

CONTENIDO DE OLIGOSACÁRIDOS EN SEMILLAS DE LEGUMINOSAS SILVESTRES MEXICANAS

OLIGOSACCHARIDE CONTENT OF MEXICAN WILD LEGUME SEEDS

Leticia Maya-Zepeda¹, Jorge Hernández-Gobora², Ramón Rodríguez-Macías¹, Pedro Macedonio García-López¹, Mario A. Ruiz-López^{1*}

¹ Departamento de Botánica y Zoología, ² Departamento de Producción Animal. Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad de Guadalajara, Km. 15.5 Carr. GDL-NOG. Las Agujas, Nextipac, Zapopan, Jalisco, México. C.P.45110

* Corresponding author E-mail: mruiz@cucba.udg.mx.

RESUMEN

El consumo de oligosacáridos de la familia de la rafinosa (RFOs) ha adquirido importancia recientemente porque se consideran prebióticos; se ha reportado que pueden ayudar a prevenir enfermedades intestinales, estimulan el sistema inmune, mejoran la digestión de la lactosa y la absorción de minerales, y además ayudan en la prevención del cáncer de colon. El objetivo de este trabajo fue cuantificar por cromatografía de líquidos de alto rendimiento con detector de índice de refracción (HPLC-IR) el contenido de oligosacáridos en semillas de siete leguminosas silvestres actualmente consumidas, o con potencial de ser consumidas previo tratamiento (*Acacia pennatula* (Schlecht. & Cham) Benth, *Enterolobium cyclocarpum* (Jacq.) Griseb, *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit, *Pithecellobium dulce* (Roxb.) Benth, *Lupinus elegans* Kunth, *Lupinus montanus* Kunth y *Lupinus rotundiflorus* M.E. Jones). El análisis proximal mostró un alto contenido de proteínas, especialmente en las especies de *Lupinus*. El contenido total de α -galactósidos osciló de 18,6 mg g⁻¹ (*A. pennatula*) a 88,1 mg g⁻¹ (*P. dulce*). Con excepción de *E. cyclocarpum* donde la rafinosa (49,0 mg g⁻¹) fue el principal, mientras que los oligosacáridos más abundantes en el resto de las leguminosas analizadas fueron estaquiosa y verbascosa. Estos valores indican que pueden ser considerados una fuente importante de oligosacáridos de la familia de la rafinosa (RFOs).

Palabras clave: Fructooligosacáridos, legumbres, HPLC-IR.

ABSTRACT

The consumption of raffinose family oligosaccharides (RFO) has recently gained importance due to the fact that they are considered prebiotic; it have been reported to prevent intestinal diseases, stimulate the immune system, improve lactose digestion and minerals absorption, and also prevent colon cancer. The aim of this work was to quantify the oligosaccharide content of seven different types of wild legumes seeds that are currently consumed or could potentially be consumed after processing (*Acacia pennatula* (Schlecht. & Cham) Benth, *Enterolobium cyclocarpum* (Jacq.) Griseb, *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit, *Pithecellobium dulce* (Roxb.) Benth, *Lupinus elegans* Kunth, *Lupinus montanus* Kunth y *Lupinus rotundiflorus* M.E. Jones), by high performance liquid chromatography with refractive index detection (HPLC-RI). The proximate analysis showed a high content of protein, especially in *Lupinus* species. The total α -galactoside content ranged from 18.6 mg g⁻¹ (*A. pennatula*) to 88.1 mg g⁻¹ (*P. dulce*). With the exception of *E. cyclocarpum*, in which raffinose content (49.0 mg g⁻¹) was the highest stachyose and verbascose were the dominant oligosaccharides found in the legume species analyzed. These values indicate that these species can be significant source of raffinose family oligosaccharides (RFOs).

Key words: Fructooligosaccharide, legumes, HPLC-RI.

INTRODUCCIÓN

Las semillas de las leguminosas contienen concentración alta de proteína (15 a 45%), aceites (7 a 20%), fibra cruda (3 a 15%) y carbohidratos (25 a 60%). Estas especies se utilizan en la alimentación humana y animal como fuente de proteína vegetal, además que son también fuente importante de oligosacáridos. Estos carbohidratos tienen peso molecular bajo, están formados por residuos de α -D-galactopiranosil, unidos por el enlace α (1-6)-galactosídico al C6 de la molécula de glucosa que forma parte de la sacarosa. Estos compuestos en las plantas funcionan como carbohidratos de reserva, transporte y adaptación al estrés ambiental como la sequía (Pollock et al., 1999).

Los oligosacáridos son resistentes a la hidrólisis por glucosidasas de la mucosa del intestino delgado de los monogástricos, que carecen de la enzima α -1,6-galactosidasa, por lo que a su paso por el colon son fermentados selectivamente por bacterias tales como lactobacilos y bifidobacterias. El acetato, propionato y butirato son los tres principales ácidos grasos volátiles de cadena corta (AGCC) producidos durante la fermentación bacteriana de carbohidratos, y se encuentran estrechamente relacionados con los efectos benéficos que se atribuyen al consumo de la fibra dietética. El butirato es el más abundante y se le atribuyen propiedades anticancerígenas (Campos-Vega et al., 2012; Plöger et al., 2012). Entre otros productos de la fermentación también se generan el L-lactato, CO_2 y el hidrógeno (Satya et al., 2010).

Algunos estudios han mostrado que los oligosacáridos consumidos en dosis recomendadas de 1 hasta 11 g día⁻¹ (Roberfroid, 2002), producen cambios en la composición y en la actividad de la microbiota intestinal (actividad prebiótica) (Lisowski et al., 2003; Watson y Preedy, 2010), al estimular el desarrollo de un número específico de bacterias del colon (Bouhnik et al., 2004; Villaluenga et al., 2004), como las ácido lácticas. Estos cambios brindan un beneficio a la salud del consumidor (Roberfroid, 2005; Gibson y Roberfroid, 2008), como el control de infecciones intestinales, inmuno estimulación, mejor digestión de la lactosa, incremento de la absorción de minerales y prevención de cáncer de colon (Lee y Salminen, 2009; Sungsoo y Finocchiaro, 2010).

Su potencial efecto benéfico sobre la salud se obtiene al ser consumidos en alimentos naturales o procesados, formando parte de una dieta variada, en forma regular y a niveles efectivos (American Dietetic Association, 2004).

En algunas regiones tropicales de México se consumen semillas tostadas de parota (*Enterolobium cyclocarpum*) por habitantes de estas regio-

nes. Además se emplean las semillas de *Leucaena leucocephala* como botana (snacks), también molidas en la preparación de salsas y moles; y el consumo de la cubierta carnosa del fruto del guamúchil (*Pithecellobium dulce*) (Fraile et al., 2007). Asimismo se tienen algunos informes sobre el consumo regular de harina de vainas o semillas del huizache (*Acacia pennatula*) por habitantes de algunas zonas rurales semiáridas; sin embargo el principal uso de ésta es como forraje para pequeños rumiantes (Purata et al., 1999).

Por otra parte, las especies de *Lupinus* son reconocidas por su alto valor nutricional. Existen algunas variedades domesticadas que son utilizadas en Australia y en diversos países de Europa y Sudamérica en la alimentación humana o animal (Morales et al., 2006). Son leguminosas que poseen cantidades importantes de oligosacáridos (Muzquiz et al., 1999; Martínez-Villaluenga et al., 2004), especialmente *Lupinus luteus* (con 95–123 mg g⁻¹) (Martínez-Villaluenga et al., 2005).

Sin embargo, las especies silvestres tienen un alto potencial para el consumo, y han despertado interés desde el punto de vista nutricional, tanto en Europa (Pastor-Cavada et al., 2009) como en México (Ruiz y Sotelo, 2001). En algunos estudios se han cuantificado niveles altos de oligosacáridos en especies mexicanas, tales como 52,45 mg g⁻¹ en *Lupinus mexicanus* a 88,2 mg g⁻¹ en *Lupinus campestris* (Ruiz-López et al., 2000; Jimenez-Martinez et al., 2010).

Estas leguminosas pueden ser consumidas previo tratamiento, como remojo, cocción con ebullición, presión o con microondas, así como el tostado, la extrusión, la eliminación de la testa y en menor medida la fermentación y la radiación (Greco y Bruno, 2008).

Debido a lo anterior, el objetivo de este estudio fue determinar el contenido de oligosacáridos presentes en leguminosas silvestres, que son de consumo popular o con potencial de consumo, que pudieran ser consideradas una fuente rica de oligosacáridos con propiedades prebióticas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se recolectaron vainas con semillas maduras de leguminosas silvestres, durante la primavera-otoño del 2008, en diferentes localidades del estado de Jalisco, México (Tabla 1). Los especímenes se depositaron en el "Herbario" del Instituto de Botánica de la Universidad de Guadalajara (IBUG), México. Los números de registro de los especímenes recolectados fueron *A. pennatula* 14266, *E. cyclocarpum* 186978, *L. leucocephala* 136178, *P. dulce* 34312 y tres especies de lupinos, *L. elegans* 188815, *L. montanus* 184177 y *L. rotundiflorus* 178851.

Table 1. Date and locations of collection of wild legume species in Jalisco, México, during spring-summer 2008.**Tabla 1. Fechas y localidades de colecta de las especies de las leguminosas silvestres en Jalisco, México, durante la primavera-verano 2008.**

Especie	Colecta (mes/año, estación)	Localidad
<i>Acacia pennatula</i> (Schlecht. & Cham) Benth.	06/2008 verano	Cerro La Piedrera, Mpio. Zapopan 20°46' N; 103°20' O
<i>Enterolobium cyclocarpum</i> (Jacq.) Griseb.	07/2008 verano	El Tuito, Mpio. Cabocorrientes 20°19' N; 105°20' O
<i>Leucaena leucocephala</i> (Lam.) de Wit	05/2008 primavera	Bosque San Isidro, Mpio. de Zapopan 20°46' N; 103°22' O
<i>Pithecellobium dulce</i> (Roxb.) Benth.	05/2008 primavera	Río Blanco, Mpio. Zapopan 20°37' N; 103°27' O
<i>Lupinus elegans</i> Kunth	12/2008 otoño	Sierra de Quila, Mpio. Tecolotlán 20°17' N; 104°04' O
<i>Lupinus montanus</i> Kunth	11/2008 otoño	Nevado de Colima, Mpio. Tonila 19°34' N; 103°36' O
<i>Lupinus rotundiflorus</i> M.E. Jones	04/2008 primavera	Mpio. de Talpa de Allende 20°22' N; 104°55' O

Mpio: municipio

Las semillas se separaron de las vainas y secan en una estufa de aire forzado a una temperatura de 60°C durante 48 h, y una vez deshidratadas se molieron (molino marca IKA modelo M20 S3), durante 10 segundos, usando un tamiz que proporciona un tamaño de partícula menor a 1 mm de diámetro. Se determinó a cada especie por separado y en triplicado materia seca (MS), proteína cruda (PC) mediante el método Kjeldahl, extracto etéreo (EE) por el método Soxhlet, fibra cruda (FC) por hidrólisis ácida-alcalina, cenizas (C) por combustión en mufla a 600°C, y carbohidratos totales calculados por diferencia, en base a las técnicas descritas por la AOAC (2005).

El aislamiento y purificación de los oligosacáridos se realizó a partir del extracto de 100 g de harina de semilla. El método consistió en dos extracciones de 200 mL con etanol al 50% (v/v) a temperatura de 40°C por 12 h (Ekvall et al., 2007). El extracto obtenido se llevó a ebullición bajo reflujo por 10 min. Se eliminaron los sólidos precipitados por centrifugación, luego fue concentrado al vacío (hasta un volumen de 20 mL) para posteriormente precipitar los oligosacáridos con 200 mL de etanol al 100%. Estos oligosacáridos fueron separados por centrifugación y los restos de etanol se eliminaron mediante vacío.

En el proceso de purificación la muestra fue resuspendida en 20 mL de agua y se filtró a través de 300 mL de una mezcla 1:1 (p/p) de tierra de diatomeas y carbón activado, y se utilizó 250

mL de etanol al 6% (v/v) para eliminar la sacarosa (Martínez-Villaluenga et al., 2004). Los oligosacáridos se recuperaron con 500 mL de etanol al 70% (v/v). Finalmente se hizo eluir por una columna de intercambio catiónico DOWEX 50WX8 (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) de 15 x 2,5 cm d.i., y se utilizó agua como solvente (Gulewicz et al., 2000).

La evaluación cualitativa de los oligosacáridos se hizo mediante cromatografía de capa fina (CCF), sobre una placa de gel de sílice (Merck 60 F₂₅₄); la fase móvil fue acetato de etilo-n-propanol-ácido acético-agua (4:2:2:1 v/v). La placa fue revelada con orcinol (Sigma-Aldrich) y se utilizaron estándares de sacarosa, rafinosa, verbascosa (Fluka) y estaquiosa (Sigma-Aldrich) como referencia (Waksmundzka-Hajnos et al., 2008).

Para la separación y cuantificación de los RFO extraídos, se inyectó por triplicado 20 µL de cada una de las muestras, previamente filtradas a través de una membrana de nylon de 0,45 µm (Millipore, Billerica, Massachusetts, USA), a un cromatógrafo de líquidos (HPLC) (Shimadzu, modelo VP, Shimadzu Scientific Instruments, Inc. Columbia, Maryland, USA) equipado con un detector de índice de refracción de la misma marca, modelo RID-10A. Se utilizó una columna Hi-PlexNa (Agilent Technologies Inc., Palo Alto, California, USA) de 7,7 mm x 30 cm y 10 µm, con su correspondiente guarda columna. El análisis se desarrolló a temperatura de 70°C. Como solvente de elución

se utilizó agua grado HPLC, a un flujo de 0,3 mL min⁻¹.

Los compuestos fueron identificados en base a su tiempo de retención en comparación con estándares comerciales de rafinosa, verbascosa (Fluka) y estaquiosa (Sigma-Aldrich), y la cuantificación se realizó en base al área de los picos de cada compuesto. La calibración se desarrolló mediante la inyección de los estándares externos, con tres repeticiones para cada una de las diferentes concentraciones en un intervalo de 0,05-5 mg; en todas las curvas de calibración se obtuvo una correlación mayor de R²=0,998.

Se realizó un análisis de varianza (ANDEVA) de una vía para comparar las diferencias de los oligosacáridos entre especies así como la prueba de comparación de medias SNK (Student-Newman-Keuls), con un nivel de confianza de 95%, para lo cual se utilizó el paquete SPSS (2010).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados del análisis de la composición química en las siete especies de leguminosas estudiadas se presentan en la Tabla 2.

Destacan los altos niveles de proteína cruda en las especies de *Lupinus*, con valores de 40,27 y 44,60%, en *L. rotundiflorus* y *L. elegans*, respectivamente, valores ligeramente inferiores a los reportados por Ruiz y Sotelo (2001) de 42,82 y 45,41%, respectivamente, para estas especies, pero superiores a las reportadas en otras especies silvestres de México (*L. campestris* con 39,7% y *L. barkeri* con 37,07% (Jiménez-Martínez et al., 2010; Gumes-Vera et al., 2012), mientras que en *P. dulce* se obtuvo el menor valor con 19,64%. En relación al contenido de carbohidratos totales (Tabla 2) se observó el valor más alto en *E. cyclocarpum* con 63,1%, y el más bajo en *L. montanus* con 23,04%. Los contenidos de proteínas y carbohidratos de-

terminados en el presente estudio coinciden con los resultados de Hedley (2001), respecto a que las semillas de leguminosas se caracterizan por tener niveles altos de proteínas (20-30%) y de carbohidratos (50-65%), excepto la soya y los lupinos, que tienen altos contenidos de proteínas (35-45%) y una menor proporción de carbohidratos (30-40%), debido a que no almacenan almidón como fuente de energía.

Los valores de grasa (Tabla 2) de 2,8% en *E. cyclocarpum* a 10,84% en *P. dulce* fueron superiores a los reportados en otras leguminosas (Ritchev et al., 1976), con valores de 1,0 a 5,0%.

El mayor contenido de α -galactósidos totales (Tabla 3) lo presentó *P. dulce* con 88,1 mg g⁻¹, seguido de *E. cyclocarpum* con 85,0 mg g⁻¹, sin diferencia significativa entre estas ($p > 0,05$) y al final *L. leucocephala* con 38,8 mg g⁻¹. Estos valores están en el rango reportado de otras leguminosas de consumo humano, que fluctúa de 31 a 145 mg g⁻¹ (Rupérez, 1998; Hwa y Byung-Kee, 2006), a excepción de *A. pennatula*, que presentó 18,6 mg g⁻¹ de oligosacáridos totales. En el caso de los lupinos, el total de α -galactósidos coincidió con lo reportado para otras especies mexicanas (Ruiz-López et al., 2000; Jiménez-Martínez et al., 2010).

En las especies de leguminosas analizadas en este trabajo no se observó una relación directa entre el contenido de carbohidratos totales con respecto al contenido de oligosacáridos, por lo que podría existir presencia mayoritaria de otros grupos de carbohidratos.

Se observó una variación de la composición de RFO individuales (Tabla 3), con una diferencia estadística ($p < 0,05$) en *E. cyclocarpum*, que reveló el mayor contenido de rafinosa en relación al resto de las especies, con 49,0 mg g⁻¹, valor superior a otras leguminosas de consumo humano, tales como lentejas (*Lens culinaris*), guisante (*Pisum sativum*), frijol común (*Phaseolus vulgaris*), cacahua-

Table 2. Chemical composition of seven legume species seeds (% dry basis, n = 3) collected in Jalisco, Mexico, during spring-summer 2008.

Tabla 2. Composición química proximal de semillas de siete especies de leguminosas (% en base seca, n = 3) colectadas en Jalisco, México, durante la primavera-verano de 2008.

Especie	Materia seca	Proteína (N x 6,25)	Extracto etéreo	Fibra cruda	Cenizas	Carbohidratos totales
<i>Acacia pennatula</i>	93,75	26,70	2,73	12,71	3,37	48,24
<i>Enterolobium cyclocarpum</i>	73,00	26,30	2,80	4,90	2,90	63,10
<i>Leucaena leucocephala</i>	93,37	26,12	8,20	10,50	4,03	44,52
<i>Pithecellobium dulce</i>	90,38	19,64	10,84	7,65	2,84	49,41
<i>Lupinus elegans</i>	94,80	44,60	5,80	12,91	4,20	27,30
<i>Lupinus montanus</i>	91,80	40,66	9,64	14,53	3,93	23,04
<i>Lupinus rotundiflorus</i>	94,54	40,27	5,50	15,11	4,01	32,56

te (*Arachis hypogaea*) (Ali y Muzquiz, 1998), frijol lima (*Phaseolus limensis*) y gandul (*Cajanus cajan*) (Ekvall et al., 2007). Mientras que *L. leucocephala* mostró un contenido importante de 18,0 mg g⁻¹, similar a las especies de leguminosas mencionadas, en tanto que *A. pennatula* presentó la menor cantidad de rafinosa y estaquiosa (1,45 y 3,53 mg g⁻¹, respectivamente).

Estadísticamente ($p < 0,05$) *P. dulce* fue la especie con la mayor cantidad de estaquiosa (70,6 mg g⁻¹) en comparación al resto de las especies estudiadas (Tabla 3), valor superior a las leguminosas comestibles arriba mencionadas.

Las especies de *Lupinus* mostraron el mayor contenido de verbascosa (Tabla 3), *L. elegans* (37,2 mg g⁻¹), *L. rotundiflorus* (29,57 mg g⁻¹) y *L. montanus* (12,44 mg g⁻¹), con diferencias estadísticas entre ellas, superior a otras leguminosas de grano (Kuo et al., 1988; Rupérez, 1998; Ali y Muzquiz, 1998; Hwa y Byung-Kee, 2006) y similar a los lupinos comestibles (Muzquiz et al., 1999; Martínez-Villaluenga et al., 2005) y silvestres (Ruiz-López et al., 2000; Jiménez-Martínez et al., 2010).

Debido a las diferencias en el contenido de oligosacáridos entre las especies evaluadas, se estima que sería importante realizar estudios para evaluar la influencia de los diferentes factores bióticos y abióticos sobre el contenido de estos compuestos. Además deberían ser probados en modelos animales, y fundamentar con ello su propuesta como ingredientes funcionales para consumo humano y animal.

CONCLUSIONES

Las semillas de estas siete leguminosas silvestres estudiadas pueden ser consideradas una fuente importante de oligosacáridos de la familia de la rafinosa, y podrían ser utilizadas, previo tratamiento, como alternativas nutricionales por su alto contenido de proteína, especialmente las especies de lupinos con valor superior al 40%. Cabe señalar que al ser sometidas a un tratamiento es importante evaluar los cambios que pueden ocurrir en la composición nutrimental, así como evaluar su biodisponibilidad.

Por su elevado contenido de oligosacáridos totales, las semillas de *Pithecellobium dulce* (88,11 mg g⁻¹) y de *Enterolobium cyclocarpum* (85,00 mg g⁻¹) podrían ser sometidas a extracción y purificación, para evaluar su actividad prebiótica.

RECONOCIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por el soporte financiero al proyecto y por beca otorgada al primer autor.

LITERATURA CITADA

Ali R., and M. Muzquiz. 1998. ANFs in tropical seeds for human nutrition. p. 107-129. In A.J.M. Jansman, G.D. Hill, J. Huisman, and A.F.B. van der Poel (eds.). Recent advances of research in antinutritional factors in legume

Table 3. Oligosaccharides content (mg g⁻¹ dry basis) of seven wild legumes seeds collected in Jalisco, México, during spring-autumn 2008.

Tabla 3. Contenido de oligosacáridos (mg g⁻¹ en base seca) en semillas de leguminosas silvestres colectadas en Jalisco, México, durante la primavera-otoño 2008.

Especie	Contenido de RFO [†]			
	Rafinosa	Estaquiosa	Verbascosa	α -Galactósidos Totales
	mg g ⁻¹			
<i>Acacia pennatula</i>	1,45 ± 0,00 e	3,53 ± 0,01 g	13,70 ± 0,91 c	18,66 ± 0,92 e
<i>Enterolobium cyclocarpum</i>	49,00 ± 4,29 a	31,15 ± 1,33 c	4,77 ± 0,60 e	85,00 ± 6,22 a
<i>Leucaena leucocephala</i>	18,09 ± 0,59 b	11,40 ± 0,01 f	9,36 ± 0,76 d	38,85 ± 1,36 d
<i>Pithecellobium dulce</i>	14,00 ± 0,11 c	70,61 ± 4,97 a	3,54 ± 0,18 e	88,11 ± 5,26 a
<i>Lupinus elegans</i>	7,82 ± 0,42 d	25,50 ± 1,21 d	37,20 ± 2,08 a	70,50 ± 3,71 b
<i>Lupinus montanus</i>	14,55 ± 0,92 c	37,32 ± 2,52 b	12,44 ± 0,94 c	64,31 ± 4,38 b
<i>Lupinus rotundiflorus</i>	5,60 ± 0,34 d	19,34 ± 0,82 e	29,57 ± 1,87 b	54,50 ± 3,03 c

RFO: oligosacáridos de la familia de la rafinosa

Letras diferentes en las columnas indican diferencia estadística a un nivel de $p < 0,05$.

[†]Los valores representan el promedio ± desviación estándar de tres determinaciones.

- seeds and rapeseeds. Wageningen Press, Wageningen, The Netherlands.
- AOAC. 2005. Official Methods of Analysis. 18th ed. Association of Official Analytical Chemists (AOAC), Gaithersburg, Maryland, U.S.A.
- American Dietetic Association. 2004. Position of the American Dietetic Association: Functional Foods. *J. Am. Diet. Assoc.* 104:878-882.
- Bouhnik, Y., L. Raskine, G. Simoneau, E. Vicaut, C. Neut, B. Flourié, F. Brouns, and F.R. Borne. 2004. The capacity of nondigestible carbohydrates to stimulate fecal bifidobacteria in healthy humans: a double-blind, randomized, placebo-controlled, parallel-group, dose-response relation study. *Am. J. Clin. Nutr.* 80:1658 - 1664.
- Campos-Vega, R., T. Garcia-Gasca, R. Guevara-Gonzalez, M. Ramos-Gomez, B.D. Oomah, and G. Loarca-Piña. 2012. Human gut flora-fermented nondigestible fraction from cooked bean (*Phaseolus vulgaris* L.) modifies protein expression associated with apoptosis, cell cycle arrest, and proliferation in human adenocarcinoma colon cancer cells. *J. Agr. Food Chem.* 60:12443-12450.
- Ekvall, J., R. Stegmark, and M. Nyman. 2007. Optimization of extraction methods for determination of the raffinose family oligosaccharides in leguminous vine peas (*Pisum sativum* L.) and effects of blanching. *J. Food Compos. Anal.* 20:678-683.
- Frailé M., E., M.D. García-Suarez, A. Martínez-Bernal, y R. Slomianski. 2007. Nutritivas y apetecibles: conozca de leguminosas comestibles. Parte I. Hojas, vainas y semillas. *ContactoS* 66:27-35.
- Gibson, G.R., and M.B. Robertfroid. 2008. Handbook of prebiotics. CRC Press, Florida, USA.
- Greco, L.V., and M.N. Bruno. 2008. Food science and technology: New research. Nova Sci. Publisher Inc., New York, USA.
- Guemes-Vera, N., J. Martinez-Herrera, J.F. Hernandez-Chavez, J. Yanez-Fernandez, and A. Totosaus. 2012. Comparison of chemical composition and protein digestibility, carotenoids, tannins and alkaloids content of wild *Lupinus* varieties flour. *Pak. J. Nutr.* 11:676-682.
- Gulewicz, P., D. Ciesiolka, J. Frias, C. Vidal-Valverde, S. Frejnagel, K. Trojanowska, and K. Gulewicz. 2000. Simple method of isolation and purification of α -galactosides from legumes. *J. Agric. Food Chem.* 48:3120-3123.
- Hedley, C.L. 2001. Carbohydrates in grain legume seeds: improving nutritional quality and agronomic characteristics. CABI Pub., Wallingford, Oxon, UK.
- Hwa, H.I., and B. Byung-Kee. 2006. Oligosaccharide content and composition of legumes and their reduction by soaking, cooking, ultrasound, and high hydrostatic pressure. *Cereal Chem.* 83:428-433.
- Jimenez-Martinez, C., R. Mora-Escobedo, A. Cardador-Martinez, M. Muzquiz, M. Martin-Pedrosa, and G. Davila-Ortiz. 2010. Effect of aqueous, acid, and alkaline thermal treatments on antinutritional factors content and protein quality in *Lupinus campestris* seed flour. *J. Agric. Food Chem.* 58:1741-1745.
- Kuo, T.M., J.F. VanMiddlesworth, and W.J. Wolf. 1988. Content of raffinose oligosaccharides and sucrose in various plant seeds. *J. Agric. Food Chem.* 36:32-36.
- Lee, Y.K., and S. Salminen. 2009. Handbook of probiotics and prebiotics. 2nd ed. John Wiley & Sons, New Jersey, USA.
- Lisowski, M., M. Lewandowska, M. Bednarczyk, P. Gulewicz, and K. Gulewicz. 2003. Prebiotic properties of pea α -galactosides preparation applied to chicken *per os*. *Bull. Pol. Acad. Sci., Biol.* 5:1291-298.
- Martínez-Villaluenga, C., J. Frías, K. Gulewicz, and C. Vidal-Valverde. 2004. Improved method to obtain pure α -galactosides from lupin seeds. *J. Agric. Food Chem.* 52:6920-6922.
- Martínez-Villaluenga, C., J. Frías, and C. Vidal-Valverde. 2005. Raffinose family oligosaccharides and sucrose contents in 13 Spanish lupin cultivars. *Food Chem.* 91:645-649.
- Morales, M., B. Øllgaard, L.P. Kvist, F. Borchsenius, y H. Balslev. 2006. Botánica económica de los Andes Centrales. Universidad Mayor de San Andrés, La Paz, Bolivia.
- Muzquiz, M., C. Burbano, M.M. Pedrosa, W. Folkman, and K. Gulewicz. 1999. *Lupinus* as a potential source of raffinose family oligosaccharides preparative method for their isolation and purification. *Ind. Crop Prod.* 19:183-188.
- Pastor-Cavada, E., R. Juan, J.E. Pastor, M. Alaiz, and J. Vioque. 2009. Analytical nutritional characteristics of seed proteins in six wild *Lupinus* species from Southern Spain. *Food Chem.* 117:466-469.
- Plöger, S., F. Stumpff, G.B. Penner, J-D. Schulzke, G. Gäbel, H. Martens, Z. Shen, D. Günzel, and J.R. Aschenbach. 2012. Microbial butyrate and its role for barrier function in the gastrointestinal tract. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1258(1):52-59.
- Pollock, C., A. Carins, J. Gallagher, M.A. Machado, and A. Kochhar. 1999. The metabolism of sugars based upon sucrose. p. 47-60. In Plant carbohydrate biochemistry. BIOS Scientific Publishers, Oxford, UK.

- Purata, S.E., R. Greenberg, V. Barrientos, and J. López-Portillo. 1999. Economic potential of the huizache, *Acacia pennatula* (Mimosoideae) in Central Veracruz, México. *Econ. Bot.* 53:15-29.
- Ritchey, S.J., C.R. Meiners, N.L. Derise, H.C. Lau, and E.W. Murphy. 1976. Proximate composition and yield of raw and cooked mature dry legumes. *J. Agric. Food Chem.* 24:1122-1126.
- Roberfroid, M. 2002. Functional foods: concepts and application to inulin and oligofructose. *Br. J. Nutr.* (87) Suppl. 2:S139-S143.
- Roberfroid, M. 2005. Inulin-type fructans: functional food ingredients. CRC Press, Florida, USA.
- Ruiz, L.M.A., and A. Sotelo. 2001. Chemical composition, nutritive value and toxicological evaluation of Mexican wild lupins. *J. Agric. Food Chem.* 39:5337-5341.
- Ruiz-López, M.A., P.M. García-López, H. Castañeda-Vazquez, J.F. Zamora, P. Garzón-de la Mora, and J. Bañuelos. 2000. Chemical composition and antinutrient content of three *Lupinus* species from Jalisco, México. *J. Food Compos. Anal.* 13:193-199.
- Rupérez, P. 1998. Oligosaccharides in raw and processed legumes. *Z. Lebensm. Unters. Forsch. A.* 206:130-133.
- Satya, S., G. Kaushik, and S.N. Naik. 2010. Processing of food legumes: a boon to human nutrition. *Mediterr. J. Nutr. Metab.* 3:183-195.
- SPSS. 2010. Statistics for Windows. Versión 19.0. IBM Corp., Armonk, New York, USA.
- Sungsoo, S.C., and E.T. Finocchiaro. 2010. Handbook of prebiotics and probiotics ingredients: Health benefits and food applications. CRC Press, Florida, USA.
- Villaluenga, C.M., M. Wardęńska, R. Pilarski, M. Bednarczyk, and P. Gulewicz. 2004. Utilization of the chicken embryo model for assessment of biological activity of different oligosaccharides. *Folia Biol.* 52:135-142.
- Waksmundzka-Hajnos, M., J. Sherma, and T. Kowalska. 2008. Thin layer chromatography in phytochemistry. CRC Press, Florida, USA.
- Watson, R.R., and V.R. Preedy. 2010. Bioactive foods in promoting health: probiotics and prebiotics. Academic Press, London, UK.