toma de agua (Al-Karaki, 1998). La variabilidad de peso fresco del eje embrionario (Figuras 40b y 41b) se fue incrementando a medida que transcurría el tiempo de ensayo, al no alcanzar todos los ejes el mismo nivel de desarrollo a un tiempo concreto de germinación. Esto fue debido, en parte, a que a partir de las semillas más grandes, se obtuvieron los ejes de mayor tamaño. Esta variabilidad de peso de los cotiledones y del eje, se refleja claramente en el peso fresco de la semilla o plántula entera (Brakke y Gardner, 1987; Qiu y col., 1994; Al-Karaki, 1998). La variabilidad que presentó el peso fresco de la cascarilla (Figuras 40c y 41c), no fue de gran relevancia, porque el único parámetro que influyó a cada tiempo de germinación, fue el diferente tamaño inicial de cada semilla y por lo tanto de su cascarilla (Al-Karaki, 1998).

A continuación, se consideran los cambios de los pesos medios de la semilla o de la plántula en relación con las fases de las que consta el proceso de germinación:

Imbibición de la semilla y emergencia de la radícula

Los pesos frescos iniciales de la semilla entera, el par de cotiledones y la cascarilla de las variedades Alameda y Brocal, mostrados en las Figuras 43a y 44a, se duplicaron a las 48-72 h de germinación debido al rápido incremento del contenido en agua, obteniéndose a ese tiempo un porcentaje de humedad del 55%. Mientras que, a las 72 h de ensayo el peso fresco del eje embrionario alcanzó valores 25 veces superiores a los iniciales, con un contenido máximo de humedad del 88%. Durante la germinación de otras leguminosas como *Vicia sativa*, garbanzo y judía, otros autores también observaron un incremento rápido del peso fresco de los cotiledones y del eje embrionario durante las primeras horas de ensayo, que estaba directamente relacionado con la toma de agua (Simon y Meany, 1965; Walker, 1974; Aldasoro y Nicolás, 1979; Schlereth y col., 2000).

La rápida absorción de agua que se produjo durante las primeras horas de incubación en las variedades Alameda y Brocal, fue debida a que el potencial hídrico de la semilla era mucho más bajo que el del medio húmedo que la rodeaba. Además, la hidratación de la semilla desencadenó la activación del embrión y el inicio de los procesos metabólicos necesarios para el desarrollo de la radícula y por lo tanto del eje embrionario (Barceló y col., 2001). De hecho, en estas variedades, se produjo la emergencia de la radícula a las 48 h de ensayo, y los valores máximos de peso fresco de los cotiledones se alcanzaron entre las 48 y las 72 h, debido a la gran absorción de agua por parte de los mismos, favorecida al romperse la cascarilla (García-Agustín y Primo-Millo, 1993; Barceló y col., 2001). De forma semejante, Briarty y col. (1970) observaron en otra variedad de *V. faba*, que el peso fresco de los cotiledones se duplicaba a las 24 h, momento en el que apareció la radícula.

Como quedó reflejado en las Figuras 43b y 44b, el peso seco de los cotiledones descendió ligeramente durante esas primeras 72 h de ensayo, lo que confirma que el incremento de peso fresco se debió únicamente a la absorción de agua. Sin embargo, el peso seco del eje embrionario aumentó ligeramente durante ese periodo de incubación, como consecuencia de la expansión y crecimiento de su propia radícula, por lo que el incremento de peso fresco no se debió exclusivamente a la toma de agua. El peso seco de la cascarilla no se modificó durante este periodo, por lo que el aumento de peso fresco se debió a la toma de agua e hidratación de la cascarilla. Como consecuencia de las variaciones observadas en las distintas partes de la semilla, el peso seco de la semilla entera de ambas variedades, mostró la misma evolución que los cotiledones, porque la representación del eje embrionario en la semilla fue mínima durante esas primeras horas de ensayo y el peso seco de la cascarilla permaneció constante.

Desarrollo de la plántula

Tras la emergencia de la radícula, el peso fresco de los cotiledones prácticamente no se modificó (Figuras 43a y 44a), aunque si se produjo una lenta y gradual toma de agua por parte de los mismos. Pero como se observa en las Figuras 43b y 44b, el peso seco de los cotiledones, descendió rápidamente a partir de las 48-72 h, debido a que las sustancias de reserva acumuladas inicialmente se fueron utilizando en el desarrollo del eje embrionario. Estos hechos confirman que el peso fresco de los cotiledones no se modificó, porque la toma de agua fue compensada con la reducción de estas reservas. Este descenso gradual del peso seco de los cotiledones hasta el final de la germinación, también fue observado por diferentes autores en distintas especies de *Vicia* y en otras leguminosas como guisante, lupino, judía, garbanzo o soja (Bain y Mercer, 1966; Beevers y Guernsey, 1966; Green y Sudia, 1969; Briarty y col., 1970; Hsu y col., 1973; Walker, 1974; Wahab y Burris, 1975;

Matheson y Saini, 1977; Aldasoro y Nicolás, 1979; Brown y Huber, 1987; Schlereth y col., 2000). Según estos autores, la reducción de peso seco fue debida a los cambios metabólicos y morfogenéticos producidos durante la germinación de la semilla, que se manifestaron claramente en los cotiledones, porque es aquí donde se almacenan las sustancias de reserva que van siendo hidrolizadas y utilizadas en parte como sustrato para la respiración y en parte para el crecimiento y desarrollo de la plántula.

En el eje embrionario, el contenido en humedad permaneció constante entre las 72 y 216 h de ensayo, por lo que el aumento de peso fresco (Figuras 43a y 44a) y seco (Figuras 43b y 44b) observado durante este periodo, se debió exclusivamente al crecimiento exponencial del eje embrionario. Tanto en *V. faba* como en otras leguminosas, el peso seco del eje embrionario mostró la misma tendencia (Simon y Meany, 1965; Beevers y Guernsey, 1966; Green y Sudia, 1969; Hsu y col., 1973; Wahab y Burris, 1975; Aldasoro y Nicolás, 1979; Brown y Huber, 1987; Griffiths y Ramsay, 1996; Schlereth y col., 2000).

En cuanto a la cascarilla, se detectó a partir de las 72 h un porcentaje de agua que no se modificó a lo largo de la germinación, por lo que su peso fresco (Figuras 43a y 44a) y seco (Figuras 43b y 44b) se mantuvo constante. Griffiths y Ramsay (1996), detectaron también en *V. faba*, valores de peso seco semejantes a los obtenidos en nuestro estudio y una evolución similar. Este comportamiento refleja claramente la función desempeñada por esta cubierta, que actúa como barrera de protección frente a posibles agresiones externas y regula los intercambios que se producen entre el interior y el exterior de la semilla (de la Cuadra, 1993).

Como consecuencia de las variaciones observadas anteriormente en las distintas partes de la semilla y de la plántula entera, a partir de las 72 h de germinación, el peso fresco de la semilla entera se incrementó rápidamente (Figuras 43a y 44a) y el contenido en agua fue aumentando lenta y gradualmente hasta el final del ensayo. Por lo tanto, este aumento de peso fresco además de ser concurrente con la elongación del eje embrionario, estaba también relacionado con la absorción de agua. Pero si observamos las Figuras 43b y 44b, el peso seco de la semilla o de la plántula entera prácticamente no mostró variaciones entre las 72 y 216 h de germinación, porque el incremento de peso del eje embrionario fue compensado con la reducción de los cotiledones. Esta misma evolución fue observada tanto en haba como en otras leguminosas (Green y Sudia, 1969; Wahab y Burris, 1975; Griffiths y Ramsay, 1996).

3. FACTORES NO-NUTRITIVOS

3.1. MONO-, DI- Y OLIGOSACÁRIDOS

La cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) es una técnica muy utilizada para la detección y cuantificación de los mono-, di- y oligosacáridos en leguminosas, por su precisión y sensibilidad, pero previamente se ha de proceder a la extracción de estos azúcares de la muestra y a la purificación del extracto. En numerosas ocasiones, la extracción se ha llevado a cabo con etanol al 80% (Kennedy y col., 1985; Dini y col., 1989), pero en algunos casos ha resultado incompleta. En otras ocasiones, en las que se ha utilizado únicamente agua, se han extraído junto a los azúcares, las α -galactosidasas endógenas encargadas de hidrolizar los oligosacáridos (Saini, 1988). Por lo tanto, el solvente de extracción más apropiado, y utilizado en este estudio, fue etanol al 50%, ya que con esta proporción etanol/agua, además de extraerse todos estos azúcares, se pueden evitar degradaciones enzimáticas (Bach Knudsen y Li, 1991; Kosson, 1992; Johansen y col., 1996; Piotrowicz-Cieslak y col., 2003). Es recomendable utilizar para purificar el extracto, columnas de intercambio aniónico y para la separación cromatográfica de los azúcares, columnas en fase amino. Además, una manera adecuada de proceder a la detección de estos compuestos es utilizando un detector de índice de refracción, ya que son moléculas que no tienen grupos cromóforos, ni tampoco poseen carga (Lattanzio y col., 1986; Muzquiz y col., 1992; Trugo y col., 1995; Porzucek y col., 2002)

La elución de los azúcares solubles a través de la columna cromatográfica, se ha realizado en algunas ocasiones con una única fase móvil de acetonitrilo/agua (Lattanzio y col., 1986; Sánchez-Mata y col., 1998). Pero en nuestro trabajo se utilizaron dos fases móviles diferentes, ya que se observó una gran heterogeneidad en el contenido de estos compuestos. De hecho, algunos carbohidratos no se pudieron cuantificar debido al pequeño tamaño de los picos, incluso inyectando volúmenes de muestra superiores, porque al aumentar el volumen, los picos de mayor tamaño también se agrandaban y se solapaban con los más cercanos. Por ello, el problema se intentó solventar utilizando acetonitrilo/agua en proporción 75/25 para separar los monosacáridos (fructosa, glucosa y galactosa), debido a que con un mayor porcentaje de acetonitrilo se alargaban los tiempos de retención, obteniéndose una mejor separación y resolución de los picos. Sin embargo, para la elución de los disacáridos (sacarosa y melibiosa) y de los α -galactósidos (rafinosa, ciceritol, estaquiosa, verbascosa y ajucosa), el solvente de elución utilizado fue acetonitrilo/agua 60/40, ya que con un menor porcentaje de acetonitrilo, se facilitó la cuantificación de estos azúcares al reducirse la anchura de los picos, mejorando así su resolución. Otros autores como Vidal-Valverde y Frías (1992), también utilizaron una fase móvil con una mayor proporción de acetonitrilo para separar los monosacáridos (glucosa y fructosa) y otra fase

diferente, con un menor porcentaje de acetonitrilo, para eluir la sacarosa y los oligosacáridos de la familia de la rafinosa (OFR).

En los cromatogramas de las dos variedades de *V. faba* aquí analizadas (Figura 45), el pico que eluyó entre rafinosa y estaquiosa se pudo identificar y cuantificar como ciceritol, ya que disponíamos de un patrón de este compuesto necesario para conocer el tiempo de retención y contrastar el perfil cromatográfico. Por la bibliografía consultada, ya se tenía conocimiento de un compuesto que eluía entre esos dos oligosacáridos, pero inicialmente, autores como Aman (1979), Fleming (1981) o Sosulski y col. (1982) lo identificaron erróneamente como maninotriosa. Posteriormente, Quemener y Brillouet (1983) demostraron que era un digalactósido de pinitol al que denominaron ciceritol por encontrarse en abundancia en las semillas de *Cicer arietinum*.

Con los métodos utilizados en este trabajo para la extracción (Johansen y col., 1996) y cuantificación (Muzquiz y col., 1992) de azúcares solubles, tuvimos la posibilidad de separar y valorar individualmente mono-, di- y oligosacáridos que se fueron sintetizando o degradando a expensas de otros a lo largo de la germinación. Siendo de gran utilidad para el estudio del metabolismo de estos azúcares y para el conocimiento del papel fisiológico desempeñado por cada uno de ellos.

Carbohidratos solubles en semillas sin germinar

Semilla entera y cotiledones

En las dos variedades de haba analizadas en este trabajo, se detectaron tanto en las semillas enteras como en los cotiledones, niveles parecidos de azúcares solubles (mono-, di- y oligosacáridos), ya que el par de cotiledones es el órgano que contiene las reservas nutricionales necesarias para el desarrollo de la plántula y constituye el 86% del peso total de la semilla.

El contenido de monosacáridos en las semillas secas y maduras de las leguminosas suele ser bajo o incluso nulo, porque estos azúcares, presentes al comienzo de la formación de la semilla, son utilizados en la biosíntesis de disacáridos y oligosacáridos durante el desarrollo de la misma (Górecki, 2000). Esto parece confirmarse en las dos variedades de haba analizadas en este trabajo, donde únicamente fue detectado un 10% de monosacáridos frente al total de azúcares solubles (Tabla 7). En las semillas y cotiledones de esta misma especie, diversos autores (Pritchard y col., 1973; Cerning y col., 1975; Naivikul y D'Appolonia, 1978; Vidal-Valverde y col., 1998) detectaron monosacáridos, y en algunas de las variedades se obtuvieron cantidades parecidas a las del presente estudio. Sin embargo, otros investigadores no los detectaron (Sosulski y col., 1982; Quemener y

Brillouet, 1983; Lattanzio y col., 1986; Horbowicz y Obendorf, 1994). En otras leguminosas como judía, guisante, garbanzo, lenteja, lupino o soja, el contenido fue también muy bajo o incluso nulo (Jaya y Venkataraman, 1981; Trugo y col., 1985; Saini y Gladstones, 1986; Kuo y col., 1988; Vidal-Valverde y Frías, 1992; Frías y col., 1994b; Górecki y col., 1996; Sánchez-Mata y col., 1998, 1999; Trugo y col., 2000; Kadlec y col., 2000, 2001; Vidal-Valverde y col., 2002, 2003; Frías y col., 2003). Según las investigaciones realizadas por Koster y Leopold (1988) y Wettlaufer y Leopold (1991), esto es ventajoso para la semilla, ya que al ser compuestos de naturaleza reductora, estarían implicados en reacciones no-enzimáticas de Amadori y Maillard causando el deterioro de proteínas, y en reacciones oxidativas liberando radicales libres y produciendo daños a tejidos secos.

En cuanto al contenido de disacáridos, se determinó un porcentaje del 35% frente al total de azúcares solubles, con niveles de sacarosa muy superiores a los de melibiosa (Tabla 7). La melibiosa, es un azúcar reductor del que se detectaron cantidades en Alameda tres veces superiores a las de Brocal (Tabla 7). Según la revisión bibliográfica realizada, no se han encontrado datos de este azúcar en otras variedades de haba. Jiménez-Martínez y col. (2004) obtuvieron en *Lupinus campestris* valores de melibiosa (6 mg/g) parecidos a los encontrados en la variedad Alameda, utilizando un método de extracción y determinación muy similar al de este estudio. En cambio, Saini y Gladstones (1986) detectaron en otras especies de *Lupinus* únicamente trazas, utilizando para su análisis métodos de cromatografía en papel y en capa fina, poco apropiados para llevar a cabo determinaciones cuantitativas. Sánchez-Mata y col. (1998), con una metodología similar a la utilizada en este estudio, obtuvieron en guisante 1 mg/g de este disacárido y en judía valores entre 0,5-1,8 mg/g, pero no lo detectaron ni en lenteja ni en garbanzo. Por lo tanto, según estos datos, la melibiosa no parece estar en todas las leguminosas. Este compuesto, es un α -galactósido de glucosa, α -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 6)- α -D-glucopiranosido, y como tal, se degrada por bacterias anaerobias en el tracto intestinal de animales monogástricos, aunque según los estudios realizados por Myhara y col. (1988), sin liberar gases. De manera que, estos autores han llegado a pensar que la molécula de fructosa que forma parte de los α -galactósidos de sacarosa, a los que posteriormente hacemos mención, podría ser la responsable de la producción de gas en el intestino de los animales monogástricos.

La sacarosa, es el disacárido más abundante de las leguminosas y su acumulación se produce al inicio del desarrollo de la semilla (Górecki, 2000). Como se refleja en la Tabla 7, el contenido detectado en la var. Alameda fue un 20% superior al de la var. Brocal. Además, la elevada concentración de sacarosa detectada en estas variedades fue importante, porque su papel fisiológico parece estar relacionado con su intervención en la

—

tolerancia a la desecación y en la aclimatación frente al frío de la semilla, confiriendo estabilidad y viabilidad a las membranas celulares y a las proteínas susceptibles de perder su integridad estructural (Koster y Leopold, 1988; Sun y Leopold, 1995; Modi y col., 2000; Minorsky, 2003). A nivel nutricional, este azúcar también tiene una función destacada, ya que es utilizado como fuente de energía por el animal.

En semillas y cotiledones de otras variedades de *V. faba* se han detectado también valores elevados de sacarosa (Cerning y col., 1975; Sosulski y col., 1982; Quemener y Brillouet, 1983; Jood y col., 1985; Lattanzio y col., 1986; Kuo y col., 1988; Quemener, 1988; Dini y col., 1989; Ndzondzi-Bokouango y col., 1989; Abdel-Gawad, 1993; Horbowicz y Obendorf, 1994; Rupérez, 1998; Vidal-Valverde y col., 1998), aunque autores como Pritchard y col. (1973) obtuvieron en una de las 8 variedades de haba analizadas, un contenido muy inferior (2 mg/g) al que habitualmente presentan las semillas maduras de esta especie. No en todas las variedades analizadas de lenteja, judía, guisante, garbanzo, lupino, soja y cacahuete, se detectaron niveles altos de sacarosa, ya que son muchos los factores que influyen en el contenido de este disacárido (Kuo y col., 1988; Abdel-Gawad, 1993; de la Cuadra y col., 1994; Frías y col., 1994b; Horbowicz y Obendorf, 1994; Górecki y col., 1996; Rupérez, 1998; Sánchez-Mata y col., 1998; 1999; Muzquiz y col., 1999; Gulewicz y col., 2000; Szczecinski y col., 2000; Trugo y col., 2000; Kadlec y col., 2000; 2001; Porzucek y col., 2002; Sat y Keles, 2002; Vidal-Valverde y col., 2002, 2003; Frías y col., 2003; Bryant y col., 2004; Jiménez-Martínez y col., 2004). Así por ejemplo, Muzquiz y col. (1999) detectaron una gran variación en el contenido de sacarosa entre las 19 variedades de judía analizadas, comprobando que, tanto la variedad seleccionada como las condiciones medioambientales, influían significativamente en el contenido de este azúcar.

Los oligosacáridos de la familia de la rafinosa, se encontraron en una proporción del 50% frente al total de los azúcares solubles (Tabla 7). Estos compuestos, también denominados α -galactósidos de sacarosa, se consideran factores no-nutritivos porque el hombre y otros animales monogástricos no pueden digerirlos por la falta de α -galactosidasas a nivel intestinal. De manera que, al ser aprovechados por las bacterias colónicas se liberan los gases causantes de la flatulencia: hidrógeno, dióxido de carbono y metano. Este efecto indeseable ha sido estudiado por diferentes autores y entre ellos, habría que considerar los ensayos realizados *in vivo* por Calloway y Murphy (1968) y Wagner y col. (1976), en los que se observó como estaquiosa producía más hidrógeno, y por lo tanto más flatulencia, que rafinosa. Estas afirmaciones, concuerdan con las obtenidas por Nowak y Steinkraus (1988), que utilizaron bacterias colónicas para sus ensayos *in vitro*. Además, según las investigaciones realizadas por Cristofaro y col. (1974) en animales de experimentación, el peso molecular de estos oligosacáridos parecía influir en el desarrollo de flatulencia. Por lo

tanto, rafinosa tendría un efecto mínimo en la producción de gases, pero estaquiosa y verbascosa producirían un elevado volumen de gas, sin diferencias entre ambos. Los estudios realizados *in vivo* por Fleming (1981), confirmaron una vez más que rafinosa y estaquiosa producían flatulencia, pero en cambio verbascosa parecía liberar menos hidrógeno. Ya que según este investigador, a medida que se incrementaba el peso molecular del oligosacárido, la afinidad de las α -galactosidasas por este sustrato, era cada vez menor. Estas observaciones, coinciden con las realizadas *in vitro* por Quemener y Brillouet (1983), al demostrar que el porcentaje de rafinosa degradado por α -galactosidasas a un tiempo concreto, era ligeramente superior al de estaquiosa, mientras que la verbascosa hidrolizada era inferior a la de estos oligosacáridos. En relación con estos estudios, podría decirse que la flatulencia está relacionada principalmente con la estaquiosa, ya que además de generar un elevado volumen de gas, es un azúcar cuyo contenido en las leguminosas supera al de rafinosa. Pero respecto a la verbascosa, presente en elevada cantidad en habas, no parece claro el nivel de flatulencia que puede generar.

Al analizar individualmente cada uno de estos compuestos en las variedades Alameda y Brocal, se comprobó que la cantidad de rafinosa era inferior a la de estaquiosa y verbascosa (Tabla 7). Algunos autores obtuvieron en *V. faba* valores de rafinosa iguales a los detectados en nuestras variedades (Eskin y col., 1980; Ndzondzi-Bokouango y col., 1989; Abdel-Gawad, 1993), sin embargo, otros detectaron niveles inferiores, entre 1-3,5 mg/g (Naivikul y D'Appolonia, 1978; Sosulski y col., 1982; Quemener y Brillouet, 1983; Lattanzio y col., 1986; Kuo y col., 1988; Dini y col., 1989; Horbowicz y Obendorf, 1994; Vidal-Valverde y col., 1998) y autores como Cerning y col. (1975) y Jood y col. (1985) determinaron cantidades superiores (10 mg/g). En otras leguminosas, rafinosa también fue detectada en menor proporción que estaquiosa y verbascosa, con valores muy diferentes (0-24 mg/g) dependiendo de la especie e incluso de la variedad analizada (Trugo y col., 1985; Knudsen, 1986; Kuo y col., 1988; Muzquiz y col., 1992, 1999; Abdel-Gawad, 1993; de la Cuadra y col., 1994; Frías y col., 1994b; Horbowicz y Obendorf, 1994; Górecki y col., 1996; Sánchez-Mata y col., 1998, 1999; Szczecinski y col., 2000; Trugo y col., 2000; Kadlec y col., 2001; Sat y Keles, 2002; Vidal-Valverde y col., 2002, 2003; Frías y col., 2003; Bryant y col., 2004; Jiménez-Martínez y col., 2004).

El contenido en estaquiosa de las semillas maduras de *V. faba* suele ser inferior al de verbascosa. De hecho, en las semillas de las dos variedades aquí analizadas se detectaron pequeñas cantidades de estaquiosa (9 mg/g) y en los cotiledones valores ligeramente superiores (10 mg/g). Cerning y col. (1975) obtuvieron en esta misma especie cantidades parecidas: 8 mg/g en la semilla entera y 11 mg/g en los cotiledones. Otros autores, detectaron en distintas variedades de haba contenidos de estaquiosa entre 2-14 mg/g, y

siempre inferiores a los de verbascosa (Vose y col., 1976; Naivikul y D'Appolonia, 1978; Sosulski y col., 1982; Quemener y Brillouet, 1983; Jood y col., 1985; Lattanzio y col., 1986; Kuo y col., 1988; Quemener, 1988; Dini y col., 1989; Ndzondzi-Bokouango y col., 1989; Abdel-Gawad, 1993; Horbowicz y Obendorf, 1994; Vidal-Valverde y col., 1998). En cambio, Eskin y col. (1980) detectaron en los cotiledones de dos variedades de haba, niveles de estaquiosa superiores a los de verbascosa; algo poco característico de esta especie. La estaquiosa, es el OFR más abundante de leguminosas como lenteja, judía, lupino, soja, cacahuete y algunas variedades de guisante y garbanzo, por lo que en estas especies la flatulencia estará relacionada principalmente con este tetrasacárido (Knudsen, 1986; Kuo y col., 1988; Muzquiz y col., 1992; Abdel-Gawad, 1993; de la Cuadra y col., 1994; Frías y col., 1994b; Horbowicz y Obendorf, 1994; Górecki y col., 1996; Oboh y col., 1998; Rupérez, 1998; Sánchez-Mata y col., 1998, 1999; Trugo y col., 2000; Sat y Keles, 2002; Vidal-Valverde y col., 2002, 2003; Frías y col., 2003; Bryant y col., 2004; Jiménez-Martínez y col., 2004).

El contenido en verbascosa de las variedades Alameda y Brocal se encontró en una proporción de alrededor del 66% frente al total de los OFR (Tabla 7). En esta misma especie, otros autores presentaron cantidades muy variadas de este pentasacárido (8-53 mg/g) y en muchas ocasiones muy parecidas a las detectadas en nuestras variedades, pero siempre en mayor proporción que rafinosa y estaquiosa (Cerning y col., 1975; Vose y col., 1976; Naivikul y D'Appolonia, 1978; Eskin y col., 1980; Sosulski y col., 1982; Quemener y Brillouet, 1983; Jood y col., 1985; Lattanzio y col., 1986; Kuo y col., 1988; Quemener, 1988; Dini y col., 1989; Ndzondzi-Bokouango y col., 1989; Abdel-Gawad, 1993; Horbowicz y Obendorf, 1994; Rupérez, 1998; Vidal-Valverde y col., 1998). La verbascosa, también es el α -galactósido de sacarosa más abundante de otras especies de *Vicia*, como es *Vicia villosa* y de otras leguminosas como *Phaseolus mungo*, *Phaseolus aureus*, *Cajanus cajan* y alguna variedad de garbanzo y guisante (Vose y col., 1976; Naivikul y D'Appolonia, 1978; Aman, 1979; Reddy y Salunkhe, 1980; Jaya y Venkataraman, 1981; Sosulski y col., 1982; Quemener y Brillouet, 1983; Jood y col., 1985; Kuo y col., 1988; Horbowicz y Obendorf, 1994; Oboh y col., 1998; Szczecinski y col., 2000; Vidal-Valverde y col., 2003).

Como se ha señalado anteriormente, sacarosa parece ser la encargada de estabilizar los componentes celulares de la semilla en situaciones de estrés medioambiental, como es la pérdida de agua en los tejidos. Pero para ello, necesita la presencia de los OFR, que inhiben la cristalización de este disacárido, proporcionándole un estado viscoso con el que se evitan reacciones que puedan deteriorar estos tejidos secos (Koster y Leopold, 1988; Bernal-Lugo y Leopold, 1992). Además, gracias a la elevada cantidad de sacarosa y de OFR, y al bajo contenido en monosacáridos, las semillas secas y maduras se pueden

almacenar durante largos periodos de tiempo conservando su capacidad para germinar (Wettlaufer y Leopold, 1991; Górecki, 2000; Groot y col., 2003).

Otro α -galactósido detectado en ambas variedades de *V. faba*, pero en este caso derivado del inositol, fue el ciceritol, cuya función en la semilla parece ser también la de facilitar la tolerancia a la desecación y el almacenamiento (Horbowicz y Obendorf, 1994). El contenido en ciceritol fue bajo, con cantidades en Alameda cuatro veces inferiores a las de Brocal (Tabla 7). Este compuesto no ha sido detectado en otras variedades de *V. faba*, aunque Szczecinski y col. (2000) obtuvieron un alto contenido en otra especie del género *Vicia*, *V. villosa* (52 mg/g). Las cantidades determinadas en garbanzo (12-39 mg/g) y lenteja (2-19 mg/g) generalmente fueron elevadas, y en judía, lupino, *C. cajan* y *P. aureus*, se detectaron pequeñas concentraciones: 0-7 mg/g (Aman, 1979; Fleming, 1981; Sosulski y col., 1982; Quemener y Brillouet, 1983; Rossi y col., 1984; Knudsen, 1986; Frías y col., 1994b; Horbowicz y Obendorf, 1994; Górecki y col., 1996; Sánchez-Mata y col., 1998, 1999; Gulewicz y col., 2000; Vidal-Valverde y col., 2002; Jiménez-Martínez y col., 2004). La capacidad del ciceritol para producir flatulencia parece ser inferior a la de los α -galactósidos de sacarosa, ya que según los ensayos llevados a cabo *in vivo* por Fleming (1981), no hay evidencias de que produzca gas en el intestino. Además, los estudios realizados *in vitro* por Quemener y Brillouet (1983), demuestran que la hidrólisis del ciceritol, es mucho más lenta que la de los OFR por la presencia de pinitol en su estructura, con lo que se reduce la sensibilidad de la molécula para ser hidrolizada por α -galactosidasas.

Como se puede deducir de los distintos trabajos de investigación, las leguminosas presentaron una gran variabilidad de resultados en relación con el contenido de azúcares solubles, ya que como hemos señalado anteriormente, son muchos los factores que pueden influir. Estas diferencias son habituales entre especies, pero también se dan entre las distintas variedades de una misma especie, incluso dentro de una misma variedad. Esto puede deberse a factores genéticos, pero las condiciones climatológicas, el terreno donde se desarrolla la semilla y las técnicas de cultivo utilizadas, también pueden modificar las cantidades; incluso su nivel de maduración y las condiciones de transporte y de almacenamiento son importantes a la hora de evaluar el contenido en carbohidratos (Cerning y col., 1975; Rossi y col., 1984; Yaklich, 1984; Kennedy y col., 1985; Lattanzio y col., 1986; Saini y Gladstones, 1986; Dini y col., 1989; Muzquiz y col., 1999; Lahuta y col., 2000a; Sat y Keles, 2002). Además, el nivel de actividad de las α -galactosidasas que presenta la semilla madura, repercute en el contenido de los azúcares solubles (Saini, 1988; Obendorf, 1997; Lahuta y col., 2000a). También hay que tener en cuenta, que estas variaciones en OFR y otros azúcares solubles, además pueden ser atribuibles a las diferentes técnicas de extracción y purificación, o incluso métodos de separación y cuantificación utilizados para

analizar estos compuestos (Trugo y col., 1985; Saini, 1988; Muzquiz y col., 1992; Johansen y col., 1996).

Eje embrionario

En las dos variedades de *V. faba* aquí analizadas, el contenido total de azúcares solubles del eje embrionario expresado en mg/g, fue unas 3,5 veces superior al de semilla entera y cotiledones (Tabla 7). Aunque es importante recordar, que el eje constituye únicamente el 1% del peso total de la semilla.

En cuanto a los monosacáridos detectados en ambas variedades, habría que señalar que el contenido en galactosa fue superior al de fructosa y glucosa (Tabla 7). Esta concentración de galactosa, podría estar relacionada con el papel desempeñado durante el proceso germinativo, como puede ser su incorporación a las paredes celulares o a los galactolípidos de las membranas celulares de la plántula en desarrollo (Bewley y Black, 1995). En la bibliografía consultada no se han encontrado datos referentes al contenido de monosacáridos en el eje embrionario de semillas de *V. faba* y los niveles detectados en otras leguminosas han sido muy bajos o incluso nulos (Kawamura, 1967; Koster y Leopold, 1988; Kuo y col., 1988), porque como anteriormente señalamos, durante el desarrollo de la semilla éstos son utilizados en la síntesis de carbohidratos de mayor peso molecular (Górecki, 2000).

El contenido de sacarosa en el eje embrionario fue alto, con valores en la var. Alameda un 20% superiores a los de Brocal (Tabla 7). Horbowicz y Obendorf (1994) detectaron en esta misma especie niveles (57 mg/g) parecidos a los de la var. Alameda. También se encontraron elevadas cantidades en el eje de *V. villosa* (26 mg/g), *Lupinus albus* (35 mg/g), *Lupinus luteus* (20 mg/g), garbanzo (36 mg/g), lenteja (39 mg/g), judía (67-81 mg/g) y soja (52-111 mg/g) (Abrahamsen y Sudia, 1966; Kawamura y col., 1977; Kuo y col., 1988; Horbowicz y Obendorf, 1994; Górecki y col., 1996; Szczecinski y col., 2000). Según los estudios realizados por Koster y Leopold (1988), la alta concentración de sacarosa proporciona al eje embrionario tolerancia a la desecación, aunque para ello necesita la presencia de los α -galactósidos.

El porcentaje de α -galactósidos de sacarosa detectado en ambas variedades, frente al total de azúcares solubles, fue del 50% aproximadamente. Los niveles de rafinosa determinados en la var. Brocal (30 mg/g) fueron de más del doble que los de la var. Alameda (12 mg/g). Horbowicz y Obendorf (1994) obtuvieron en el eje de esta misma especie, un contenido en rafinosa similar al detectado en Alameda. En otras leguminosas, se detectaron cantidades muy variadas de este trisacárido (5-27 mg/g), y siempre inferiores a

las de estaquiosa y verbascosa (Abrahamsen y Sudia, 1966; Kawamura y col., 1977; Kuo y col., 1988; Horbowicz y Obendorf, 1994; Górecki y col., 1996; Szczecinski y col., 2000).

La cantidad de estaquiosa detectada en el eje embrionario de las variedades Alameda y Brocal fue inferior a la de verbascosa (Tabla 7). Horbowicz y Obendorf (1994), obtuvieron en esta misma especie valores de estaquiosa de casi el doble (65 mg/g) a los detectados en nuestras variedades, y también inferiores a los de verbascosa. Sin embargo, es el OFR encontrado en mayor proporción en leguminosas como garbanzo, judía, lenteja, lupino o soja (Abrahamsen y Sudia, 1966; Kawamura y col., 1977; Kuo y col., 1988; Horbowicz y Obendorf, 1994; Górecki y col., 1996).

Verbascosa fue el OFR mayoritario, detectado en una proporción del 65% para Alameda y del 59% para Brocal (Tabla 7). Horbowicz y Obendorf (1994) obtuvieron valores semejantes (99 mg/g) a los de nuestras variedades y en una proporción del 55%. En los ejes de las semillas de otra especie de *Vicia*, *V. villosa*, también fue el OFR encontrado en mayor proporción, con valores de 52 mg/g (Szczecinski y col., 2000).

Como se muestra en la Tabla 7, el ciceritol fue detectado únicamente en el eje embrionario de la variedad Alameda y en baja cantidad. Este compuesto se determinó en elevadas concentraciones en los ejes de *V. villosa* (64 mg/g), lenteja (39 mg/g) y garbanzo (36 mg/g), y en menor cantidad en *L. luteus*, *L. albus*, *C. cajan* y soja (Horbowicz y Obendorf, 1994; Górecki y col., 1996; Szczecinski y col., 2000).

En cuanto a la función fisiológica desempeñada por los α -galactósidos (OFR y ciceritol) en el eje embrionario de las semillas de leguminosas, es importante destacar la intervención de los mismos en la tolerancia a la desecación, al evitar la cristalización de la sacarosa, encargada de que no se produzcan daños estructurales en las membranas celulares (Koster y Leopold, 1988; Horbowicz y Obendorf, 1994).

Cascarilla

El contenido total de azúcares solubles fue muy bajo, con valores de 8 mg/g en la var. Alameda y de 3 mg/g en la var. Brocal (Tabla 7). En la cascarilla de esta misma especie, Cerning y col. (1975) obtuvieron un contenido total de carbohidratos solubles de 16 mg/g, con valores de sacarosa de 5 mg/g, 3 mg/g de estaquiosa y 8 mg/g de verbascosa. Estas diferencias con nuestras variedades, pudieron deberse a la variabilidad genética así como al método de determinación utilizado, ya que estos autores eligieron la cromatografía en papel para cuantificar cada uno de estos azúcares, no siendo la más apropiada para estos propósitos, debido a su baja precisión. Los únicos datos encontrados en la bibliografía referentes al contenido de carbohidratos solubles en la cascarilla de otras leguminosas, fueron

los de Kawamura y col. (1977) en soja (monosacáridos, sacarosa, rafinosa y estaquiosa), los de Frías y col. (1999) en lenteja (rafinosa y estaquiosa) y los de Saini y Gladstones (1986) en lupino (sacarosa, rafinosa, estaquiosa). Como las cantidades de azúcares solubles presentes en la cascarilla, son bajas habitualmente, eliminando esta cubierta no podrían solucionarse los problemas relacionados con la ingestión de los OFR.

Evolución de los carbohidratos solubles a lo largo de la germinación

Cotiledones

Como pudo observarse en la Figura 46, el bajo contenido de fructosa y de glucosa detectado inicialmente en los cotiledones de las variedades Alameda y Brocal, se incrementó ligeramente con la germinación, mientras que los niveles de galactosa, más altos que los de fructosa y glucosa, sufrieron una pequeña reducción. Por lo tanto, el contenido total de monosacáridos no mostró prácticamente variaciones a lo largo de los 9 días de ensayo. Autores como Rahma y col. (1987), observaron en esta misma especie, ligeras reducciones de los monosacáridos con la germinación. Mientras que en otras leguminosas como garbanzo, *P. aureus* o soja, las pequeñas cantidades iniciales se incrementaron (Abrahamsen y Sudia, 1966; Jaya y Venkataraman, 1981; Brown y Huber, 1987). Según los estudios realizados por Cruz y da Silva (1986), el bajo contenido de fructosa y de glucosa detectado en los cotiledones de estas leguminosas, podría estar relacionada con la baja actividad de las invertasas encargadas de hidrolizar sacarosa por su enlace β -(1 \rightarrow 2) glucosídico para liberar fructosa y glucosa. El incremento de los niveles de estos dos monosacáridos observado en los cotiledones de algunas de estas leguminosas, podría estar relacionado con la actuación de las amilasas sobre el almidón, que provocaría el acúmulo de fructosa y glucosa (Ologhobo y Fetuga, 1986; Nnanna y Phillips, 1988). La presencia de galactosa durante todo el proceso germinativo, principalmente en nuestras variedades de *V. faba*, posiblemente proceda de la degradación de los OFR por su enlace α -(1 \rightarrow 6) galactosídico en presencia de las α -galactosidasas (Cruz y da Silva, 1986; Bau y col., 1997).

La evolución de la melibiosa durante la germinación fue diferente para las dos variedades analizadas en este estudio, ya que mientras en Alameda se produjo una disminución de su contenido, en Brocal se observó un incremento (Figura 46). También Jaya y Venkataraman (1981) observaron como en los cotiledones de garbanzo, los niveles de melibiosa se duplicaban con la germinación, mientras que en *P. aureus* se reducían a la mitad. El descenso observado en algunas de estas leguminosas, podría estar provocado por la actuación de las α -galactosidasas sobre el enlace α -(1 \rightarrow 6) de la melibiosa, liberándose

galactosa y glucosa. Mientras que el incremento, probablemente se deba a su acumulación a expensas de la rafinosa que va siendo hidrolizada por su enlace β -(1 \rightarrow 2) en presencia de invertasas (Wahab y Burris, 1975; Dey, 1985).

En cuanto a la evolución de sacarosa, se observó un contenido máximo de este disacárido entre el 2º y 3º día de ensayo (Figura 47), coincidiendo con el momento de la emergencia de la radícula, cambio morfológico que podemos apreciar en la Figura 30. El aumento de sacarosa observado durante estas primeras horas de germinación, es decir, antes de comenzar la movilización de la mayoría de las sustancias de reserva almacenadas en los cotiledones (almidón, proteína y lípidos), podría deberse a su acumulación a expensas de los OFR que se hidrolizan rápidamente cuando se produce la emergencia de la radícula; momento en el que las α -galactosidasas alcanzan su máxima actividad (Abrahamsen y Sudia, 1966; Corchete y Guerra, 1987; Bau y col., 1997). A continuación, se produjo un descenso de la sacarosa, que pudo deberse a la mayor actividad de las invertasas (hidrolasas) y sacarosa sintetasas (glicosiltransferasas) encargadas de hidrolizar la sacarosa, o incluso a una rápida movilización de este azúcar desde los cotiledones hacia el eje embrionario (Brown y Huber, 1987; Madore, 1995; Avigad y Dey, 1997; Sturm, 1999). Finalmente, el aumento de sacarosa observado a partir del 5º día en la var. Alameda y del 6º día en la var. Brocal, podría deberse a su acumulación a expensas del almidón y de los lípidos presentes en los cotiledones, que se van transformando en sacarosa a lo largo del proceso germinativo (Beevers, 1961; Jood y col., 1985; Ologhobo y Fetuga, 1986).

La sacarosa no siempre ha mostrado el mismo comportamiento durante el proceso germinativo. Así por ejemplo, en los cotiledones de soja y garbanzo, Brown y Huber (1987) y Jaya y Venkataraman (1981) detectaron elevados niveles de sacarosa el 2º día de germinación, por su acumulación a expensas de los OFR degradados. Jood y col. (1985) y Jaya y Venkataraman (1981), observaron en *V. faba* y *P. aureus*, un incremento gradual de este disacárido a lo largo de 4 días de ensayo, inicialmente por la hidrólisis de los OFR y posteriormente por la degradación del almidón y de los lípidos. Por el contrario, en las variedades de soja analizadas por Abrahamsen y Sudia (1966) y Kuo y col. (1988), el elevado contenido inicial de sacarosa se redujo gradualmente a lo largo de la germinación, probablemente porque se fue degradando, o incluso porque se fue produciendo una traslocación desde los cotiledones hacia el eje.

Con relación al contenido de OFR, es importante señalar que los niveles de rafinosa fueron descendiendo ligera y paulatinamente durante la germinación, obteniéndose a los 9 días reducciones del 47% en la var. Alameda y del 31% en la var. Brocal (Figura 47). En los cotiledones de otras leguminosas se observó esta misma evolución, aunque el

porcentaje reducido fue diferente dependiendo de la especie y de las condiciones de germinación utilizadas por cada autor. Así pues, en garbanzo se produjeron reducciones del 29% a los 4 días de ensayo, en *P. aureus* del 54-69% a los 4-5 días y en soja del 71-85% a los 3-5 días (Abrahamsen y Sudia, 1966; Jaya y Venkataraman, 1981; Kuo y col., 1988). En los cotiledones, tanto de nuestras variedades como de estas otras leguminosas, la reducción de rafinosa aparentemente no fue tan rápida como la observada para estaquiosa y verbascosa, debido a la acumulación temporal de este trisacárido como resultado de la degradación de sus homólogos de mayor peso molecular (Kaur y Kawatra, 2000).

Como se aprecia en la Figura 47, en los cotiledones de nuestras variedades se observó un ligero ascenso en el contenido de estaquiosa durante las primeras 24 h de incubación. Esto pudo deberse a la hidrólisis de verbascosa, que provocó la acumulación temporal de estaquiosa. A los 2 días de ensayo, coincidiendo con la emergencia de la radícula, los niveles de estaquiosa se redujeron bruscamente, y a partir del 3^{er} día, en Alameda se obtuvieron cantidades muy pequeñas de este α -galactósido y en Brocal ya no fue detectado. Con procesos de germinación de entre 3 y 5 días, estaquiosa también se redujo o incluso se eliminó de *P. aureus* (96-100%), garbanzo (100%) y soja (74-96%) (Abrahamsen y Sudia, 1966; Jaya y Venkataraman, 1981; Kuo y col., 1988). El elevado contenido inicial de verbascosa, se redujo un 93% aproximadamente el 2^o día de ensayo y a partir del 3^{er} día, este oligosacárido ya no fue detectado. De forma semejante, Jaya y Venkataraman (1981) y Kuo y col. (1988), eliminaron verbascosa de cotiledones de garbanzo y *P. aureus*, en un periodo de tiempo de entre 2 y 4 días, dependiendo de las condiciones de germinación aplicadas por cada autor.

Según los estudios realizados por Dey y Pridham (1972) y Quemener y Brillouet (1982), los OFR de menor peso molecular se hidrolizan con más facilidad. Por lo tanto, rafinosa se degradará más rápido que estaquiosa y este último a más velocidad que verbascosa. Aunque, tanto en nuestro estudio como en los de los otros autores, el primero que se reduce o incluso se elimina de los cotiledones es verbascosa, seguido de estaquiosa y por último rafinosa. Esto parece ser debido a la acumulación temporal de los α -galactósidos de menor peso molecular a expensas de los de mayor tamaño, que van siendo hidrolizados durante el periodo germinativo. Además, habría que resaltar que la rápida hidrólisis de los OFR durante los primeros días de germinación, coincide con el periodo en que emerge la radícula y con la máxima actividad alcanzada por las α -galactosidasas e invertasas encargadas de la degradación de estos azúcares (Reddy y Salunkhe, 1980; Cruz y da Silva, 1986; Corchete y Guerra, 1987; Nnanna y Phillips, 1988). Según las investigaciones llevadas a cabo por Corchete y Guerra (1987), el eje embrionario

es el encargado de regular la actividad de las α -galactosidasas presentes en los cotiledones durante la germinación.

La evolución del ciceritol durante la germinación fue contraria a la de los OFR, ya que a partir del 2º día de ensayo se produjo un rápido ascenso de este α -galactósido de inositol en las variedades Alameda y Brocal (Figura 47). Por lo tanto, podría ejercer una función de protección de la integridad estructural de proteínas y membranas celulares a lo largo del desarrollo de la plántula (Horbowicz y Obendorf, 1994; Szczecinski y col., 2000).

Eje embrionario

Cuando los resultados obtenidos en las variedades Alameda y Brocal se presentaron en “mg por g de materia seca”, el elevado contenido de monosacáridos totales se redujo ligeramente con la germinación. Analizando individualmente cada uno de ellos, observamos que a los 3-4 días de ensayo se alcanzaron los niveles máximos de fructosa y de glucosa, y posteriormente ambos mostraron ligeras oscilaciones. Pero por el contrario, el alto contenido inicial de galactosa se redujo en las dos variedades (Figura 48). Cuando los datos se expresaron en “mg por eje embrionario” se observó un incremento del 95% en el contenido total de los monosacáridos (Figuras 50b y 51b). En otras leguminosas como *P. aureus* y soja, donde los resultados se mostraron en mg/g, Kuo y col. (1988) observaron como el bajo contenido inicial de fructosa y de glucosa, se iba incrementando hasta alcanzar las máximas concentraciones el 4º día de ensayo. Este comportamiento fue muy semejante al observado en nuestras variedades de haba. Sin embargo, estos investigadores no detectaron galactosa a lo largo de la germinación, probablemente por la rápida metabolización y transformación de este azúcar en otros compuestos necesarios para el eje embrionario en desarrollo (Pazur y col., 1962; Dey, 1985; Bewley y Black, 1995). Koster y Leopold (1988), observaron que a las 18 h de germinación se producía en las semillas de soja la emergencia de la radícula y a las 24 h en las semillas de guisante. Durante este periodo, se produjo en ambas especies un rápido aumento de los monosacáridos, principalmente de glucosa. La aparición de la radícula, es el dato morfológico más indicado para comparar resultados y poder interpretar la evolución de los azúcares a lo largo de la germinación, ya que el número de horas de incubación no nos da la suficiente información a cerca de los cambios metabólicos que se producen durante el proceso de germinación.

Una vez presentados todos estos resultados, habría que indicar que el acúmulo de fructosa, glucosa y galactosa en el eje embrionario de estas especies, pudo producirse a expensas de los OFR hidrolizados durante las primeras horas de germinación, es decir durante la fase de imbibición de la semilla y emergencia de la radícula, que es cuando se alcanza una mayor actividad de las α -galactosidasas (Koster y Leopold, 1988; Bau y col.,

1997). También es importante resaltar, la función que ejercen los monosacáridos en el eje embrionario a lo largo de la germinación. Estos azúcares, son utilizados durante el desarrollo de este eje como fuente de energía para los distintos procesos metabólicos y como sustrato en la síntesis de diferentes compuestos, como pueden ser los polisacáridos de las paredes celulares o los galactolípidos de las membranas celulares (Dey, 1985; Kuo y col., 1988; Bewley y Black, 1995; Górecki y col., 2000).

En relación con la evolución de sacarosa en el eje embrionario durante los 9 días de ensayo, es importante señalar que al presentar los resultados en mg/g (Figura 49), los elevados niveles iniciales se redujeron en ambas variedades. En cambio, al mostrar la evolución de sacarosa referida a un solo eje embrionario (Figuras 50b y 51b), pudimos observar que el bajo contenido inicial se incrementaba ligeramente a lo largo de la germinación. Por lo tanto, la sacarosa presente en los cotiledones, podría estar siendo transportada al eje para su expansión y crecimiento (Brown y Huber, 1987; Kuo y col., 1988; Avigad y Dey, 1997; Bau y col., 1997). En el eje embrionario de otras leguminosas, se observaron en algunas ocasiones descensos y en otras, incrementos del contenido de este disacárido (Abrahamsen y Sudia, 1966; Koster y Leopold, 1988; Kuo y col., 1988).

El comportamiento de los OFR durante el periodo germinativo quedó reflejado en la Figura 49. La rafinosa estuvo presente a lo largo de las 216 h de ensayo en ambas variedades, probablemente debido a su acumulación a expensas de la verbascosa y de la estaquiosa hidrolizadas durante este proceso (Bau y col., 1997; Kaur y Kawatra, 2000). En el eje embrionario de guisante y soja, Koster y Leopold (1988) ya no detectaron rafinosa a un tiempo de germinación próximo a la aparición de la radícula. En otras variedades de soja, Abrahamsen y Sudia (1966) y Kuo y col. (1988) dejaron de detectar este trisacárido entre 72-120 h, dependiendo de las condiciones de germinación utilizadas por cada uno de ellos.

Coincidiendo con la emergencia de la radícula, estaquiosa y verbascosa ya no se detectaron a las 48 h de ensayo en ninguna de las dos variedades analizadas (Figura 49). En otras leguminosas, el contenido de estos oligosacáridos también se redujo rápidamente. Así por ejemplo, en guisante ya no fue detectada verbascosa a las 12 h y estaquiosa a las 30 h, y en *P. mungo*, verbascosa desapareció a las 48 h y estaquiosa a las 72 h. En estas dos especies, estaquiosa permaneció en el eje durante unas horas más, probablemente por su acumulación a expensas de la verbascosa degradada. Por otra parte, en leguminosas que no contienen verbascosa, como es el caso de la soja, la reducción de estaquiosa se produjo entre las 42-96 h de germinación (Abrahamsen y Sudia, 1966; Koster y Leopold, 1988; Kuo y col., 1988).

Según los estudios realizados por Koster y Leopold, (1988), en el eje embrionario de las leguminosas parece existir una correlación entre la tolerancia a la desecación y el contenido en azúcares solubles, ya que los OFR abundantes al inicio de la germinación, descienden rápidamente cuando emerge la radícula, momento en que el eje embrionario pierde la tolerancia a la desecación. Además, a medida que estos oligosacáridos van siendo degradados, el contenido de los monosacáridos necesarios para el desarrollo del eje embrionario, también aumenta. En algunas ocasiones, la presencia de estos monosacáridos puede favorecer el deterioro de estos ejes sensibles a la desecación. Aunque concretamente en los ejes de las habas aquí analizadas, se observó un incremento gradual del ciceritol a lo largo del ensayo (Figura 49), que podría desempeñar la misma función de protección que ejercían los OFR antes de comenzar el proceso germinativo (Horbowicz y Obendorf, 1994; Carrouee, 1995).

Semilla y plántula entera

Como quedó reflejado en las Figuras 50 y 51, a partir de los resultados obtenidos en los cotiledones y en el eje embrionario de ambas variedades, pudo conocerse el contenido de azúcares soluble presente en las semillas y plántulas enteras a lo largo del proceso germinativo.

El aumento de los monosacáridos observado durante la germinación en la semilla y plántula entera (Figuras 50c y 51c), procedía principalmente del incremento detectado en el eje embrionario (Figuras 50b y 51b). En guisante, judía, soja y lenteja el contenido en monosacáridos también se incrementó (East y col., 1972; Snauwaert y Markakis, 1976; Labaneiah y Luh, 1981; Vidal-Valverde y Frías, 1992; Urbano y col., 1995; Vidal-Valverde y col., 2002) y su acumulación pudo producirse a expensas de los α -galactósidos y sacarosa que fueron hidrolizándose a lo largo de la germinación (Bau y col., 1997). Pero estos azúcares no siempre han seguido la misma cinética durante el proceso germinativo, ya que por ejemplo en guisante y garbanzo, otros autores detectaron un descenso en el contenido de los mismos (Aman, 1979; Kadlec y col., 2000). Según los estudios realizados por Dey (1985) y Bewley y Black (1995), esto pudo deberse a su rápida transformación en otros compuestos necesarios para el desarrollo del eje embrionario.

El contenido en sacarosa de la semilla o plántula entera de las dos variedades analizadas a lo largo de la germinación, fue muy similar al detectado en los cotiledones, debido a la escasa cantidad presente en el eje embrionario. De manera que, coincidiendo con la emergencia de la radícula, a los 2-3 días de germinación se alcanzaron cantidades elevadas de este azúcar (Figuras 50 y 51). En otras legumbres de consumo humano también se obtuvieron niveles máximos entre los 2-4 días de incubación (Aman, 1979; Sathe y

col., 1983; Muzquiz y col., 1992; de la Cuadra y col., 1994). La sacarosa, es un disacárido presente en todas las leguminosas, que suele encontrarse en elevada cantidad durante todo el proceso de germinación, aunque la evolución no siempre es la misma. Tanto en haba como en otras especies, algunos autores observaron un incremento gradual de este compuesto a lo largo de la germinación (Snauwaert y Markakis, 1976; Jood y col., 1985; Ndzondzi-Bokouango y col., 1989; Trugo y col., 1990; Vidal-Valverde y col., 2002). Mientras que, en estas mismas leguminosas otros autores observaron una reducción del contenido inicial (Pazur y col., 1962; East y col., 1972; Labaneiah y Luh, 1981; Vidal-Valverde y col., 1998). Incluso un gran número de investigadores, no observaron prácticamente variaciones en las concentraciones de este disacárido (Aman, 1979; Jood y col., 1985; Camacho y col., 1992; Vidal-Valverde y Frías, 1992; Urbano y col., 1995; Kadlec y col., 2000; Vidal-Valverde y col., 2002).

En las semillas enteras de Alameda y Brocal, el contenido total de OFR (rafinosa, estaquiosa, verbascosa y ajucosa) fue, igual que en los cotiledones, elevado durante las primeras 24 h de ensayo, pero el 2º día los niveles se redujeron y a partir del 3º día, los bajos valores obtenidos, procedentes principalmente de la rafinosa, se mantuvieron prácticamente constantes (Figuras 50c y 51c). En otras variedades de haba, Ndzondzi-Bokouango y col. (1989) observaron una reducción paulatina de la rafinosa y de la estaquiosa a lo largo de 6 días de germinación, mientras que el elevado contenido inicial de verbascosa se redujo bruscamente al 3º día y posteriormente siguió disminuyendo. El pequeño contenido inicial de ajucosa, ya no fue detectado por estos autores a las 24 h de ensayo. En esta misma especie, Jood y col. (1985) ya no detectaron rafinosa, estaquiosa y verbascosa el 3º día de germinación.

Como se muestra en las Figuras 50 y 51, el contenido de ciceritol fue incrementándose a lo largo de la germinación tanto en los cotiledones, como en el eje embrionario de ambas variedades, y esto se vio reflejado en la plántula entera. En cambio, Jood y col. (1985) y Ndzondzi-Bokouango y col. (1989) no detectaron este trisacárido en sus variedades de haba. La presencia de este compuesto podría ser importante cuando la falta de OFR necesarios para conferir estabilidad a membranas y proteínas, se compensa con el ciceritol acumulado durante la germinación. De manera que, la plántula en desarrollo no pierde la tolerancia a la desecación (Carrouee, 1995).

En muchas otras leguminosas, también han sido analizados α -galactósidos a lo largo de la germinación. En lenteja, ya no se detectaron estaquiosa y ciceritol a los 2 días y rafinosa a los 6 días de ensayo (Vidal-Valverde y col., 2002). En garbanzo, con tratamientos de 3 días, se lograron reducciones del 80-100% para los OFR y del 68% para el ciceritol y en

P. aureus, a los 2 días se redujo el contenido inicial de OFR un 87%, mientras que el ciceritol prácticamente se eliminó a ese tiempo (Rao y Belavady, 1978; Aman, 1979; Jood y col., 1985). Como podemos observar, en estas leguminosas el ciceritol mostró la misma evolución que los otros α -galactósidos a lo largo de la germinación. En lenteja, garbanzo y guisante, Camacho y col. (1992) obtuvieron reducciones del 90% para estaquiosa y del 60% para rafinosa a los 3 días de ensayo. En guisante, Vidal-Valverde y col. (2002) ya no detectaron verbascosa a los 2 días y estaquiosa a los 4 días, pero rafinosa se redujo un 82% a los 6 días. En judía, estos mismos autores, redujeron a los 4 días el 100% de estaquiosa y a los 6 días el 91% de rafinosa, y otros investigadores (Snauwaert y Markakis, 1976; Sathe y col., 1983; Trugo y col., 1990; Camacho y col., 1992) redujeron entre los 3-5 días de ensayo el 69-92% de estaquiosa y el 55-70% de rafinosa.

De los datos aquí recopilados, es necesario destacar que verbascosa y estaquiosa se redujeron rápidamente durante los primeros días de germinación, momento en el que, según nuestros ensayos (Figura 30) y los estudios realizados por Corchete y Guerra (1987), se produce la emergencia de la radícula y además, se incrementa la actividad de las α -galactosidasas necesarias para la hidrólisis de estos azúcares. La rafinosa también se degrada durante el proceso germinativo, pero concretamente en nuestras variedades de haba, no se apreció el descenso de este compuesto, probablemente por su acumulación temporal a expensas de la estaquiosa y la verbascosa hidrolizadas. En las legumbres analizadas por otros investigadores, la reducción de rafinosa aparentemente fue más lenta que la de estaquiosa y verbascosa, por este mismo motivo (Kaur y Kawatra, 2000).

En relación con los azúcares solubles presentes en las distintas legumbres germinadas, habría que concluir diciendo que, no siempre presentan el mismo comportamiento a lo largo del proceso germinativo. De hecho, el diferente origen de la semilla influye en el contenido de estos carbohidratos y las condiciones de germinación (sustrato, luz, temperatura, humedad, ...) utilizadas por cada investigador también. Además, el porcentaje de OFR que se consigue reducir con un tratamiento de germinación, puede variar dependiendo de los niveles de α -galactosidasas presentes en cada semilla y esto a su vez, repercute en el contenido de sacarosa y monosacáridos procedentes de la hidrólisis de los oligosacáridos (Abrahamsen y Sudia, 1966; Sathe y col., 1983; Nnanna y Phillips, 1988; de la Cuadra y col., 1994; Vidal-Valverde y col., 2002).

Finalmente, es importante recordar que los OFR presentes en las leguminosas, son agentes productores de flatulencia (Cristofaro y col., 1974; Fleming, 1981). Pero la germinación, como técnica de procesado es muy efectiva y rápida para reducir o incluso eliminar estos compuestos, y el dato morfológico que nos indica esa reducción es la

emergencia de la radícula (Corchete y Guerra, 1987; Koster y Leopold, 1988). Por lo que generalmente, con un tratamiento de germinación de aproximadamente 72 h, sería suficiente para eliminar por lo menos los OFR de mayor peso molecular. Savitri y Desikachar (1985), además de reducir el contenido de los OFR con la germinación, demostraron *in vivo* que las semillas germinadas producían menos flatulencia que las no germinadas. Además, según los estudios realizados por Nnanna y Phillips (1988), al inicio de la germinación la actividad de las amilasas y proteasas es mínima y la de las α -galactosidasas máxima. Por ello, las habas y otras legumbres germinadas, serán una fuente rica en proteína y almidón, pero deficitaria en oligosacáridos productores de flatulencia, siendo adecuadas para el consumo humano y de otros animales monogástricos.

3.2. VICINA, CONVICINA Y L-DOPA

La determinación de vicina, convicina y L-DOPA se ha llevado a cabo durante muchos años a través de métodos espectrofotométricos (Maggi y Cometti, 1972; Collier, 1976), pero son procedimientos con ciertas limitaciones, ya que con ellos no se pueden detectar individualmente estos analitos y se producen sobreestimaciones. Por lo tanto, actualmente se utilizan como ensayos rápidos para dar una valoración global de los compuestos de una muestra.

Estos factores no-nutritivos también pueden analizarse por técnicas cromatográficas. Concretamente la cromatografía en papel (Brown y Roberts, 1972) y en capa fina (Olsen y Andersen, 1978) son útiles para la separación e identificación de estos compuestos, pero no son las más indicadas para realizar ensayos cuantitativos ya que son poco precisas. Una técnica cuantitativa que puede utilizarse, es la cromatografía de gases (Pitz y Sosulski, 1979; Bjerg y col., 1984a), pero requiere largos periodos de tiempo para su desarrollo, ya que es necesario llevar a cabo previamente la derivatización de los compuestos. Sin embargo, la cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) se utiliza frecuentemente para la separación y cuantificación de vicina, convicina y L-DOPA, porque además de ser precisa, sensible y segura, la rapidez con que se realiza evita la oxidación y precipitación de los glucósidos (Marquardt, 1982; Knudsen y col., 1985).

Son muchos los procedimientos utilizados para la extracción y purificación de estos compuestos, pero el desarrollado por Marquardt y Fröhlich (1981), basado en la precipitación de proteínas con ácido perclórico al 5%, es uno de los más rápidos y sencillos, ya que no requiere la previa desproteínización de la muestra. Además, existen varios tipos de columnas cromatográficas para la separación de vicina, convicina y L-DOPA, pero las más utilizadas en CLAR son las de fase reversa C₁₈ (Marquardt y Fröhlich, 1981; Burbano y col.,

1993; Siddhuraju y Becker, 2001a; Kirakosyan y col., 2004). Un solvente de elución muy apropiado para la separación y resolución de los tres analitos, es el tampón de fosfato amónico a pH 2 utilizado por Marquardt y Fröhlich (1981). La detección y cuantificación de estos compuestos se lleva a cabo habitualmente por absorción de luz ultravioleta.

El método de Marquardt y Fröhlich (1981) modificado por Burbano y col. (1993), fue el elegido para separar y cuantificar vicina, convicina y L-DOPA en las muestras de Alameda y Brocal, ya que reunía las condiciones adecuadas para este fin. La posibilidad de analizar cada compuesto independientemente, fue importante para poder estudiar algunos de los cambios fisiológicos y metabólicos producidos durante la germinación de la semilla y desarrollo de la plántula. Además, fue necesario diferenciar a los glucósidos pirimidínicos de la L-DOPA, porque mientras los primeros son compuestos tóxicos que pueden producir fabismo (Marquardt, 1989), la L-DOPA es un principio activo utilizado en el tratamiento del Parkinson (Randhir y col., 2002).

Vicina, convicina y L-DOPA en semillas sin germinar

Vicina y convicina son unos glucósidos pirimidínicos que se concentran principalmente en las semillas del género *Vicia*, de los que se conoce poco su origen metabólico y su lugar de síntesis. Según las investigaciones realizadas por Ramsay y Griffiths (1996) estos compuestos parecen sintetizarse en la cascarilla, desde donde se exportarían a los cotiledones y al eje embrionario. Su biosíntesis se produce en los primeros estadios del desarrollo de la semilla, por lo que su concentración en las semillas verdes y frescas es elevada. Sin embargo, durante el proceso de maduración y desecación el contenido de estos glucósidos se reduce, aunque su presencia en la semilla es constante porque son productos finales de un proceso metabólico (Jamalian y Bassiri, 1978; Lattanzio y col., 1982; Burbano y col., 1995b).

En las semillas maduras y secas de las variedades Alameda y Brocal fueron detectados ambos glucósidos, con valores de vicina del doble a los de convicina (Tabla 13). En numerosos trabajos de investigación se han analizado diferentes variedades y cultivares de *V. faba*, debido a la implicación que estos compuestos tienen sobre el fabismo, enfermedad hemolítica hereditaria asociada al consumo de habas. Así pues, Pitz y col. (1981) obtuvieron en 242 cultivares un rango de variación comprendido entre los 4,4-8,2 mg/g para vicina y 1,3-6,4 mg/g para convicina. Gardiner y col. (1982) detectaron en 78 genotipos distintos un intervalo de variación muy semejante al obtenido por Pitz y col. (1981). Posteriormente, Bjerg y col. (1985) analizaron varias líneas genéticas donde obtuvieron niveles de vicina de 5,1-8,0 mg/g y de convicina de 2,3-3,7 mg/g, y Burbano y col.

(1993) detectaron en 40 líneas de distintos orígenes botánicos y geográficos un rango de variación más amplio, con niveles de vicina entre 3,6-8,7 mg/g y de convicina entre 0,9-7,2 mg/g. Todos estos autores concluyeron que tanto el genotipo como las condiciones medioambientales tenían efectos muy significativos en el contenido de estos glucósidos, y que además, el contenido de vicina y de convicina estaba bajo control genético independiente. También es importante destacar los estudios realizados por Duc y col. (1989) en esta misma especie, porque examinando una amplia colección de genotipos, encontraron en uno de procedencia polaca cantidades de vicina de 0,4 mg/g y de convicina de 0,04 mg/g. Estas líneas, que han sido de difícil adaptación agronómica, actualmente están siendo utilizadas por su bajo contenido en estos glucósidos (Duc y col., 2004; Gutierrez y col., 2004).

En relación con la distribución de estos compuestos en las semillas maduras de *V. faba*, se ha observado que no es homogénea. Concretamente en las dos variedades analizadas en este trabajo, la mayor parte de la vicina y de la convicina total de la semilla, se encontró en los cotiledones, un pequeño porcentaje fue detectado en el eje y la proporción obtenida en la cascarilla fue mínima (Tabla 14). Griffiths y Ramsay (1992b, 1996) detectaron en otras variedades de *V. faba*, porcentajes de cada glucósido similares a los obtenidos en el presente estudio: el 86-92% de vicina y el 92-98% de convicina fue encontrado en los cotiledones, mientras que el 6-13% de vicina y el 1-8% de convicina se localizó en el eje. Como acabamos de señalar, la mayoría de los glucósidos pirimidínicos se encuentra en los cotiledones, en parte por tener una elevada representación dentro del peso total de la semilla. Pero además, si analizamos los resultados mostrados en la Tabla 13 en mg/g, vemos que la concentración de vicina en el eje embrionario fue muy superior a la de los cotiledones, mientras que los niveles de convicina fueron bajos tanto en los cotiledones como en el eje embrionario. El contenido de vicina y de convicina detectado por Burbano y col. (1995b) y Griffiths y Ramsay (1992a) en las distintas partes de la semilla de *V. faba*, fue semejante al obtenido en nuestras variedades. Según Griffiths y Ramsay (1992a), la alta concentración de vicina presente en el eje de estas semillas podría estar relacionada con alguna función fisiológica importante durante su expansión y crecimiento a lo largo de la germinación.

V. faba no es la única especie donde se han encontrado vicina y convicina, en las semillas enteras y en los cotiledones de *V. sativa* y *Vicia bithynica* se obtuvieron cantidades de estos glucósidos pirimidínicos parecidas, con niveles de vicina también superiores a los de convicina. Sin embargo, las cantidades detectadas en *Vicia narbonensis* fueron muy inferiores a las de las otras especies del género *Vicia*. En el eje embrionario de *V. bithynica* y *V. narbonensis* se obtuvieron niveles de vicina superiores a los de convicina, y en una

proporción vicina/convicina similar a la encontrada en el eje de *V. faba*. En la cascarilla de estas dos especies, se detectaron cantidades muy pequeñas de estos glucósidos (Pitz y col., 1980; Griffiths y Ramsay, 1992a; Farran y col., 2002; Arias y col., 2004).

En cuanto a la función desempeñada por vicina y convicina en la semilla, habría que señalar que son compuestos con un elevado contenido en nitrógeno, lo que podría suponer una fuente de reserva de este elemento (Mager y col., 1980). Además, la presencia de estos compuestos es importante, porque están implicados en mecanismos de defensa frente a depredadores y organismos patógenos (Bjerg y col., 1984b; Pavlík y col., 2002).

A diferencia de los glucósidos pirimidínicos, L-DOPA se acumula principalmente en vainas, tallos y hojas de *V. faba*. En las semillas muy jóvenes pueden detectarse pequeñas cantidades de este aminoácido no proteico, que se van reduciendo conforme se utilizan en las diferentes reacciones biosintéticas, por lo que en las semillas maduras y secas el contenido es muy bajo (Longo y col., 1974; Lattanzio y col., 1982; Burbano y col., 1995; Kirakosyan y col., 2004). Coincidiendo con lo aquí señalado, el contenido en L-DOPA de las semillas de Alameda y Brocal fue mínimo, encontrándose repartido entre el eje embrionario y la cascarilla (Tabla 13 y 14). Kirakosyan y col. (2004) detectaron en 24 cultivares de *V. faba*, cantidades de L-DOPA en un rango de 0,01-2 mg/g, predominando los valores próximos a cero. Askar (1986) mostró valores entre 0,1-0,5 mg/g para 9 variedades, y Wong y Lim (1992) obtuvieron niveles mayores: 2,8 mg/g. En cambio, en las leguminosas del género *Mucuna* fue detectado un contenido elevado de L-DOPA: 36-47 mg/g, localizado principalmente en los cotiledones (Prakash y Tewari, 1999; Siddhuraju y Becker, 2001b).

Estudios realizados *in vitro* parecen demostrar que L-DOPA está relacionada con el fabismo (Kosower y Kosower, 1967; Beutler, 1970), aunque ensayos *in vivo* no han podido confirmarlo (Gaetani y col., 1970). Dado que esta enfermedad está asociada a la ingesta de la semilla de *V. faba*, y L-DOPA se concentra principalmente en las partes verdes de la planta, se cree poco probable que tenga alguna conexión (Longo y col., 1974).

Evolución de los glucósidos pirimidínicos y L-DOPA a lo largo de la germinación

Cotiledones

En las variedades analizadas en este estudio, los niveles de vicina y convicina descendieron ligera y gradualmente a lo largo del periodo germinativo, hechos que quedaron reflejados tanto en la Figura 53, donde los resultados se mostraron en mg/g, como en las Figuras 55a y 56a, donde los datos se presentaron en mg/par de cotiledones. En esta misma especie, Rahma y col. (1987) y Griffiths y Ramsay (1996) también observaron reducciones en

el contenido de estos glucósidos con la germinación. Además, Griffiths y Ramsay (1996) analizaron los cotiledones de *V. narbonensis*, donde el bajo contenido inicial de vicina y de convicina descendió.

La reducción de los glucósidos pirimidínicos de los cotiledones mediante procesos como la germinación podría ser beneficiosa, ya que como hemos indicado anteriormente, estos compuestos pueden desencadenar el fabismo en algunos individuos con una predisposición genética (Marquardt, 1989).

Eje embrionario

La evolución de la vicina durante la germinación, expresada en mg/g, quedó reflejada en la Figura 54, donde los altos niveles iniciales se redujeron un 80% en la var. Alameda (51-10 mg/g) y un 82% en la var. Brocal (57-10 mg/g). Sin embargo, al presentar estos resultados en mg/eje embrionario (Figura 55b y 56b), en ambas variedades pudimos observar como el bajo contenido inicial (0,4 mg) se incrementaba gradualmente a lo largo de la germinación, alcanzándose a los 9 días de ensayo valores de 2 mg. En esta misma especie, Griffiths y Ramsay (1996) analizaron el contenido de vicina durante los 17 días de ensayo, y al igual que nosotros, al expresar los resultados en mg/g detectaron reducciones del 97% (38,2-1,1 mg/g). Pero cuando los datos obtenidos por estos autores, quedaron referidos a un solo eje embrionario, el contenido inicial de 0,3 mg se incrementó hasta el 4º día de ensayo y a continuación se fue reduciendo paulatinamente.

En lo referente al comportamiento de la convicina durante el proceso germinativo, habría que destacar que expresando los resultados en mg/g, el contenido detectado inicialmente se incrementó con la germinación algo más del doble, obteniéndose a los 9 días de ensayo valores de aproximadamente 7 mg/g en ambas variedades (Figura 54). Como pudimos observar en las Figuras 55b y 56b, al referir los datos a un solo eje embrionario, los bajos niveles iniciales de este glucósido se incrementaron un 98%, alcanzándose al final de la germinación valores de 1,6 y 1,3 mg en Alameda y Brocal, respectivamente. También en *V. faba*, Griffiths y Ramsay (1996) analizaron la evolución de convicina a lo largo de la germinación, y al expresar los datos en mg/g observaron como el contenido inicial aumentaba ligeramente hasta alcanzarse los valores máximos de 2,3 mg/g el 7º día de ensayo. Cuando los resultados se presentaron en mg/eje embrionario, los niveles iniciales se incrementaron un 92% a los 17 días de ensayo (0,1-1,2 mg).

Griffiths y Ramsay (1996) también analizaron el eje embrionario de *V. narbonensis*, y al presentar los datos en mg/eje detectaron cantidades muy bajas de vicina y de convicina,

que se incrementaron durante el proceso de germinación. Por lo tanto, la evolución de estos compuestos fue semejante a la obtenida en nuestras variedades de *V. faba*.

Durante la germinación, los ejes embrionarios son muy vulnerables a organismos patógenos y la presencia de vicina y convicina es importante, al ser compuestos capaces de actuar frente a depredadores, además de presentar propiedades fungicidas y bacteriostáticas (Griffiths y Ramsay, 1992a; Ramsay y Griffiths, 1996).

Lo más representativo de los cambios producidos en el eje embrionario de las dos variedades aquí analizadas, fue el aumento en el contenido de L-DOPA a medida que transcurría la germinación, ya que los niveles iniciales de este aminoácido se incrementaron 1000 veces al final del ensayo (Figuras 55b y 56b). Diversos autores han sugerido, que el incremento de L-DOPA, podría deberse a la movilización hacia el eje embrionario de precursores necesarios para la biosíntesis de este aminoácido (Griffith y Conn, 1973; Shetty y col., 2001; Kirakosyan y col., 2004). Además, según los experimentos realizados por Wong y Lim (1992) en *V. faba*, L-DOPA se concentra principalmente en el tallo y en las hojas.

El elevado contenido en L-DOPA del eje embrionario aporta beneficios, ya que al ser un compuesto fenólico tiene propiedades antioxidantes que pueden ser utilizadas para proteger a las células de daños oxidativos durante la germinación. Este compuesto, también parece intervenir en el mecanismo de defensa frente a insectos, nematodos, hongos, etc. (Navon y Bernays, 1978; Bjerg y col., 1984b; Shetty y col., 2001; Ranhir y col., 2004).

Según las observaciones realizadas por algunos investigadores, el eje embrionario de *V. faba* contiene la suficiente cantidad de L-DOPA para ser farmacológicamente activo en pacientes con enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson, pero sin producir los efectos secundarios de la L-DOPA sintética. La utilización de esta fuente natural de L-DOPA, podría ser importante para países en vías de desarrollo, ya que su síntesis tiene un alto coste y su disponibilidad es reducida (Wong y Lim, 1992; Kemster y col., 1993; Shetty y col., 2001; Kirakosyan y col., 2004).

Semilla y plántula entera

En las semillas de Alameda y Brocal germinadas a lo largo de 9 días, el contenido de vicina y convicina permaneció constante (Figuras 55c y 56c). De acuerdo con lo sugerido por Griffiths y Ramsay (1996), esto podría deberse a la traslocación de ambos glucósidos desde los cotiledones al eje embrionario durante el periodo de germinación, proceso que podría estar produciéndose en nuestras variedades, donde podemos apreciar una disminución de la vicina y de la convicina en los cotiledones (Figuras 55a y 56a) paralela al aumento observado en el eje (Figuras 55b y 56b).

En esta misma especie, Hegazy y Marquardt (1983) obtuvieron reducciones mínimas de los glucósidos a los 10 días de ensayo: 18% de vicina (7,4-6,1 mg/g) y 14% de convicina (2,2-1,9 mg/g) y al igual que nosotros, tampoco observaron variaciones en el peso seco de las semillas y plántulas enteras a lo largo del ensayo. Por lo que estos autores, sugirieron que la germinación no era un método efectivo para eliminar vicina y convicina. A los 3 días de germinación, Khalil y Manssur (1995) lograron reducciones del 28% de vicina (6,8-4,9 mg/g) y del 30% de convicina (2,7-1,9 mg/g), y Griffiths y Ramsay (1996) obtuvieron a los 17 días porcentajes de reducción parecidos: 37% de vicina (3,8 mg/semilla-2,4 mg/plántula) y 25% de convicina (0,8 mg/semilla-0,6 mg/plántula), sin variaciones en el peso seco. Jamalian (1999) obtuvo a los 7 días, reducciones muy superiores a las obtenidas por los otros autores: 84% de vicina (3,2-0,5 mg/g) y 100% de convicina (0,3-0,0 mg/g) y por el contrario, el peso seco se incrementó con el transcurso de la germinación. Según este investigador, el descenso de los glucósidos pudo deberse al efecto de dilución producido como resultado del aumento del peso seco, o posiblemente debido a la síntesis de las β -glucosidasas encargadas de hidrolizar estos compuestos. En otra especie de *Vicia*, *V. narbonensis*, el bajo contenido inicial de ambos glucósidos mostró oscilaciones durante los 17 días de germinación (Griffiths y Ramsay, 1996).

En relación con el contenido de L-DOPA, el aumento producido en el eje embrionario quedó reflejado en la plántula entera (Figuras 55 y 56). Los bajos niveles iniciales de este compuesto fenólico fueron incrementándose gradualmente a lo largo de la germinación, alcanzándose a los 9 días valores de aproximadamente 19 mg/g en la plántula entera de ambas variedades. Kirakosyan y col. (2004) observaron inicialmente en sus cultivares de *V. faba*, cantidades también pequeñas de L-DOPA, pero a los 10 días de germinación obtuvieron valores de hasta 40 mg/g en esas plántulas enteras. Siendo importante destacar, que los cultivares con mayores cantidades de L-DOPA inicialmente, fueron los que alcanzaron las concentraciones más elevadas de este aminoácido al final de la germinación. Sin embargo, en leguminosas con un elevado contenido inicial en L-DOPA, como *M. pruriens*, la evolución de este compuesto fue muy diferente a la observada en *V. faba*, ya que su contenido fue reduciéndose gradualmente a lo largo de la germinación (Prakash y Tewari, 1999; Siddhuraju y Becker, 2001b; Wanjekeche y col., 2003). Las plántulas enteras de *V. faba*, podrían utilizarse para tratar el Parkinson y a su vez nutrir al individuo, ya que los cotiledones son una fuente rica en proteína y los ejes embrionarios presentan un elevado contenido en L-DOPA. Por tanto, según los estudios realizados por diversos autores, los alimentos ricos en proteína, que interfieren con la absorción y transporte de la L-DOPA sintética administrada por vía oral, podrían ser sustituidos por brotes de haba (Kempster y col., 1993; Shetty y col., 2001; Randhir y col., 2002).

3.3. INOSITOLES FOSFATO

Los inositoles fosfato presentes en las leguminosas, se analizan frecuentemente por cromatografía líquida de alta resolución (CLAR). Previamente es necesario extraer los analitos de la muestra, purificar el extracto y separar cada uno de los inositoles individualmente, para proceder posteriormente a su detección y cuantificación. El solvente de extracción utilizado generalmente es ácido clorhídrico 0,5 M y las columnas de intercambio aniónico son idóneas para eliminar el fósforo inorgánico y concentrar los inositoles fosfato. Un sistema empleado habitualmente para la separación de estos compuestos es la cromatografía en fase reversa, que debe ser compatible con la técnica utilizada para su detección y cuantificación, como es el índice de refracción, muy apropiado para compuestos que no absorben luz visible ni ultravioleta (Sandberg y col., 1989; Lehrfeld, 1994; Burbano y col., 1995a).

En el presente estudio, los inositoles tri-, tetra-, penta- y hexafosfato se valoraron por CLAR de par iónico en fase reversa siguiendo la metodología de Lehrfeld (1994) y Burbano y col. (1995a), ya que es sencilla, rápida y efectiva. Con el reactivo de par iónico, se aumentó el tiempo de retención de los inositoles fosfato en la columna cromatográfica, permitiendo una mejor separación de cada uno de ellos.

La principal ventaja del método analítico aquí utilizado, fue la posibilidad de cuantificar independientemente el ácido fítico y sus derivados parcialmente desfosforilados. Esto es de gran importancia desde el punto de vista nutricional, ya que únicamente los inositoles fosfato altamente fosforilados (IP6, IP5) afectan negativamente a la biodisponibilidad de minerales, mientras que los menos fosforilados (IP4, IP3, IP2, IP1) tienen una escasa capacidad de unión a cationes, y forman complejos más solubles (Lönnerdal y col., 1989; Sandström y Sandberg, 1992; Sandberg y col., 1993, 1999). Además, es importante diferenciar al ácido fítico de sus homólogos parcialmente desfosforilados, por las propiedades beneficiosas para la salud de cada uno de ellos (Vallejo y col., 1987; Zhou y Erdman, 1995; Steer y Gibson, 2002; Konietzny y Greiner, 2003). También, el poder cuantificar individualmente el ácido fítico (IP6) y cada uno de los productos de su hidrólisis, es particularmente útil para estudiar las transformaciones que se producen por acción de las fitasas, tanto endógenas como exógenas, así como por algún tipo de procesado: germinación, fermentación, cocción, etc. (Skoglund y col., 1997; Greiner y Konietzny, 1998; Egli y col., 2002).

Inositoles fosfato en semillas sin germinar

—

Semilla entera

Durante el proceso de maduración de la semilla, el ácido fítico (IP6) se sintetiza en el citoplasma y se transporta a los cuerpos proteicos, donde se almacena en forma de sales de K^+ , Mg^{2+} o Ca^{2+} (Cosgrove, 1980; Griffiths, 1984a; Honke y col., 1998; Brinch-Pedersen y col., 2002). Este compuesto constituye la principal forma de reserva de fosfato inorgánico y *mio*-inositol de la semilla, y concretamente en habas entre un 40-60% del fósforo total se encuentra en forma de IP6 (Griffiths y Jones, 1977; Reddy y col., 1982).

En la var. Alameda analizada en este trabajo, se detectaron por CLAR cantidades totales de inositoles fosfato de 8,6 mg/g, significativamente superiores a las de la var. Brocal (6,5 mg/g). En ambas variedades, el 65% de los inositoles fosfato se encontró en forma de IP6, en menor proporción fue detectado IP5 (25%) y además se obtuvieron cantidades pequeñas de IP4 y de IP3 (Tabla 17). Utilizando una metodología similar, Burbano y col. (1995a) obtuvieron en estas mismas variedades un porcentaje de IP6 (69% en Alameda y 76% en Brocal) ligeramente superior al obtenido en nuestro estudio, y cantidades de cada uno de los inositoles fosfato similares a las nuestras. En otras variedades de *V. faba*, Honke y col. (1998) obtuvieron valores de IP6 de 12 mg/g, representando este compuesto el 99% de los inositoles fosfato totales, mientras que El-Moniem y col. (2000) detectaron 3 mg/g, en una proporción del 97%. En otras leguminosas, donde los inositoles fosfato se analizaron también por CLAR, se observaron variaciones entre especies, entre variedades de una misma especie, incluso dentro una misma variedad. Por ejemplo en guisante, se detectaron valores de IP6 de 2-11 mg/g, en judía de 5-11 mg/g y en lenteja de 2-6 mg/g, y en estas especies la proporción de IP6 frente al total de inositoles fosfato fue del 72-95%. En garbanzo se obtuvieron 4 mg/g de IP6 (78%), en *L. albus* 3 mg/g (100%), en *L. luteus* 7-15 mg/g (92-99%) y en soja 15 mg/g (87%) (Burbano y col., 1995a; Morris y Hill, 1996; Ayet y col., 1997; Greiner y Konietzny, 1998; Honke y col., 1998; Muzquiz y col., 1999; El-Moniem y col., 2000; Fredrikson y col., 2001; Vidal-Valverde y col., 2002, 2003).

También es importante hacer mención al método de cromatografía en columna de intercambio aniónico de Harland y Oberleas (1977) y a los procedimientos analíticos basados en la precipitación del hierro, ya que han sido ampliamente utilizados por numerosos investigadores para la detección de inositoles fosfato en semillas de diferentes leguminosas, a pesar de que con ellos no puede diferenciarse al ácido fítico de sus derivados menos fosforilados. Con estos métodos, se detectaron en haba valores de inositoles fosfato en un rango de entre 8-17 mg/g (Griffiths y Thomas, 1981; Eskin y Wiebe, 1983; Fernández y col., 1997; Vidal-Valverde y col., 1998; Butrón, 2002; Saharan y col., 2002). En otras leguminosa también se obtuvieron cantidades totales de inositoles fosfato muy distintas, así pues, en soja se detectaron 2-9 mg/g, en guisante 8-9 mg/g, en lenteja 7-12 mg/g, en judía 5-16 mg/g

–
y en garbanzo 13 mg/g (Lolas y Markakis, 1975; Tabekhia y Luh, 1980; Abdullah y col., 1984; Beal y Mehta, 1985; Carnovale y col., 1988; Sattar y col., 1990; Kyriakidis y col., 1998; Urbano y col., 1999).

Una vez mostrado el contenido de inositoles fosfato en haba y otras leguminosas, vemos que existe una gran variabilidad de resultados. Parte de los problemas que nos encontramos al comparar los datos obtenidos por los diferentes autores, se deben a la utilización de procedimientos analíticos muy diversos para su determinación. Los métodos que permiten la separación y cuantificación de cada inositol fosfato individualmente parecen ser los más adecuados. Así pues, con los análisis realizados por CLAR en nuestras variedades de haba y por los diferentes autores en otras semillas maduras de leguminosas, queda demostrado que el IP6 siempre está presente, siendo además el inositol fosfato mayoritario. Aunque, su concentración y su proporción frente a los inositoles fosfato menos fosforilados puede ser distinta entre variedades de una misma especie, debido a las diferencias genéticas existentes. Incluso dentro de una misma variedad, se ha comprobado como puede variar el contenido de IP6, dependiendo de las condiciones climatológicas y del terreno utilizado para el desarrollo de las semillas (Griffiths y Thomas, 1981; Muzquiz y col., 1999; Fredrikson y col., 2001; García-López y col., 2004).

Partes constituyentes de la semilla

En relación con el contenido de cada uno de los inositoles fosfato presentes en las diferentes partes de la semilla, en la Tabla 17 pudimos observar que tanto los cotiledones como el eje embrionario de las dos variedades de haba aquí analizadas, contenían cantidades semejantes de IP6. En menor proporción se encontró IP5, con niveles en los cotiledones superiores a los del eje, y el contenido de IP4 y de IP3 fue muy bajo en ambas partes. En la cascarilla únicamente se detectaron pequeñas cantidades de IP5.

En cuanto al contenido total de inositoles fosfato, en esta misma tabla se mostraron valores para los cotiledones de 9,4 mg/g en Alameda y de 7,0 mg/g en Brocal. En el eje embrionario se obtuvieron cantidades ligeramente inferiores a las de los cotiledones y en la cascarilla fue detectado un contenido mínimo de estos compuestos. El-Tabey Shehata y col. (1983) y Carnovale y col. (1988) detectaron en los cotiledones de *V. faba* cantidades de inositoles fosfato de 3-10 mg/g, mientras que los valores de la cascarilla fueron muy inferiores: 0,3-0,8 mg/g.

Beal y Mehta (1985) y Fredrikson y col. (2001) analizaron inositoles fosfato en las diferentes partes de la semilla de guisante, y en el eje detectaron cantidades de estos compuestos (11-12 mg/g) 1,5 veces superiores a las de los cotiledones (7-8 mg/g), y en la

—

cascarilla obtuvieron valores de 0,1 mg/g. Como podemos observar, la distribución de los inositoles fosfato detectada por estos autores en sus variedades de guisante, fue diferente a la de las variedades de haba analizadas en el presente trabajo. Por lo tanto, esto nos indica que la distribución de los inositoles fosfato varía según la especie.

Evolución de los inositoles fosfato durante la germinación

Cotiledones

Para poder interpretar adecuadamente los cambios que se van produciendo a lo largo del proceso de germinación, es importante señalar que el ácido fítico va siendo desfosforilado enzimáticamente por acción de las fitasas endógenas, que se incrementan al ser sintetizadas *de novo* (Bianchetti y Sartirana, 1967) o al activarse las preexistentes (Eastwood y Laidman, 1971), obteniéndose así *mio*-inositol penta-, tetra-, tri-, di- y monofosfato, además de fosfato inorgánico y *mio*-inositol demandados por la plántula en desarrollo (Crans y col., 1995; Loewus y Murthy, 2000; Greiner y col., 2002). También debemos mencionar el papel del ácido giberélico como inductor de la secreción de las fitasas, aunque no estimule su síntesis (Srivastava, 1964; Gabard y Jones, 1986). Mientras que por el contrario, el fosfato inorgánico parece inhibir estas enzimas o impedir su síntesis al inicio de la germinación (Sartirana y Bianchetti, 1967; Mandal y col., 1972; Walker, 1974; Gibson y Ullah, 1990).

En la Figura 58, donde los resultados se presentaron en mg/g, el contenido total de inositoles fosfato se redujo a los 9 días de germinación un 14% en la var. Alameda y un 8% en la var. Brocal. En la bibliografía consultada, pudimos observar como en los cotiledones de guisante se alcanzaban a los 10 días de ensayo reducciones del 75% y con periodos de incubación más cortos (2-3 días), el contenido de estos compuestos se reducía un 39% en soja y *P. aureus*, un 41% en *P. mungo*, un 64% en garbanzo y un 66% en *C. cajan* (Beal y Metha, 1985; Chitra y col., 1996). Los distintos porcentajes de reducción obtenidos en nuestras habas y en las otras leguminosas, probablemente estén relacionados con el diferente mecanismo de degradación del ácido fítico en cada especie, y por tanto con la distinta actividad de las fitasas endógenas (Lolas y Markakis, 1977; Chen y Pan, 1977; Beal y Metha, 1985; Kyriakidis y col., 1998).

Cuando los datos se expresaron en mg/par de cotiledones, como se muestra en las Figuras 60a y 61a, pudimos observar como el contenido inicial de los inositoles fosfato totales se reducía un 43% al final del ensayo. En otros trabajos de investigación también se presentaron los resultados referidos a un par de cotiledones, y así por ejemplo en judía, Crans y col. (1995) detectaron a los 6 días reducciones del 60% y Walker y col. (1974)

lograron a los 10 días reducciones superiores (90%). En los cotiledones de guisante, Guardiola y Sutcliffe (1971) detectaron a los 15 días de germinación una reducción de inositoles fosfato próxima al 100%. Según estos investigadores, el comportamiento observado en los cotiledones de judía y guisante fue debido a la desfosforilación enzimática de los inositoles fosfato por la acción de las fitasas endógenas, que se incrementaron gradualmente durante la germinación. Además, los experimentos realizados por estos autores, indicaron que el fosfato inorgánico liberado tras la hidrólisis de los inositoles fosfato en los cotiledones, había sido transferido al eje embrionario para ser utilizado en su desarrollo y transformación en una plántula.

En este estudio se analizaron individualmente cada uno de los inositoles fosfato, de manera que en las Figuras 60a y 61a pudimos observar como el contenido inicial de IP6, IP5, IP4 e IP3 iba descendiendo a lo largo de la germinación. La reducción del IP6 (28%) y del IP5 (72%) obtenida en ambas variedades, podría estar relacionada con su degradación por actuación de las fitasas endógenas (Greiner y col., 2001). Pero también hay que hacer mención a los productos de su hidrólisis: el IP3 y el IP4, que no se acumularon, sino que a su vez se redujeron, quizá por su rápida desfosforilación a *mio*-inositol y fosfato inorgánico necesarios para el desarrollo del eje embrionario (Crans y col., 1995; Loewus y Murthy, 2000).

Eje embrionario

En nuestras variedades de haba, se observó durante el proceso germinativo un rápido descenso de los inositoles fosfato totales hasta el 6º día de ensayo, no mostrándose variaciones posteriormente (Figura 59). Este comportamiento fue muy parecido al apreciado por Crans y col. (1995) en el eje embrionario de judía, donde estos compuestos se redujeron rápidamente hasta el 4º día de germinación, detectándose tras ese tiempo un contenido mínimo.

Como pudimos observar en las Figuras 60b y 61b, al referir los resultados a un solo eje embrionario, el contenido de inositoles fosfato fue muy pequeño a lo largo de toda la germinación. En ambas variedades, se produjo un descenso de estos compuestos coincidiendo con la emergencia de la radícula (2º día). A continuación, en la var. Alameda se observó un incremento gradual de los mismos, duplicándose el contenido inicial al final del ensayo, mientras que en la var. Brocal se alcanzaron valores máximos al 4º día, que posteriormente mostraron variaciones. Crans y col. (1995), que también presentaron los resultados de judía en mg/eje embrionario, detectaron cantidades pequeñas de inositoles fosfato durante los 6 días de ensayo. La degradación de estos compuestos se produjo con la aparición de la radícula (1^{er} día) y a partir del 2º día, se observó un incremento gradual de

los mismos, alcanzándose al final de la germinación niveles del doble a los detectados inicialmente. Según estos autores, el aumento podría deberse a la síntesis en el propio eje embrionario de IP6, ya que este compuesto no puede ser transportado intercelularmente y no sería posible la translocación de los cotiledones al eje. Por lo tanto, el fósforo inorgánico liberado en los cotiledones, se transportaría al eje embrionario para la posterior síntesis de IP6.

Continuando con las investigaciones realizadas en judía por Crans y col. (1995), el IP6 podría intervenir en algún proceso durante el desarrollo del eje embrionario, ya que inicialmente este compuesto se localizó en las vacuolas, y a los 3 días de germinación fue encontrado en el citoplasma. Por lo tanto, podría haberse trasladado al citoplasma de las células del eje, para desempeñar su función de quelar metales iónicos. Así por ejemplo, con su unión al Fe^{2+} podría evitar la formación de radicales libres causantes de daños oxidativos.

Semilla y plántula entera

En la semilla y en la plántula entera de las dos variedades analizadas en este estudio, el contenido y el comportamiento a lo largo de la germinación de cada uno de los inositoles fosfato fue prácticamente igual al de los cotiledones, ya que los niveles detectados en el eje embrionario y en la cascarilla fueron muy bajos (Figuras 60 y 61). En esta misma especie, Honke y col. (1998) detectaron a los 8 días de ensayo reducciones en el contenido de IP6 del 78% y de IP5 del 100%. Pero al contrario que en nuestras variedades, estos autores observaron un aumento del IP3 y del IP4, probablemente debido a su acumulación temporal tras la hidrólisis enzimática del IP6.

Como se refleja en las Figuras 60c y 61c, el contenido total de inositoles fosfato se redujo a los 9 días de germinación un 43% en ambas variedades de haba. En esta misma especie y en unas condiciones de germinación muy parecidas a las del presente estudio, Eskin y Wiebe (1983) y Kyriakidis y col. (1998) redujeron a los 10 días el 71-83% de estos compuestos. En ambos trabajos, el descenso en el contenido de los inositoles fosfato fue acompañado del incremento de la actividad fitásica. Con ensayos de germinación muy diferentes, otros autores obtuvieron reducciones del 45-69% (Sharma y Sehgal, 1992; Khalil y Manssur, 1995; Vidal-Valverde y col., 1998; Alonso y col., 2000; Saharan y col., 2002).

Por la revisión bibliográfica conocemos que el proceso de germinación no sólo es efectivo para la reducción de los inositoles fosfato en haba, sino también para muchas otras

leguminosas. Durante periodos de tiempo cortos, de hasta 3 días, se obtuvieron resultados muy distintos. En garbanzo, los inositoles se redujeron un 10%, en soja un 11-31%, en lenteja un 23-40%, en judía un 30%, en *L. albus* un 62% y en *L. luteus* un 78% (Abdullah y col., 1984; Ologhobo y Fetuga, 1984; El-Mahdy y col., 1985; Reddy y col., 1989; De La Cuadra y col., 1994; Alonso y col., 2000; Egli y col., 2002). Para autores como Egli y col. (2002), un periodo de 3 días no fue suficiente para reducir el contenido en inositoles fosfato de leguminosas como garbanzo, judía, guisante o *L. albus*, a pesar de que en todas ellas la actividad fitásica se incrementó ligeramente. Por lo que concluyeron que no existía una relación directa entre la actividad enzimática y el contenido en ácido fítico de la semilla.

Con tiempos de germinación que se podrían considerar intermedios, de 4 a 6 días, se consiguieron reducciones importantes en algunas leguminosas. Por ejemplo en soja, los inositoles fosfato se redujeron un 36-74%, en lenteja un 53-82%, en guisante un 48%, en judía un 40-58% y en garbanzo un 40%, y paralelamente fue incrementándose la actividad fitásica (Chen y Pan, 1977; Tabekhia y Luh, 1980; Sathe y col., 1983; El-Mahdy y col., 1985; Reddy y col., 1989; Sattar y col., 1990a; Gorospe y col., 1992; Ayet y col., 1997; Greiner y col., 1998; Vidal-Valverde y col., 2001). Sin embargo, en judía y garbanzo Greiner y col. (1998) no observaron reducciones de los inositoles fosfato, a pesar de detectar un pequeño aumento en la actividad fitásica.

Durante periodos de germinación de entre 7 y 10 días se redujo de guisante, lenteja y garbanzo aproximadamente un 75% de los inositoles fosfato y de judía y *L. luteus* un 42%. En todas ellas, se consiguió a su vez un incremento importante de la actividad de las fitasas, obteniéndose por tanto, una buena correlación entre la actividad de estas enzimas y la hidrólisis del ácido fítico durante la germinación (Lolas y Markakis, 1977; Beal y Metha, 1985; Honke y col., 1998; Kyriakidis y col., 1998).

Una vez presentados todos estos datos, se podría concluir que la germinación como técnica de procesado es eficaz en la reducción de los inositoles fosfato del haba y de otras leguminosas. En algunos de estos trabajos, a medida que los tiempos de germinación se alargaban, se fue observando una mayor reducción de los inositoles fosfato, aunque hay otros factores que intervienen en el proceso germinativo como son: luz, sustrato, temperatura, humedad, etc., así como la especie o incluso la variedad utilizada.

También es importante señalar, que con la germinación logramos incrementar el valor nutritivo de las semillas, ya que con la hidrólisis del ácido fítico se libera el fósforo de la molécula que podrá ser absorbido por el individuo, y aumenta la biodisponibilidad de minerales que se encontraban ligados a este IP6 formando sales. Además, la digestión y absorción de proteína es mayor, ya que al reducirse el contenido en IP6 de la semilla, no

accede al organismo este compuesto capaz de formar complejos con enzimas proteolíticas y otras proteínas (Tabekhia y Luh, 1980; Ologhobo y Fetuga, 1984; Gorospe y col., 1992; Das y col., 1999; Vidal-Valverde, 2002).

Por otra parte, las fitasas de las legumbres germinadas podrían utilizarse en aplicaciones biotecnológicas para reducir el contenido en ácido fítico presente en otros alimentos. Estas enzimas podrían ser importantes como alternativa a las fitasas de cereales o a las fitasas microbianas, ya que principalmente estas últimas, producen más reacciones alérgicas y son peor aceptadas por el consumidor (Kyriakidis y col., 1998). En trabajos como los de Greiner y col. (2001) han sido purificadas fitasas de semillas de *V. faba* var. Alameda germinadas durante 4 días (momento en el que estas enzimas alcanza su máxima actividad), con vistas a ser utilizadas en la mejora de la calidad nutritiva de otros productos.

3.4. TANINOS CONDENSADOS O PROANTOCIANIDINAS

Las habas, igual que otras muchas leguminosas, contienen taninos condensados, que son polímeros estructuralmente muy variados, de un elevado peso molecular y con un gran número de grupos hidroxilo y otros grupos funcionales con los que se unen a proteínas y otras macromoléculas. Por todo ello, sus propiedades físicoquímicas (polaridad, estabilidad térmica, peso molecular, ...) son muy distintas, siendo complicado elegir la técnica más apropiada para su análisis (Chung y col., 1998; Scalbert y col., 2000; Stobiecki y Makkar, 2004).

El método utilizado en este trabajo para analizar taninos condensados en los cotiledones y en la cascarilla de *V. faba*, fue el de Porter y col. (1986). Es un procedimiento basado en la despolimerización oxidativa de las proantocianidinas mediante calor en medio ácido, con la posterior determinación colorimétrica a 550 nm de las antocianidinas liberadas. Este método es sencillo y específico de proantocianidinas, ya que los flavan-3-oles monoméricos y otros fenoles no producen esos pigmentos. Como son moléculas muy complejas y heterogéneas, la forma más adecuada de valorarlos sería con un patrón interno de proantocianidinas extraídas de la propia muestra vegetal (Santos-Buelga y Scalbert, 2000). Pero en este trabajo, las proantocianidinas de *V. faba* se valoraron con un patrón externo de cianidina, ya que obtener el patrón interno a partir de este material vegetal, es un proceso costoso y laborioso.

Durante el proceso de maduración de la semilla, los taninos condensados de los cotiledones disminuyen, mientras que en la cascarilla aumentan debido a la polimerización

de compuestos fenólicos ya existentes. Según los estudios realizados por algunos autores, la mayor parte de estos compuestos se encuentran en la cascarilla de las semillas maduras y secas de *V. faba* (Griffiths, 1981; Sjödin y col., 1981; Ndzondzi-Bokouango y col., 1989; Troszynska y col., 1993; Bekkara y col., 1998; Alonso y col., 2000; Borowska y col., 2003; Chavan y col., 2003) y coincidiendo con estos resultados, habría que indicar que en los cotiledones de las variedades analizadas en nuestro estudio no se detectaron proantocianidinas, sin embargo en la cascarilla de la var. Alameda se obtuvieron 6 mg/g de estos compuestos y en la cascarilla de la var. Brocal 7 mg/g (Tabla 21). En la bibliografía consultada, se han encontrado datos de taninos condensados en habas, pero es difícil realizar comparaciones con los datos obtenidos en este trabajo, ya que los patrones utilizados para su valoración fueron muy diferentes, y en ningún caso los resultados se expresaron en equivalentes de cianidina (despolimerización oxidativa), sino en equivalentes de ácido gálico (ensayo de Folin), ácido tánico (complejos con proteínas) o catequina (ensayo de la vainillina ácida).

La presencia de taninos condensados en la cascarilla es beneficioso para la semilla, ya que debido a la capacidad de estos compuestos para inhibir enzimas, pueden actuar frente al ataque de bacterias, virus y hongos (Deshpande y col., 1985; Butler, 1989; Shirley, 1996). Además, gracias a su propiedad astringente, su presencia en las semillas hace que los animales rechacen su consumo (Salunkhe y col., 1982; Wang y col., 1998b).

El descascarillado, es una técnica de procesado utilizada frecuentemente para reducir los taninos condensados de las leguminosas, porque como acabamos de señalar, la mayor parte de estos compuestos están localizados en la cascarilla. Con esta práctica, logramos a su vez, incrementar la digestibilidad de la proteína y por tanto la calidad nutritiva de la semilla (Eggum, 1980; Deshpande y col., 1982; Chang y col., 1994; Alonso y col., 2000; Dueñas y col., 2003). Concretamente en haba, el contenido de proantocianidinas se redujo con el descascarillado un 92%, en judía un 68-94%, en garbanzo un 87%, en *Vigna unguiculata* un 96%, en *C. cajan* un 95% y en *P. aureus* un 93% (Deshpande y col., 1982; Narasinga Rao y Prabhavathi, 1982; Chang col., 1994; Alonso y col., 2000). En otras ocasiones, también se ha utilizado la germinación para reducir los taninos condensados, ya que estos compuestos parecen hidrolizarse por enzimas que se activan durante este proceso. De hecho, algunos autores han obtenido con la germinación reducciones en haba del 29-60%, en judía del 72% (Khalil y Mansour, 1995; Alonso y col., 2000), en *Phaseolus angularis* y *Phaseolus calcaratus* del 64% (Chau y Cheung, 1997) y en garbanzo del 49-64% (Narasinga Rao y Prabhavathi, 1982; Rao y Deosthale, 1982). La reducción de proantocianidinas de las semillas de leguminosas, también puede llevarse a cabo por mejora genética, sin embargo, se ha comprobado que al ser compuestos con un papel protector

frente al ataque de depredadores, su eliminación hace a los cultivos más susceptibles a enfermedades y plagas (Butler, 1989; Wang y col., 1998b).

3.5. INHIBIDORES DE TRIPSINA

La mayoría de los métodos utilizados para determinar la actividad de los inhibidores de tripsina, se han basado en el desarrollado por Kakade y col. (1974). La precisión y sensibilidad de este método es baja, por lo que han sido descritas muchas modificaciones a lo largo de los años, principalmente en cuanto al proceso de extracción, que generalmente se realizaba en medio básico (Marquardt y col., 1975, Sjödin y col., 1981). Actualmente suelen utilizarse condiciones ácidas para este fin (Wang y col., 1998a; Welham y Domoney, 2000), ya que se ha comprobado que es un medio más selectivo a la hora de extraer los inhibidores de tripsina de la fracción de albúmina, con lo que se evita una sobreestimación de los mismos. De hecho, se reduce la extracción de otros compuestos, como pueden ser otras proteínas o incluso taninos condensados, que compiten por su unión a la tripsina (Sjödin y col., 1981; Schulze y col., 1993; Carvalho y Sgarbieri, 1997). Concretamente, autores como Wilson y col. (1972) o Bhatti (1977), que detectaron en los cotiledones de *V. faba* una actividad inhibitoria muy superior a la de la cascarilla, utilizaron un medio ácido para la extracción de los inhibidores de tripsina. Sin embargo, otros investigadores como Marquardt y col. (1975), Sjödin y col. (1981) o Troszynska y col. (1993) utilizando unas condiciones básicas, obtuvieron una actividad antitripsina en la cascarilla superior a la de los cotiledones. La elevada actividad inhibitoria que detectaron estos autores en la cascarilla de *V. faba*, fue debida a la extracción de taninos condensados junto a inhibidores de tripsina. Los taninos presentes en la cascarilla, poseen una gran afinidad por enzimas digestivas como la tripsina y provocan una inhibición no-competitiva que lleva a la formación de complejos reversibles tanino-tripsina. Por lo tanto, esta actividad antitripsina de la cascarilla no procede de los inhibidores de tripsina, sino de los taninos (Griffiths y Moseley, 1980; Griffiths, 1979, 1981; Sjödin y col., 1981). Estos hechos fueron corroborados por Valdebouze y col. (1980), ya que inicialmente obtuvieron en la cascarilla valores de 25 UIT/mg, pero una vez añadido al medio de extracción polivinilpirrolidona (reactivo que forma complejos con taninos) evitaron las interferencias con los taninos, con lo cual, ya no fue detectada actividad antitripsina.

El método elegido en esta Memoria para determinar la actividad de los inhibidores de tripsina, fue el desarrollado por Welham y Domoney (2000). Es un procedimiento analítico en el que se realizaron importantes modificaciones respecto al método original de Kakade, como es la utilización de un medio ácido de extracción, además de otros cambios necesarios para la adecuada valoración de la actividad antitripsina.

Inhibidores de tripsina en semillas sin germinar

Por diferentes estudios, se tiene conocimiento de que a lo largo del desarrollo de la semilla el contenido de inhibidores de tripsina se va incrementando tanto en los cotiledones como en el eje embrionario, alcanzándose los niveles máximos durante el periodo de desecación. Los inhibidores acumulados en la semilla madura y seca parecen proporcionar estabilidad a las proteínas, pudiendo así intervenir en la adquisición de tolerancia a la desecación (Kute y col., 1984; Giri y col., 1998; Welham y col., 1998; Lam y col., 1999). Además, el elevado contenido en cisteína que estos compuestos presentan en su estructura, podría ser utilizado por la semilla como fuente de aminoácidos azufrados (Pusztai, 1972).

Como pudimos observar en la Tabla 22, en las semillas maduras de las variedades Alameda y Brocal se detectaron actividades de los inhibidores de tripsina de 7 UIT/mg muestra. En esta misma especie, Hernández-Infante y col. (1998) y Elsheikh y col. (2000) detectaron valores semejantes a los del presente estudio, pero otros autores obtuvieron niveles inferiores: 3-6 UIT/mg (Ndzondzi-Bokouango y col., 1989; Fernández y col., 1993; Periago y col., 1997; Vidal-Valverde, 1997; Alonso y col., 2000; Borowska y col., 2003). Griffiths (1984b) detectó actividades muy bajas en cinco variedades de *V. faba*, con un intervalo de variación de 1,41-1,54 UIT/mg. En otra especie del género *Vicia*, *V. sativa*, se detectaron valores de 6 UIT/mg, similares a los obtenidos en nuestras habas, y en otras leguminosas se obtuvo un amplio rango de variabilidad: en guisante se detectaron 0,2-8 UIT/mg, en judía 3-31 UIT/mg, en garbanzo 8-18 UIT/mg y en lenteja 2-5 UIT/mg (Griffiths, 1984b; Frías y col., 1995; Periago y col., 1997; Hernández-Infante y col., 1998; Wang y col., 1998a; Alonso y col., 1998, 2000; Pisulewska y Pisulewski, 2000). En guisante, Wang y col. (1998a) observaron que la actividad de los inhibidores de tripsina variaba significativamente por causa del genotipo y las condiciones medioambientales, y en esta misma leguminosa, Valdebouze y col. (1980) comprobaron que la actividad inhibitoria de los cultivares de invierno era del doble que la de los cultivares de verano. Saini y col. (1992), observaron en garbanzo, que la actividad antitripsina variaba con la localización geográfica e incluso con el año de recolección de la semilla. Los niveles detectados en diferentes especies de *Lupinus* presentaron un rango de variación comprendido entre 1-12 UIT/mg (Periago y col., 1997; Ruiz-López y col., 2000). En *Lathyrus sativus* (17-29 UIT/mg) y soja (21-75 UIT/mg) se obtuvieron actividades superiores a las de otras leguminosas (Abdullah y col., 1984; Hernández-Infante y col., 1998; Wang y col., 1998a; Pisulewska y Pisulewski, 2000). Los experimentos realizados por Pisulewska y Pisulewski (2000) en distintas leguminosas, señalan que, según la técnica de recolección utilizada, los niveles de actividad inhibitoria varían.

En relación con la distribución de los inhibidores de tripsina en la semilla, en la Tabla 22 pudimos observar expresando los datos en UIT por mg de muestra, que la actividad antitripsina de la semilla entera (7 UIT/mg) y de los cotiledones (8 UIT/mg) era 4 veces inferior a la del eje embrionario (28 UIT/mg en la var. Alameda y 38 UIT/mg en la var. Brocal). De forma similar, Welham y col. (1998) detectaron en los cotiledones de guisante (6 UIT/mg) valores 3 veces menores que los del eje embrionario (19 UIT/mg). En esta misma tabla, también se presentaron los resultados en UIT por mg de proteína, de manera que, en la semilla entera de las dos variedades analizadas, se obtuvieron 44 UIT/mg proteína y en los cotiledones se detectaron valores ligeramente inferiores, mientras que en el eje se obtuvieron actividades 3 veces superiores a las detectadas en la semilla entera y en los cotiledones. Rani y Hira (1993) analizaron inhibidores de tripsina en esta misma especie y obtuvieron datos muy parecidos: 40 UIT/mg proteína en la semilla entera y 32 UIT/mg proteína en los cotiledones. Sin embargo, Borowska y col. (2003) detectaron actividades de entre 12-16 UIT/mg proteína en cuatro variedades distintas de *V. faba*; valores mucho más bajos que los obtenidos en las anteriores variedades mencionadas. Por el contrario, al mostrar los resultados en UIT por parte constituyente de la semilla, la actividad inhibitoria de la semilla entera y de los cotiledones fue 25 veces superior a la del eje embrionario, ya que este último representa únicamente el 1% del peso total de la semilla.

Evolución de los inhibidores de tripsina a lo largo de la germinación

Cotiledones

La actividad de los inhibidores de tripsina expresada tanto en UIT/mg muestra como en UIT/mg proteína, se incrementó con la germinación (Tabla 23). Sin embargo, Rahma y col. (1987) detectaron en esta misma especie una reducción del 15% a las 48 h (7,9-6,7 UIT/mg proteína) y posteriormente estos valores se mantuvieron prácticamente constantes. En los cotiledones de judía, Nielsen y Liener (1988) analizaron la actividad de los inhibidores a lo largo de 10 días de germinación, y observaron reducciones a partir del 9º día de ensayo. Kamalakannan y col. (1981) analizaron los cotiledones de *Vigna mungo*, donde la actividad antitripsina fue descendiendo a lo largo de 6 días de germinación. Según estos investigadores, el comportamiento observado podría deberse a la hidrólisis de las proteínas acumuladas en los cotiledones, necesarias para el desarrollo del eje embrionario.

En las Figuras 64a y 65a, se mostró la evolución de la actividad de los inhibidores de tripsina a lo largo de la germinación expresada en UIT/par de cotiledones, detectándose una ligera subida de actividad a las 24 h de ensayo en ambas variedades. Estos resultados, fueron parecidos a los obtenidos por Carasco y Xavier-Filho (1982) en los cotiledones de *Vigna unguiculata*, ya que se alcanzó un contenido máximo de inhibidores de tripsina a las

24 h de ensayo. Según los estudios realizados por estos autores, el incremento de los inhibidores en los cotiledones, no estaba directamente relacionado con el comienzo de la germinación, porque el desarrollo del eje embrionario no se vio afectado por las variaciones de actividad inhibitoria. Nielsen y Liener (1988) detectaron en los cotiledones de judía un descenso de la actividad de los inhibidores de tripsina a partir el 5º día de ensayo; evolución diferente a la observada en el presente estudio.

Una vez descrito el comportamiento de los inhibidores de tripsina en las dos variedades en estudio, es importante destacar su constante presencia en los cotiledones a lo largo del proceso de germinación, ya que podría estar relacionada con una función de protección frente al ataque de microorganismos e insectos (Liener y Kakade, 1980; Pusztaí y col., 2004).

Eje embrionario

Como pudimos apreciar en la Tabla 24, donde los datos se expresaron en UIT/mg muestra y en UIT/mg proteína, la actividad inhibitoria del eje embrionario fue disminuyendo gradualmente a lo largo de la germinación. Cuando los resultados se presentaron en UIT/eje embrionario, también se obtuvieron reducciones (Figuras 64b y 65b). Este comportamiento, podría estar relacionado con la activación de proteasas endógenas durante la germinación, que hidrolizarían los inhibidores de tripsina de origen proteico para ser utilizados en el desarrollo del eje embrionario (Savelkoul y col., 1992). La evolución observada en el eje embrionario de otras especies fue diferente. Así por ejemplo, Kamalakannan y col. (1981) detectaron en el eje de *V. mungo* un ligero incremento de la actividad de los inhibidores a lo largo de 6 días de ensayo, y Nielsen y Liener (1988) no detectaron actividad antitripsina en el eje de judía durante los 10 días de germinación.

Semilla y plántula entera

La germinación, es un técnica de procesado utilizada frecuentemente para reducir factores no-nutritivos como los inhibidores de tripsina, que dificultan la hidrólisis de la proteína y reducen el valor nutricional de la semilla.

En las variedades Alameda y Brocal no se apreciaron cambios importantes en la actividad de los inhibidores de tripsina a lo largo de los 9 días de germinación (Figuras 64c y 65c). Este mismo comportamiento fue observado en haba, lenteja, garbanzo, judía y soja durante periodos de germinación de hasta 6 días (Kakade y Evans, 1966; Collins y Sanders, 1976; Chang y Harrold, 1988; Rani y Hira, 1993; Weder y Link, 1993), y concretamente en haba, Rani y Hira (1993) también detectaron un incremento del valor nutritivo de estas semillas. Con ensayos de germinación de entre 6-8 días, otros autores obtuvieron

—
incrementos de la actividad antitripsica del 29% en haba (Bhatti, 1977) y del 39-41% en judía (Pusztai, 1972; Palmer y col., 1973; Chang y Harrold, 1988).

Sin embargo, en otros trabajos de investigación pudo apreciarse como los inhibidores de tripsina de las leguminosas se reducían con la germinación. En haba, se redujeron estos compuestos a los 2-6 días de ensayo un 21-69% (Ndzondzi-Bokouango y col., 1989; Sharma y Sehgal, 1992; Khalil y Mansour, 1995; Alonso y col., 2000; Saharan y col., 2002) y en estas semillas, Khalil y Mansour (1995) y Alonso y col. (2000) también detectaron un incremento de la digestibilidad de la proteína. A los 2-3 días de ensayo, los inhibidores de tripsina de guisante se redujeron un 27-84% (Hobday y col., 1973; Bishnoi y Khetarpaul, 1994; Alonso y col., 1998). Durante periodos de entre 1-10 días, la pérdida de actividad antitripsica en judía fue del 17-63% (El-Hag y col., 1978; Sathe y col., 1983; Trugo y col., 1990; Alonso y col., 2000) y además, Alonso y col. (2000) detectaron tras la germinación de estas semillas un incremento de la digestibilidad de la proteína. En lenteja, se produjeron reducciones del 21-54% (El-Mahdy y col., 1985; Batra y col., 1986; Vidal-Valverde y col., 1994; Frías y col., 1995; Urbano y col., 1995) y según Vidal-Valverde y col. (1994) y Frías y col. (1995), podría deberse a la utilización de estos inhibidores como fuente de energía para el desarrollo de la plántula. Con tratamientos de germinación de 3-6 días, los porcentajes de reducción obtenidos en garbanzo fueron del 24-83% (Bansal y col., 1988; Sattar y col., 1990b; Savage y Thompson, 1993) y los de soja del 17-23% (Abdullah y col., 1984; Ndzondzi-Bokouango y col., 1989). Según algunos autores como Wilson (1980) o Khokhar y Chauhan (1986), las reducciones observadas en las leguminosas podrían atribuirse a la movilización y degradación enzimática de proteínas, incluidos inhibidores de tripsina, durante la germinación de la semilla. Sin embargo, según los estudios realizados por Ryan (1981), esta reducción no parece estar relacionada con ningún proceso bioquímico o fisiológico específico de la germinación de la semilla.

Como acabamos de comprobar, existe una gran controversia entre los resultados obtenidos por los diferentes investigadores, ya que junto a la estabilidad, aumento o disminución de la actividad de los inhibidores de tripsina, en ocasiones se observa un incremento del valor nutritivo de la semilla y en otras ocasiones un descenso (Nielsen y Liener, 1988; Bishnoi y Khetarpaul, 1994; Chau y Cheung, 1997). Por lo tanto, según estos resultados podría concluirse que no siempre existe una relación directa entre el contenido de inhibidores de tripsina y el valor nutritivo de la semilla.

4. PRUEBAS EXPERIMENTALES EN RATAS

Una vez determinado el contenido de los factores no-nutritivos en las semillas y plántulas de *V. faba* var. Alameda y var. Brocal a lo largo de 216 h de germinación, para la realización de los experimentos nutricionales en ratas macho en crecimiento, se eligieron las semillas de la var. Alameda sin germinar (VF) y germinadas durante 72 h (VFG).

En los ensayos realizados en este estudio, observamos que la inclusión de la ración de habas sin germinar como única fuente de proteína para ratas, daba lugar a peores índices productivos (ganancia de peso, relación ganancia/alimento), nitrógeno retenido y valores de utilización neta de proteína (UNP), junto a mayores niveles de grasa corporal, frente a los valores detectados con la ración testigo de lactoalbúmina (Tabla 25), a pesar de que las raciones se equilibraron e igualaron en proteína y energía digestible, para que fueran comparables desde un punto de vista nutricional (Tabla 4). Los datos aquí obtenidos utilizando harinas de habas sin germinar en raciones equilibradas para ratas, corroboran resultados anteriores (Rubio y col., 1991).

Con la incorporación de habas germinadas en la ración, frente a las habas sin germinar, no mejoraron significativamente los parámetros de productividad, ni los niveles de grasa corporal de las ratas. Estos resultados coincidieron con los obtenidos en otros ensayos utilizando leguminosas como lenteja (Urbano y col., 1995) o garbanzo (Khaleque y col., 1985). Sin embargo, con estas habas germinadas se obtuvieron valores significativamente menores de peso seco fecal y de nitrógeno excretado en heces, lo que llevó a mayores niveles de nitrógeno retenido y de UNP (Tabla 25). Shekib (1994) detectó también en ratas que se alimentaron con habas germinadas, un ligero incremento en la utilización de la proteína. Mansour (1996) y Donangelo y col. (1995) observaron este mismo efecto con la administración de garbanzo, lupino y soja germinadas.

Como quedó reflejado en la Tabla 25, con la utilización de la ración de habas sin germinar, en comparación con la ración de lactoalbúmina, se produjo un incremento de la materia seca fecal y una mayor excreción de nitrógeno a través de las heces, que parece estar relacionado con la elevada cantidad de polisacáridos no amiláceos (PNA) presentes en las semillas de *V. faba* (166 mg PNA/g m.s.; Rubio y col., 1991). Estos polisacáridos no absorbidos, fueron utilizados por la flora bacteriana anaerobia del tracto intestinal, como sustrato energético para su propio mantenimiento y crecimiento, originándose así un aumento de la masa bacteriana, que formaba parte del peso seco de las heces y del nitrógeno fecal (Cummings, 1984; Mason, 1984; Goodlad y Mathers, 1990; Fernández y Gassull, 1999; Rubio, 2002). Goodlad y Mathers (1990), detectaron valores similares de N fecal en ratas alimentadas con guisante y observaron a su vez, como se incrementaba el

—
contenido en ácido diaminopimélico, utilizado como indicador de biomasa bacteriana. Por lo tanto, generalmente la mayor parte del N fecal determinado en las heces de las ratas alimentadas con leguminosas, se corresponde con proteínas de bacterias y no con proteínas de las legumbres sin digerir.

Trabajos previos realizados con legumbres germinadas, sugieren que la germinación afecta principalmente a la fracción hidrocarbonada de la semilla, mejorando la digestibilidad tanto de los carbohidratos como de las proteínas, ya que los carbohidratos podrían favorecer la utilización de la proteína (Shekib, 1994). Si bien, conviene tener en cuenta que en muchos casos se trata de estudios *in vitro* (Vidal-Valverde y col., 1992; Urbano y col., 1995; Trugo y col., 2000) que no suelen guardar una correlación directa con los resultados *in vivo* (Trugo y col., 1990; Donangelo, 1995; Mansour, 1996; Schulze y col., 1997). Así por ejemplo, en semillas germinadas de *V. unguiculata*, Nnanna y Phillips (1990) detectaron *in vivo* un incremento de la digestibilidad tanto del almidón como de la proteína, pero *in vitro*, otros autores (Fernández y Berry, 1988; Rahma, 1988; Chitra y col., 1996) únicamente detectaron reducciones de la digestibilidad del almidón, sin afectar a la digestibilidad de la proteína. En este estudio, cuando se administraron habas germinadas, en vez de aquellas sin germinar, se obtuvo una mayor digestibilidad ileal aparente de los aminoácidos (Tabla 26) junto a una mayor concentración de Cr₂O₃ en el contenido ileal (Tabla 25), y como se refleja en las heces, esto indica una mayor digestibilidad de la materia seca (Tabla 25). Por lo tanto, una elevada digestibilidad de los carbohidratos mejora el acceso de los enzimas digestivos a la fracción proteica y así se incrementa la digestibilidad de la proteína ileal. También, con la mayor digestibilidad de los PNA de las habas germinadas en el intestino delgado, llega menos materia sin digerir al intestino grueso, habiendo menor cantidad de componentes fermentables para la flora bacteriana, menor crecimiento microbiano, menores pesos absolutos y relativos del ciego (Tabla 28) y menor excreción fecal de N (Tabla 25). Además, es importante indicar que el contenido de los oligosacáridos de la familia de la rafinosa de las habas sin germinar (46 mg/g de m.s.), generalmente utilizados por la flora colónica para su desarrollo y multiplicación, disminuyó de forma drástica a las 72 h de germinación, por lo que en las habas germinadas únicamente se detectaron 5 mg/g de estos azúcares. Por lo tanto, los datos mostrados en las Tablas 25 y 28 que acabamos de relacionar con los PNA, probablemente también estén relacionados con el menor contenido de oligosacáridos presentes en las semillas germinadas.

Estudios anteriormente publicados sugieren que la fracción que contiene las proteínas de almacenamiento, es la que está principalmente implicada en el menor valor nutritivo de estas materias primas vegetales, comparadas con las de origen animal como la lactoalbúmina (Rubio y col., 1991, 1995, 1998). Aunque la razón de ello no está del todo

–

aclarada, parece que el efecto tiene que ver con la absorción y con el metabolismo de la proteína. Hay que recordar, que las raciones de habas fueron formuladas para que no tuvieran deficiencias en ningún aminoácido comparado con la ración testigo (Tabla 4). Como quedó reflejado en la Tabla 26, la digestibilidad ileal de los aminoácidos en ratas alimentadas con raciones de habas, germinadas o no, suplementadas con aminoácidos, fue similar o incluso mayor que la de la ración testigo de LA, por lo que su bajo valor nutritivo no parece estar directamente relacionado con la baja digestibilidad de ningún aminoácido. Debido a que la proteína total y cada aminoácido individualmente se digieren y absorben fácilmente en el intestino delgado, el efecto observado en el metabolismo y retención del nitrógeno en ratas en desarrollo, podría estar relacionado con una alteración en la utilización de las proteínas en el intestino y/o fuera de él. Los valores de digestibilidad sólo reflejan la eliminación de los aminoácidos del lumen intestinal, pero no dan ninguna referencia de cómo esta proteína es utilizada por los enterocitos, o en general, en el metabolismo proteico. Además, como la absorción de proteínas no está limitada a aminoácidos individuales, sino que incluye también a péptidos de diferente tamaño y composición (Silk y col., 1985; Webb, 1990), es posible que la proporción de aminoácidos absorbidos en el intestino sea diferente para cada una de las distintas proteínas, como han sugerido otros (Galibois y col., 1989), y que algunos péptidos absorbidos tengan un valor biológico.

Estudios realizados por Rubio y col. (1999) en ratas alimentadas con semillas o proteína purificada de leguminosas, mostraron descensos significativos en las concentraciones plasmáticas de alanina, treonina, leucina y lisina, junto con incrementos en glicina y arginina, hechos que se confirman en este estudio al comparar las concentraciones obtenidas con la ración de LA, frente a las raciones de habas sin germinar y germinadas (Tabla 27). Las concentraciones plasmáticas de los aminoácidos procedentes de las ratas alimentadas con VFG, fueron similares a las obtenidas tras la ingestión de VF (Tabla 27), resultados que coinciden con los de algunos autores como Khalil y Mansour (1995) o Bau (2000) que utilizaron haba y otras leguminosas como soja. Además, la incorporación en la ración de las habas germinadas, frente a las no germinadas, dio lugar a mayores valores de la digestibilidad ileal de algunos aminoácidos (Tabla 26) que no se refleja en mayores valores plasmáticos (Tabla 27), debido a que no hay una relación directa entre la digestibilidad intestinal y la concentración plasmática de aminoácidos (Fernández-Figares y col., 1997), porque los aminoácidos absorbidos son el resultado del metabolismo intestinal de las proteínas en el lumen (Wu, 1998), pero no refleja necesariamente la composición de estas proteínas.

El incremento de la grasa corporal de las ratas alimentadas con habas, frente a los niveles obtenidos con la ración testigo (Tabla 25), parece estar relacionado con la menor

—

movilización de los lípidos (Rubio y col., 1995) y con el incremento de la absorción y recuperación de energía a través de los ácidos grasos de cadena corta producidos por la fermentación de la fibra en el intestino grueso (Mathers, 1991). Además, cuando las ratas son alimentadas con legumbres o con la proteína de éstas, en comparación con la ración testigo, la producción de urea se incrementa, mientras que la retención de proteína y los valores de UNP se reducen, lo que sugiere una reducción en la síntesis proteica (Rubio, 2000). Con la reducción de la eficiencia en la deposición de proteínas, se incrementa la eficiencia en la retención de lípidos (Nieto y col., 1995), y esto podría contribuir a elevar el contenido lipídico en ratas alimentadas con legumbres.

Los datos obtenidos en este trabajo en relación con los pesos relativos de órganos digestivos y hematopoyéticos concuerdan con resultados anteriores (Wang y McInrosh, 1996; Rubio y col., 1988, 1998, 1999). Los pesos frescos relativos del intestino delgado, ciego y colon, de las ratas alimentadas con la ración de VF, fueron superiores a los obtenidos con la ración de LA (Tabla 28), y esto coincidió con el incremento del peso seco de las heces (Tabla 25). Es interesante observar, que tras la ingestión de la ración de VFG, las ratas presentaron un peso fresco relativo del ciego y del colon significativamente igual al testigo, mientras que el peso del intestino delgado fue igual al obtenido con VF. El incremento del peso relativo intestinal en las ratas alimentadas con habas, germinadas o no, fue debido a mayores cantidades de material no digerido en el intestino delgado (Goodlad y Mathers, 1990; Wyatt y col., 1988), mientras que los menores pesos relativos del ciego y del colon cuando se consumieron habas germinadas, frente a las no germinadas, podrían sugerir un incremento de la digestibilidad de la materia seca, como se muestra en las heces (Tabla 25). Los pesos frescos relativos del hígado y del timo fueron significativamente menores en aquellos animales alimentados con habas, en comparación con los alimentados con la ración testigo, y los del bazo tendieron a ser inferiores, pero las diferencias no fueron significativas, debido probablemente a la variabilidad de los datos (Tabla 28). Valores parecidos de pesos relativos de hígado, bazo y timo fueron obtenidos previamente en ratas alimentadas con habas, lupinos, guisantes y garbanzos (Goodlad y Mathers, 1992; Rubio y col., 1999) y no parece que los posibles factores aquí implicados hayan sido modificados por el proceso germinativo en las condiciones utilizadas en el presente estudio. Los menores pesos del hígado, probablemente indiquen alteraciones en la síntesis proteica a causa de la reducción en la concentración de glucógeno y proteínas. Los menores pesos relativos del timo, parecen estar relacionados con cambios producidos en el sistema inmunológico, y aunque la razón no esté del todo clara, podría tener que ver con la biodisponibilidad de minerales y con la calidad de la proteína (Rubio y col., 1999; Rubio, 2000).

Finalmente, es importante señalar que la germinación de las semillas de *V. faba* fue efectiva, ya que se produjo un incremento significativo, aunque limitado, de su valor nutritivo, porque además de mejorar la digestibilidad de carbohidratos y proteína, también se redujo significativamente el contenido de factores no-nutritivos en un rango del 9-90%, según el compuesto analizado. Por lo tanto, estas semillas germinadas son potencialmente útiles para la alimentación de animales monogástricos.

CONCLUSIÓN

VI. CONCLUSIÓN

Del estudio realizado sobre el contenido de los factores no-nutritivos en semillas de *Vicia faba* L. var. Alameda y var. Brocal, sin germinar y germinadas hasta 216 h, así como sobre la influencia de la germinación en el valor nutritivo de las semillas de la var. Alameda, se puede concluir lo siguiente:

1.- Las condiciones idóneas para germinar las semillas de las variedades Alameda y Brocal son: arena como sustrato, fotoperiodo de 8 h luz por día, 20°C de temperatura y humedad constante.

2.- El peso fresco de la semilla de las dos variedades analizadas, se incrementa 4 veces al finalizar la germinación; el peso de los cotiledones y de la cascarilla se duplica y el del eje embrionario aumenta 300 veces.

3.- El peso seco de la semilla de ambas variedades, permanece prácticamente constante a lo largo de la germinación; el peso de los cotiledones se reduce un 32%, el del eje embrionario se incrementa un 97% y el de la cascarilla no se modifica durante el ensayo.

4.- Respecto al contenido de los factores no-nutritivos (mg/g de m.s.) presentes en los **cotiledones**, indicar que:

- los *oligosacáridos de la familia de la rafinosa*, responsables de la flatulencia, se reducen un 90% en la var. Alameda y un 94% en la var. Brocal al final de la germinación.
- el α -galactósido de inositol, *ciceritol*, alcanza a las 216 h de ensayo incrementos del 93% y del 80%, en las variedades Alameda y Brocal, respectivamente.
- los glucósidos pirimidínicos productores de fabismo, *vicina* y *convicina*, disminuyen durante la germinación. El contenido de *vicina* se reduce un 29% en la var. Alameda y un 40% en la var. Brocal. La *convicina* se reduce a las 216 h un 51% en ambas variedades.
- el aminoácido no proteico, *L-DOPA*, no se detecta en los cotiledones.
- los *inositoles fosfato*, que interfieren con la biodisponibilidad de nutrientes, se reducen con la germinación un 14% en Alameda y un 18% en Brocal.

—

- la actividad de los *inhibidores de tripsina* (UIT/mg m.s.) se incrementa al final del ensayo un 28% en la var. Alameda y un 22% en la var. Brocal.

5.- En la **cascarilla** de las semillas de las dos variedades analizadas, sólo se detectan taninos condensados con un contenido de 6 mg/g m.s. en la var. Alameda y de 7 mg/g m.s. en la var. Brocal.

6.- En relación con el contenido de los factores no-nutritivos (mg/g de m.s.) en el **eje embrionario**, señalar que:

- los *oligosacáridos de la familia de la rafinosa* se reducen al final del ensayo un 94% en la var. Alameda y un 79% en la var. Brocal.

- el contenido de *ciceritol* alcanza incrementos del 97% en Alameda y del 100% en Brocal.

- la *vicina* se reduce a las 216 h un 81% en las dos variedades, sin embargo, la *convicina* aumenta con la germinación un 57% en la var. Alameda y un 54% en la var. Brocal.

- el contenido de *L-DOPA* se incrementa un 97% en la var. Alameda y un 96% en la var. Brocal al final de la germinación.

- los *inositoles fosfato* se reducen a las 216 h de ensayo un 93% en Alameda y un 97% en Brocal.

- la actividad de los *inhibidores de tripsina* (UIT/mg m.s.) disminuye con la germinación un 97% en ambas variedades.

7.- Respecto al contenido de los factores no-nutritivos (mg por semilla o plántula) de la **semilla o plántula**, se concluye que:

- los *oligosacáridos de la familia de la rafinosa* se reducen con la germinación un 89% en la var. Alameda y un 74% en la var. Brocal.

- el *ciceritol* alcanza a las 216 h incrementos del 97% y 92%, en las variedades Alameda y Brocal, respectivamente.

- el contenido de *vicina* y de *convicina* no varía durante el ensayo.

- la *L-DOPA* alcanza valores 1000 veces superiores a los iniciales al final de la germinación.

—

- el contenido de *inositoles fosfato* se reduce a las 216 h de ensayo un 42% en ambas variedades.
- la actividad de los *inhibidores de tripsina* (UIT/semilla) permanece prácticamente constante a lo largo de la germinación.

8.- Se seleccionan semillas de la variedad Alameda germinadas durante 72 h para realizar los estudios nutricionales, debido que a este tiempo se obtuvo una reducción del contenido de los factores no-nutritivos entre un 9% y un 90%, según el compuesto analizado.

9.- La germinación de semillas de *V. faba* es potencialmente útil para la alimentación de animales monogástricos, ya que se produce un incremento significativo, aunque limitado, del valor nutritivo de dichas semillas.

BIBLIOGRAFÍA

7. BIBLIOGRAFÍA

- Abdel-Gawad A.S. 1993. Effect of domestic processing on oligosaccharide content of some dry legume seeds. *Food Chem.*, 46: 25-31.
- Abdullah A., Baldwin R.E., Minor H. 1984. Germination effects on flatus-causing factors and antinutrients of mungbeans and two strains of small-seeded soybeans. *J. Food Protection*, 47(6): 441-444.
- Abrahamsen M., Sudia T.W. 1966. Studies on the soluble carbohydrates and carbohydrate precursors in germinating soybean seed. *Amer. J. Bot.*, 53: 108-114.
- Adewusi S.R.A., Falade O.S. 1996. The effects of cooking on extractable tannin, phytate, sugars and mineral solubility in some improved Nigerian legume seeds. *Food Science and Technology International*, 2: 231-239.
- Adibi S.A., Mercer D.M. 1973. Protein digestion in human intestine as reflected in luminal, mucosal and plasma amino acid concentration after meals. *J. Clin. Invest.*, 52: 1586-1594.
- Adjei-Twum D.C., Splittstoesser W.E. 1976. Use of soybeans as sprouts. *HortScience*, 11(3): 235-236.
- Adsule R.N., Kadam S.S. y Reddy N.R. 1989. Lectins. En: *Handbook of World Food Legumes: Nutritional Chemistry, Processing Technology, and Utilization*. Vol. I. Salunkhe D.K., Kadam S. S. (Ed.). Boca Raton, Florida, EEUU, CRC Press, 135-143.
- Aguilera JF., Prieto C., Molina E., Lachica M. 1988. A micromethod for routine determination of chromic oxide in nutrition studies. *Analysis*, 16(8): 454-457.
- Akpinar N., Akpinar M.A., Türkoglu S. 2001. Total lipid content and fatty acid composition of the seeds of some *Vicia L.* species. *Food Chem.*, 74: 449-453.
- Alarcón-Corredor O.M., Carnevalí de Tatá E., Reinoso-Füller J., Contreras Y., Ramírez de Fernández M., Yáñez-Domínguez C. 2000. Modificaciones de los lípidos séricos de ratas suplementadas con cobre por vía oral. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 50(3).
- Aldasoro J.J., Nicolás G. 1979. Changes in the concentrations of glycolytic intermediates and adenosine phosphates during germination of seeds of *Cicer arietinum L.* *Int. J. Biochem.*, 10: 947-950.
- Al-Karaki G.N. 1998. Seed size and water potential effects on water uptake, germination and growth of lentil. *J. Agronomy and Crop Science*, 181: 237-242.
- Alonso R., Orúe E., Marzo F. 1998. Effects of extrusion and conventional processing methods on protein and antinutritional factor contents in pea seeds. *Food Chem.*, 63: 505-512.
- Alonso R., Aguirre A., Marzo F. 2000. Effects of extrusion and traditional processing methods on antinutrients and in vitro digestibility of protein and starch in faba and kidney beans. *Food Chem.*, 68: 159-165.
- Aman P. 1979. Carbohydrates in raw and germinated seeds from mung bean and chick pea. *J. Sci. Food Agric.*, 30: 869-875.
- Andrews R.S., Pridham J.B. 1965. Structure of a dopa glucoside from *Vicia faba*. *Nature*, 205: 1213-1214
- AOAC. 1984. Association of Official Analytical Chemists, Official Methods of Analysis, 14th ed., Arlington, VA, EEUU.
- Arbid M.S.S., Marquardt R.R. 1985. Hydrolysis of the toxic constituents (vicine and convicine) in fababean (*Vicia faba L.*) food preparations following treatment with β -glucosidase. *J. Sci Food Agric.*, 36: 839-846.
- Arentoft A.M., Michaelsen S., Sorensen H. 1993. Determination of oligosaccharides by capillary zone electrophoresis. *J. Chrom.*, 652: 517-524.
- Arias M., Ortiz L.T., de los Mozos M. 2004. Phenolic compounds and pyrimidine glycoside determination in *Vicia narbonensis* seed. En: *Recent Advances of Research in Antinutritional Factors in Legume Seeds and Oilseeds: Proceeding of the fourth international workshop on antinutritional factors in legume seeds and oilseeds*. Muzquiz M., Hill G.D., Cuadrado C., Pedrosa M.M., Burbano C. (Ed.), EAAP publication, Wageningen, The Netherlands, 29-33.
- Askar A. 1986. Faba beans (*Vicia faba L.*) and their role in the human diet. *Food and Nutrition Bulletin*, Tokyo, 8(3): 15-24.

-
- Augustin J., Klein B.P. 1989. Nutrient composition of raw, cooked, canned, and sprouted legumes En: Legumes: chemistry, technology, and human nutrition. Matthews R.H. (Ed.), 187-217.
- Avigad G., Dey P.M. 1997. Carbohydrate metabolism: storage carbohydrates. Plant Biochemistry, Academic Press Ltd., 143-204.
- Ayet, G., Muzquiz, M., Burbano, C., Robredo, L.M., Cuadrado, C. y Price, K. 1996. Determinación de saponinas en las principales leguminosas cultivadas en España. Food Sci. Tech. Int., 2: 96-100.
- Ayet G., Burbano C., Cuadrado C., Pedrosa M.M., Robredo L.M., Muzquiz M., de la Cuadra C., Castaño A., Osagie A. 1997. Effect of germination, under different environmental conditions, on saponins, phytic acid and tannins in lentils (*Lens culinaris*). J. Sci. Food Agric., 74: 273-279.
- Bach Knudsen K.E., Li B.W. 1991. Determination of oligosaccharides in protein-rich feedstuffs by gas-liquid chromatography and high-performance liquid chromatography. J. Agric. Food Chem., 39: 689-694.
- Bacon J.R., Wanigatunga S.C.D.R, An J., Fenwick G.R. 1995. A microassay for the analysis of trypsin inhibitor activity in peas. Food Chem., 52: 77-80.
- Bain J.M., Mercer F.V. 1966. The relationship of the axis and the cotyledons in germinating seeds and seedlings of *Pisum sativum* L. Aust. J. Biol. Sci., 19: 85-96.
- Bansal K.K., Dhindsa K.S., Batra V.I.P. 1988. Trypsin inhibitor and hemagglutinin activities in chickpea (*Cicer Arietinum* L.): Effects of heat and germination. J. Fd. Sci. Technol., 25(1): 46-48.
- Barceló J., Nicolás G., Sabater B., Sánchez R. 2001. Maduración y germinación de las semillas. En: Fisiología Vegetal, Luca de Tena J.I. (Ed.), Ediciones Pirámide, España, 477-503.
- Bartholomai G.B., Tosi E., González R. 2000. Caracterización de compuestos nutritivos, no nutritivos y calidad proteica. Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo. Editorial Eudeba, Buenos Aires, Argentina.
- Bartolomé B., Estrella I., Hernández T. 1997. Changes in phenolic compounds in lentils (*Lens culinaris*) during germination and fermentation. Z. Lebensm Unters Forsch A., 205: 290-294.
- Bate-Smith E.C. 1973. Tannins of herbaceous leguminosae. Phytochem., 12: 1809-1812.
- Batra V.I.P., Vasishta R., Dhindsa K.S. 1986. Effect of heat and germination on typsin inhibitor activity in lentil and pigeon pea. J. Food Sci. Technol., 23: 260-263.
- Bau H.M., Villaume C., Nicolas J. P., Méjean L. 1997. Effect of germination on chemical composition, biochemical constituents and antinutritional factors of soya bean (*Glycine max*) seeds. J. Sci. Food Agric., 73: 1-9.
- Bau H.M., Villaume C., Méjean L. 2000. Effect of soyabean (*Glycine max*) germination on biologically active components, nutritional values of seeds, and biological characteristics in rats. Nahrung, 44: 2-6.
- Baumgartner B., Chrispeels M.J. 1976. Partial characterization of a protease inhibitor which inhibits the major endopeptidase present in the cotyledons of mung beans. Plant Physiol., 58: 1-6.
- Beal L., Mehta T. 1985. Zinc and phytate distribution in peas, influence of heat treatment, germination, pH, substrate, and phosphorus on pea phytate and phytase. J. Food Sci., 50: 96-100.
- Beevers L., Guernsey F.S. 1966. Changes in some nitrogenous components during the germination of pea seeds. Plant Physiol., 41: 1455-1458.
- Bekkara F., Jay M., Viricel M.R., Rome S. 1998. Distribution of phenolic compounds within seed and seedlings of two *Vicia faba* cvs differing in their seed tannin content, and study of their seed and root phenolic exudations. Plant and Soil, 203: 27-36.
- Belitz H.D., Weder J.K.P. 1990. Protein inhibitors of hydrolases in plants foodstuffs. Food Rev. Int., 6(2): 151-211.
- Bello J. 2000. Estudio bromatológico de los carbohidratos. Ciencia Bromatológica. Principios generales de los alimentos, Ediciones Díaz de Santos, Madrid, España, 77-103.
- Bello J. 2005. Alimentos saludables. Calidad de Vida, Alimentos y Salud Humana, Ediciones Díaz de Santos, Madrid, España, 210-241.

-
- Belsey M.A. 1973. The Epidemiology of Favism. Bull. Wld. Hlth. Org. 48: 4.
- Bernal-Lugo I., Leopold A.C. 1992. Changes in soluble carbohydrates during seed storage. Plant. Physiol., 98: 1207-1210.
- Beutler E. 1970. L-dopa and favism. Blood, 36(4): 523-525.
- Beveridge R.J., Ford C.W., Richards G.N. 1977. Polysaccharides of tropical pasture herbage. VII. Identification of a new pinitol galactoside from seeds of *Trifolium subterraneum* (subterranean clover) and analysis of several pasture legume seeds for cyclohexitols and their galactosides. Aust J. Chem., 30, 1583-1590.
- Bewley J.D., Black M. 1995. Seeds Physiology of Development and Germination, Plenum Press, N Y, EEUU, 161-163.
- Bewley J.D. 1997. Seed germination and dormancy. The Plant Cell. American Society of Plant Physiologists, 9: 1055-1066.
- Bhatty R.S. 1977. Trypsin inhibitor activity in faba beans (*Vicia faba* var. minor), changes during germination and distribution. Can. J. Plant Sci., 57: 979-982.
- Bianchetti R., Sartirana M.L. 1967. The mechanism of the repression by inorganic phosphate of phytase synthesis in the germinating wheat embryo. Biochim. Biophys. Acta, 145: 485-490.
- Birk Y. 1968. Chemistry and nutritional significance of proteinase inhibitors from plant sources. Ann. N. Y. Acad. Sci., 146: 388-399.
- Birk Y., Peri I. 1980. Saponins. En Toxic constituents of plant foodstuffs, Liener I.E.(Ed.), Academic Press, New York, EEUU, 161-182.
- Bishnoi S., Khetarpaul N. 1994. Protein digestibility of vegetables and field peas (*Pisum sativum*). Varietal differences and effect of domestic processing and cooking methods. Plant Foods Hum. Nutr., 46: 71-76.
- Bjerg B., Eggum B.O., Olsen O., Sorensen H. 1984a. Antinutritional and favism inducing factors in *Vicia faba* L.: Nutritional value of faba beans; metabolism and properties of vicine, convicine and dopa-glucoside. En: *Vicia faba*: Agronomy, Physiology and Breeding, Hebblethwaite P.D., Dawkins T.C.K., Health M.C., Lockwood O. (Ed.), Netherlands, 287-296.
- Bjerg B., Heide M., Norgaard Knudsen J.C., Sorensen H. 1984b. Inhibitory effects of convicine, vicine and dopa from *Vicia faba* on the in vitro growth rates of fungal pathogens. Z. für Pflanz. und Pflanz. J. Plant Dis. Protec., 91(5): 483-487.
- Bjerg B., Norgaard Knudsen J.C., Olsen O., Poulsen M.H., Sorensen H. 1985. Quantitative analysis and inheritance of vicine y convicine content in seeds of *Vicia faba* L. Z. Pflanz., 94: 135-148.
- Blair R. 1977. Faba beans: an improved crop for animal feeding. Feedingstuffs, 49: 15-16.
- Bohnert H., Jensen R.G. 1996. Strategies for engineering water-stress tolerance in plants. Trends Biotechnol., 14: 89-97.
- Boralkar M., Reddy N.S. 1985. Effect of roasting, germination and fermentation on the digestibility of starch and protein present in soy bean. Nutrition Reports International, 31(4): 833-837.
- Borowska J., Giczewska A., Zadernowski R. 2003. Nutritional value of broad bean seeds. Part 2: Selected biologically active components. Nahrung/Food, 47(2): 98-101.
- Bradford M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analyt. Biochem., 72: 248-254.
- Brakke M.P., Gardner F.P. 1987. Juvenile growth in pigeonpea, soybean, and cowpea in relation to seed and seedling characteristics. Crop. Sci., 27: 311-316.
- Bravo L. 1999. Effect of processing on the non-starch polysaccharides and *in vitro* starch digestibility of legumes. Food Sci. Tech. Int., 5(5): 415-423.
- Briarty L.G., Coult D.A., Boulter D. 1970. Protein bodies of germinating seeds of *Vicia faba*. J. Experiment. Botany, 21(67): 513-524.

-
- Brinch-Pedersen H., Sorensen L.D., Holm P.B. 2002. Engineering crop plants: getting a handle on phosphate. *Trends in Plant Science*, 7(3): 118-125.
- Broadhurst R.B., Jones W.T. 1978. Analysis of condensed tannins using acidified vanillin. *J. Sci. Food and Agric.*, 29: 788-794.
- Brown E.G., Roberts F.M. 1972. Formation of vicine and convicine by *Vicia faba*. *Phytochem.*, 11: 3203-3206.
- Brown C.S., Huber S.C. 1987. Photosynthesis, reserve mobilization and enzymes of sucrose metabolism in soybean (*Glycine max*) cotyledons. *Physiol. Plantarum*, 70: 537-543.
- Bryant R.J., Rao D.R., Ogutu S. 2004. α and β -galactosidase activities and oligosaccharide content in peanuts. *Plant Food for Human Nutrition*, 58: 213-223.
- Burbano C., Cuadrado C., Muzquiz M., Cubero J.I. 1993. Determinación de factores antinutritivos termorresistentes en leguminosas. II: vicina y convicina. *Invest. Agr.: Prod. Prot. Veg.*, 8(3): 363-376.
- Burbano C., Muzquiz M., Osagie A., Ayet G., Cuadrado C. 1995a. Determination of phytate and lower inositol phosphates in Spanish legumes by HPLC methodology. *Food Chem.*, 62: 321-326.
- Burbano C., Cuadrado C., Muzquiz M., Cubero J.I. 1995b. Variation of favism-inducing factors (vicine, convicine and L-DOPA) during pod development in *Vicia faba* L. *Plant Foods for Human Nutrition*, 47: 265-274.
- Butler L.G. 1989. Sorghum polyphenols. En: *Toxicants of plant origin. Vol IV. Phenolics*. Cheeke P.R. (Ed.), CRC Press, Boca Raton, Florida, EEUU, 95-121.
- Butrón J. 2002. Efecto de la suplementación enzimática y extrusionado de leguminosas en el crecimiento y metabolismo animal. Tesis Doctoral, Departamento de Ciencias del Medio Natural, Universidad Pública de Navarra, Navarra, España, pp. 110.
- Caffrey M., Fonseca V., Leopold A.C. 1988. Lipid-sugar interactions. Relevance to anhydrous biology. *Plant. Physiol.*, 86: 754-758.
- Calloway D.H., Murphy E.L. 1968. The use of expired air to measure intestinal gas formation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 150: 82-95.
- Camacho L., Sierra C., Campos R., Guzmán E., Marcus D. 1992. Cambios nutricionales inducidos por la germinación de leguminosas habituales en Chile. *Archivos Latinoamericanos de nutrición*, 42(3): 283-290.
- Carasco J.F., Xavier-Filho J. 1982. Effect of protein synthesis and respiration inhibitors on protease inhibitor activity in imbibing seeds of cowpea, *Vigna unguiculata* (L.) Walp. *Revta Brasil. Bot.*, 5: 25-28.
- Carbonaro M., Grant G., Cappelloni M., Pusttai A. 2000. Perspectives into factors limiting in vivo digestion of legume proteins: Antinutritional compounds or storage proteins?. *J. Agric. Food chem.*, 48(3): 742-749.
- Carmona A., Borguud L., Borges G., Levy-Benshimol A. 1996. Effect of black bean tannins on in vitro carbohydrate digestion and absorption. *J. Nutr. Biochem.*, 7: 445-450.
- Carnovale E., Lugaro E., Lombardi-Biccia G. 1988. Phytic acid in faba bean and pea: effect on protein availability. *Cereal Chem.*, 65(2):114-117.
- Carlsson N-G., Karlsson H., Sandberg A-S. 1992. Determination of oligosaccharides in foods, diets, and intestinal contents by high-temperature gas chromatography and gas chromatography/mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.*, 40: 2404-2412.
- Carvalho M.R.B., Sgarbieri V.C. 1997. Heat treatment and inactivation of trypsin-chymotrypsin inhibitors and lectins from beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *J. Food Biochem.*, 21: 219-233.
- Chang K.C., Satterlee L.D. 1981. Isolation and characterization of the major protein from great northern beans (*Phaseolus vulgaris*). *J. Food Sci.*, 46: 1368-1373.
- Chang K.C., Harrold R.L. 1988. Changes in selected biochemical components in vivo protein digestibility and amino acids in two bean cultivars during germination. *J. Food Sci.*, 53: 783-787.

-
- Chang M.J., Collins J.L., Baily J.W., Coffey D.L. 1994. Cowpea tannins related to cultivar, maturity, dehulling and heating. *J. Food Sci.*, 59: 1034-1036.
- Chau C.-F., Cheung P.C.-K. 1997. Effect of various processing methods on antinutrientes and in vitro digestibility of protein and starch of two chinese indigenous legume seeds. *J. Agric. Food Chem.*, 45: 4773-4776.
- Chavan J.K. y Kadam S.S. 1989. Protease inhibitors. En: *Handbook of World Food Legumes: Nutritional Chemistry, Processing Technology, and Utilitation*. Vol. I. Salunkhe D.K., Kadam S. S., (Ed.). CRC Press, Boca Raton, Florida, EEUU, 123-133.
- Chavan J.K., Kute L.S., Kadam S.S. 1989. Broad bean. En: *Handbook of World Food Legumes: Nutritional Chemistry, Procesing Technology, and Utilitation*. Vol. I. Salunkhe D.K., Kadam S. S., (Ed.). CRC Press, Boca Raton, Florida, EEUU, 223-245.
- Chavan U.D., McKenzie D.B., Amarowicz R., Shahidi F. 2003. Phytochemical components of beach pea (*Lathyrus maritimus* L.). *Food Chem.*, 81: 61-71.
- Cheeke, P.R. 1976. Nutritional and physiological properties of saponins. *Nutr. Rep. Int.*, 13 (3): 315-324.
- Chen L.H., Pan S.H. 1977. Decrease of phytates during germination of pea seeds (*Pisum sativum*). *Nutr. Rep. Int.*, 16(1): 125-131.
- Chen Q. 2004. Determination of phytic acid and inositol pentakisphosphates in foods by high-performance ion chromatography. *J. Agric. Food Chem.*, 52: 4604-4613.
- Chen W., Anderson J., Jennings D. 1984. Propionate may mediate the hypocholesterolemic effect of certain soluble plant fibers in cholesterol-fed rats. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 175: 215-218.
- Chevion M., Navok T., Glaser G., Mager J. 1982. The chemistry of favism-inducing compounds. The properties of isouramilo and their reaction with glutathione. *Eur. J. Biochem.*, 127: 405-409.
- Chevion M. y Navok T. 1983. A novel method for quantitation of favism-inducing agents in legumes. *Anal. Biochem.*, 128: 152.
- Chitra U., Singh U., Rao P.V. 1996. Phytic acid, in vitro protein digestibility, dietary fiber, and minerals of pulses as influenced by processing methods. *Plant Foods for Human Nutrition*, 49: 307-316.
- Chrispeels M.J., Raikhel N.V. 1991. Lectins, lectin genes and their role in plant defense. *The Plant Cell*, 3: 1-9.
- Chung K-T., Wong T. Y., Wei C-I., Huang Y-W., Lin Y. 1998. Tannins and human health: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 38(6): 421-464.
- Church D.C., Pond W.G. 1987. Metabolismo de la energía. En: *Bases Científicas para la Nutrición y Alimentación de los Animales Domésticos*, Editorial Acribia, Zaragoza, España, 139-160.
- Cecconi O., Nelson R.M., Roberts W.G., Hanasaki K., Mannori G., Schultz C., Ulich T.R., Aruffo A., Bevilacqua M.B. 1994. Inositol polyanions. Noncarbohydrate inhibitors of L- and P-selectin that block inflammation. *J. Biological Chem.*, 269(21): 15060-15066.
- Cerning J., Saposnik A., Guilbot A. 1975. Carbohydrate composition of horse beans (*Vicia faba*) of different origins. *Cereal Chem.*, 52: 125-138.
- Cerning-Beroard J., Filiatre A. 1976. A comparison of the carbohydrate composition of legume seeds: horsebeans, peas and lupines. *Ceral Chem.*, 53(6): 968-978.
- Clemente A., MacKenzie D.A., Johnson I.T., Domoney C. 2004. Investigation of legume seed protease inhibitors as potential anticarcinogenic proteins. En: *Recent Advances of Research in Antinutritional Factors in Legume Seeds and Oilseeds: Proceeding of the 4th International Workshop on Antinutritional Factors in Legume Seeds and Oilseeds*. Muzquiz M., Hill G.D., Cuadrado C., Pedrosa M.M., Burbano C. (Ed.), Wageningen Academic Publishers, The Netherlands, 137-141.
- Collier H.B. 1976. The estimation of vicine in fababeans by an ultraviolet spectrophotometric method, *J. Inst. Can. Sci. Technol. Aliment.*, 9(3):155-159.

-
- Collins J.L. y Sanders G.G., 1976. Changes in trypsin inhibitory activity in some soybean varieties during maturation and germination. *J. Food Sci.*, 41: 168-172.
- Cook N.C., Samman S. 1996. Flavonoids—Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *Nutritional Biochem.*, 7: 66-76.
- Corchete M.P., Guerra H. 1987. α - and β -galactosidase activities during germination of lentil seeds. *Plant Physiol. Biochem.*, 25(2): 105-109.
- Cosgrove D.J., 1980. Inositol Phosphates: Their Chemistry, Biochemistry and Physiology. Elsevier Sci. Publ. Co., Elsevier Sci. Publ., EEUU.
- Cowden W.B., Ramshaw I.A., Badenoch-Jones P. 1987. Divicine-induced free radical killing of tumour cells. *Med. Sci. Res.*, 15: 997-998.
- Crans D.C., Mikus M., Frieauff R.B. 1995. Phytate metabolism in bean seedlings during post-germinative growth. *J. Plant Physiol.*, 145: 101-107.
- Cristofaro E., Mottu F., Wuhrmann J.J. 1974. Involvement of the raffinose family of oligosaccharides in flatulence. *Sugar in Nutrition*, Sipple H., McNutt K. (Ed.), Academic Press, NY, EEUU, pag 313-336.
- Crittenden R.G., Playne M.J. 1996. Production, properties and applications of food-grade oligosaccharides. *Trends in Food Science & Technology*, 7: 353-361.
- Cronquist A. 1981. An integrated system of classification of flowering plants. Columbia University Press, N Y, EEUU, pag 1262.
- Cruz R., da Silva. 1986. Soybean (*Glycine max*) endogenous alpha-galactosidase and invertase during the germinative process. *Arq. Biol. Tecnol.*, 29(3): 435-443.
- Cummings J.H. 1981. Short chain fatty acids in the human colon. *Gut*, 22: 763-779.
- Cummings J.H. 1984. Microbial digestion of complex carbohydrates in man. *Prod. Nutr. Soc.*, 43: 35-44.
- Cubero J. I. 1974. On the evolution of *Vicia faba* L. *Theor Appl. Genet.*, 45:47-51.
- Czukur B. 2000. Processing. En: *Carbohydrates in Grain Legumes Seeds, Improving Nutritional Quality and Agronomic Characteristics*, Hedley C.L. (Ed.), CABI Publishing, Norwich, UK, 112-115.
- Damodaran M., Ramaswamy R. 1937. Isolation of L-3:4-dihydroxyphenylalanine from the seeds of *Mucuna pruriens*. *Biochem. J.*, 31: 2149-2152.
- Das J., Chaturvedi Y., Nagar R. 1999. Effect of germination on inorganic, labile and phytate phosphorus of some legumes. *J. Food Sci. Technol.*, 36(6): 532-534.
- Datta P.K., Basu P.S., Datta T.K. 1985. Some biologically active protein constituents of *Vicia faba* protein bodies. *J. Food Sci. Technol.*, 22(2): 97-101.
- Datta K., Usha R., Dutta S.K., Singh M. 2001. A comparative study of the winged bean protease inhibitors and their interaction with proteases. *Plant Physiol. Biochem.*, 39: 949-959.
- De R., Kar R.K. 1995. Seed germination and seedling growth of mung bean (*Vigna radiata*) under water stress induced by PEG-6000. *Seed Sci. Technol.*, 23: 301-308.
- De Haro A. 1983. La calidad nutritiva de las leguminosas-grano y su control genético. En: *Leguminosas de grano*, Cubero J.I., Moreno M.T. (Ed.). Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, 211-249.
- De La Cuadra C. 1993. Germinación, latencia y dormición de las semillas. Hojas Divulgadoras Núm. 3/92HD del Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación.
- De La Cuadra C., Muzquiz M., Burbano C., Ayet G., Calvo R., Osagie A., Cuadrado C. 1994. Alkaloid, α -galactoside and phytic acid changes in germinating lupin seeds. *J. Sci. Food Agric.*, 66: 357-364.
- Delzenne N.M., Roberfroid M.R. 1994. Physiological effects of non-digestible oligosaccharides. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.*, 27: 1-6.
- Deshpande S.S., Sathe S.K., Salunkhe D. K., Cornforth D.P. 1982. Effects of dehulling on phytic acid, polyphenols, and enzyme inhibitors of dry beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *J. Food Sci.*, 47: 1846-1850.

-
- Deshpande S. S., Cheryan M. 1984. Effects of phytic acid, divalent cations, and their interactions on α -amilase activity. *J. Food Sci.*, 49: 516-524.
- Deshpande S.S., Cheryan M., Salunkhe D. K. 1985. Tannin analysis of food products. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 24: 401-449.
- Deshpande S.S., Damodaran S. 1989. Structure-digestibility relationship of legume 7S proteins. *J. Food Sci.*, 54(1): 108-113.
- Dey P.M., Pridham J.B. 1972. Biochemistry of α -galactosidases, *Adv. Enzymol.*, 36: 91-130.
- Dey P.M. 1983. Galactokinase of *Vicia faba* seeds. *Eur J. Biochem.*, 136: 155-159.
- Dey P.M. 1985. D-galactose-containing oligosaccharides. En: *Biochemistry of Storage Carbohydrates in Green Plants*, Dey P.M. (Ed.), Academic Press, Londres, 53-129.
- Dini A., Simone F., Ramundo E., Senatore F. 1989. Oligosaccharides in five different *Vicia faba* L. cultivars. *Biochemical Systematics and Ecology*, 17(7/8): 559-561.
- Dittrich P., Brandl A. 1987. Revision of the pathway of D-pinitol formation in leguminosae. *Phytochem.*, 26(7): 1925-1926.
- D'Mello J.P.F. 1994. Amino acid imbalances, antagonism and toxicities. En: *Amino acids in farm animal nutrition*, D'Mello J.P.F (Ed.), CAB International: Wallingford, UK, 63-97.
- Domoney C. 1999. Inhibitors of legume seeds. En: *Seed Proteins*. Shewry P.R. y Casey (Eds.). Netherlands: Kluwer Academic Publishers., 697-719.
- Donangelo C.M., Trugo L.C., Trugo N.M.F. y Eggum B.O. 1995. Effect of germination of legume seeds on chemical composition and on protein and energy utilization in rats. *Food Chem.*, 53: 23-27.
- Duc, G., Sixdenier G., Lila M., Furstoss V. 1989. Search for genetic variability for vicine and convicine content in *Vicia faba* L. A first report of a gene which codes for nearly zero-vicine and zero-convicine contents. En: *Recent Advances of Research in Antinutritional Factors in Legume Seeds: Proceedings 1st International Workshop on Antinutritional Factors in Legume Seeds*, Huisman J., van der Poel T.F.B., Liener I.E. (Ed.), EAAP publication, Wageningen, The Netherlands, 305-313.
- Duc G., Marget P., Page D., Domoney C. 2004. Facile breeding markers to lower contents of vicine and convicine in faba bean seeds and trypsin inhibitors in pea seeds. En: *Recent Advances of Research in Antinutritional Factors in Legume Seeds and Oilseeds: Proceeding of the 4th International Workshop on Antinutritional Factors in Legume Seeds and Oilseeds*. Muzquiz M., Hill G.D., Cuadrado C., Pedrosa M.M., Burbano C. (Ed.), Wageningen Academic Publishers, The Netherlands, 281-285.
- Dueñas M., Sun B., Hernández T., Estrella I., Spranger M.I. 2003. Proanthocyanidin composition in the seed coat of lentils (*Lens culinaris* L.). *J. Agric. Food Chem.*, 51: 7999-8004.
- East J.W., Nakayama T.O.M., Parkman S.B. 1972. Changes in stachyose, raffinose, sucrose, and monosaccharides during germination of soybeans. *Crop Sci.*, 12: 7-9.
- Eastwood D., Laidman D. 1971. The mobilization of macronutrients elements in the germinating wheat grain. *Phytochem.*, 10: 1275-1284.
- Eggum B.O. 1980. *Vicia faba*. Feeding value, processing and viruses. Bond D.A. (Ed.). ECSC, EEC, EAEC, Bruselas, Luxemburgo, 107-123.
- Eggum B.O. 1989. Biochemical and methodological principles. En: *Protein Metabolism in Farm Animals: Evaluation, digestion, absorption y metabolismo*. Bock H.D., Eggum B.O., Low A.G., Simon O., Zebrowska A.G. (Ed.), Oxford University Press, VEB Deutscher Landwirtschaftsverlag, Berlín, Alemania, 1-52.
- Egli I., Davidsson L., M.A. Juillerat, Barclay D., Hurrell R.F. 2002. The influence of soaking and germination on the phytase activity and phytic acid content of grains and seeds potentially useful for complementary feeding. *J. Food Sci.*, 67 (9): 3484-3488.

-
- El-Hag N., Haard N.F., Morse R.E. 1978. Influence of sprouting on the digestibility coefficient, trypsin inhibitor and globulin of red kidney beans. *J. Food Sci.*, 43: 1874-1875.
- Elías L.G., Fernández D.G., Bressani R. 1979. Possible effects of seed coat polyphenolics on the nutritional quality of bean protein. *J. Food Sci.*, 44(2): 524-527.
- Ellis R., Morris E.R. 1983. Improved ion-exchange phytate method. *Cereal Chem.*, 60(2): 121-124.
- El-Mahdy A.R., Moustafa E.K., Mohamed M.S. 1981. Trypsin inhibitor activity in *Vicia faba* beans. *Food Chem.*, 6: 63-71.
- El-Mahdy A. R., Moharram Y. G., Abou-Samaha O. R. 1985. Influence of germination on the nutritional quality of lentil seeds. *Z. Lebensm Unters Forsch*, 181: 318-320.
- El-Moniem G.M.A., Honke J., Bednarska A. 2000. Effect of frying various legumes under optimum conditions on amino acids, in vitro protein digestibility, phytate and oligosaccharides. *J. Sci. Food Agric.*, 80:57-62.
- Elsheikh E.A.E., Fadul I.A., El Tinay A.H. 2000. Effect of cooking on anti-nutritional factors and in vitro protein digestibility (IVPD) of faba bean grown with different nutritional regimes. *Food Chem.*, 68: 211-212.
- El-Tabey Shehata A.M., Abu-Bakr T.M., El-Shimi N.M. 1983. Phytate, phosphorus and calcium contents of mature seeds of *Vicia faba* L. and their relation to texture of pressure-cooked faba beans. *J. Food Processing and Preservation*, 7: 185-192.
- Englyst H.N., Quigley M.E., Hudson G.J., Cummings J.H. 1992. Determination of dietary fibre as non-starch polysaccharides by gas-liquid chromatography. *Analyst.*, 117: 1707-1714.
- Erlanger B.F., Kokowsky N., Cohen W. 1961. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Archives of Biochem. and Biophys.*, 95: 271-278.
- Eskin N.A.M., Hoehn E., Frenkel C. 1978. A simple and rapid quantitative method for total phenols. *J. Agr. Food Chem.*, 26: 973-975.
- Eskin N.A.M., Johnson S., Vaisey-Genser M., McDonald B.E. 1980. A study of oligosaccharides in a select group of legumes. *J. Inst. Can. Sci. Technol. Aliment.*, 13(1): 40-42.
- Eskin N.A.M., Wiebe S. 1983. Changes in phytase activity and phytate during germination of two fababean cultivars. *J. Food Sci.*, 48: 270-271.
- Evans W.J., Pierce A.G., Jr. 1982. Interaction of phytic acid with the metal ions, copper (II), cobalt (II), iron (III), magnesium (II), and manganese (II). *J. Food Science*, 47: 1014-1015.
- Evans W.J., Martin C.J. 1988. Heat of complex formation of Al (III) and Cd (II) with phytic acid. IX. *J. Inorganic Biochem.*, 34: 11-18.
- Everard B. 1982. Guía de campo de las flores de Europa. Ediciones Omega, S.A., Casanova, 220- Barcelona, España, 545-547.
- Farran M.T., Darwish A.H., Uwayjan M.G., Sleiman F.T., Ashkarian V.M. 2002. Vicine and Convicine in common vetch (*Vicia sativa*) seeds enhance β -cyanoalanine toxicity in male broiler chicks. *International Journal of Toxicology*, 21: 201-209.
- Fenwick G.R., Oakenfull D., 1983. Saponin content of food plants and some prepared foods. *J. Sci. Food Agric.*, 34: 186-191.
- Fernandes A.O., Banerji A.P. 1995. Inhibition of benzopyrene-induced forestomach tumors by field bean protease inhibitor(s). *Carcinogenesis*, 16: 1843-1846.
- Fernández F., Gassull M., Á. 1999. Fibra dietética. En: Tratado de nutrición, Hernández M., Sastre A. (Ed.), Ediciones Díaz de Santos, Madrid, España, 125-138.
- Fernández M.M., Aranda P., López-Jurado M., Urbano G., Estrella E., Sotomayor C., Díaz C., Prodanov M., Frias J., Vidal-Valverde C. 1993. Effect of processing on some antinutritive factors of faba beans: Influence on protein digestibility and food intake in rats. En: Recent Advances of Research in Antinutritional Factors in Legume Seeds: Proceedings of the 2nd International Workshop on Antinutritional Factors in Legume Seeds,

- van der Poel A.F.B., Huisman J., Saini H.S. (Ed.), EAAP publication, Wageningen, The Netherlands, 467-471.
- Fernández M., Aranda P., López-Jurado M., García-Fuentes M.A., Urbano G. 1997. Bioavailability of phytic acid phosphorus in processed Vicia faba L. var. Major. J. Agric. Food Chem., 45: 4367-4371.
- Fernandez M.L., Berry J.W. 1988. Effect of germination on chickpea starch. Starch/Starke, 41: 17-21.
- Fernández-Figares I., Prieto C., Nieto R., Aguilera JF. 1997. Free amino acid concentrations in plasma, muscle and liver as indirect measures of protein adequacy in growing chickens. Anim. Sci., 64: 529-539.
- Fleming S.E., Vose J.R. 1979. Digestibility of raw and cooked starches from legume seeds using the laboratory rat. J. Nutr., 109: 2067-2075.
- Fleming S.E. 1981. A study of relationships between flatus potential and carbohydrate distribution in legume seeds. J. Food Sci., 46: 794-803.
- Folch J., Lees M., Stanley G.H.S. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. J. Biol. Chem., 226: 497-507.
- Fredrikson M., Larsson Alminger M., Carlsson N-G., Sandberg A.-S. 2001. Phytate content and phytate degradation by endogenous phytase in pea (*Pisum sativum*). J. Sci. Food Agric., 81: 1139-1144.
- Frei B. 1995. Cardiovascular disease and nutrient antioxidants: role of low-density lipoprotein oxidation. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 35 (1 y 2): 83-98.
- Frías J., Hedley C., Price K.R., Fenwick G.R., Vidal-Valverde C. 1994a. Improved methods of oligosaccharide analysis for genetic studies of legume seeds. J. Liq. Chrom., 17(11): 2469-2483.
- Frías J., Vidal-Valverde C., Bakhsh A., Arthur A.E., Hedley C. 1994b. An assessment of variation for nutritional and non-nutritional carbohydrates in lentil seeds (*Lens culinaris*). Plant Breeding, 113(2): 170-173.
- Frías J., Díaz-Pollan C., Hedley C.L., Vidal-Valverde C. 1995. Evolution of trypsin inhibitor activity during germination of lentils. J. Agric. Food Chem., 43: 2231-2234.
- Frías J., Price K.R., Fenwick G.R., Hedley C.L., Sörensen H., Vidal-Valverde C. 1996a. Improved method for the analysis of α -galactosides in pea seeds by capillary zone electrophoresis. Comparison with high-performance liquid chromatography-triple-pulse amperometric detection. J. Chrom., 719: 213-219.
- Frías J., Vidal-Valverde C., Kozłowska H., Tabera J., Honke J. y Hedley C.L. 1996b. Natural fermentation of lentils. Influence of time, flour concentration, and temperature on the kinetics of monosaccharides, disaccharides, and α -galactosides. J. Agric. Food Chem., 44: 579-584.
- Frías J., Bakhsh A., Jones D.A., Arthur A.E., Vidal-Valverde C., Rhodes M.J.C., Hedley C.L. 1999. Genetic analysis of the raffinose oligosaccharides pathway in lentil seeds. Journal of Experimental Botany, 50(333): 469-476.
- Frías J., Doblado R., Vidal-Valverde C. 2003. Kinetics of soluble carbohydrates by action of endo/exo α -galactosidasas enzyme in lentils and peas. Eur. Food Res. Technol., 216: 199-203.
- Friedman M. 1996. Nutritional value of proteins from different food sources. A review. J. Agric. Food Chem., 44: 2-29.
- Friedman M., Brandon D.L. 2001. Nutritional and health benefits of soy proteins. J. Agric. Food Chem., 49, 1069-1086.
- Gabard K.A., Jones R.L. 1986. Localization of phytase and acid phosphatase isoenzymes in aleurone layers of barley. Physiol. Plant., 67: 182-192.
- Gaetani G., Salvidio E., Pannacciulli I., Ajmar F., Paravidino G. 1970. Absence of haemolytic effects of L-DOPA on transfused G6PD-deficient erythrocytes. Experientia 26: 785-786.
- Galibois I., Simoes Nunes C., Rérat A., Savoie L. 1989. Net appearance of amino acids in portal blood during the ingestion of casein or rapeseed proteins in the pig. Can. J. Physiol. Pharmacol., 67: 1409-1417.
- García V.V., Mendoza E.M.T. 1992. Raffinose oligosaccharides in legumes. Food Chem., 2(5): 303-320.
- García-Agustín P., Primo-Millo, E. 1993. Germinación de las semillas. En: Fisiología y Bioquímica Vegetal, Azcon-Bieto J., Talon M. (Eds), España, McGraw Hill Interamericana, 419-433.

-
- García-López P.M., Gurrola Díaz C.M., Garzón de la Mora P., Isaac Virgen M.L., Ruiz López M.A., Cuadrado C., Burbano C., Pedrosa M.M., Muzquiz M. 2004. Phytate and α -galactoside content of wild lupins from Jalisco, México. En: Recent Advances of Research in Antinutritional Factors in Legume Seeds and Oilseeds: Proceeding of the 4th International Workshop on Antinutritional Factors in Legume Seeds and Oilseeds. Muzquiz M., Hill G.D., Cuadrado C., Pedrosa M.M., Burbano C. (Ed.), EAAP publication, Wageningen, The Netherlands, 53-56.
- Gardiner E.E., Marquardt R.R., Kemp G. 1982. Variation in vicine and convicine concentration of faba bean genotypes. *Can. J. Plant Sci.*, 62: 589-592.
- Ghorpade V.M., Kadam S.S. 1989. Germination. En: Handbook of World Food Legumes: Nutritional Chemistry, Processing Technology, and Utilitation. Vol. III. Salunkhe D.K., Kadam S.S., (Ed.), CRC Press, Boca Raton, Florida, EEUU, 165-176.
- Gibson D.M., Ullah A.B.J. 1990. Phytases and their action on phytic acid. En: Inositol Metabolism in Plants, Morre, Biss, Loewus (Ed.), Wiley-Liss, NY, EEUU, 77-92.
- Giri A.P., Harsulkar A.M., Deshpande V.V., Sainani M.N., Gupta V.S., Ranjekar P.K. 1998. Chickpea defensive proteinase inhibitors can be inactivated by podborer gut proteinases. *Plant Physiol.*, 116(1): 393-401.
- Goldstein I.J., Porezt R.D., 1986. Isolation and chemical properties of lectins. En: The lectins: Properties, Functions and Applications in Biology and Medicine. Liener I.E., Sharon N., Goldstein I.J. (Ed.), Academic Press, N Y, EEUU.
- Golenser J., Miller J., Spira D.T., Navok T., Chevion M. 1983. Inhibitory effect of a fava bean component on the in vitro development of *Plasmodium falciparum* in normal and glucose-6-phosphate dehydrogenase deficient erythrocytes. *Blood*, 61(3): 507-510.
- Goodchild A.V., El Haremein F.J., Makkar H.P.S., El Monein A.A., Williams P.C. 1997. 18th International Conference on Near-Infrared Spectroscopy, 15-19 Septiembre. Haus der Technik, Essen, Abstracts 37.
- Goodlad J.S., Mathers J.C. 1990. Large bowel fermentation in rats given diets containing raw peas (*Pisum sativum*). *Br. J. Nutr.*, 64: 569-587.
- Goodlad J.S., Mathers J.C. 1992. Digestion of complex carbohydrates and large bowel fermentation in rats fed on raw and cooked peas (*Pisum sativum*). *Br J. Nutr.*, 67:475-488.
- Górecki R.J., Brenac P., Clapham W.M., Willcott J.B., Obendorf R.L. 1996. Soluble carbohydrates in white lupin seeds matured at 13 and 28°C. *Seed physiology, production and technology. Crop Sci.*, 36: 1277-1282.
- Górecki R.J. 2000. Seed physiology and biochemistry. En: Carbohydrates in Grain Legumes Seeds, Improving Nutritional Quality and Agronomic Characteristics, Hedley C.L. (Ed.), CABI Publishing, Norwich, UK, 117-138.
- Gorospe M.J., Vidal-Valverde C., Frías J. 1992. The effect of processing on phytic acid content of lentils. 1^{re} Conference Europeenne Sur Les Proteagineux, Angers, 425-426.
- Graf E., Dintzis F.R. 1982. Determination of phytic acid in foods by high-performance liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.*, 30: 1094-1097.
- Graf E., Empson K.L., Eaton J.W. 1987. Phytic acid. A natural food antioxidant. *J. Biol. Chem.*, 262: 11647-11650.
- Graf E., Eaton J.W. 1993. Suppression of colonic cancer by dietary phytic acid. *Nutr. Cancer*, 19: 11-19.
- Graf M., Frei B., Winterhalter K.H., Richter C. 1985. Divicine induces calcium release from rat liver mitochondria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 129(1): 18-25.
- Granito M., Champ M., David A., Bonnet C., Guerra M. 2001. Identification of gas-producing components in different varieties of *Phaseolus vulgaris* by in vitro fermentation. *J. Sci. Food Agric.*, 81: 543-550.
- Grant G. 1989. Anti-nutritional effects of soyabean: a review. *Progress in Food and Nutrition Science*, 13: 317-348.
- Grant G., Van Driessche E. 1993. Legume lectins: physicochemical and nutritional properties. En: Recent advances of research in antinutritional factors in legume seeds: Proceeding of the 2nd International Workshop on Antinutritional Factors in Legume Seeds. van der Poel AFB, Huisman J., Saini HS (Ed.), EAAP publication, Wageningen, The Netherlands.

- Grant G., Dorward P., Pusztai A. 1993. Pancreatic enlargement is evident in rats fed diets containing soybean (*G max*) or cowpea (*V unguiculate*) for 800 days but not in those given diets based on kidney bean (*P vulgaris*) or lupin seed (*L angustifolius*). *J. Nutr.*, 123: 2207-2215.
- Green D.G., Sudia T.W. 1969. Germination and seedling development of soybeans in a carbon dioxide-deficient atmosphere. *Amer. J. Bot.*, 56(9): 1018-1022.
- Greenwood J.S., Bewley J.D. 1984. Subcellular distribution of phytin in the endosperm of developing castor bean: a possibility for its synthesis in the cytoplasm prior to deposition within protein bodies. *Planta* 160: 113-120.
- Greiner R., Konietzny U. 1997. Phytate hydrolysis in black beans by endogeneous and exogeneous enzymes. En: *Effects of Antinutrients on the nutritional value of legume diets. Proceedings of the Fourth Scientific Workshop.* Bardocz S., Muzquiz M., Pusztai A. (Ed.), Madrid, España.
- Greiner R., Konietzny U. 1998. Endogenous phytate-degrading enzymes are responsible for phytate reduction while preparing beans (*Phaseolus vulgaris*). *J. Food Processing Preservation*, 29: 321-331.
- Greiner R., Pedrosa M.M., Muzquiz M., Ayet C., Cuadrado C., Burbano C. 1998. Effect of germination on phytate content and phytase activity in legumes. En: *3rd European Conference on Grain legumes, Valladolid, España*, 82-83.
- Greiner R., Muzquiz M., Burbano C., Cuadrado C., Pedrosa M.M., Goyoaga C. 2001. Purification and characterization of a phytate-degrading enzyme from germinated faba beans (*Vicia faba* var. Alameda). *J. Agric. Food Chem.*, 49: 2234-2240.
- Greiner R., Larsson-Alminger M., Carlsson N-G., Muzquiz M., Burbano C., Cuadrado C., Pedrosa M.M., Goyoaga C. 2002. Pathway of dephosphorylation of myo-inositol hexakisphosphate by phytases of legume seeds. *J. Agric. Food Chem.*, 50(23): 6865-6870.
- Grela E.R., Studziński T., Matras J. 2001. Antinutrients factors in seeds of *Lathyrus sativus* cultivated in Poland. *Lathyrus Lathyrism Newsletter*, 2: 101-104.
- Griffith T, Conn E.E. 1973. Biosynthesis of 3,4-dihydroxyphenylalanine in *Vicia faba*. *Phytochem.*, 12: 1651-1656.
- Griffiths D.W., Jones D.I.H. 1977. Variation in the tannin, phytate and protease inhibitor activity of field beans (*Vicia faba*).
- Griffiths D.W. 1979. The inhibition of digestive enzymes by extracts of field bean (*Vicia faba*). *J. Sci. Agric.*, 458-462.
- Griffiths D.W., Moseley G. 1980. The effect of diets containing field beans of high or low polyphenolic content on the activity of digestive enzymes in the intestines of rats. *J. Sci. Food Agric.*, 31: 255-259.
- Griffiths D.W. 1981. The polyphenolic content and enzyme inhibitory activity of testas from bean (*Vicia faba*) and pea (*Pisum spp.*) varieties.
- Griffiths D.W., Thomas T.A. 1981. Phytate and total phosphorus content of field beans (*Vicia faba* L.). *J. Sci. Food Agric.*, 32: 187-192.
- Griffiths D.W. 1984a. An assessment of the potential for improving the nutritive value of field beans (*Vicia faba*) - a progress report. En: *Vicia faba: Agronomy, Physiology and Breeding.* Hebblethwaite P.D., Dawkins T.C.K., Heath M.C., Lockwood G. (Ed.), The Netherlands, 271-278.
- Griffiths D.W. 1984b. The trypsin and chymotrypsin inhibitor activities of various pea (*Pisum spp.*) and field bean (*Vicia faba*) cultivars. *J. Sci. Food Agric.*, 35: 481-486.
- Griffiths W., Ramsay G. 1992a. The concentration of vicine and convicine in *Vicia faba* and some related species and their distribution within mature seeds. *J. Sci. Food Agric.*, 59: 463-468.
- Griffiths W., Ramsay G. 1992b. The distribution of vicine and convicine within seeds of *Vicia faba* and related species. 1^{re} Conference Europeenne Sur Les Proteagineux, Angers, 155-156.
- Griffiths W., Ramsay G. 1996. The distribution of pyrimidinone glucosides in developing seedlings of *Vicia faba* and *Vicia narbonensis*. *J. Sci. Food Agric.*, 72: 469-475.

-
- Grizard D., Barthelemy C. 1999. Non-digestible oligosaccharides used as prebiotic agents: mode of production and beneficial effects on animal and human health. *Reprod. Nutr. Dev.*, 39: 563-588.
- Groot S.P.C., Soeda Y., Stoopen G., Konings M.C.J.M. Van der Geest A.H.M. 2003. Gene expression during loss and regaining of stress tolerance at seed priming and drying. En: *The Biology of Seeds: Recent Research Advance. Proceedings of the Seventh International Workshop on Seeds*, Salamanca, Spain 2002. Nicolás G., Bradford K.J., Como D., Pritchard H.W. (Ed.), CAB International Publishing, 279-287.
- Guardiola J.L., Sutcliffe J.F. 1971. Mobilization of phosphorus in the cotyledons of young seedlings of the garden pea (*Pisum sativum* L.). *Ann. Bot.*, 35(142): 809-823.
- Guggenheim M. 1913. Dioxypheylalanine, a new amino acid from *Vicia faba*. *Z. Physiol. Chem.*, 88: 276-284.
- Guillon F., Champ M. M.-J. 2002. Carbohydrate fractions of legumes: uses in human nutrition and potential for health. *British Journal of Nutrition*, 88(3): S293-S306.
- Gulewicz P., Ciesiolka D., Frías J., Vidal-Valverde C., Frejnagel S., Trojanowska K., Gulewicz K. 2000. Simple method of isolation and purification of α -galactosides from legumes. *J. Agric. Food Chem.*, 48: 3120-3123.
- Gupta P., Dhawan K., Malhotra S., Singh R. 2000. Purification and characterization of trypsin inhibitor from seeds of faba bean (*Vicia faba* L.). *Acta physiol. plant.*, 22(4): 433-438.
- Gutiérrez N., Duc G., Marget P., Ávila C.M., Suso M.J., Cubero J.I., Moreno M.T., Torres A.M. 2004. Identification of molecular markers tightly linked to low tannin and vicine-convicine content in faba beans. En: *Recent Advances of Research in Antinutritional Factors in Legume Seeds and Oilseeds: Proceeding of the 4th International Workshop on Antinutritional Factors in Legume Seeds and Oilseeds*. Muzquiz M., Hill G.D., Cuadrado C., Pedrosa M.M., Burbano C. (Ed.), EAAP publication, Wageningen, The Netherlands, 287-290.
- Haddad J., Allaf K. 2004. Reduction of antinutritional factors of soybean and rapeseed by processing: description of the process and effectiveness evaluation. En: *5th European Conference on Grain Legumes, Abstracts of posters n° 71*.
- Hajós G., Gelencsér E., Pusztai A., Grant G., Sakhri M., Bardocz S. 1995. Biological effects and survival of trypsin inhibitors and the agglutinin from soya bean in the small intestine of the rat. *J. Agric. Food Chem.*, 43: 165-170.
- Hanelt P. 1972. Die infraspezifische Variabilität von *Vicia faba* und ihre Gliederung. *Kulturpflanze*, 20: 276-284.
- Harland B.F., Oberleas D. 1977. A modified method for phytate analysis using an ion-exchange procedure: Application to textured vegetable proteins. *Cereal Chem.*, 54: 827-832.
- Harland B.F., Oberleas D. 1986. Anion-exchange method for determination of phytate in food: collaborative study. *J. AOAC*, 69: 667-677.
- Harley S.M., Beevers L. 1989. Coated vesicles are involved in the transport of storage proteins during seed development in *Pisum sativum* L. *Plant. Physiol.*, 91: 674-678.
- Hedemann M.S., Welham T., Boisen S., Canibe N., Bilham L., Domoney C. 1999. Studies on the biological responses of rats to seed trypsin inhibitors using near-isogenic lines of *Pisum sativum* L (pea). *J. Sci. Food Agric.*, 79: 1-7.
- Hegazy M.I., Marquardt R.R. 1983. Development of a simple procedure for complete extraction of vicine and convicine from fababeans (*Vicia faba* L.). *J. Sci. Food Agric.*, 34:100-108.
- Heger J., Frydrych Z. 1989. Efficiency of utilization of amino acids. En: *Absorption and utilization of amino acids*, Friedman M. (Ed.), CRC Press, Boca Raton, Florida EEUU, 31-68.
- Herman E.M., Shannon L.M. 1985. Accumulation and subcellular localization of α -galactosidase-hemagglutinin in developing soybean cotyledons. *Plant Physiol.*, 77: 886-890.

-
- Hernández-Infante M., Sousa V., Montalvo I., Tena E. 1998. Impact of microwave heating on hemagglutinins, trypsin inhibitors and protein quality of selected legume seeds. *Plant Foods Hum. Nutr.*, 52: 199-208.
- Heubner W., Stadler H. 1914. Determination of phytin by titration. *Biochem. Z.*, 64:422.
- Higazi M.I., Read W.W.C. 1974. A method for determination of vicine in plant material and in blood. *Agric. Food Chem.*, 22: 570-571.
- Ho K. Y., Huang J.S., Tsai C.C., Lin T.C., Hsu Y.F., Lin C.C. 1999. Antioxidant activity of tannin components from *Vaccinium vitis-idaea* L. *J. Pharm. Pharmacol.*, 51: 1075-1078.
- Hobday S.M., Thurman D.A., Barber D.J. 1973. Proteolytic and trypsin inhibitory activities in extracts of germinating *Pisum sativum* seeds. *Phytochem.*, 12: 1041-1046.
- Hoch G., Peterbauer T., Richter A. 1999. Purification and characterization of stachyose synthase from lentil (*Lens culinaris*) seeds: galactopinitol and stachyose synthesis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 366: 75-81.
- Honke J., Kozłowska H., Vidal-Valverde C., Frias J., Górecki R. 1998. Changes in quantities of inositol phosphates during maturation and germination of legumes seeds. *Z. Lebensmittel Unters Forsch A.*, 206: 279-283.
- Hör M., Rimpler H., Heinrich M. 1995. Inhibition of intestinal chloride secretion by proanthocyanidins from *Guazuma ulmifolia*. *Plant Med.*, 61: 208-212.
- Horbowicz M., Oberdorf L. 1994. Seed desiccation tolerance and storability: dependence on flatulence-producing oligosaccharides and cyclitols – review and survey. *Seed Science Research*, 4: 385-405.
- Horisberger M., Tacchini-Vonlanthen M. 1983. Ultrastructural localization of Bowman-Birk inhibitor on thin sections of *Glycine max* (soybean) cv. Maple Arrow by the gold method. *Histochemistry*, 77: 313-321.
- Hsu S.H., Hadley H.H., Hymowitz T. 1973. Changes in carbohydrates contents of germinating soybean seeds. *Crop Science*, 13: 407-410.
- Hussein L.A. 1982. Antinutritional factors in faba beans. En: *Faba Bean Improvement*. Vol. 6. Hawtin G.Y., Webb C. (Ed.), ICARDA. ISBN, Netherlands, 333-341.
- ISTA. 1999. The germination test. International Seed Testing Association - International Rules for Seed Testing.
- Iverson J.L., Bueno M.P. 1981. Evaluation of high pressure liquid chromatography and gas-liquid chromatography for quantitative determination of sugars in foods. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 64(1): 139-143.
- Iyer V., Kadam S.S., Salunkhe D.K. 1989. Cooking. En: Salunkhe, D.K., Kadam, S.S., (Ed.). *Handbook of World Food Legumes: Nutritional Chemistry, Processing Technology, and Utilization*. Vol. III. CRC Press, Boca Raton, Florida, EEUU, 141-163.
- Jaffé W.G. 1980. Hemagglutinins (Lectins). En: *Toxic constituents of plant foodstuffs*, Liener I.E. (Ed.), Academic Press, 73-103.
- Jacobs L. 1986. *Dietary Fiber: Basic and Clinic Aspects*, Vahouny G. y Kritchevsky D (Ed.), Plenum Press, NY, EEUU, 211-228.
- Jamalian J., Bassiri A. 1978. Variation in vicine concentration during pod development in broad beans (*Vicia faba* L.). *Agric. Food Chem.*, 26: 1454-1456.
- Jamalian J. 1999. Removal of favism-inducing factors vicine and convicine and the associated effects on the protein content and digestibility of fababeans (*Vicia faba* L.). *J. Sci. Food Agric.*, 79: 1909-1914.
- Jansman A.J.M., Frolich A.A., Marquardt R.R. 1994. Production of proline-rich proteins by the parotid glands of rats is enhanced by feeding diets containing tannins from faba beans (*Vicia faba* L.). *J. Nutr.*, 124: 249-258.
- Janzen D.H., Ryan C.A., Liener I.E., Pearce G. 1986. Potentially defensive proteins in mature seeds of 59 species of tropical leguminosae. *J. Chem. Ecology*, 12(6): 1469-1480.
- Jaya T.V. Venkataraman L.V. 1981. Changes in the carbohydrate constituents of chickpea and greengram during germination. *Food Chem.*, 7: 95-104.

- Jenkins D.J.A., Wolever T.M.S., Jenkins A.L., Thompson L.U., Rao A.V., Francis T. 1986. The glycemic index: Blood glucose response to foods. En: The glycemic index: Blood glucose response to foods, Vahouny G.V., Kritchevsky D. (Ed.), Alan R. Liss, N Y, EEUU, 167.
- Jiménez-Martínez C., Pedrosa M.M., Muzquiz M., Dávila-Ortiz G. 2004. Elimination of quinolizidine alkaloids, α -galactosides and phenolic compounds from *Lupinus campestris* seed by aqueous, acid and alkaline thermal treatment. En: Recent Advances of Research in Antinutritional Factors in Legume Seeds and Oilseeds: Proceeding of the fourth international workshop on antinutritional factors in legume seeds and oilseeds. Muzquiz M., Hill G.D., Cuadrado C., Pedrosa M.M., Burbano C. (Ed.), EAAP publication, Wageningen, The Netherlands, 345-348.
- Johansen H.N., Glioto V., Knudsen K.E.B. 1996. Influence of extraction solvent and temperature on the quantitative determination of oligosaccharides from plant materials by HPLC. J. Agric. Food Chem., 44: 1470-1474.
- Jood S., Mehta U., Singh R., Bhat C.M. 1985. Effect of processing of flatulence-producing factors in legumes. J. Agric. Food Chem., 33: 268-271.
- Jovanovic S., Steenken S., Simic M.G., Hara Y. 1998. Antioxidant properties of flavonoids: reduction potentials and electron transfer reactions of flavonoid radicals. En: Flavonoids in Health and Disease. Rice-Evans C., Packer L. (Ed.). Marcel Dekker, N Y, EEUU, 137-161.
- Juste J.A. 1992. Las legumbres en la historia. En: Legumbres, Aguilar S.A. de Ediciones, Madrid, España, 9-21.
- Kadam S.S., Deshpande S.S., Jambhale N.D. 1989a. Seed structure and composition. En: Handbook of World Food Legumes: Nutritional Chemistry, Processing Technology, and Utilitation. Vol. I. Salunkhe, D.K., Kadam, S.S. (Ed.), CRC Press, Boca Raton, Florida, EEUU, 23-50.
- Kadam S.S., Jadhav S.J., Salunkhe D.K. 1989b. Other antinutritional factors. En: Handbook of World Food Legumes: Nutritional Chemistry, Processing Technology, and Utilitation. Vol. I. Salunkhe, D.K., Kadam, S.S. (Ed.), CRC Press, Boca Raton, Florida, EEUU, 189-193.
- Kadam S.S., Salunkhe D.K. 1989. Milling. En: Handbook of World Food Legumes: Nutritional Chemistry, Processing Technology, and Utilitation. Vol. III. Salunkhe, D.K., Kadam, S.S., (Ed.). CRC Press, Boca Raton, Florida, EEUU, 121-131.
- Kadlec P., Rubecová A., Réblová Z., Starhová H., Bubník Z. 2000. Influence of germination on the carbohydrate composition of pea. Czech J. Food Sci., 18: 9-13.
- Kadlec P., 2000. Carbohydrate chemistry. En: Carbohydrates in Grain Legumes Seeds, Improving Nutritional Quality and Agronomic Characteristics, Hedley C.L. (Ed.), CABI Publishing, Norwich, UK, 15-59.
- Kadlec P., Rubecová A., Hinkova A., Kaasova J., Bubnik Z., Pour V. 2001. Processing of yellow pea by germination, microwave treatment and drying. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 2(2): 133-137.
- Kadlec P., Dostalova J., Zatopkova M., Houska M., Strohalm J. 2004. The shelf life of germinated grain legume seeds treated by high pressure. En: 5th European Conference on Grain Legumes, Abstracts of posters n° 73.
- Kamalakkanan V., Sathyamoorthy A.V., Motlag D.B. 1981. Studies on black gram (*Vigna mungo*) trypsin inhibitor. J. Sci. Food Agric., 32: 1172-1176.
- Kantar F., Pilbeam C.J., Hebblethwaite. 1996. Effect of tannin content of faba bean (*Vicia faba*) seed on seed vigour, germination and field emergence. Ann. Appl. Biol., 128: 85-93.
- Kakade M.L., Evans R.J. 1966. Effect of soaking and germination on the nutritive value of navy beans. J Food Sci., 31: 781-783.
- Kakade M.L., Rackis J.J., McGhee J.E., Puski G. 1974. Determination of trypsin inhibitor activity of soy products: a collaborative analysis of an improved procedure. American Association of Cereal Chem., 51: 376-382.
- Karoutis A.I., Tyler R.T. 1992. Analysis of legume oligosaccharides by high-resolution gas chromatography. J. Chrom., 623: 186-190.

-
- Kaur M., Kawatra B.L. 2000. Effect of domestic processing on flatus producing factors in ricebean (*Vigna umbellata*). *Nahrung* 44(6): 447-450.
- Kawamura S. 1967. Quantitative paper chromatography of sugars of the cotyledon, hull, and hypocotyl of soybeans of selected varieties. *Tech. Bull. Fac. Agr. Kagawa Univ.*, 18(2): 117-130.
- Kawamura S., Nagao K., Kasal T. 1977. Determination of free monosaccharides and detection of sugar alcohols in mature soybean seeds. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 23: 249-255.
- Kempster P.A., Bogetic Z., Secombe J.W., Martin H.D., Balazs N.D.H., Wahlqvist M.L. 1993. Motor effects of broad beans (*Vicia faba*) in Parkinson's disease: single dose studies. *Asian Pacific J. Clin. Nutr.*, 2: 85-89.
- Kenedy I.R., Mwandemele O.D., McWhirter K.S. 1985. Estimation of sucrose, raffinose and stachyose in soybean seeds. *Food Chem.*, 17: 85-93.
- Kennedy A.R. 1998. The Bowman-Birk inhibitor from soybeans as an anticarcinogenic agent. *Am. J. Clin. Nutr.*, 68 (Suppl):1406S-1412S.
- Khaleque A., Elias L.G., Braham J.E., Bressani R. 1985. Studies on the development of infant foods from plant protein sources. Part I. Effect of germination of chickpea (*Cicer arietinum*) on the nutritive value and digestibility of proteins. *Arch. Latinoam. Nutr.*, 35(2): 315-325.
- Khalil A.H., Mansour E.H. 1995. The effect of cooking, autoclaving and germination on the nutritional quality of faba beans. *Food Chem.*, 54: 177-182.
- Khokhar S., Chauhan B.M. 1986. Antinutritional factors in moth bean (*Vigna aconitifolia*): varietal differences and effects of methods of domestic processing and cooking. *J. Food Sci.*, 591-594.
- Khokhar S., Frias J., Price K.R., Fenwick G.R., Hedley C.L. 1996. Physico-chemical characteristics of khesari dhal (*Lathyrus sativus*): Changes in α -galactosides, monosaccharides and disaccharides during food processing. *J. Sci. Food Agric.*, 70: 487-492.
- Kim S-I., Hoehm E., Eskin N.H.M., Ismail F. 1982a. A simple and rapid colorimetric method for determination of vicine and convicine. *J. Agric. Food Chem.*, 30: 144.
- Kim Y.S., Tsao D., Morita A., Bella A. 1982b. Effect of sodium butyrate on three human colorectal adenocarcinoma cell lines in culture. En: *Colonic Carcinogenesis*, Malt R.A., Williamson R.C.N. (Ed.), MTP Press, Ltd., Lancaster, Inglaterra, 317-323.
- Kirakosyan A., Kaufman P.B., Duke J.A., Warber S., Bolling S. 2004. The production of L-dopa and isoflavones in seeds and seedlings of different cultivars of *Vicia faba* L. (fava bean). *Evidence-Based Integrative Medicine*, 1(2): 131-135.
- Knuckles B.E., Kuzmicky D.D., Betschart, A. A. 1982. HPLC analysis of phytic acid in selected foods and biological samples. *J. Food Sci.*, 49: 1267-1268.
- Knuckles B.E., y Betschart A.A.1987. Effect of phytate and other myoinositol phosphate esteres on α -amylase digestion of starch. *J. Food Sci.*, 52(3): 719-721.
- Knudsen I.M.1986. High-performance liquid chromatographic determination of oligosaccharides in leguminous seeds. *J. Sci. Food Agric.*, 37: 560-566.
- Kocourek J., Horejsi V. 1981. Defining a lectin. *Nature*, 290: 188.
- Koizumi K., Utamura T., Okada Y. 1985. Analyses of homogeneous D-gluco-oligosaccharides and polysaccharides (degree of polymerization up to about 35) by high-performance liquid chromatography and thin-layer chromatography. *J. Chrom.*, 321: 145-157.
- Konietzny U., Greiner R. 2003. Nutritional impact. *Phytic Acid*. Elsevier Science Ltd., 4555-4563.
- Kosower N.S., Kosower E.M. 1967. Does 3,4-Dihydroxyphenylalanine play a part in favism?. *Nature*, 215: 285-286.
- Kosson R. 1992. Determination of raffinose-type sugars in seeds of leguminous plants by high-pressure liquid chromatography (HPLC). *Roczn. Pzh.*, XLIII(2): 179-185.
- Koster K.L., Leopold A.C. 1988. Sugars and desiccation tolerance in seeds. *Plant Physiol.*, 88: 829-832.

-
- Kumar K.G., Venkataraman L.V. 1978. Chickpea seed proteins: modification during germination. *Phytochem.*, 17: 605-609.
- Kuo T.M., VanMiddlesworth J.F., Wolf W.J. 1988. Content of raffinose oligosaccharides and sucrose in various plant seeds. *J. Agric. Food Chem.*, 36: 32-36.
- Kute L.S., Kadam S.S. y Salunkhe D. K. 1984. Changes in sugars, starch and trypsin inhibitor activity in winged bean (*Psophocarpus tetragonolobus* L.DC) during seed development. *J. Food Sci.*, 49: 314-315.
- Kyriakidis N.B., Galiotou-Panayotou M., Stavropoulou A., Athanasopoulos P. 1998. Increase in phytase activity and decrease in phytate during germination of four common legumes. *Biotechnology Letters*, 20(5): 475-478.
- Labaneiah M.E.O., Luh B.S. 1981. Changes of starch, crude fiber, and oligosaccharides in germinating dry beans. *Cereal Chem.*, 58(2): 135-138.
- Lahuta L.B., Górecki R.J., Michalczyk D., Piotrowicz-Cieslak A.I. 2000a. Alpha-D-galactosidase activity in stored yellow lupin (*Lupinus luteus* L.) seeds. *Electronic Journal of Polish Agricultural Universities, Agronomy*, 3(1).
- Lahuta L.B., Login A., Rejowski A., Socha A., Zalewski K. 2000b. Influence of water deficit on the accumulation of sugars in developing field bean (*Vicia faba* var. minor) seeds. *Seed Sci. Technol.*, 28: 93-100.
- Lam J-M, Pwee K.H., Sun W.Q., Chua Y.L., Wang X.J. 1999. Enzyme stabilizing activity of seed trypsin inhibitors during desiccation. *Plant Sci.*, 142: 209-218.
- Lattanzio V., Bianco V., Lafiandra D. 1982. High-performance reversed-phase liquid chromatography (HPLC) of favism-inducing factors in *Vicia faba* L. *Experientia*, 38: 789-790.
- Lattanzio V., Bianco V.V., Miccolis V., Linsalata. 1986. Mono- and oligosaccharides in fifteen *Vicia faba* L. cultivars. *Food Chem.*, 22: 17-25.
- Lee K., Abendroth, J. A. 1983. High performance liquid chromatographic determination of phytic acid in foods. *J. Food Sci.*, 48: 1344-1361.
- Lehele L., Tanner W. 1973. The function of *myo*-inositol in the biosynthesis of raffinose. Purification and characterization of galactinol:sucrose 6-galactosyltransferasa from *Vicia faba* seeds. *Eur. J. Biochem.*, 38: 103-110.
- Lehrfeld J. 1989. High-performance liquid chromatography analysis of phytic acid on a pH-stable, macroporous polymer column. *Cereal Chem.*, 66: 610-616.
- Lehrfeld J., Morris E.R. 1992. Overestimation of phytic acid in foods by the AOAC anion-exchange method. *J. Agric. Food Chem.*, 40: 2208-2210.
- Lehrfeld J. 1994. HPLC Separation and quantification of phytic acid and some inositol phosphates in foods: problems and solutions *J. Agric. Food Chem.*, 42: 2726-2731.
- Li S., Sauer W.C., Huang S., Hardin R.T. 1998. Response of pancreatic secretions to feeding diets with low and high levels of soybean trypsin inhibitors in growing pigs. *J. Sci. Food Agric.*, 76: 347-356.
- Lineback D.R., Ke C.H. 1975. Starches and low-molecular-weight carbohydrates from chick pea and horse bean flours. *American Association of Cereal Chemists*, 334-347.
- Liener I.E., Kakade M.L. 1980. Protease inhibitors. En: *Toxic Constituents of plant foodstuffs*. Liener I.E. (Ed.). Academic Press, N Y, EEUU, 7-57.
- Liener I.E. 1989. Antinutritional factors. En: *Legumes: Chemistry, Technology, and Human Nutrition*. Matthews R.H. (Ed.), Marcel Dekker, N Y, EEUU, 339-370.
- Lis H., Sharon N. 1986. Lectins as molecules and as a tool. *Ann. Rev. Biochem.*, 66: 36-67.
- Liu Y., Shu C., Lamb J.D. 1997. High-performance capillary electrophoretic separation of carbohydrates with indirect UV detection using diethylamine and borate as electrolyte additives. *J. Cap. Elec.*, 4(3): 97-103.
- Loewus F.A., Murthy P.P.N. 2000. *Myo*-Inositol metabolism in plants. *Plant Sci.*, 150: 1-19.
- Lolas G.M., Markakis, P. 1975. Phytic acid and other phosphorous compounds of beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *J. Agr. Food Chem.*, 23: 13-16.

-
- Lolas G.M., Markakis, P. 1977. The phytase of navy beans (*Phaseolus vulgaris*). J. Food Sci., 42: 1094-1097.
- Longo R., Castellani A., Sberze P., Tibolla M. 1974. Distribution of L-DOPA and related amino acids in *Vicia*. Phytochem., 13: 167-171.
- Lönnerdal B., Sandberg A. S., Sandström B., Kunz C. 1989. Inhibitory effects of phytic acid and other inositol phosphates on zinc and calcium absorption in suckling rats. J. Nutr., 119: 211-214.
- Lott J.N.A., Buttrose M.S. 1977. Globoids in protein bodies of legume seed cotyledons. Aust. J. Plant Physiol., 5: 89-111.
- Lowell C.A., Kuo T.M. 1989. Oligosaccharide metabolism and accumulation in developing soybean seeds. Crop Sci., 29: 459-465.
- Machaiah J.P., Pednekar M.D., Thomas P. 1999. Reduction in flatulence factors in mung beans (*Vigna radiata*) using low-dose γ -irradiation. J. Sci. Food Agric., 79: 648-652.
- Madore M.A. 1995. Catabolism of raffinose family oligosaccharides by vegetative sink tissues. En: Carbon Partitioning and Source-Sink Interactions in Plants, Madore M.A., Lucas W.L.(Ed.), American Society of Plant Physiologists, EEUU, 204-214.
- Maga J.A. 1982. Phytate: its chemistry, occurrence, food interactions, nutritional significance, and methods of analysis. J. Agric. Food Chem., 30(1): 1-9.
- Mager J., Chevion M., Glaser G. 1980. Favism. En: Toxic constituents of plant foodstuffs. Liener I.E. (Ed.) Academic Press, Londres, GB, 265-288.
- Maggi N., Cometti A. 1972. Colorimetric assay of levodopa. Journal of Pharmaceutical Sciences, 61(6): 924-927.
- Makkar H.P.S., Dawra R.K., Singh B. 1987. Protein precipitation assay for quantitation of tannins: determination of protein in tannin-protein complex. Anal. Biochem., 166: 435-439.
- Makkar H.P.S., Becker K. 1993. Vanillin-HCl method for condensed tannins: effect of organic solvents used for extraction of tannins. J. Chem. Ecology, 19: 613-621.
- Mandal N.C., Burman S., Biswas B.B. 1972. Isolation, purification and characterization of phytase from germinating mung beans. Phytochem., 11: 495-502.
- Mansour E.H. 1996. Biological and chemical evaluation of chickpea seed proteins as affected by germination, extraction and α -amilase treatment. Plant Foods Human Nutr., 49: 271-282.
- M.A.P.A. 2003a. <http://www.mapya.es/estadistica/infoestad.html>. Evolución de las macromagnitudes agrarias 1990-2002. Evolución de las macromagnitudes agrarias nacionales. Anuario de Estadística Agroalimentaria.
- M.A.P.A. 2003b. <http://www.mapya.es/es/estadistica/pags/encuestacultivos/resultados.htm>. Encuesta sobre superficies y rendimientos de cultivos.
- M.A.P.A. 2003c. http://www.mapya.es/es/estadistica/Anu_01/indice.asp. Leguminosas grano. Superficies y Producciones de cultivos. Anuario de Estadística Agroalimentaria.
- Marquardt R.R., McKirdy J.A., Ward T., Campbell L.D. 1975. Amino acid, hemagglutinin and trypsin inhibitor levels, and proximate analyses of faba beans (*Vicia faba*) and faba bean fractions. Can. J. Anim. Sci., 55: 421-429.
- Marquardt R.R., Fröhlich A.A. 1981. Rapid reserved-phase high-performance liquid chromatographic method for the quantitation of vicine, convicine and related compounds. J. Chrom., 208: 373-379.
- Marquardt R.R. 1982. Favism. En: Faba bean improvement. Volumen 6. Hawtin G., Webb C. (Eds.), ICARDA, Netherlands, 343-353.
- Marquardt R.R. 1989. Vicine, convicina, and their aglycones - divicine and isouramil. En: Toxicants of Plant Origin: Glycosides. Volume II. Cheeke P.R (Ed.), CRC Press, Boca Raton, Florida, EEUU, 161-200.
- Mason V.C. 1984. Metabolism of nitrogenous compounds in the large intestine. Proc. Nutr. Soc., 43: 45-53.

-
- Matella N.J., Stoeckle A.W., Dolan K.D., Lee Y., Bennink M.R. 2004. Use of hydration, germination and alpha-galactosidase treatments to reduce oligosaccharide content in dry beans. Session 83E, Fruit & Vegetable Products: Processed vegetables, Nevada, EEUU.
- Mathers J.C. 1991. Digestion of non-starch polysaccharides by non-ruminant omnivores. Proc. Nutr. Soc., 50: 161-172.
- Matheson N.K., Saini H.S. 1977. Polysaccharide and oligosaccharide changes in germinating lupin cotyledons. Phytochem., 16: 59-66.
- Mathews C.K., Van Holde K.E. 1998. Metabolismo de los nucleótidos. Bioquímica. McGraw-Hill/Interamericana de España, pag 880.
- Mattheus S., Mila I., Scalbert A., Pollet B., Lapiere C., Hervé duPenhoat C.L.M., Rolando C., Donnelly D.M.X. 1997. Method for estimation of proanthocyanidins based on their acid depolymerization in the presence of nucleophiles. J. Agric. Food Chem., 45: 1195-1201.
- Mazur A., Bayle D., Lab C., Rock E., Rayssiguer Y. 1999. Inhibitory effect of procyanidin-rich extracts on LDL oxidation in vitro. Atherosclerosis, 145: 421-422.
- McGuinness E.E., Morgan R.G.H., Levison D.A., Frape D.L., Hopwood D., Wormsley K.G. 1980. The effects of long-term feeding of soya flour on the rat pancreas. Scand. J. Gastroent., 15: 497-502.
- McKay A.M. 1992. Hydrolysis of vicine and convicine from fababeans by microbial β -glucosidase enzymes. Journal of Applied Bacteriology, 72: 475-478.
- McMurrough L., McDowell J. 1978. Chromatographic separation and automated analysis of flavanols. J. Anal. Biochem, 91:92-100.
- Meletis J., Konstantopoulos K. 2004. Favism - from the "avoid fava beans" of Pythagoras to the present. Haema, 7(1): 17-21.
- Mercer L.P., Dodds S.J., Smith D.I. 1989. Dispensable, indispensable, and conditionally indispensable amino acid ratios in the diet. En: Absorption and utilization of amino acids. Friedman M. (Ed.), CRC Press, Boca Raton, Florida, EEUU, 1-14.
- Miller E.R. 1920. Dihydroxyphenylalanine, a constituent of the velvet bean. J. Biol. Chem., 44: 481-486.
- Minorsky P.V. 2003. The hot and the classic. Raffinose oligosaccharides. Plant Physiol., 131: 1159-1160.
- Modi A.T., McDonald M.B., Streeter J.G. 2000. Soluble carbohydrates in soybean seeds during development and imbibition. Seed Sci. Technol., 28: 115-127.
- Moneam N.M.A. 1990. Effects of presoaking of faba bean enzyme inhibitors and polyphenols after cooking. J. Agric. Food Chem., 38: 1479-1482.
- Moreno M.T. 1983. Las leguminosas de grano: una visión de conjunto. En: Leguminosas de grano. Cubero J.I., Moreno M.T (Ed.). Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, España, 15-34.
- Morris E.R., Hill A.D. 1996. Inositol phosphate content of selected dry beans, peas, and lentils, raw and cooked. J. Food Comp. Anal., 9: 2-12.
- Mossé J. 1990. Nitrogen to protein conversion factor for ten cereals and six legumes or oilseeds. A reappraisal of its definition and determination. Variation according to species and to seed protein content. J. Agric. Food Chem., 38: 18-24.
- Murdock L.L., Huesing J.E., Nielsen S.S., Pratt R.C., Shade R.E. 1990. Biological effects of plant lectins on the cowpea weevil. Phytochem., 29(1): 85-89.
- Muratova V. 1931. Common bean *Vicia faba*. Bull. Appl. Bot. Genet. Pl. Breed., Suppl. 50: 285.
- Muzquiz M., Rey C., Cuadrado C. 1992. Effect of germination on the oligosaccharide content of lupin species. J. Chrom., 607: 349-352.
- Muzquiz M., Burbano C., Ayet G., Pedrosa M.M., Cuadrado C. 1999. The investigation of antinutritional factors in *Phaseolus vulgaris*. Environmental and varietal differences. Biotechnol. Agron. Soc. Environ., 3(4): 210-216.

-
- Muzquiz M., Hill G.D., Cuadrado C., Pedrosa M.M., Burbano C. 2004. Recent Advances of Research in Antinutritional Factors in Legume Seeds and Oilseeds. EAAP publication, Wageningen, The Netherlands.
- Myhara R.M., Nilsson K., Skura B.J., Bowmer E.J., Cruickshank P.K. 1988. Gas production from melibiose, raffinose and white bean extracts by bacteria of human fecal origin. *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.*, 21: 245-250.
- Naivikul O., D'Appolonia B.L. 1978. Comparison of legume and wheat flour carbohydrates. I. Sugar analysis. *Cereal Chem.*, 55(6): 913-918.
- Narasinga Rao B.S., Prabhavathi T. 1982. Tannin content of foods commonly consumed in India and its influence on ionisable iron. *J. Sci. Food Agric.*, 33: 89-96.
- Narisawa T., Magadia N.E., Weisburger J.H. 1974. Promoting effect of bile acids on colon carcinogenesis after intrarectal instillation of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in rats. *J. Natl. Cancer Inst.*, 53(4): 1093-1097.
- Navon A., Bernays E.A. 1978. Inhibition of feeding in acridids by non-protein amino acids. *Comp. Biochem. Physiol.*, 59A: 161-164.
- Ndzondzi-Bokouango G., Bau H.M., Giannangeli F., Debry G. 1989. Chemical composition and nutritive value of faba bean. *Sci. Aliment.*, 9: 785-797.
- Niba L.L., Rose N. 2003. Effect of soaking solution concentration on resistant starch and oligosaccharides content of adzuki (*V. angularis*), fava (*V. faba*), lima (*P. lunatus*) and mung bean (*V. radiata* L.). *J. Food Sci.*, 1(1): 4-8.
- Nielsen S.S., Liener I.E. 1988. Effect of germination on trypsin inhibitor and hemagglutinating activities in *Phaseolus vulgaris*. *J. Food Sci.*, 53: 298-301.
- Nielsen S.S. 1991. Digestibility of legume proteins. *Food Technol.*, 9: 112-114, 118.
- Nieto R.M., Prieto C., Fernández-Figares I., Aguilera J.F. 1995. Effect of protein quality on energy metabolism in growing chicks. *Br. J. Nutr.*, 74: 163-172.
- Nnanna I.A., Phillips R.D. 1988. Changes in oligosaccharide content, enzyme activities and dry matter during controlled germination of cowpeas (*Vigna unguiculata*). *J. Food Sci.*, 53(6): 1782-1786.
- Nnanna I.A., Phillips R.D. 1990. Protein and starch digestibility and flatulence potential of germinated cowpeas (*Vigna unguiculata*). *J. Food Sci.*, 55: 151-153.
- Nolan K. B., Duffin P. A., McWeeny D. J. 1987. Effects of phytate on mineral bioavailability. In vitro studies on Mg^{2+} , Ca^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} and Zn^{2+} (also Cd^{2+}) solubilities in the presence of phytate. *J. Sci. Food Agric.*, 40: 3194-3200.
- Norioka N., Hara S., Ikenaka T., Abe J. 1988. Distribution of the Kunitz and the Bowman-Birk family proteinase inhibitors in leguminous seeds. *Agric. Biol. Chem.*, 52(5): 1245-1252.
- Norton G. 1991. Proteinase inhibitors. En: *Toxic Substances in Crop Plants*. D'Mello J.P.F. (Ed.). 68-106.
- Nowak J., Steinkraus K.H. 1988. Effect of tempeh fermentation of peas on their potential flatulence productivity as measured by gas production and growth of clostridium perfringens. *Nutrition Reports International*. 38(6): 1163-1171.
- NRC. 1995. *Nutrient Requirements of Laboratory Animals*. National Academy Press, Washington DC, EEUU.
- Oakenfull D.G., Topping D.L. 1983. Saponins and plasma cholesterol. *Atherosclerosis*, 48: 301-303.
- Obendorf R.L. 1997. Oligosaccharides and galactosyl cyclitols in seed desiccation tolerance. *Seed Science Research*, 7: 63-74.
- Oboh H.A., Muzquiz M., Burbano C., Cuadrado C., Pedrosa M.M., Ayet G., Osagie A.U. 1998. Anti-nutritional constituents of six underutilized legumes grown in Nigeria. *Journal of Chromatography A*, 823: 307-312.
- O'Dell B.L., de Boland A. 1976. Complexation of phytate with proteins and cations in corn and oilseed meals. *J. Agric. Food Chem.*, 24: 804-808.
- Odorcic S., Obendorf R.L. 2003. Galactosyl cyclitol accumulation enhanced by substrate feeding of soybean embryos. En: *The Biology of Seeds: Recent Research Advances*. Proceedings of the Seventh International Workshop

- on Seeds, Salamanca, Spain 2002. Nicolás G., Bradford K.J., Como D., Pritchard H.W. (Ed.), CAB International Publishing, 51-60.
- Ologhobo A.D., Fetuga B.L. 1984. Distribution of phosphorus and phytate in some nigerian varieties of legumes and some effects of processing. *J. Food Sci.*, 49: 199-201.
- Ologhobo A.D., Fetuga B.L. 1986. Changes in carbohydrates contents of germinating Cowpeas seeds. *Food Chem.*, 20: 117-125.
- Olsen H.S. y Andersen J.H. 1978. The estimation of vicine and convicine in fababeans (*Vicia faba* L.) and isolated fababeans proteins. *J. Sci. Food Agric.*, 29: 323-331.
- Opik H., Simon E.W. 1963. Water content and respiration rate of bean cotyledons. *Journal of Experimental Botany*, 14(41): 299-310.
- Owens F.N., Pettigrew J.E. 1989. Subdividing amino acid requirements into portions for maintenance and growth. En: Absorption and utilization of amino acids. Friedman (Ed.), CRC Press, Boca Raton, Florida, EEUU, 15-30.
- Pallauf J., Rimbach G. 1997. Nutritional significance of phytic acid and phytase. *Arch. Anim. Nutr.*, 50: 301-319.
- Palmer J.K. 1975. A versatile system for sugar analysis via liquid chromatography. *Anal. Letters*, 8(3): 215-224.
- Palmer R., McIntosh A., Pusztaí A. 1973. The nutritional evaluation of kidney beans (*Phaseolus vulgaris*). The effect of nutritional value of seed germination and changes in trypsin inhibitor content. *J. Sci. Food Agric.*, 24: 937-944.
- Pavlík M., Vánová M., Laudová V., Harmatha. 2002. Fungitoxicity of natural heterocycle glucoside vicine obtained from *Vicia faba* L. against selected microscopic filamentous fungi. *Rostlinná Výroba*, 48(12): 543-547.
- Pazur J.H., Shadaksharaswamy M., Meidell G.E. 1962. The metabolism of oligosaccharides in germinating soybeans, *Glycine max*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 99: 78-85.
- Pennycooke J.C., Michelle L.J., Stushnoff C. 2003. Down-regulating α -galactosidase enhances freezing tolerance in transgenic petunia. *Plant Physiol.*, 133: 901-909.
- Pérez S. y Torralba A. 1997. La fijación del Nitrógeno por los seres vivos. Seminario Fisiología Vegetal, 21.01. Facultad Biología Oviedo., 21.
- Periago M.J., Martínez M.C., Ros G., López G., Ortuño J., Rodrigo J., Rincón F. 1997. Influencia del inhibidor de la tripsina y del ácido fítico sobre la digestibilidad in vitro de la proteína en legumbres de la dieta mediterránea. *Alimentaria*, 113-117.
- Persson H., Türk M., Nyman M., Sandberg A.S. 1998. Binding of Cu^{2+} , Zn^{2+} , and Cd^{2+} to inositol tri-, tetra-, penta-, and hexaphosphates. *J. Agric. Food Chem.*, 46: 3194-3200.
- Phillippy B.Q., Bland J.M. 1988. Gradient ion chromatography of inositol phosphates. *Anal. Biochem.*, 175: 162-166.
- Piotrowicz-Cieslak A.I., Garcia Lopez P.M., Gulewicz K. 2003. Cyclitols, galactosyl cyclitols and raffinose family oligosaccharides in mexican wild lupin seeds. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 72(2): 109-114.
- Piotrowicz-Cieslak. 2004. Flatulence-producing galactosyl cyclitols D-chiro-inositol fraction in maturing yellow lupin seed. En: Recent Advances of Research in Antinutritional Factors in Legume Seeds and Oilseeds: Proceeding of the 4th international workshop on antinutritional factors in legume seeds and oilseeds. Muzquiz M., Hill G.D., Cuadrado C., Pedrosa M.M., Burbano C. (Ed.), EAAP publication, Wageningen, The Netherlands, 69-72.
- Pisulewska E., Pisulewski P.M. 2000. Trypsin inhibitor activity of legume seeds (peas, chickling vech, lentils, and soya beans) as affected by the technique of harvest. *Animal Feed Science and Technology*, 86: 261-265.
- Pitz W. J., Sosulski F.W. 1979. Determination of vicine and convicine in fababean cultivars by gas-liquid chromatography. *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.*, 12: 93-97.
- Pitz W. J., Sosulski F.W. y Hogge L.R. 1980. Occurrence of vicine and convicine in seeds of some *Vicia* species and others pulses. *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.*, 13(1): 35-39.
- Pitz W. J., Sosulski F.W. y Rowland G.G. 1981. Effect of genotype and environment of vicine and convicine levels in fababeans (*Vicia faba minor*). *J. Sci. Food Agric.*, 32: 1.

- Porter L.J., Hrstich L.N., Chan B.G. 1986. The conversion of procyanidin and prodelphinidins to cyanidin and delphinidin. *Phytochemistry*, 25: 223-230.
- Porzucek H., Duszkiewicz-Reinhard W., Piecyk M., Klepacka M., Gniewosz M. 2002. Changes of flatulence-causing sugars in legume protein samples by high hydrostatic pressure. *Food Sci. Technol.*, 5(2).
- Prakash D., Tewari S.K. 1999. Variation of L-Dopa contents in *Mucuna* species. *J. Med. Arom. Plant Sci.*, 21: 343-346.
- Price, K.R., Johnson, I.T., and Fenwick, G.R., 1987. The chemistry and biological significance of saponins in foods and feedingstuff. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 26: 27-131.
- Pritchard P.J., Dryburgh E.A., Wilson B.J. 1973. Carbohydrates of spring and winter field beans (*Vicia faba* L.). *J. Sci. Food Agr.*, 24: 663-668.
- Prodanov M., Sierra I., Vidal-Valverde C. 1997. Natural fermentation of lentils - influence of time, temperature and flour concentration on the kinetics of thiamin, riboflavin and niacin. *Z. Lebensm. Unters. Forsch. A.*, 205(6): 464-469.
- Pusztai A. 1972. Metabolism of trypsin-inhibitory proteins in the germinating seeds of kidney bean (*Phaseolus vulgaris*). *Planta*, 107: 121-129.
- Pusztai A., Grant G., Bardocz S., Baintner K., Gelencsér E., Ewen B. 1997. Both free and complexed trypsin inhibitors stimulate pancreatic secretion and change duodenal enzyme levels. *Am. J. Physiol.*, 272: G340-G350.
- Pusztai A., Grant G., Bardocz S., Martín-Cabrejas M.A. 2004. The mode of action of ANFs on the gastrointestinal tract and its microflora. En: *Recent Advances of Research in Antinutritional Factors in Legume Seeds and Oilseeds: Proceeding of the 4th International Workshop on Antinutritional Factors in Legume Seeds and Oilseeds*. Muzquiz M., Hill G.D., Cuadrado C., Pedrosa M.M., Burbano C. (Ed.), EAAP publication, Wageningen, The Netherlands, 87-100.
- Qiu J., Mosjidis J.A., Williams J.C. 1994. Seedling growth as affected by seed weight in common vetch. *Agron. J.*, 86: 245-251.
- Quemener B., Gueguen J., Mercier C. 1982. Determination of vicine and convicine in fababeans by high pressure liquid chromatography. *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.*, 15 (2):109-115.
- Quemener B., Brillouet J-M. 1983. Ciceritol, a pinitol digalactoside from seeds of chickpea, lentil and white lupin. *Phytochem.*, 22: 1745-1751.
- Quemener B. 1988. Improvements in the high-pressure liquid chromatographic determination of amino sugars and α -galactosides in faba bean, lupine, and pea. *J. Agric. Food Chem.* 36: 754-759.
- Rabey J.M., Vered Y., Shabtai H., Graff E., Harsat A., Korczyn A.D. 1993. Broad bean (*Vicia faba*) consumption and Parkinson's disease. *Advances in Neurology*, 60: 681-684..
- Rahma E.H., El-Bedawey A.A., El-Adawy T.A., Goma M.A. 1987. Changes in chemical and antinutritional factors and functional properties of faba beans during germination. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.*, 20(6): 271-276.
- Rahma E.H. 1988. Functional and electrophoretic characteristics of faba bean (*Vicia faba*) flour proteins as affected by germination. *Nahrung*, 32(6): 577-583.
- Ramsay G., Griffiths W., Dow N.D. 1991. Spontaneous and induced variation in levels of vicine and convicine in faba beans. *Aspects of Applied Biology*, 27: 43-47.
- Ramsay G., Griffiths W. 1996. Accumulation of vicine and convicine in *Vicia faba* and *V. narbonensis*. *Phytochem*, 42(1): 63-67.
- Randhir R., Shetty P., Shetty K. 2002. L-DOPA and total phenolic stimulation in dark germinated faba bean in response to peptide and phytochemical elicitors. *J. Food Sci. Technol.*, 30(6): 413-416.
- Randhir R., Lin Y-T., Shetty K. 2004. Phenolics, their antioxidant and antimicrobial activity in dark germinated fenugreek sprouts in response to peptide and phytochemical elicitors. *Asian Pacific J. Clin. Nutr.*, 13(3): 295-307.

-
- Rani N., Hira C.K. 1993. Effect of various treatments on nutritional quality of faba beans (*Vicia faba*). J. Food Sci. Technol., 30(6): 413-416.
- Rao P.U., Belavady B. 1978. Oligosaccharides in pulses: varietal differences and effects of cooking and germination. American Chemical Society, 26(2): 316-319.
- Rao P.U., Deosthale Y.G. 1982. Tannin content of pulses: varietal differences and effects of germination and cooking. J. Sci. Food Agric., 33: 1013-1016.
- Ravindran V., Bryden W.L., Kornegay E.T. 1995. Phytates: Occurrence, bioavailability and implications in poultry nutrition. Poultry and Avian Biology Reviews, 6(2): 125-143.
- Reddy N.R., Balakrishnan C.V. Salunkhe D.K. 1978. Phytate phosphorus and mineral changes during germination and cooking of black gram (*Phaseolus mungo*) seeds. J. Food Sci., 43: 540-543.
- Reddy N.R., Salunkhe D.K. 1980. Changes in oligosaccharides during germination and cooking of black gram and fermentation of black gram/rice blend. Cereal Chem., 57(5): 356-360.
- Reddy N.R., Sathe S.K., Salunkhe, D.K. 1982. Phytates in legumes and cereals. Adv. Food Res., 28: 1-92.
- Reddy N.R., Pierson M.D., Sathe S.K., Salunkhe D.K. 1984. Chemical, nutritional and physiological aspects of dry bean carbohydrates- a review. Food Chem., 13: 25-68.
- Reddy N.R., Sathe S.K., Pierson, M.D. 1988. Removal of phytate from great northern beans (*Phaseolus vulgaris* L.) and its combined density fraction. J. Food. Sci., 63: 107.
- Reddy N.R., Salunkhe, D.K. 1989. Fermentation. En: Handbook of World Food Legumes: Nutritional Chemistry, Processing Technology, and Utilitation. Vol. I. Salunkhe D.K., Kadam S.S. (Ed.), CRC Press, Boca Raton, Florida, EEUU, 177-218.
- Reddy N.R., Sathe S.K., Salunkhe, D.K. 1989. Phytates. En: Handbook of World Food Legumes: Nutritional Chemistry, Processing Technology, and Utilitation. Vol. I. Salunkhe D.K., Kadam S.S. (Ed.), CRC Press, Boca Raton, Florida, EEUU, 163-187.
- Reeck G.R., Kramer K.J., Baker J.E., Kanost M.R., Fabrick J.A., Behnke C.A. 1997. Proteinase inhibitors and resistance of transgenic plants to insects. En: Advances In Insect Control: The Role of Transgenic Plants, Carozzi N., Koziel M. (Ed.), Taylor y Francis, Londres, G.B., 157-183.
- Rémésy C., Demigné C., Moran C. 1992. Metabolism and utilisation of short-chain fatty acids produced by colonic fermentation. En: Dietary Fiber-a Component of Food. Schweizer T.F., Edwards C.A. (Ed.), Springer Verlag, 137-150.
- Revilleza M.J.R., Mendoza E.M.T., Raymundo L.C. 1990. Oligosaccharides in several Philippine indigenous food legumes: determination, localization and removal. Plant Foods for Human Nutrition, 40: 83-93.
- Rickard S.E., Thompson L.U. 1997. Interactions and biological effects of phytic acid. En: Antinutrients and Phytochemicals in Food. Capítulo 17: 294-312.
- Ricardo da Silva J.M., Darmon N., Fernández Y., Mitjavila S. 1991. Oxygen Free Radical Scavenger capacity in aqueous models of different procyanidins. J. Agric. Food Chem., 39: 1549-1552.
- Rocic B., Rocic S., Ashcroft S.J.H., Harrison D.E., Poje M. 1985. Diabetogenic action of alloxan-like compounds: the cytotoxic effect of dehydro-isouramil hydrochloride on the rat pancreatic β -cells. Diab. Croat., 14(3): 143-149.
- Rodríguez R. 2004. Proteínas de defensa vegetal. En: Reactividad cruzada en alergia a alimentos, Cisteró A., Enrique E. (Ed.), MRA ediciones, España, 93-104.
- Ross G.J.S. 1987. Maximum Likelihood Program.
- Ross G.J.S. 1990. Nonlinear estimation. Springer-Verlag, N Y, EEUU, 4-11.
- Rossi M., Germondari I., Casini P. 1984. Comparison of chickpea cultivars: chemical composition, nutritional evaluation, and oligosaccharide content. J. Agric. Food Chem., 32: 811-814.
- Roth E.F., Raventos-Suarez C., Rinaldi A., Nagel R.L. 1983. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency inhibits in vitro growth of *Plasmodium falciparum*. Prc. Natl. Acad. Sci., 80:298-299.

-
- Rubio L.A., Brenes A. 1988. Plasma mineral concentrations in growing chickens fed diets containing raw and autoclaved faba beans (*Vicia faba* L.) and faba bean fractions. *Nutrition Reports International*, 38: 609-619.
- Rubio L.A., Grant G., Bardocz S., Dewey P., Brown D., Pusztai A. 1991. Nutritional response of growing rats to faba beans (*Vicia faba*, minor) and faba bean fractions. *Br. J. Nutr.*, 66: 533-542.
- Rubio L.A., Grant G., Scislawski P.W.O., Brown D., Bardocz S., Pusztai A. 1995. The utilization of lupin (*Lupinus angustifolius*) and faba bean globulins by rats is poorer than of soybean globulins or lactalbumin but the nutritional value of lupin seed meal is lower only than that of lactalbumin. *American Institute of Nutrition*, 2145-2155.
- Rubio L.A., Grant G., Dewey P., Brown D., Annand M., Bardocz S., Pusztai A. 1998. Nutritional utilization by rats of chickpea (*Cicer arietinum*) meal and its isolated globulin proteins is poorer than that of defatted soybean or lactalbumin. *J. Nutr.*, 128: 1042-1047.
- Rubio L.A., Grant G., Daguid T., Brown D., Pusztai A. 1999. Organ relative weights and plasma amino acid concentrations in rats fed diets based in legume (faba bean, lupin, chickpea, soybean) seed meals or their fractions. *J. Sci. Food Agric.*, 79: 187-194.
- Rubio L.A. 2000. Physiological effects of legume storage proteins. *Nutr. Abs. Rev. Series A: Human and Experimental*, 70(6): 197-204.
- Rubio L.A. . 2002. Determination of diaminopimelic acid in rat feces by high-performance liquid chromatography using the Pico Tag method. *J Chromatography B*, 784: 125-129.
- Rubio L.A., Pedrosa M.M., Pérez A., Cuadrado C., Burbano C., Muzquiz M. 2005. Ileal digestibility of defatted soybean, lupin and chickpea seed meals in cannulated iberian pigs: II. Fatty acids and carbohydrates. *J. Sci. Food Agric.*, 85: 1322-1328.
- Ruiz-López M.A., García-López P.M., Castañeda-Vázquez H., Zamora N.J.F., Garzón-De la Mora P., Bañuelos Pineda J., Burbano C., Pedrosa M.M., Cuadrado C., Muzquiz M. 2000. Chemical composition and antinutrient content of three *lupinus* species from Jalisco, Mexico. *J. Food Composition and Analysis*, 13: 193-199.
- Rupérez P. 1998. Oligosaccharides in raw and processed legumes. *Z. Lebensm Unters Forsch A.*, 206: 130-133.
- Ryan C.A. 1983. Wound-regulated synthesis and compartmentation of proteinase inhibitors in plant leaves. En: *Structure and Function of Plant Genomes*, Ciferri O.Y., Dure D.H. (Ed.), 337-346.
- Saharan K., Khetarpaul N., Bishnoi S. 2002. Antinutrients and protein digestibility of fababean and ricebean as affected by soaking, dehulling and germination. *J. Food Sci. Technol.*, 39(4): 418-422.
- Saini H.S, Lymbery J. 1983. Soluble carbohydrates of developing lupin seeds. *Phytochem.*, 22 (6): 1367-1370.
- Saini H.S, Gladstones J.S. 1986. Variability in the total and component galactosyl sucrose oligosaccharides of *Lupinus* species. *Aust. J. Agric. Res.*, 37: 157-166.
- Saini H.S. 1988. Extractability and evaluation of α -galactosides of sucrose in leguminous seeds. *Food Chem.*, 28: 149-157.
- Saini H.S, Weder J.K.P., Knights E.J. 1992. Inhibitor activities of chickpeas (*Cicer arietinum* L.) against bovine, porcine and human trypsin and chymotrypsin. *J. Sci. Food Agric.*, 60: 287-295.
- Saini H.S. 1993. Distribution of tannins, vicine and convicine activity in legumes seeds. En: *Recent Advances of Research in Antinutritional Factors in Legume Seeds: Proceedings of the 2th International Workshop on Antinutritional Factors in Legume Seeds*. van der Poel A.F.B., Huisman J, Saini H.S. (Ed.), EAAP publication, Wageningen, The Netherlands, 95-100.
- Saint-Cricq de Gaulejac N., Vivas N., de Freitas V., Bourgeois G. 1999. The influence of various phenolic compounds on scavenging activity assessed by an enzymatic method. *J. Sci. Food Agric.*, 79: 1081-1090.
- Saito M., Hosoyama H., Ariga T., Kataoka S., Yamaji N. 1998. Antiulcer activity of grape seed extract and procyanidins. *J. Agric. Food Chem.*, 46: 1460-1464.

-
- Sakanaka S., Sato T., Kim M., Yamamoto T. 1990. Inhibitory effects of green tea polyphenols on glucan synthesis and cellular adherence of cariogenic streptococci. *Agric. Biol. Chem.*, 54(11): 2925-2929.
- Salunkhe D.K., Jadhav S.J., Kadam S.S., Chavan J.K. 1982. Chemical, biochemical, and biological significance of polyphenols in cereals and legumes. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 17: 277-305.
- Salunkhe D.K., Sathe S.K., Reddy N.R. 1982. Legume lipids. En: *Chemistry and Biochemistry of Legumes*, Arora S.K. (Ed.), 51- 109.
- Salunkhe D.K., Sathe S.K., Reddy N.R. 1989. Lipids. En: *Handbook of World Food Legumes: Nutritional Chemistry, Processing Technology, and Utilization*. Vol. I. Salunkhe D.K., Kadam S. S. (Ed.), CRC Press, Boca Raton, Florida, EEUU, 99-116.
- Sánchez-Mata M.C. 1996. Influencia del procesado en el contenido de azúcares solubles (α -galactósidos) en garbanzo (*Cicer arietinum* L.). Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Farmacia. Tesina.
- Sánchez-Mata M.C., Peñuela-Teruel M.J., Cámara Hurtado M., Díez-Marqués C., Torija-Isasa M.E. 1998. Determination of mono-, di-, and oligosaccharides in legumes by high-performance liquid chromatography using an amino-bonded silica column. *J. Agric. Food Chem.*, 46: 3648-3652.
- Sánchez-Mata M.C., Cámara Hurtado M.M., Díez-Marqués C. 1999. Effect of domestic processes and water hardness on soluble sugars content of chickpeas (*Cicer arietinum* L.). *Food Chem.*, 65: 331-338.
- Sánchez-Mata M.C., Cámara Hurtado M., Díez-Marqués C. 2002. Identification and quantification of soluble sugars in green beans by HPLC. *Eur. Food Res. Technol.*, 214: 254-258.
- Sandberg A.S., Ahderinne, R. 1986. HPLC method for determination of inositol tri-, tetra-, penta-, and hexaphosphates in foods and intestinal contents. *J. Food Sci.*, 61: 647-660.
- Sandberg A.S., Carlsson N.G., Sandberg, U. 1989. Effects of Inositol tri-, tetra-, penta-, and hexaphosphates on *in vitro* estimation of iron availability. *J. Food Sci.*, 64: 169-161.
- Sandberg A.S., Brune M., Carlsson N.G., Hallberg L., Rossander-Hultén L., Sandström B. 1993. The effects of various inositol phosphates on iron and zinc absorption in humans. En: *Bioavailability '93: Nutritional, Chemical and Food Processing Implications of Nutrient Availability; Proceedings, Part 2, Symposium, Ettlingen, Alemania*.
- Sandberg A.S. 1994. Antinutrient effects of phytate. *Nutrition*, 18/NR 9: 429-432.
- Sandberg A.S., Brune M., Carlsson N.G., Hallberg L., Skoglund E., Rossander-Hultén L. 1999. Inositol phosphates with different numbers of phosphate groups influence iron absorption in humans. *Am. J. Clin. Nutr.*, 70: 240-246.
- Sandström B., Sandberg A.S. 1992. Inhibitory effects of isolated inositol phosphates on zinc absorption in humans. *J. Trace Elem. Electrolytes Health Disease*, 6: 99-103.
- Santos-Buelga C., Scalbert A. 2000. Proanthocyanidins and tannin-like compounds-nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. *J. Sci. Food Agric.*, 80: 1094-1117.
- Sartirana M.L., Bianchetti R. 1967. The effects of phosphate on the development of phytase in the wheat embryo. *Physiol. Plant.*, 20: 1066-1075.
- Sastry M.C.S., Murray D.R. 1987. The contribution of trypsin inhibitors to the nutritional value of chick pea seed protein. *J. Sci. Food Agric.*, 40: 253-261.
- Sat I.G., Keles F. 2002. The effect of soaking and cooking on the oligosaccharide content of seker a dry bean variety (*P. vulgaris* L.) grown in Turkey. *Pakistan Journal of Nutrition*, 1(5): 206-208.
- Sathe S.K., Deshpande S.S., Reddy N.R., Goll D.E., Salunkhe D.K. 1983. Effects of germination on proteins, raffinose oligosaccharides, and antinutritional factors in the Great Northern Beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *J Food Sci.*, 48: 1796-1800.
- Sathe S.K. y Salunkhe D.K. 1989. Technology of removal of unwanted components of dry legumes. En: *Handbook of World Food Legumes: Nutritional Chemistry, Processing Technology, and Utilization*. Vol. III, Salunkhe, D.K., Kadam, S.S., (Ed.), CRC Press, Boca Raton, Florida, EEUU, 249-279.

-
- Sattar A., Neelofar, Akhtar M.A. 1990a. Irradiation and germination effects on phytate, protein and amino acids of soybean. *Plant Food and Human Nutrition*, 40: 185-194.
- Sattar A., Atta A., Akhtar M.A. 1990b. Effect of irradiation and germination on trypsin inhibitor and protein content of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Int. J. Vit. Nutr. Res.*, 60: 402-406.
- Savage G.P., Thompson D.R. 1993. Effect of processing on the trypsin inhibitor content and nutritive value of chickpeas (*Cicer arietinum*). En: *Recent Advances of Research in Antinutritional Factors in Legume Seeds: Proceedings of the 2th International Workshop on Antinutritional Factors in Legume Seeds*, EAAP publication, Wageningen, The Netherlands, 435-440.
- Savelkoul F.H.M.G., van der Poel A.F.B., Tamminga S. 1992. The presence and inactivation of trypsin inhibitors, tannins, lectins and amylase inhibitors in legume seeds during germination. A review. *Plant Foods for Human Nutrition*, 42: 71-85.
- Savitri A., Desikachar H.S.R. 1985. A comparative study of flatus production in relation to the oligosaccharide content of some legumes. *Nutrition Reports International*, 31(2): 337-344.
- Scalbert A. 1992. Quantitative methods for the estimation of tannins in plant tissues. En: *Plant Polyphenols, Synthesis, Properties, Significance*, Hemingway R.W., Laks P.E. (Eds.), Plenum Press, N Y, EEUU, 259-280.
- Scalbert A., Déprez S., Mila I., Albrecht A-M., Huneau J-F., Rabot S. 2000. Proanthocyanidins and human health: systemic effect and local effects in the gut. *BioFactors*. IOS Press, 13: 115-120.
- Schlereth A., Becker C., Horstmann C., Tiedemann J., Müntz K. 2000. Comparison of globulin mobilization and cysteine proteinases in embryonic axes and cotyledons during germination and seedling growth of vetch (*Vicia sativa* L.). *J. Experimental Botany*, 51(349): 1423-1433.
- Schulze H., Slager E.A., Coolen R., van der Driessche. 1993. Effect of different feed ingredients on the analysis of the trypsin inhibitor activity (TIA) in feed. En: *Recent advances of research in antinutritional factors in legume seeds: Proceedings of the 2th International Workshop on Antinutritional Factors in Legume Seeds*, EAAP publication, Wageningen, The Netherlands, 41-45.
- Schulze H., Savelkoul F.H.M.G., Verstegen M.W.A., van der Pole A.F.B., Tamminga S., Nibbelink S.G. 1997. Nutritional evaluation of biologically treated white kidney beans (*Ph vulgaris* L.) in pigs: ileal and amino acid digestibility. *J. Anim. Sci.*, 75: 3185-3194.
- Senaratna T., McKersie B.D. 1983. Dehydration injury in germinating soybean (*Glycine max* L. Merr.) seeds. *Plant Physiol.*, 72: 620-624.
- Shamsuddin A.M. 2002. Anti-cancer function of phytic acid. *Inter. J. Food Sci. and Tech.*, 37: 769-782.
- Sharma A., Sehgal S. 1992. Effect of domestic processing, cooking and germination on the trypsin inhibitor activity and tannin content of faba bean (*Vicia faba*). *Plant Food for Human Nutrition*, 42: 127-133.
- Shekib L.A. 1994. In-vitro digestibility and microscopic appearance of germinated legume starches and their effect on dietary protein utilization. *Food Chem.*, 50: 59-63.
- Shetty P.S., Kurpad A.V. 1986. Increasing starch intake in the human diet increases fecal bulking. *Am. J. Clin. Nutr.*, 43:210-302.
- Shetty P., Athalla M., Shetty K. 2001. Enhancement of phenolic content, L-DOPA and antioxidant activity in germinating fava beans in response to bacterial elicitors. *Food Biotechnol.* 15 (1): 47-67.
- Shirley B.W. 1996. Flavonoid biosynthesis: "new" functions for an "old" pathway. *Trends in Plant Science*, 1(11): 377-382.
- Siddhuraju P., Becker K. 2001a. Rapid reverse-phase high performance liquid chromatographic method for the quantification of L-DOPA (L-3,4-Dihydroxyphenylalanine), non-methylated and methylated tetrahydroisoquinoline compounds from *Mucuna beans*. *Food Chem.*, 72: 389-394.

-
- Siddhuraju P., Becker K. 2001b. Effect of various domestic processing methods on antinutrients and *in vitro* protein and starch digestibility of two indigenous varieties of indian tribal pulse, *Mucuna pruriens* var. Utilis. J. Agric. Food Chem., 49: 3058-3067.
- Silk D.B.A., Grimble G.K., Rees R.G. 1985. Protein digestion and amino acid and peptide absorption. Proc. Nutr. Soc., 44: 63-72.
- Silveira M.B., Monereo S., Molina B. 2003. Alimentos funcionales y nutrición óptima. ¿Cerca o lejos?. Rev. Esp. Salud Pública, 77(3): 317-331.
- Simon E.W., Meany A. 1965. Utilization of reserves in germinating *Phaseolus* seeds. Plant Physiol., 40: 1136-1139.
- Simon O. 1989. Metabolism of proteins and amino acids. En: Protein Metabolism in Farm Animals: Evaluation, Digestion, Absorption and Metabolism, Bock H.D., Eggum B.O., Low A.G., Simon O., Zebrowska A.G. (Ed.), Oxford University press, VEB Deutscher Landwirtschaftsverlag, Berlín, Alemania, 273-366.
- Singleton. 1981. Naturally occurring food toxicants: phenolic substances of plant origin common in foods. Adv. Food Res., 27:149-242.
- Skoglund E., Carlsson N. G., Sandberg A. S. 1997. Determination of isomers of inositol mono- to hexaphosphates in selected foods and intestinal contents using high-performance ion chromatography, J. Agric. Food Chem., 45: 431-436.
- Skoglund E., Carlsson N-G., Sandberg A-S. 1998. High-performance chromatographic separation of inositol phosphate isomers on strong anion exchange columns. J. Agric. Food Chem., 46: 1877-1882.
- Sjödín J., Martensson P., Magyarosi T. 1981. Selection for antinutritional substances in field bean (*Vicia faba* L.). Z. Pflanzenzüchtg, 86: 231-247.
- Snauwaert F., Markakis P. 1976. Effect of germination and gamma irradiation on the oligosaccharides of navy beans (*Phaseolus vulgaris* L.). Lebensm.-Wiss. U. -Technol., 9: 93-95.
- Sosulski F.W., Elkowicz L., Reichert R.D. 1982. Oligosaccharides in eleven legumes and their air-classified protein and starch fractions. Journal of Food Science, 47: 498-502.
- Srivastava B.I.S. 1964. The effect of gibberellic acid on ribonuclease and phytase activity of germinating barley seeds. Canadian Journal of Botany, 42: 1303-1305.
- Steer T.E., Gibson G.R. 2002. The microbiology of phytic acid metabolism by gut bacteria and relevance for bowel cancer. Inter. J. Food Sci. and Technol., 37: 783-790.
- Stevens B.R., Kaunitz J.D., Wright E.M. 1984. Intestinal transport of amino acids and sugars: advances using membrane vesicles. Ann. Rev. Physiol., 46: 417-433.
- Stobiecki M., Makkar H.P.S. 2004. Recent advances in analytical methods for identification and quantification of phenolic compounds. En: Recent Advances of Research in Antinutritional Factors in Legume Seeds and Oilseeds: Proceeding of the 4th International Workshop on Antinutritional Factors in Legume Seeds and Oilseeds. Muzquiz M., Hill G.D., Cuadrado C., Pedrosa M.M., Burbano C. (Ed.), EAAP publication, Wageningen, The Netherlands, 11-28.
- Strauss G., Hauser H. 1986. Stabilization of lipid bilayer vesicles by sucrose during freezing. Proc. Natl. Acad. Sci., 83: 2422-2426.
- Sturm A. 1999. Invertases. Primary structures, functions, and roles in plant development and sucrose partitioning. Plant Physiol., 121: 1-8.
- Suarez F.L., Springfield J., Furne J.K., Lohrmann T.T., Kerr P.S., Levitt M.D. 1999. Gas production in humans ingesting a soybean flour derived from beans naturally low in oligosaccharides. Am. J. Clin. Nutr., 69: 135-139.
- Sun W.Q., Leopold A.C. 1995. The Maillard reaction and oxidative stress during aging of soybean seeds. Physiologia Plantarum, 94: 94-104.

-
- Szczecinski P., Gryff-Keller, Horbowicz M., Lahuta L.B. 2000. Galactosylpinitols isolated from vetch (*Vicia villosa* Roth.) seeds. *J. Agric. Food Chem.*, 48: 2717-2720.
- Tabekhia M.M, Luh B.S. 1980. Effect of germination, cooking, and canning on phosphorus and phytate retention in dry beans. *J. Food Sci.*, 45: 406-408.
- Tabera J., Frías J., Estrella I., Villa R., Vidal-Valverde C. 1995. Natural fermentation of lentils. Influence of time, concentration and temperature on protein content, trypsin inhibitor activity and phenolic compound content. *Z. Lebensm Unters Forsch*, 201: 587-591.
- Tamir S., Bell J., Finlay T.H., Sakal E., Smirnoff P., Gaur S., Birk Y. 1996. Isolation, characterization and properties of a trypsin-chymotrypsin inhibitor from amaranth seeds. *J. Protein Chem.*, 15(2): 219-229.
- Tanaka M., Thananunkul, Lee T.-C., Chichester C.O. 1975. A simplified method for the quantitative determination of sucrose, raffinose and stachyose in legume seeds. *J. Food Sci.*, 40(5): 1087-1088.
- Tangendjaja B., Buckle K.A., Wootton M. 1980. Analysis of phytic acid by high-performance liquid chromatography. *J. Chrom.*, 197: 274-277.
- Theander O., Aman P., Westerlund E., Graham H. 1994. Enzymatic/chemical analysis of dietary fiber. *J. AOAC Int.*, 77(3): 703-709.
- Thompson D.B., Erdman J.W. 1982. Phytic acid determination in soybeans. *J. Food Sci.*, 47: 513-517.
- Thompson L.U., Yoon J.H. 1984. Starch digestibility as affected by polyphenols and phytic acid. *J Food Sci.*, 49: 1228-1229.
- Thompson L.U., Tenebaum A.V., Hui H. 1986. Effect of lectins and the mixing of proteins on rate of protein digestibility. *J. Food Sci.*, 51(1): 150-152.
- Thompson L.U. 1990. Phytates in canola/rapeseed. En *Canola and Rapeseed*, Shahidi F. (Ed.).
- Thompson L.U. 1993. Potential health benefits and problems associated with antinutrients in foods. *Food Res. Int.*, 26: 131-149.
- Tomomatsu H. 1994. Health effects of oligosaccharides. *Food Technol.*, 48(10): 61-65.
- Torija M.E., Díez C. 1999. Legumbres. En: *Tratado de nutrición*, Hernández M., Sastre A. (Ed.), Ediciones Díaz de Santos, Madrid, España, 425-429.
- Treutter D. 1989. Chemical reaction detection of catechins and proanthocyanidins with 4-dimethylaminocinnamaldehyde. *J. Chromatogr.*, 467: 185-193.
- Troll W., Frenkel K., Wiesner R. 1987. Protease inhibitors: possible preventive agents of various types of cancer and their mechanisms of action. *Current Concepts and Approaches to the Study of Prostate Cancer*, 297-315.
- Troszynska A., Honke J., Kozłowska H. 1993. Polyphenolic compounds in faba bean (*Vicia faba* L.) seed coat. En: *Recent Advances of Research in Antinutritional Factors in Legume Seeds: Proceedings of the 2th International Workshop on Antinutritional Factors in Legume Seeds*, van der Poel A.F.B., Huisman J., Saini H.S. (Ed.), EAAP publication, Wageningen, The Netherlands, 91-94.
- Trugo L.C., Ramos L.A., Trugo N.M.F., Souza M.C.P. 1990. Oligosaccharide composition and trypsin inhibitor activity of *P. vulgaris* and the effect of germination on the α -galactoside composition and fermentation in the human colon. *Food Chem.*, 36: 53-61.
- Trugo L.C., Farah A., Cabral L. 1995. Oligosaccharide distribution in Brazilian soya bean cultivars. *Food Chem.*, 385-387.
- Trugo L.C., Donangelo C.M., Trugo N.M.F., Bach Knudsen K.E. 2000. Effect of heat treatment on nutritional quality of germinated legume seeds. *J. Agric. Chem.*, 48: 2082-2086.
- Urbano G., López-Jurado M., Hernández J., Fernández M., Moreu M-C., Frías J., Díaz-Pollan C., Prodanov M., Vidal-Valverde C. 1995. Nutritional Assessment of raw, heated, and germinated lentils. *J. Agric. Food Chem.*, 43: 1871-1877.

-
- Urbano G., López-Jurado M., Fernández M., Moreu M-C., Porres-Foulquie J., Frías J., Vidal-Valverde C. 1999. Ca and P bioavailability of processed lentils as affected by dietary fiber and phytic acid content. *Nutrition Research*, 19(1): 49-64.
- Urbano G., López-Jurado M., Aranda P., Vidal-Valverde C., Tenorio E., Porres J. 2000. The role of phytic acid in legumes: antinutrient or beneficial function?. *J. Physiol. Biochem.*, 56(3): 283-294.
- Urdaneta E., Barrenetxe J., Arricibita F., Ibañez F., Marzo F. 2004. Nutritional response of rats to faba beans seeds (*Vicia faba* L.) treated by traditional and extrusion methods. En: 5th European Conference on Grain Legumes, Abstracts of posters nº 255.
- van Amerongen A., Ostafe V., Meijer M.M.T., Gruppen H., Meerdink G., Berendsen L.B.J.M., Koets M., Wichers J.H. 1998. Specific-Immuno- (Chimo) Trypsin-Inhibitor-Assays for determination of (residual) activity of Bowman-Birk or Kunitz soybean trypsin inhibitors. En: Recent Advances of Research in Antinutritional Factors in Legume Seeds and Rapeseeds: Proceedings of the 3th International Workshop on Antinutritional Factors in Legume Seeds and Rapeseeds, Jansman A.J.M., Hill G.D., Huisman J., van der Poel A.F.B. (Ed.). EAAP publication, Wageningen, The Netherlands, 33-37.
- van Oort M.G., Hamer R.J., Slager E.A. 1989. The trypsin inhibitor assay: Improvement of an existing method. En: Recent Advances of Research in Antinutritional Factors in Legume Seeds: Proceedings of the 1st International Workshop on Antinutritional Factors in Legume Seeds, Huisman J., van der Poel T.F.B., Liener I.E. (Ed.), EAAP publication, Wageningen, The Netherlands, 110-113.
- Valdebouce P., Bergeron P., Gaborit T., Delort-Laval J. 1980. Analisis of trypsin inhibitors. *Can. J. Plant Sci.*, 60: 695-701.
- Vallejo M., Jackson T., Lightman S., Hanley M.R. 1987. Occurrence and extracellular actions of inositol pentakis- and hexakisphosphate in mammalian brain. *Nature*, 330: 656-658.
- Vered Y., Grosskopf I., Palevitch D., Harsat A., Charach G., Weintraub M.S., Graff E. 1997. The influence of *Vicia faba* (broad bean) seedlings on urinary sodium excretion. *Planta Medica*, 63: 237-240.
- Vidal-Valverde C., Frías J. 1992. Changes in carbohydrates during germination of lentils. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 194: 461-464.
- Vidal-Valverde C., Frías J., Prodanov M., Tabera J., Ruiz R., and Bacon J. 1993. Effect of natural fermentation on carbohydrates, riboflavin and trypsin inhibitor activity of lentils. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 197: 449-462.
- Vidal-Valverde C., Frías J., Estrella I., Gorospe M.J., Ruiz R., Bacon J. 1994. Effect of processing on some antinutritional factors of lentils. *J. Agric. Food Chem.*, 42: 2291-2295.
- Vidal-Valverde C., Frías J., Díaz-Pollán C., Fernández M., López-Jurado M., Urbano G. 1997. Influence of processing on trypsin inhibitor activity of faba beans and its physiological effect. *J. Agric. Food Chem.*, 45: 3559-3564.
- Vidal-Valverde C., Frías J., Sotomayor C., Díaz-Pollán C., Urbano G. 1998. Nutrients and antinutritional factors in faba bean as affected by processing. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 207: 140-145.
- Vidal-Valverde C., Frías J., Lambein F., Kuo Y-H. 2001. Increasing the functionality of legumes by germination. 4th European Conference on Grain Legumes, Cracovia, Polonia, 422.
- Vidal-Valverde C., Frías J., Sierra I., Blázquez I., Lambein F., Kuo Y-H. 2002. New functional legume foods by germination: effect on the nutritive value of beans, lentils and peas. *Eur. Food Res. Technol.*, 215:472-477.
- Vidal-Valverde C., Frías J., Hernández A., Martín-Álvarez P.J., Sierra I., Rodríguez C., Blázquez I., Vicente G. 2003. Assessment of nutritional compounds and antinutritional factors in pea (*Pisum sativum*) seeds. *J. Sci. Food Agric.*, 83: 298-306.
- Vinjamoori D.V., Nadeau S.H., Das P.K., Byrum J.R. 2000. A rapid method for the simultaneous determination of sucrose, stachyose and raffinose in soy beans using anion exchange chromatography and pulsed amperometric. Annual Meeting. American Association of Cereal Chemists, Missouri, EEUU, 84a.

-
- Vijayakumari K., Siddhuraju P., Janardhanan K. 1996. Effect of soaking, cooking and autoclaving on phytic acid and oligosaccharide contents of the tribal pulse, *Mucuna monosperma* D.C. ex. Wight. *Food Chem.*, 55: 173-177.
- Visek W.J., Clinton S.K., Truex E.R. 1978. Nutrition and experimental carcinogenesis. *Cornell Vet.*, 68: 3.
- Vose J.R., Basterrechea M.J., Gorin P.A.J., Finlayson A.J., Youngs C.G. 1976. Air classification of field peas and horsbean flours: chemical studies of starch and protein fractions. *Cereal Chem.*, 53(6): 928-936.
- Wagner J.R., Becker R., Gumbmann M.R., Olson A.C. 1976. Hydrogen production in the rat following ingestion of raffinose, stachyose and oligosaccharide-free bean residue. *J. Nutr.*, 106: 466-470.
- Wahab A.H., Burris J.S. 1975. Metabolism of mono- and oligosaccharides and growth studies in germinating soybean seeds *Glycine max* (L.) Merrill. *Carbohydrate and Growth Data. Iowa State Journal of Research*, 50(1): 29-45.
- Walker K. A. 1974. Changes in phytic acid and phytase during early development of *Phaseolus vulgaris* L. *Planta*, 116: 91-98.
- Wang P.-X., Ueberschär K.H. 1990. The estimation of vicine, convicine and condensed tannins in 22 varieties of fababeans (*Vicia faba* L.). *Animal Feed Science and Technology*, 31: 157-165.
- Wang X., Warkentin T.D., Briggs C.J., Oomah B.D., Campbell C.G., Woods S. 1998a. Trypsin inhibitor activity in field pea (*Pisum sativum* L.) and grass pea (*Lathyrus sativus* L.). *J. Agric. Food Chem.*, 46: 2620-2623.
- Wang X., Warkentin T.D., Briggs C.J., Oomah B.D. 1998b. Total phenolics and condensed tannins in field pea and grass pea. *Euphytica*, 101: 97-102.
- Wang Y.H., McInrosh G.H. 1996. Extrusion and boiling improve rat body weight gain and plasma cholesterol lowering ability of peas and chickpeas. *J. Nutr.*, 126: 3054-3062.
- Wanjekeche E., Wakasa V., Mureithi J.G. 2003. Effect of germination, alkaline and acid soaking and boiling on the nutritional value of mature and immature mucuna (*Mucuna pruriens*) beans. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 1: 183-192.
- Wapnir R. A. 1990. Protein nutrition and mineral absorption, CRC Press, Boca Raton, Florida, EEUU.
- Warsy A.S., Norton G., Stein M. 1974. Protease inhibitors from broad bean isolation and purification. *Phytochem.*, 13: 2481-2486.
- Webb K.E. 1990. Intestinal absorption of protein hydrolysis products: a review. *J. Anim. Sci.*, 68: 3011-3022.
- Weder J.K.P., Link I. 1993. Effect of treatments on legume inhibitor activity against human proteinases. En: *Recent Advances of Research in Antinutritional Factors in Legume Seeds: Proceedings of the 2th International Workshop on Antinutritional Factors in Legume Seeds*, van der Poel A.F.B., Huisman J, Saini H.S. (Ed.), EAAP publication, Wageningen, The Netherlands, 481-485.
- Weder J.K.P., Kahleyß R. 1998. Isolation and characterisation of four trypsin-chymotrypsin inhibitors from lentil seeds. *J. Sci. Food Agric.*, 78: 429-434.
- Welham T., O'Neill M., Johnson S., Wang T.L. Domoney C. 1998. Expression patterns of genes encoding seed trypsin inhibitors in *Pisum sativum*. *Plant Sci.*, 131: 13-24.
- Welham T., Domoney C. 2000. Temporal and spatial activity of a promoter from a pea enzyme inhibitor gene and its exploitation for seed quality improvement. *Plant Sci.*, 159: 289-299.
- Wethli E., Morris T.R., Shresta T.P. 1975. The effect of feeding high levels of low-quality proteins to growing chickens. *Br. J. Nutr.*, 34: 363-373.
- Wettlaufer S.H., Leopold A.C. 1991. Relevance of Amadori and Maillard products to seed deterioration. *Plant Physiol.*, 97: 165-169.
- Williams S.G. 1970. The role of phytic acid in the wheat grain. *Plant Physiol.*, 45: 376-381.
- Wilson B.J., McNab J.M., Bentley H. 1972. Trypsin inhibitor activity in the field bean (*Vicia faba* L.). *J. Sci. Fd. Agric.*, 23: 679-684.
- Wilson K.A. 1980. The release of proteinase inhibitors from legume seeds during germination. *Phytochemistry*, 19: 2517-2519.

-
-
- Wolf W.J. 1972. Soybean ultrastructure and its relationship to processing. En: Symp. Proteins. Iglett (Ed.). The Avi. Publi., Connecticut, 231-240.
- Wong K.P., Lim B.G. 1992. L-dopa in the seedlings of *Vicia faba*: its identification, cuantification and metabolism. Biogenic Amines, 8(3/4): 167-173.
- Wright P.S., Anderson J.W., Bridges S. 1990. Propionate inhibits hepatocyte lipid synthesis. Proceeding of the Society of Experimental Biology and Medicine, 195: 26-29.
- Wu G. 1998. Intestinal mucosal amino acid catabolism. J. Nutr., 128:1249-1252.
- Wyatt G.M., Horn N., Gee J.M., Johnson I.T. 1988. Intestinal microflora and gastrointestinal adaptation in the rat in response to non-digestible dietary polysaccharides. Br. J. Nutr., 60: 197-207.
- Xavier-Filho J. y Campos F.A.P. 1989. Proteinase inhibitors. En: Toxicants of plant origin. Vol. III. Cheeke P.R. (Ed.), CRC Press, Boca Raton, Florida, EEUU, 2-16.
- Xu P., Price J., Aggett P.J. 1992. Recent advances in methodology for analysis of phytate and inositol phosphates in foods. Progress in Food and Nutrition Science, 16: 246-262.
- Yaklich R.W. 1984. Effect of aging on soluble oligosaccharide content in soybean seeds. Crop Science, 25: 701-704.
- Zduncyk Z., Frejnagel S., Krefft B. 1996. Effect of faba beans coat with different phenolics content on the use of protein by rats. Pol. J. Food Nutr. Sci., 5(2): 91-101.
- Zhou J.R., Erdman J.W. 1995. Phytic acid in health and disease. Crit. Rev. Food Sci. Nutr., 35(6): 495-508.
- Zohary D. 1977. Comments on the origin of cultivated broad bean, *Vicia faba* L. Isr. J. Bot., 26: 39-40.
- Zulet M.A., Martínez J.A. 2001. Dieta mediterránea: legumbres y colesterolemia. Rev. Chil. Nutr., 28(2): 312-320.