



*Universidad Nacional de Córdoba
Facultad de Ciencias Agropecuarias
Escuela para Graduados*



**VARIABILIDAD DE LA CALIDAD NUTRICIONAL
DE SOJA EN ARGENTINA POR EFECTO
AMBIENTAL. EVALUACIÓN NUTRICIONAL Y
SENSORIAL DE TOFU COMO PRODUCTO
DERIVADO**

Carla Georgina Marioli Nobile

Tesis
Para optar al Grado Académico de
Doctora en Ciencias Agropecuarias

Córdoba, 2016

**VARIABILIDAD DE LA CALIDAD NUTRICIONAL DE
SOJA EN ARGENTINA POR EFECTO AMBIENTAL.
EVALUACIÓN NUTRICIONAL Y SENSORIAL DE TOFU
COMO PRODUCTO DERIVADO**

Carla Georgina Marioli Nobile

Comisión Asesora de Tesis

Director: Biól. (PhD) María José Martínez
Codirector: Biól. (PhD) Nelson Rubén Grosso
Asesores: Ing. Agr. (PhD) Mónica Balzarini

Tribunal Examinador de Tesis

Biól. (PhD) Damián Maestri
Ing. Agr. (PhD) Pablo Loza
Ing. Agr. (PhD) Mónica Balzarini

Presentación formal académica

Facultad de Ciencias Agropecuarias
Universidad Nacional de Córdoba

AGRADECIMIENTOS

A mi directora de tesis Dra. María José Martínez, por involucrarme en su línea de investigación y en sus proyectos subsidiados en esta temática. Por alentarme y apoyarme en las decisiones propuestas a lo largo de la carrera. Por las gestiones realizadas ante INTA y centros de investigación CEPROCOR e ITA INTA Castelar donde pude realizar actividades de esta tesis asegurando los insumos necesarios, recursos humanos capacitados y equipamientos de alta complejidad. Agradezco su noble actitud de vincularme con profesionales investigadores reconocidos que contribuyeron a enriquecer este trabajo.

A mi codirector, Dr. Nelson Rubén Grosso, por sus respuestas objetivas y alentadoras en cada paso, procurando el cumplimiento a término de los objetivos propuestos para esta carrera de doctorado. A la Dra. Mónica Balzarini, por involucrarse en cada problema dando soluciones prácticas ante nuevos desafíos.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y técnicas (CONICET) y al Ministerio de Ciencia y Tecnología de la Provincia de Córdoba por el financiamiento de este estudio a través del otorgamiento de mi beca doctoral.

Al Dr. Daniel Ploper por aceptarme como becaria e investigadora en la Estación Experimental Agroindustrial Obispo Colombes (EEAOC). A Enrique Ustarroz por permitirme el inicio de las actividades en la Estación Experimental Agrícola INTA Manfredi. Al Dr. Atilio Castagnaro y Dra. Vilma Conci por su preocupación y gestión ante CONICET para permitirme realizar mis tareas de doctorado a un nuevo lugar de trabajo en el menor tiempo posible. A la Dra. Paula Filipponne por su entendimiento como madre y sus gestiones para procurar la redacción de esta tesis.

A Silvia Zossi por haberme incorporado en su equipo de trabajo, por compartir sus conocimientos de manera desinteresada y por su apoyo en todo momento. A mis compañeros del Laboratorio de Química de la EEAOC: Rafael Suarez, Marcos Sastre, Soledad Medina, Bea Juarez, Romina Torres, por su presencia, compartir sus

conocimientos y desmedidos acompañamiento y sugerencias en la labor diaria, siempre con alegría.

A mis compañeras del Laboratorio de Calidad de Granos (EEA INTA Manfredi): Mercedes Silva, Roxana Aguilar, Patricia Fabro, por su calidez en enseñarme el desenvolvimiento en el laboratorio, por su ayuda y aliento diarios, y las charlas de vida.

A Diego Soldini (EEA INTA Marcos Juárez) por su disposición en brindar materiales y dar respuesta a toda consulta. A David Luna (EEA INTA Manfredi) por su acompañamiento y aliento en los ensayos a campo.

Al grupo de trabajo del Laboratorio de Proteínas de ITA INTA Castelar, de manera especial a Adriana Pazos y Verónica Chamorro por su calidez en mi bienvenida y estadía, y por involucrarse en la actividad de investigación.

A la Dra. Silvana Petruccelli y su equipo de trabajo en el Centro de Investigación y Desarrollo en Criología de Alimentos, La plata, por darme la bienvenida a la realización de prácticas en su laboratorio; y muy especialmente a Vanesa Marin Viegas. A Marcela Inga y Dr. Raúl Badini de CEPROCOR por su asesoramiento en el análisis de minerales.

Al Dr. Juan Miguel Marioli (UNRC), Mauricio Turco (CEPROCOR), Fernando Ledesma (EEAOC), por su positiva predisposición en cada consulta y desinteresado compartir de conocimientos.

Al Dr. Sam K.-C. Chang por aceptar el trabajo en conjunto, compartir su extenso conocimiento y volverme miembro de su equipo de trabajo en el laboratorio del departamento de *Food Science, Nutrition and Health Promotion*, Universidad de Misisipi. A los miembros de su equipo de trabajo, especialmente, Shweta Kumari, Yin Zhang, Hsinyi Lu, quienes hicieron mi llegada y estadía acogedora en Starkville, MS.

A los miembros del panel sensorial: Shi Meng, Shweta Kumari, Lei Cao, Yuqing Tan, Soma, Yan Zhang, Jungyi Zan, Li Zhang, Yin Zhang, Hsinyi Lu, Xue Zhang, Junmei

Liu, Chunmei Gu, por su interés en participar y aprender y por sus, aportes, sugerencias y observaciones constantes a lo largo de sesión.

A Cesar Filipone y Julieta Zabala por involucrarse más allá de la búsqueda bibliográfica y responder cálidamente a cada uno de mis pedidos de ayuda.

A la Magíster Mónica de Lourdes Bocco, por haberme introducido y despertado en mí la curiosidad por investigar.

A mis padres, Miriam y Miguel, por su confianza desmedida en mí y en la realización de cada meta que me propusiera. A mis hermanos Franco y Piero por su alegre compañía y apoyo.

A mis suegros, Alicia y Eduardo, por su aliento y presencia. A mis abuelos por su sabiduría.

A mi esposo Agustín, alentándome a seguir en los altos y bajos, quien sostuvo mi ausencia en ocasiones prolongadas, y a mis hijos Mirco y Atilio por darme vida. ¡Gracias!

A mis padres, a mi esposo Agustín y a nuestros hijos Atilio y Mirco.

“Look deep into nature, and then you’ll understand everything better”.

Albert Einstein

RESUMEN

Los componentes químicos y nutrientes del grano de soja son afectados por el ambiente de siembra. Los nutrientes de los granos pasan a los productos alimenticios derivados tales como el tofu que es considerado como muy nutritivo de bajo costo de producción. En este estudio se evaluó el efecto de variables ambientales sobre la composición nutricional del grano en variedades especiales no transgénicas. Además, se preparó tofu con estas variedades especiales y se evaluaron las propiedades químicas, nutricionales y sensoriales de este producto. Para el estudio del efecto ambiental, se determinó la composición química en granos de un cultivar especial del banco de germoplasma de soja del INTA Marcos Juárez (ALIM 3.14) y una variedad comercial de amplia difusión (DM4600) en muestras provenientes de una red de ensayos multi-ambientales conformado por ocho localidades, en dos fechas de siembra y en dos años consecutivos. Sobre tofu se analizó el contenido de proteínas y capacidad antioxidante en genotipos especiales de alto contenido en proteína (ALIM5.09, ALIM18.01 y FN3.85). La concentración de azúcares totales y oligosacáridos varió ampliamente entre muestras ($p = <0.0001$). Entre los minerales también se observó una amplia variación en los granos afectada por las condiciones ambientales ($p = <0.003$). Se identificaron condiciones ambientales óptimas que maximizaron la concentración de los nutrientes en los granos de soja. Así se estableció que cuando las temperaturas medias máximas del aire registradas durante el período de llenado de granos fueron menores a 28.3 °C resultaron en granos con mayor concentración de aminoácidos totales, menor concentración de rafinosa y de Ca. Cuando las precipitaciones fueron superiores a 380.5 mm y 111.5 mm hubo mayor concentración de metionina y mejor relación de proteínas 11S/7S, respectivamente. La concentración de sacarosa y de azúcares totales se incrementó significativamente con temperaturas medias del aire inferiores a 19.4 °C. Mayor concentración de Zn y Se ocurrieron cuando los valores de radiación solar fueron inferiores a 18.1 MJ m⁻². Las características del suelo tuvieron un efecto significativo principalmente en la concentración de elementos menores en el grano de soja. La concentración de Mo y Cd en suelo se relacionó positivamente con la concentración de Mo y Cd en grano. En relación a la preparación de tofu, este producto presentó un valor promedio de contenido proteico de 57.32 g 100g⁻¹ siendo mayor el contenido proteico en las variedades especiales ($p = <0.001$). La concentración proteica en tofu estuvo correlacionada con la concentración proteica en el grano. En tanto a las propiedades antioxidantes medidas como contenido de fenoles totales, contenido de taninos condensados y contenido de flavonoides totales estuvieron en menor concentración en tofu que en la soja usada como materia prima. En cuanto a la evaluación sensorial de este producto, se observó que la aceptabilidad fue buena. Las condiciones ambientales afectan la composición nutricional del grano de soja durante el período de llenado de granos. Es por eso que se deben considerar los ambientes de cultivo, cuando se quiere lograr un producto especial que contenga nutrientes en determinadas concentraciones. Los granos de soja de variedades especiales de altas proteínas desarrolladas y cultivadas en Argentina responden bien en la preparación de tofu y constituyen una alternativa alimenticia para el agregado de valor de una materia prima de bajo costo.

Palabras clave: llenado de granos, variables ambientales, minerales, oligosacáridos, aminoácidos.

ABSTRACT

The chemical composition of soybeans is affected by the environment. Tofu is a soy food and holds the nutritive value of soybeans at low-cost. The purpose of this study was to evaluate the effect of the environment during seed fill on the nutritional composition of specialty and non-specialty soybeans. Additionally, the chemical, nutritional, and sensory properties of tofu prepared with the specialty soybeans were evaluated. The environmental effect was evaluated using samples from a multi environmental trial established on eight locations, in two sowing dates and in two consecutive crop-years. A specialty (non transgenic) soybean variety ALIM3.14 and a transgenic soybean variety widely used in the Argentinean soybean crop area were used. Tofu was prepared with specialty soybean varieties (ALIM5.09, ALIM18.01 y FN3.85). Protein content and antioxidant capacity were analyzed in tofu. Total sugar and oligosaccharide concentrations showed high variation amongst soybean samples ($p = <0.0001$). The mineral concentration in beans also showed high variation and was affected by the environment ($p = <0.003$). Optimum weather conditions that maximized nutrient concentrations in grains were identified. Maximum air temperatures below 28.3 °C resulted in soybeans with higher total amino acid concentration, lower raffinose and lower Ca. Methionine concentration increased and the 11S/7S ratio improved at precipitations over 380.5 mm and 111.5 mm, respectively. Higher sucrose and total sugar concentrations were observed at mean air temperature below 19.4 °C. Solar radiation below 18.1 MJ m⁻² resulted in higher Zn and Se concentrations in beans. The soil properties affected mainly the minor element concentrations in soybeans. Mo and Cd concentrations in soils were positive correlated with Mo and Cd concentrations in grains. Tofu exhibited a mean value of 57.32 g 100g⁻¹ protein. The protein content of tofu was positively correlated with the protein content in soybeans. Specialty soybeans had higher protein concentrations ($p = <0.001$). Antioxidant properties measured by total phenolic content, total flavonoid content, total condensed tannins and antioxidant capacity by DPPH were higher in the beans than in the prepared tofu samples. Satisfactory overall quality of tofu resulted after the sensory evaluation. The chemical composition of soybeans is affected by the environmental conditions during seed fill. Environmental conditions should be considered when desired nutrient concentrations are followed for grains to be destined to the food industry. Specialty high protein soybeans developed and grown in Argentina showed good performance for making tofu and represent an alternative product for the addition of value at low cost.

Key words: seed fill, environmental variables, minerals, oligosaccharides, amino acids.

TABLA DE CONTENIDOS

	Pág.
LISTA DE TABLAS	xii
LISTA DE FIGURAS	xiv
LISTA DE ABREVIATURAS	xvi
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN.....	1
Introducción de la soja en América y su expansión	1
Usos y aplicaciones	2
Calidad nutricional y de compuestos bioactivos del grano de soja	4
Variabilidad en los componentes químicos del grano.....	7
Región sojera argentina	8
Impacto económico y ambiental del cultivo de soja en Argentina	9
Hipótesis.....	11
Objetivos	11
Objetivo general	11
Objetivos específicos	11
Bibliografía	13
CAPÍTULO II. COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LA FRACCIÓN NO OLEOSA DEL GRANO DE SOJA.....	17
INTRODUCCIÓN	17
Proteínas y aminoácidos	17
Carbohidratos	19
Minerales	21
MATERIALES Y MÉTODOS	23
Determinación de glicininas y β -conglucinininas de las proteínas de soja.....	24
Extracción de proteínas	24
Separación mediante SDS-PAGE	24
Cuantificación de las fracciones proteicas y cálculo de	

coeficiente 11S/7S.....	25
Determinación de aminoácidos	26
Hidrólisis Proteica y ajuste de pH	26
Determinación de aminoácidos mediante HPLC	26
Determinación de azúcares solubles	27
Extracción de azúcares a partir de harina de soja.....	27
Determinación de azúcares mediante HPLC.....	28
Determinación de fibra cruda	28
Determinación de minerales	29
Análisis estadístico.....	30
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	31
CONCLUSIONES.....	45
BIBLIOGRAFÍA	46
CAPÍTULO III. EFECTO DEL AMBIENTE SOBRE LA VARIABILIDAD DE LA COMPOSICION NUTRICIAL DEL GRANO DE SOJA.....	51
INTRODUCCIÓN.....	51
MATERIALES Y MÉTODOS.....	53
Variables ambientales.....	54
Análisis de suelos	54
Análisis estadístico	55
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	57
CONCLUSIONES	72
BIBLIOGRAFÍA	74
CAPÍTULO IV. ELABORACION DE TOFU Y DETERMINACIÓN DE SU CALIDAD QUÍMICA Y SENSORIAL UTILIZANDO GRANOS DE SOJA NO-GMO.....	76
INTRODUCCIÓN.....	76
El tofu: origen y expansión en América.....	76
Tipos de tofu. Composición química del tofu firme	77
Percepción sensorial de productos de soja.....	79

MATERIALES Y MÉTODOS.....	80
Material vegetal.....	80
Elaboración de tofu firme.....	81
Análisis de textura en tofu.....	83
Análisis químico de tofu y de soja.....	83
Análisis sensorial de tofu.....	86
Análisis estadístico.....	87
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	90
Análisis químicos en soja y tofu.....	90
Análisis sensorial en tofu.....	96
CONCLUSIONES.....	100
BIBLIOGRAFÍA	101
CAPÍTULO V. CONCLUSIONES GENERALES.....	104
ANEXO 1.....	106

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 2.1. Aminoácidos en harina desgrasada de soja de dos cultivares g 100g ⁻¹ de harina de soja desgrasada en base seca. Valores promediados sobre 20 ambientes evaluados.....	32
Tabla 2.2. Requerimiento diario de aminoácidos esenciales en adultos, y concentración de aminoácidos esenciales en los dos cultivares de soja. Valores promediados sobre 20 ambientes.....	33
Tabla 2.3. Relación entre glicininas (11S) y β-conglicininas (7S) de proteínas de soja de dos cultivares. Valores promedios, mínimos y máximos	37
Tabla 2.4. Concentración de rafinosa y fibra cruda en dos genotipos de soja en ocho localidades.....	38
Tabla 2.5. Azúcares solubles en semillas de soja de dos cultivares. Valores promediados sobre 20 ambientes.....	39
Tabla 2.6. Concentraciones de minerales por genotipo, especial y comercial, para ocho localidades con interacción G×A significativa.....	41
Tabla 2.7. Cenizas y minerales en porotos de soja de dos cultivares. Valores promediados sobre 20 ambientes.....	42
Tabla 2.8. Coeficientes de correlación de Pearson entre minerales presentes en la semilla de soja.....	45
Tabla 3.1. Características de los suelos de las ocho localidades estudiadas en la región sojera argentina.....	58
Tabla 3.2. Características climáticas de los ambientes definidos por la combinación de localidad, año y fecha de siembra. Medias de valores diarios tomados durante R5 y R7.....	60
Tabla 3.3. Elementos minerales en muestras de suelos de ocho localidades.....	61
Tabla 3.4. Concentración máxima admitida de metales en suelos para uso agrícola según Ley 24051 (1992).....	61
Tabla 3.5. Condiciones ambientales óptimas (CAO) definidas a partir de umbrales de variables climáticas que maximizan la concentración de aminoácidos en harina desgrasada de soja (g 100g ⁻¹ MS) en comparación al valor promedio obtenido sobre dos cultivares de soja en 21 ambientes evaluados.....	64

Tabla 3.6. Condiciones ambientales óptimas (CAO) definidas a partir de umbrales de variables climáticas durante el período de llenado de granos de la soja (R5R7) que maximizan la concentración de azúcares, fibra y cenizas en soja ($\text{g } 100\text{g}^{-1}$ MS) en comparación a los valores promedios obtenido sobre dos cultivares de soja en 21 ambientes.....	67
Tabla 3.7. Condiciones ambientales óptimas definidas a partir de umbrales de variables climáticas durante el período de llenado de granos de la soja (R5R7) que maximizan la concentración de minerales en soja en comparación al valor promedio obtenido sobre dos cultivares de soja en 21 ambientes.....	72
Tabla 4.5. Muestras de soja usadas para elaboración de tofu.....	81
Tabla 4.2. Contenido de proteína en muestras de soja y tofu, rendimiento en extracto de soja y tofu en kg de semillas de soja. Parámetros de textura medidos en tofu mediante INSTRON.....	91
Tabla 4.3. Coeficientes de correlación de Pearson entre componentes químicos del grano y tofu, y los parámetros de textura.....	93
Tabla 4.4. Contenido de fenoles totales (TPC), flavonoides totales (TFC) y taninos condensados totales (CTC) y potencialidad antioxidante medida como DPPH en muestras de soja y tofu.....	94

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1.1. Área sembrada con soja en el mundo (GAEZ, 2011).....	2
Figura 2.1. Representación en diagrama de cintas de la estructura de un homo-hexámero de glicinina (11S) (Adachi et al., 2001).....	18
Figura 2.2. Representación en diagrama de cintas de la estructura de un homo-trímero de β -conglucina (Maruyama et al., 2001).....	18
Figura 2.3. Galacto-oligosacáridos presentes en el grano de soja.....	20
Figura 2.4. Sub unidades proteicas en gel en gradiente de acrilamida (8-16%) SDS-PAGE. En naranja se señalan las subunidades α' , α y β de las β -conglucinas (7S). En verde se señalan las subunidades ácidas (A) y básicas (B) de las conglucinas (11S). A la izquierda se indican los pesos moleculares del marcador usado en kilo Daltons (kDa).....	34
Figura 2.5. Patrón electroforético de proteínas de soja separadas en gel en gradiente de acrilamida (8-16 %). Cada calle del gel presenta proteínas de soja del cultivar Alim3.14 de distinta procedencia en cuanto a localidad, año y fecha de siembra en sus dos repeticiones a campo como se indica a continuación: líneas 1 y 2 lugar Cerrillos, segundo año, primer fecha de siembra, repeticiones 1 (I913) y 2 (I916). Líneas 3 y 4 Cerrillos, segundo año 2, segunda fecha de siembra, repeticiones 1 (I928) y 2 (I939). Líneas 5 y 6 Famaillá, primer año, segunda fecha de siembra, repeticiones 1 (H1357) y 2 (H1385). Líneas 7 y 8 Manfredi, primer año, primer fecha de siembra, repeticiones 1 (H1060) y 2 (H1067). Líneas 9 y 10 Manfredi, primer año, segunda fecha de siembra, repeticiones 1 (H1075) y 2 (H1084). Líneas 11 y 12 Manfredi, segudno año, segunda fecha de siembra, repeticiones 1 (I857) y 2 (I877). M: Marcador de peso molecular de proteínas BioRad.....	36
Figura 2.6. Cromatograma de azúcares solubles de una muestra de soja.....	37
Figura 3.1. Mapa de suelos de Argentina indicando las 8 localidades involucradas en este estudio a lo largo del área sojera argentina. Fuente: Atlas de Suelos de la República Argentina. http://geointa.inta.gov.ar/visor/?p=model_suelos	59
Figura 3.2. Representación gráfica del análisis de regresión PLS. Líneas continuas = proyecciones de las variables predictoras (variables climáticas) y líneas discontinuas = proyecciones de las variables predichas (concentración de aminoácidos en soja y relación proteica 11S/7S). Los puntos vacíos = distribución de los ambientes.....	62
Figura 3.3. Representación gráfica del análisis mediante regresión PLS. Las líneas continuas representan las proyecciones correspondientes a las variables predictoras (variables climáticas). Las líneas discontinuas representan las proyecciones de las variables predichas (concentración de azúcares, fibra cruda y cenizas en soja). Los puntos vacíos indican la distribución de los ambientes.....	65

- Figura 3.4. Representación gráfica del análisis mediante regresiones por PLS. Las líneas continuas representan las proyecciones correspondientes a las variables predictoras (variables climáticas y de suelo). Las líneas discontinuas representan las proyecciones de las variables predichas (concentración de minerales en soja). Los puntos vacíos indican la distribución de los ambientes. Nombres de minerales terminados en “S” fueron usados para indicar que se trabajó con su disponibilidad en suelo.....71
- Figura 4.1. Bandeja presentada a los panelistas para evaluación sensorial de muestras de tofu.....89
- Figura 4.2. Extracción compuestos fenólicos para análisis de contenido de fenoles totales (TPC), flavonoides totales (TFC), taninos condensados (CTC) y actividad antioxidante por DPPH. Se observa en el tubo rotulado FN3.85 partículas oscuras al fondo del tubo correspondiente a semillas de soja con hilo oscuro. El resto de los materiales son grado alimenticio con hilo claro.....92
- Figura 4.3. Comparación de los contenidos de fenoles totales (TPC), flavonoides totales (TFC), taninos condensados (CTC) y actividad antioxidante por DPPH en diferentes semillas de leguminosas (Xu *et al.*, 2007) y muestras de soja amarilla y tofu correspondientes a promedios de las muestras evaluadas en este estudio.....95
- Figura 4.4. Atributos evaluados en muestras de tofu elaborados a partir de diferentes variedades de soja. Valores de $p \leq 0.05$ indican diferencias significativas.....96
- Figura 4.5. Gráficos en radar indicando los perfiles de intensidades de atributos evaluados en muestras de tofu elaboradas a partir de diferentes muestras de soja. Extra firme y blando corresponden a los estándares comerciales de Nasoya®, “SB270” variedad específicamente desarrollada para tofu, “ideal” representa el perfil deseado en calidad de tofu, “ALIM5.09” y “ALIM18.01” son variedades mejoradas altas en proteína, “FN3.85 es una variedad transgénica comercial.....98
- Figura 4.6. Análisis de componentes principales de las variables atributos sensoriales en diferentes muestras de tofu.....99

LISTA DE ABREVIATURAS

11S/7S: cociente entre proteínas glicininas y β -conglucininas

α : alfa

A: ácidas

AA: aminoácidos

AAE: aminoácidos esenciales

AANE: aminoácidos no esenciales

AAT: aminoácidos totales

AcCys: ácido cisteico

Ala: alanina

ALIM: cultivares de soja especiales desarrolladas en el programa de mejoramiento EEA
INTA Marcos Juárez

Arg: arginina

Asp: asparraguina

Az.Sol.Tot.: Azúcares Solubles Totales

B: básicas

BH: balance hídrico

BO: Bordenave

BW: Barrow

CA: Cerro Azul

CAO: condiciones ambientales óptimas

CE: Cerrillos

CEPROCOR: Centro de Excelencia en Productos y Procesos

CIC: capacidad de intercambio catiónico

Com.: comercial

CTC: contenido de taninos condensados totales

Cys: cisteína

DPPH:

EEA: Estación Experimental Agropecuaria

EEAOC: Estación Experimental Agroindustrial Obispo Colombres

EV: contribución del ambiente a la variabilidad total

Esp.: especial
FA: Famailá
FC: Fibra cruda
Glu: glutamina
Gly: glicina
G×A: interacción genotipo-ambiente
His: histidina
hs: horas
IDR: ingesta diaria recomendada
Ile: isoleucina
INTA: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria
Leu: leucina
LMM: modelos lineales y mixtos
Lys: lisina
MA: Manfredi
Met: metionina
mg: miligramos
mL: mililitros
MS: materia seca
PA: Paraná
PNCER: Proyecto Nacional de Cereales
R1: inicio de floración en cultivo de soja
R5: inicio de llenado de granos en cultivo de soja
R7: madurez fisiológica en cultivo de soja
RS: radiación solar
RECSO: Red Nacional de Evaluación de Cultivares de Soja
RFO: oligosacáridos de la familia de rafinosa
RG: Resistente a glifosato
RQ: Reconquista
Sac.: sacarosa
SDS-PAGE: electroforesis en geles de poliacrilamida con detergente dodecilsulfato sódico

Ser: serina

Thr: treonina

Tm: temperatura media del aire

Tmx: temperatura máxima del aire

Tmn: temperatura mínima del aire

Trp: triptofano

Tyr: tirosina

pEVT: evapotranspiración potencial

Phe: fenilalanina

PLS: regresiones de los cuadrados mínimos parciales

PP: precipitación caída

Pro: Prolina

TPC: contenido de fenoles totales

TFC: contenido de flavonoides totales

μL: microlitros

Val: valina

INTRODUCCIÓN

Introducción de la soja en América y su expansión

La “soja” *Glycine max* (L.) Merrill es una especie herbácea de crecimiento anual del género *Glycine* (vocablo introducido por Linneaus en 1737 del griego “glykys”, dulce) familia *Leguminosae*, subfamilia *Papilionoideae*, tribu *Phaseoleae*. Originaria del sudeste asiático, fue introducida en América en 1765 por un marinero, Samuel Bowen, en Georgia, Estados Unidos de América, previo permiso de la corona inglesa, con el objetivo de elaborar “salsa de soja” un aderezo popular propio de platos chinos (Hymowitz y Shurtleff, 2005). Registros histórico de 1770 indican que Benjamín Franklin (Gran Bretaña) envió semillas de soja a un botánico amigo en Filadelfia (EE.UU.) junto a una receta del queso de soja “tofu” (Shurtleff y Aoyagi, 2013). La difusión del cultivo de soja fue ocurriendo de forma paulatina. George Washington Carver (Alabama, Estados Unidos) la propuso como alternativa para la recuperación de suelos en rotación con algodón y uso potencial de la semilla como materia prima oleosa para la elaboración de pinturas hacia primeras décadas de 1900.

El cultivo fue adquiriendo firmeza luego de finalizada la Segunda Guerra Mundial. En el año 1994, la ingeniería genética logró liberar una de las limitaciones existentes sobre la producción extensiva del cultivo de soja: el control de especies de malezas dicotiledóneas en un cultivo de una dicotiledónea. La nueva tecnología de cultivo acoplada a un sistema de siembra directa sobre rastrojo, de plasticidad ambiental en seco e incesante demanda externa definieron su rápida expansión por América poblando los suelos propicios para la agricultura. Así hoy, el continente americano es el principal abastecedor de soja en el mundo (Fig. 1.1), en donde Argentina ocupa el tercer lugar luego de Brasil (primer productor mundial) y Estados Unidos.

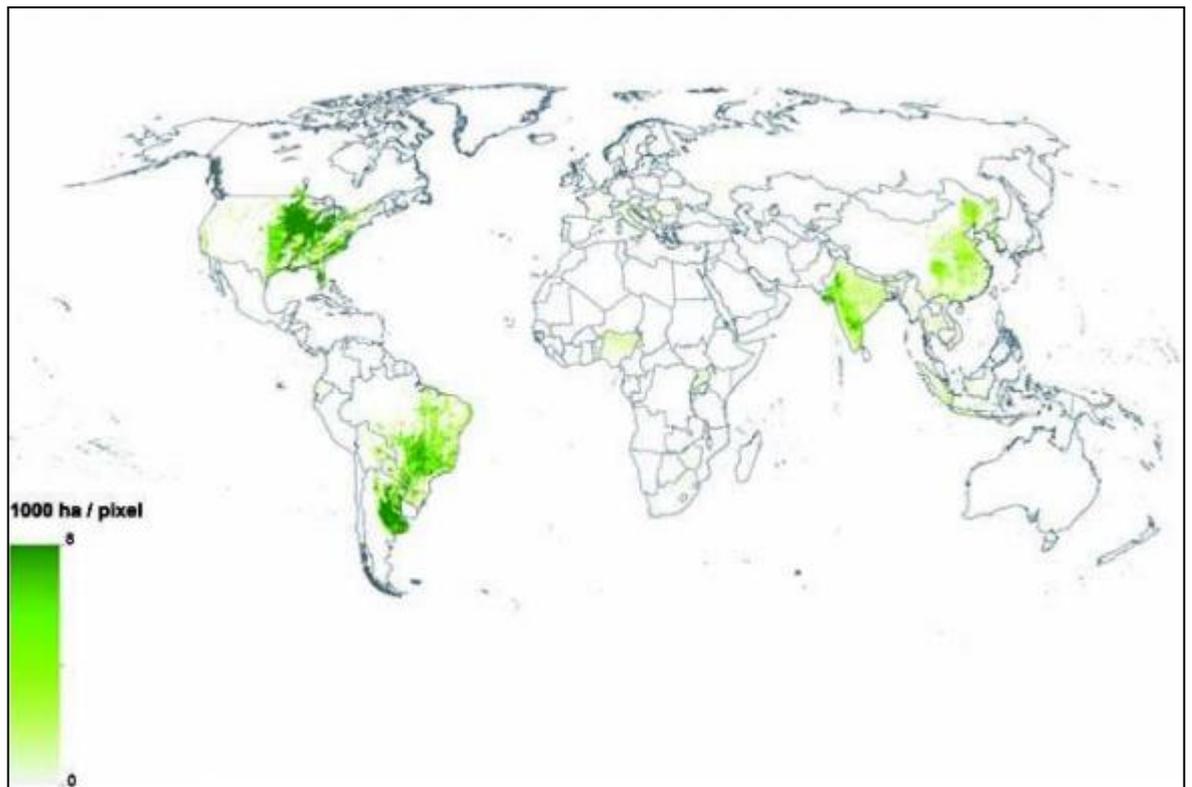


Fig. 1.1. Área sembrada con soja en el mundo (GAEZ, 2011).

Usos y aplicaciones

Los registros más antiguos sobre el uso de la soja en países asiáticos describen su aplicación principalmente para alimentación humana. El desarrollo culinario de la soja como materia prima es observable en la variedad de platos y productos que pueden ser preparados y que son incorporación en la dieta diaria en países como China, Japón, Taiwán, las Koreas, India, Vietnam, Bangladesh, entre otros.

Hace unos años, un creciente número de investigadores comenzó a profundizar sobre el estudio de las propiedades nutraceuticas del grano de soja, al reconocer la importancia de la dieta en la etiología de ciertas enfermedades de cáncer (Messina and Barnes, 1991). Tras las evidencias de los resultados, la Asociación Americana de la Salud (AHA, American Health Association) comenzó a recomendar el consumo diario de soja y de productos de soja (tofu, miso, nato, edamame, otros) para promover la salud

cardiovascular y general de las personas (Sacks *et al.*, 2006). De esta forma, el poroto, que hasta entonces había sido exportado casi en su totalidad en forma de grano, aceite y alimento proteico animal, comenzó a incluirse de manera más intensa en la dieta de los americanos.

Se consideran alimentos de soja a todos aquellos productos que se obtienen del procesamiento de los granos enteros y que conservan sus propiedades nutritivas en calidad de proteínas, carbohidratos y aceite, sin tomar en cuenta los aditivos y procesados proteicos (ej. concentrados y aislados de proteínas en embutidos) y los aderezos (ej. salsa de soja). En este sentido la leche de soja, el tofu (queso de la soja) y los granos germinados como brotes de soja, son los alimentos que mejor se han adaptado y más se han difundido en la dieta occidental. Diferentes tipos de tofu, leche de soja de distintas marcas, brotes de soja, son posibles de hallar en las góndolas de los supermercados hasta en pueblos muy pequeños en Estados Unidos y en algunas grandes ciudades de Brasil. Otros productos como miso, nato, yuba, edamame, siguen siendo exclusivos de tiendas asiáticas.

En la República Argentina, tercer productor mundial de soja, desde su introducción la soja ha sido cultivada para la obtención y exportación, casi en su totalidad, de aceite de soja y de pellets proteicos para alimentación animal. El sistema productivo vigente orientado al alto rendimiento en grano para la elaboración de productos para alimentación animal más que para la alimentación humana ha sido conducido por la falta de hábito en el consumo de la soja y de sus subproductos, falta de familiaridad con el sabor de la soja, escaso conocimiento de recetas apropiadas para su consumo humano directo, sumado al hecho de una dieta rica en proteína animal que caracteriza la cultura argentina.

El desarrollo e incorporación de los productos alimenticios derivados de la soja en Argentina está llevando su tiempo. Una sola empresa de origen local lanzó hace unos años, con buena aceptación en el mercado, leches de soja mezcladas con jugos de frutas. Los brotes de soja también son comercializados en algunas verdulerías y han sido de fácil incorporación en ensaladas o woks. El grano entero es usado en algunos casos en la preparación de guisos o en forma de pasta para la preparación de “milanesas de soja” o paté de soja. Los alimentos de receta oriental elaborados con soja (tofu, nato, miso,

edamame, yuba) son desconocidos por mayor parte de la población argentina. Es posible de encontrar alguno de ellos en tiendas asiáticas, donde la producción es familiar y sin regulación por parte de las entidades oficiales.

El tofu es un alimento resultante de la coagulación de las proteínas presentes en la leche de soja. Es un alimento de alto valor nutricional que puede conservar las propiedades nutritivas de la soja en cuanto a su aporte proteico y de ácidos grasos esenciales insaturados, además de vitaminas y minerales. Existen distintas maneras de elaborar tofu, que dan como resultado diferentes tipos de los mismos, tal como existen diferentes tipos de queso o de panes.

La soja se ha definido como la “carne de los pobres”. Chang y Hou (2004) declaran que para ellos la ausencia, a lo largo de la historia, de hechos de malnutrición masiva prolongada en China se ha debido en parte a la ingesta diaria de soja. Uno de los objetivos del presente estudio fue elaborar tofu como alternativa al valor agregado de la soja. “Why tofu in the land of beef?” (¿Por qué tofu en la tierra de la carne?), fue la pregunta del director de Fulbright Argentina (entrevista personal, enero de 2014). La búsqueda de un alimento nutritivo y proteico que incorpore todos los beneficios de la soja para promover una dieta equilibrada en proteína vegetal y animal, y que sea de preparación sencilla, sugirieron al tofu como alimento en estudio.

Calidad nutricional y de compuestos bioactivos del grano de soja

Según normas ISO 9000:2000, “calidad es el conjunto de propiedades y características de un producto que le confieren su capacidad de satisfacer necesidades implícitas o explícitas”. En alimentos, estas características desde un punto de vista nutricional, pueden definirse como la presencia de sustancias que contribuyan a satisfacer una necesidad energética y de nutrientes particulares (FAO, 2004). En el presente trabajo se define como “nutricional” a toda sustancia química que ejerce una función definida en el metabolismo animal y humano para que el mismo opere de manera normal. “Compuestos bioactivos” son constituyentes extranutricionales presentes en concentraciones pequeñas en los alimentos cuya acción en el organismo humano y animal previene o atenúa la aparición

o desarrollo de enfermedades. El accionar de los compuestos bioactivos es el resultado de amplias investigaciones epidemiológicas, en donde dietas ricas en ciertos vegetales tuvieron un efecto protector del organismo ante enfermedades cardiovasculares y cáncer, principalmente (Kris-Etherton, 2002). También se hará uso de los vocablos “grano”, “semilla” y “poroto” para hacer referencia a la semilla de soja. Si bien el fruto de la soja es una legumbre, se utilizará el término “grano” popularmente referido al poroto o semilla.

Químicamente, el grano de soja está compuesto en promedio por un 37% de proteínas, 30% de carbohidratos, 20% de lípidos, 8% de agua y 5% de cenizas (USDA, 2015; Wilson, 2004). El 90% de las proteínas del grano son proteínas de reserva del tipo globulinas. El 70% de estas globulinas está compuesto mayoritariamente por glicininas (coeficiente de sedimentación 11S) y b-conglicininas (7S). Las glicininas, 11S, son homohexámeros (peso molecular 300-380 kDa) de sub-unidades ácidas (~35 kDa) y básicas (~20 kDa) ligadas principalmente por uniones disulfuro dado por su mayor contenido de residuos de aminoácidos azufrados metionina y cisteína (Utsumi *et al.*, 1997). Las β -conglicininas (7S, 150-200 kDa) son glicoproteínas en forma de trímeros, homotrímeros, de sub-unidades identificadas como α' (72 kDa), α (68 kDa) y β (52 kDa) (Thanh y Shibasaki, 1997). Ambas globulinas presentan heterogeneidad molecular de sus subunidades entre cultivares (Utsumi *et al.*, 1981; Thanh y Shibasaki, 1978, Yamauchi *et al.*, 1981).

La proteína de soja es interesante desde el punto de vista nutricional, nutracéutico y en la reología de los alimentos. Todos los aminoácidos esenciales para la nutrición humana están contenidos en la proteína de soja, lo que define su calidad nutricional comparable a la proteína del huevo, leche o carne (Schaafsma, 2000). A demás de su capacidad nutricional, numerosos estudios se han realizado sobre sus propiedades funcionales (Philips y Williams, 2011). La promoción de hipocolesterolemia en ratas con alimento enriquecido en 11S y 7S (Lovati *et al.*, 1992), mejor regulación de lípidos en sangre e incremento del colesterol HDL (Fassini *et al.*, 2012), son algunos de sus efectos detectados en estos estudios realizados. Los fragmentos peptídicos también intervienen en la prevención de enfermedades, algunos con capacidad inmunoestimulante (Yoshikawa *et al.*, 2000), otros más conocidos, como el Lunasin con capacidad inhibitoria de teratogenesis en

células de mamíferos (McConnell *et al.*, 2014). Recientemente se ha logrado aislar una proteína presente en la fracción de las β -conglucinas (7S), cyanovirin-N (CVN), capaz de unirse a la proteína HIV GP120 y detener la infección del virus (Murad *et al.*, 2014).

El 50% de los carbohidratos totales del grano son del tipo insolubles, principalmente fibra insoluble (ligninas, celulosa), y el 50% restante está compuesto por fibra soluble (pectinas) y azúcares solubles, mayoritariamente sacarosa (8%), estaquiosa (3.5%), y rafinosa (1%) y en menor porcentaje glucosa, fructosa y verbascosa. Rafinosa, estaquiosa y verbascosa (RFO, “*Raffinose Family Oligosaccharides*”) son oligosacáridos de sacarosa ligados a una, dos y tres moléculas de galactosa, respectivamente. La importancia de la presencia de los RFO en grano de soja tiene puntos de vista opuestos. Los animales monogástricos (incluidos los humanos) carecemos de la enzima galactosidasa encargada de la ruptura del enlace galactosídico entre la sacarosa y la galactosa. Los RFOs no son digeridos en el duodeno y terminan siendo fermentados por las bacterias simbióticas del último tramo del intestino grueso. Metanol, butanol e hidrógeno son productos de esta digestión bacteriana causante de malestar intestinal. Por otro lado, los RFOs estimulan el crecimiento de estas bacterias intestinales encargadas de mantener un epitelio intestinal sano. Por esta razón, se los considera bifidogénicos o prebióticos. Se ha demostrado que la ingesta de estos compuestos podría prevenir la aparición de enfermedades como el cáncer de colon.

La porción lipídica del poroto de soja está constituida por ácidos grasos insaturados de los cuales, linoleico y linolénico son de condición esencial para la nutrición humana y animal (Valenzuela *et al.*, 1999; 2000). La fracción de cenizas, incluye minerales relevantes por su aporte a la calidad nutricional y de inocuidad del grano. Los elementos mayoritarios son K, P, Ca, Mg, Fe y Zn, y a nivel de trazas, Se, Co, Mo.

Están presentes además otros compuestos de interés nutricional y bioactivo. A modo de ejemplo se citan: tocoferoles que actúan como vitamina E en el cuerpo humano y son antioxidantes naturales del aceite del grano (DellaPenna y Pogson, 2006); isoflavonoides, con propiedades de prevenir cáncer, enfermedades cardiovasculares,

reabsorción ósea y dar alivio a los síntomas menopáusicos (Messina, 1995; Anderson y Garner, 1997; Barnes *et al.*, 2000).

Variabilidad en los componentes químicos del grano

El fenotipo de la composición química del grano de soja depende del genotipo (Chen, 2004). La genética de cultivo elegida responde principalmente a los objetivos productivos que, a su vez, están sujetos a la demanda de mercado conforme a la coyuntura socio-político-económica del momento. Argentina desde hace unos años es líder mundial en exportación de aceite de soja y proteína en forma de harina o pellets para alimento animal. El desarrollo de la industria del prensado en cierta forma impactó sobre la diversidad de los genotipos usados que, sumado a políticas de Estado indirectamente promotoras de un paquete tecnológico de soja modificada genéticamente (Soldini, 2010), desencadenaron en la actual uniformidad genética de los cultivares en uso.

La expresión del genotipo elegido depende también de la adaptación o modulación del cultivo al ambiente donde ha crecido y se ha desarrollado. Dardanelli *et al.* (2006) estudiaron y concluyeron en la definición de regiones agroecológicas propicias para el contenido de proteína y aceite en grano de soja en Argentina. Más tarde demostraron que sojas en sistemas productivos en secano presentaron una respuesta variable y diferente en contenido de aceite y proteína frente al efecto de la temperatura del aire (Carrera *et al.*, 2009). Continuando el estudio sobre la composición química y nutricional del grano, se observó mayor contenido de aceite con baja capacidad de oxidación (debido a una mayor concentración relativa de ácido graso oleico) en sojas producidas en ambientes templados y mayor contenido de isoflavonoides totales, ácidos grasos esenciales y tocoferoles totales, en ambientes frescos lo que daría granos de sojas con mejores propiedades nutraceuticas y antioxidantes (Carrera *et al.*, 2011).

Hasta el momento, las variaciones producidas en los componentes químicos y nutricionales de la fracción proteica, de los carbohidratos y de la composición mineral no han sido evaluadas en los diferentes ambientes edafoclimáticos de Argentina.

Región sojera argentina

Con 31 millones de hectáreas de cultivos, Argentina es el décimo país en el mundo según mayor superficie cultivable (BCR, 2015). De los 31 millones, 20.4 están dedicados a la siembra de soja, área que se extiende entre los 23 a los 39 grados de latitud Sur. La bonanza edafoclimática característica del territorio ha hecho posible históricamente la dedicación de las tierras a la actividad agrícola donde la soja encuentra condiciones propicias para su cultivo en sistemas de secano. La agricultura de explotación extensiva tiene sus inicios en Argentina en los primeros años del siglo XX (Barsky y Gelman, 2009). Este hecho indirectamente nos instruye sobre la juventud del recurso suelo en uso que resulta en la obtención de materias primas de excelente calidad, con bajo nivel de fertilizaciones.

El cultivo se desarrolla en fechas de siembra desde septiembre a febrero con grupos de madurez desde el II al IX (Salado Navarro, 2012). Las principales limitantes para el rendimiento son el agua edáfica (Bacigaluppo *et al.*, 2011), seguida por la temperatura y radiación solar durante el crecimiento y el desarrollo del mismo (Thuzar *et al.*, 2010). El conjunto de condiciones ambientales definido por temperatura, radiación solar, precipitaciones, tipo de suelo, es variable y diferente a lo largo del área cosechable y entre fechas de siembra. Los factores ambientales afectan la composición química del grano de soja (Ray *et al.*, 2008), especialmente durante el período de llenado de los granos que es cuando se produce la síntesis y acumulación de los distintos componentes químicos (Wilson, 2004).

Los ensayos multiambientales de manejo uniforme resultan de utilidad para evaluar los efectos del ambiente sobre los principales componentes químicos del grano en condiciones de campo. Desde 1980, la red nacional de soja del INTA conduce anualmente ensayos multiambientales comparativos de rendimiento para evaluar los distintos cultivares comerciales de soja que se encuentran en uso (Bairgorrri y Giorda, 1997; Fuentes, com. pers.). Los resultados de esta red de ensayos obtenidos gracias al proyecto PICTO BID FONCyT (N° 08-12949) (2002) muestran una amplia variación tanto en los factores climáticos influyentes durante el período de cultivo de la soja a lo largo de la región sojera

de Argentina, como en el efecto de los mismos sobre los componentes nutricionales del grano. Se han observado variaciones por efecto ambiental durante la etapa fenológica del llenado del grano de soja de las concentraciones de aceite, proteínas (Carrera *et al.*, 2009; Carrera *et al.*, 2011a; Dardanelli *et al.*, 2006; Martinez *et al.*, 2005), isoflavonoides, ácidos grasos y aminoácidos (Carrera *et al.*, 2011b; Carera *et al.*, 2014; Martinez *et al.*, 2015, 2009a, 2009b, 2007) en los granos de soja por efecto ambiental a través de la región sojera argentina.

Impacto económico y ambiental del cultivo de soja en Argentina

Un total de 58 millones de toneladas de soja fueron cosechadas en la campaña 2014-2015 (BCR, 2015). Casi la totalidad de la producción sojera argentina es exportada. Los derechos a exportación impuestos desde el año 2008, ascendieron al 35% para soja en grano y un 3% menos para productos de primera industrialización como aceite y harina de soja (Rossi, 2015). Las plantas de molienda para la obtención de aceite y hariana de soja tuvieron una gran expansión por el aumento de la importación de soja desde países limítrofes que sumados a lo producido en la República Argentina hicieron que para el año 2003 la capacidad instalada superara 4 veces la de los Estados Unidos. A partir de la imposición de retenciones, a pesar de la prohibición de importaciones, la molienda se sostuvo por el aumento de la proporción del área sembrada de esta oleaginosa en detrimento del área destinada a otros cultivos como maíz y trigo que, además, también fueron grabados con retenciones. A modo de ejemplo para destacar el crecimiento de la industrialización de la soja, quedó definida en Rosario, Argentina, la planta procesadora de aceite vegetal más grande en el mundo (Banbrook, 2005). Así fue que Argentina se convirtió en el primer exportador mundial de aceite y harina proteico para alimentación animal (IndexMundi, 2015).

El escenario vigente ha pujado al productor agropecuario a la búsqueda de un objetivo productivo reinante, el de maximizar el rendimiento en grano para la producción de aceite y pellets, ahora fomentado también hacia el biodiesel. La rentabilidad y plasticidad del paquete tecnológico de la soja transgénica es el producto que mejor se adapta a este objetivo y que ha hecho posible la expansión de la frontera agrícola con

rendimientos desde aceptables hasta excelentes. Por otro lado, la producción de soja convencional requiere de un manejo y sistema productivo especializado, que frente al de la soja RR desalienta la producción de sojas especiales (Rojas Lagarde, 2011; Trigo *et al.*, 2003). Además, la producción diferenciada, es decir de sojas no transgénicas de composición de grano diferencial junto a la implementación de un sistema de trazabilidad de organismos no genéticamente modificados requieren de costos adicionales y de estar sujetos a un sistema impositivo diferencial (Soldini, com. pers.). Más del 99% de la soja sembrada en Argentina corresponde a genotipos transgénicos del tipo resistentes a glifosato (ArgenBio, 2014).

La falta de biodiversidad es un factor en potencia de pérdida completa de cultivos (Finckh, 2008; Benbrook, 2005). La uniformidad genética del cultivo de soja, siendo la población vegetal uniforme más grande sembrada al momento en Argentina, se visualiza como un sistema inestable desde el punto de vista ambiental, y también desde el punto de vista económico, donde la comercialización del grano, proteína para alimento animal y aceite de soja depende de pocos países compradores del mayor volumen tales como la UE, principal destino de la proteína, y China, principal destino del aceite y grano.

Un reporte publicado por Cuniberti y Herrero (2013) revelo la caída en la proteína de la soja argentina. En su artículo proponen que, si bien el ambiente juega un papel definitivo sobre la composición química del grano en términos de proteína y aceite, la variación de genotipos es la fuente de variación que puede manejar el productor (Cuniverti y Herrero, 2013). Ha sido publicado previamente, que la calidad química de la soja argentina se encuentra en desventaja competitiva con respecta a la del resto de los cinco productores mundiales (Estados Unidos, Brasil, China e India) por el menor nivel proteico y de aminoácidos (Karr-Lillienthal *et al.*, 2004).

La promoción del agregado de valor en origen y diferenciación de la producción sojera se vislumbran como propuestas necesarias a favor de la diversificación de cultivos, productos y apertura de nuevos mercados. El presente estudio propone la investigación sobre la calidad de la soja obtenida en distintos ambientes productivos de la región sojera argentina, usando materiales especiales (no transgénicos) pertenecientes al programa de

mejoramiento genético de la soja del INTA Marcos Juárez. Además, se propone la elaboración de un producto alimenticio, tofu, usando los materiales argentinos, como estímulo a la promoción de la diversificación de genotipos y agregado de valor en origen.

Hipótesis

La composición de importancia nutricional de aminoácidos esenciales, proteínas de reserva, azúcares solubles y elementos minerales presentes en los granos de soja, varía ambientalmente.

La calidad nutricional del grano se asocia con la calidad nutricional y sensorial del tofu derivado.

Objetivos

Objetivo general

Caracterizar la calidad del grano de soja cultivado en Argentina con distintos genotipos y ambientes y el tofu derivado a través de la evaluación de su composición nutricional y sensorial.

Objetivos específicos

1. Poner a punto métodos para la determinación de aminoácidos, azúcares, fibra cruda y minerales en granos de soja.
2. Ampliar la caracterización de la calidad nutricional del grano de soja de un genotipo comercial y uno especial a través de la determinación de proteínas de reserva, aminoácidos, azúcares, fibra cruda y elementos minerales.
3. Evaluar el efecto de variables ambientales sobre proteínas de reserva, aminoácidos, azúcares, fibra cruda y elementos minerales del grano de soja, explorando patrones de

variabilidad producidos en respuesta a variables climáticas en el período de llenado de granos y a variables relacionadas al contenido mineral del suelo.

4. Determinar contenido de proteínas totales y de reserva, antioxidantes, textura y aceptabilidad de tofu derivado de granos de soja.

BIBLIOGRAFÍA

- ArgenBio. 2014. Cultivos aprobados y adopción. Publicado en internet. Disponible en: <http://www.argenbio.org/index.php?action=alimentos&opt=5>. Activo Abril de 2015.
- Barsky O. y Gelman J. 2009. La conformación básica del agro moderno 1880-1914. En: Historia del agro argentino. Desde la conquista hasta comienzos del siglo XXI. Barsky O. y Gelman J. (eds) Tercera Edición. Editorial Sudamericana, Buenos Aires, Argentina. Pp. 165-258
- BCR (Bolsa de Cereales de Rosario). 2015. Publicado en internet, disponible en: <http://www.bcr.com.ar/Pages/gea/estimaProd.aspx>. Activo Marzo de 2015.
- Benbrook C.M. 2005. Rust, resistance, run down soils, and rising costs – problems facing soybean producers in Argentina. Technical paper N° 8.
- Carrera C., Martínez M. J., Dardanelli J. and Balzarini M. 2009. Water deficit effect on the relationship between temperature during the seed filling period and soybean seed oil and protein concentrations. *Crop Sci.* 49: 990-998.
- Carrera C., Martínez M. J., Dardanelli J. and Balzarini M. 2011a. Environmental effect and correlation of seed components in nontransgenic soybeans: protein, oil, unsaturated fatty acids, tocopherols, and isoflavones. *Crop Sci.* 51:1-10.
- Carrera C.S. 2011. Variación ambiental de componentes químicos en genotipos de soja con características diferenciales para calidad nutricional. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de Córdoba, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Córdoba, Argentina, 150 pp.
- Carrera C.S., Reynoso C.M., Funes G.J., Martínez M.J., Dardanelli J., Resnik S.L. 2011b. Amino acid composition of soybean seeds as affected by climatic variables. *Pesq. Agrop. Bras.*, 46 (12): 1579-1587.
- Carrera C.S., Dardanelli J.L., Soldini D.O. 2014. Chemical compounds related to nutraceutical and industrial qualities of non-transgenic soybean genotypes. *J. Sci. Food Agric.*, 94: 1463-1469.
- Cuniberti M. y Herrero R. 2015. Caída de la proteína en la soja argentina. Soja actualización 2013. Informe de actualización técnica, 29: 65-66.
- Chang K.C. and Hou H.J. 2004. Science and technology of tofu making. En: Handbook of vegetable preservation and processing. Hui Y.H., Ghazala S., Murrell K.D., Nip W-K. (ed.). Marcel Dekker Inc., New York, pp. 443-478.
- Chen P. 2004. Developing high quality identity-preserved soybean for the specialty soyfood market. En: Production and marketing of identity-preserved soybean. American Soybean Association, USA. pp. 23-31.
- Dardanelli J. L., Balzarini M., Martínez M. J., Cuniberti M., Resnik S., Ramunda S. F., Herrero R. and Baigorri H. 2006. Soybean maturity groups, environments, and their interaction define mega-environments for seed composition in Argentina. *Crop Sci.* 46: 1939-1947.
- DellaPenna D., Pogson B.J. 2006. Vitamin synthesis in plants: tocopherols and carotenoids. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 57: 711-738.
- Duranti M., Lovati M.R., Dani V., Barbiroli A., Scarafoni A., Castiglioni S., Ponzone C., Morazzoni P. 2004. The α' subunit from soybean 7S globulin lowers plasma lipids and upregulates liver β -VLDL receptors in rats fed a hypercholesterolemic diet. *J. of Nutr.* 134 : 1334-1339.
- GAEZ. 2011. Global Agro-Ecological Zones, version 3.0, FAO, IIASA.

- Fassini P.G., de Souza Ferreira E., da Silva MA., Neves V.A. and Demonte A. 2012. Soybean gycinin (11S) increases HDL-cholesterol in hypercholesterolemic rats. *Nutrition and Food Science*, 42 (2): 102-110.
- FAO. 2004. Inocuidad y calidad de los alimntnos en Europa: aspectos relacionados con la calidad, el equilibrio nutricional, la importancia de los terrenos agrícolas y el patrimonio cultura. (Terroirs). 24º Conferencia regional para Europa. Montpellier, Francia. 5-7 de mayo de 2004. Disponible online: <http://www.fao.org/docrep/MEETING/007/J1875s.HTM> (18 de junio de 2015).
- Finckh M.R. 2008. Integration of breeding and technology into diversification strategies for disease control in modern agriculture. *Eur. J. Plant Pathol.*, 121: 399-409.
- Fukushima D. 2011. Soy proteins en *Handbook of Food Proteins*. Eds. Philips G.O. y Williams P.A. Woodhead publishing, pp 216-224.
- Hymowitz T. y Shurtleff W.R. 2005. Debunking soybean myths and legends in the historical and popular literature. *Crop Sci.* 45, 473-476.
- IndexMundi. 2015. Soybean meal and oil exports by country in 1000MT. Publicado en internet, disponible en: <http://www.indexmundi.com/agriculture/?commodity=soybean-oil&graph=exports>. Activo Marzo de 2015.
- Karr-Lilienthal L.K., Grieshop C.M., Merchen N. R., Mahan D.C. and Fahey G.C.Jr. 2004. Chemical composition and protein quality comparisons od souebans and soybean meals form five leading soybean-producing countries. *J. Agric. Food Chem.*, 52: 6193-6199.
- Kris-Etherton P.M., Hecker K.D., Bonanome A., Coval S.M., Binkoski A.E., Hilpert K.F., Griel A.E., Etherton T.D. 2002. Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. *Am. J. Med.* 113(9B): 71S-88S.
- Lovati M.R., Manzoni C., Corsini A., Granata A., Frattini R., Fumagalli R. y Sirtori C.R. 1992. Low density lipoprotein receptor activity is modulated by soybean globulins in cell culture. *J. Nutr.*, 122: 1971-1978.
- Martinez M.J., Cuniberti M., Herrero R., Córdoba M., Balzarini M. 2015. Biochemical composition of soybean grains from Argentina. ICC/AISTEC Conference “Grains for Feeding the World”. 2015. 1 al 3 de Julio de 2015. Milán-Italia. Pg.156.
- Martínez M.J., Carrera C., Balzarini M., Dardanelli J.L. 2009a. Chemical evaluation of soybean grains from different environments of the argentinean crop region with focus on oil, protein, fatty acids and isoflavonoids. World Soybean Research Conference VIII. 10 al 16 de Agosto. Beijing, China.
- Martínez M.J., Carrera C., Balzarini M., Dardanelli J.L. 2009b. Relaciones entre el contenido de ácidos grasos omega 3,6 y 9 e isoflavonoides del grano de soja y variables climáticas en la Argentina. En: Pág 224. En: Volumen II Actas del III Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos. 15 al 17 de abril de 2009. Córdoba, Argentina.
- Martinez M.J., Carrera C., Manzur M., Dardanelli J., Balzarini M., Turco M., Ferrayoli. C. 2007. Modelos de regresión para isoflavonoides del grano de soja en argentina utilizando variables meteorológicas. En: Pág. 122-123. En: Workshop Internacional de EcoFisiología Vegetal Aplicada al Estudio de la determinación del rendimiento y la calidad de los cultivos de granos. 6 y 7 de Septiembre de 2007. Mar del Plata, Argentina.
- Martínez M.J., Cuniberti M., Balzarini M., Dardanelli J.L., Ramunda S.F., Resnik S., Herrero R., Baigorri H. 2005. Interacción grupo de madurez-ambiente para aceite y proteína en granos de soja de Argentina. En: Pág 100-102. En: Proceedings del XI

- Congreso Latinoamericano de Grasas y Aceites, ASAGA. 16 al 18 de Noviembre de 2005. Buenos Aires, Argentina.
- Mercopress. 2014. US soybean crushers claim Argentine export taxes distort the market. Publicado en internet, disponible en: <http://en.mercopress.com/2014/11/06/us-soybean-crushers-claim-argentine-export-taxes-distort-the-market>. Activo Marzo de 2015.
- Messina M., Barnes S. 1991. The role of soy products in reducing risk of cancer. *J. Natl. Cancer Inst.*, 83: 541-546.
- McConnell E.J., Devapatla B., Yaddanapudi K. and Davis K. R. 2014. The soybean-derived peptide lunasin inhibits non-small cell lung cancer proliferation by suppressing phosphorylation of the retinoblastoma protein. *Oncotarget*, Advanced publications 2014. Disponible online 25/02/2015: file:///C:/Users/Carla/Documents/Soja%20Lunasin/Effect%20of%20Lunasin%20in%20lung%20cancer%20inhibition_2013.pdf
- Murad A., Cunha N., Lacorte C., Coelho M., Vianna G., Rech E. 2014. Expression, purification and analysis of the anti-HIV Cyanovirin-N produced in transgenic soybean seeds. *BMC Proceedings* 8 (4), 105. <http://www.biomedcentral.com/1753-6561/8/S4/P105>
- PICTO BID FONCyT (N° 08-12949). 2002. Caracterización del germoplasma de soja en Argentina, de alta calidad industrial y nutricional a través de nuevas tecnologías. Período 2004- 2008.
- Rojas Lagarde A. 2011. Soja para alimentos. Workshop: Calidad de producción. Granos con valor agregado. 5to Congreso de soja del MERCOSUR y 1er Foro de soja Asia-MERCOSUR, Mercosoja. 14 -16 de setiembre de 2011. Bolsa de Comercio de Rosario, Rosario, Argentina.
- Rossi G. 2015. Retenciones: Larga historia de tensiones. Publicado en internet. Disponible en: <https://www.bcr.com.ar/Pages/Publicaciones/infoboletinsemanal.aspx?IdArticulo=168> 1. Activo Spetiembre de 2016.
- Sacks F.M., Lichtenstein A., Van Horn L., Harris W., Kris-Etherton P. and Winston M. 2006. Soy protein, isoflavones, and cardiovascular health. An American Health Association science advisory for professionals from the nutrition committee. *J. of the AHA*, 113: 1034-1044.
- Salado Navarro L. 2012. El cultivo de soja en Argentina. 1ra Ed. Baigorri H. (in memorian) y L. Salado. Buenos Aires. pp 83-104.
- Schaafsma G. 2000. The protein digestibility-corrected amino acid score. *J. of Nutr.* 130 (7): 1865S-1867S.
- Shurtleff W., Aoyagi A. 2013. History of tofu and tofu products (965 CE to 2013). Soyinfo center, Eds. 324 pp.
- Than V.H. and Shibasaki K. 1977. Beta-conglycinin form soybean proteins. *Biochim. Biophys. Acta*, 490: 370-384.
- Thanh V.H. and Shibasaki K. 1978. Major proteins of soybean seeds. Subunits structure of β -conglycinin. *J. Agric. Food Chem.*, 26: 692-695.
- Trigo E., Chudnovsky D., Cap E. y López A. Los transgénicos en la agricultura argentina: Una historia con final abierto. Publicado en internet. Disponible en: http://www.iisd.org/tkn/pdf/tkn_transgenic_argentina_es.pdf. Activo Marzo de 2015.

- USDA. Nutritional nutrient database for standard reference. Publicado en internet. Disponible en: <http://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show/4820?manu=&fgcd=>. Activo Febrero de 2015.
- USFDA. 2009. Food and drug administration. Food labeling, health claims soy protein and coronary heart disease: final rule. *Federer Register*, 64: 57700-57733.
- Utsumi S., Inaba H. and Mori T. 1981. Heterogeneity of soybean gycinin. *Photochemistry*, 20: 585-589.
- Utsumi S., Matsumura Y. and Mori T. 1997. Structure-function relationships of soy proteins. En: *Food and proteins and their applications*. Damodaran S. and Paraf A., (ed). Marcel Dekker, New York, pp. 257-291.
- Wilson R. 2004. Seed composition. En: *Soybeans: Improvement, production and uses*. Stewart B. A. and Nielsen D. R., (ed.), 3rd ed. Agronomy Monograph 16. ASSA, CSSA, and SSSA, Madison, WI, pp. 621-677.
- Yamauchi F., Sato M., Sato W., Kamata Y. and Shibasaki K. 1981. Isolation and identification of new type of b-conglycinin in soybean globulins. *Agric. Biol. Chem.* 45: 2863-2868.

COMPOSICION QUIMICA DE LA FRACCIÓN NO OLEOSA DEL GRANO DE SOJA

INTRODUCCIÓN

En este capítulo se presenta la composición química de la fracción no oleosa del grano de soja para ampliar la caracterización de la calidad nutricional del grano de soja de un genotipo comercial y uno especial. Los materiales usados son provenientes de un ensayo multi ambiental razón por la cual se hará mención de la existencia o no de interacción entre genotipo y ambiente a los fines de poder presentar los valores promedios en sentido amplio cuando tal interacción no sea significativa.

Proteínas y aminoácidos

La fracción no oleosa del grano maduro de soja está compuesta por un extracto rico en nitrógeno, constituido básicamente por proteínas y un extracto libre de nitrógeno, representado por carbohidratos, pectinas, ligninas, isoflavonoides y minerales (Karr-Lilienthal *et al.*, 2005). Las proteínas representan el mayor porcentaje de los componentes del grano de soja y están dispuestas en cuerpos proteicos que se clasifican según su coeficiente de sedimentación en 11S (glicininas), 7S (β -conglucininas) y 2S. Glicininas y β -conglucininas representan aproximadamente el 70% del total de las proteínas determinando mayoritariamente las propiedades de las proteínas de la soja (Nielsen, 1985). Las glicininas son moléculas en forma de hexámeros con subunidades de cadena polipeptídicas ácidas y básicas unidas por puentes disulfuro (Adachi *et al.*, 2001; Nielsen, 1985) (Fig. 2.1). Las β -conglucininas son trímeros de subunidades identificadas como α' , α y β (Mujoo *et al.*, 2003; Utsumi y Kinsella, 1985) (Fig. 2.2).

Las glicininas (11S) poseen mayor cantidad de aminoácidos azufrados (metionina-cisteína), indispensables en la nutrición animal y humana (Utsumi y Kinsella, 1985). Los aminoácidos azufrados tienen la capacidad de formar puentes o uniones di-sulfuros en el establecimiento de la estructura terciaria y cuaternaria de la proteína. Esta particularidad le confiere aptitudes fisicoquímicas relevantes en la producción de alimentos. En separación electroforética bajo condiciones reducidas, es posible identificar las subunidades ácidas (A) y básicas (B) de las proteínas 11S y las subunidades α' , α y β de la fracción 7S. Se estima que las proteínas 11S confieren firmeza en la formación de geles proteicos de soja, como el tofu (cuajado de la leche de soja), deseada en la producción de tofu firme. Las proteínas 7S en cambio se asocian a la elasticidad del gel.

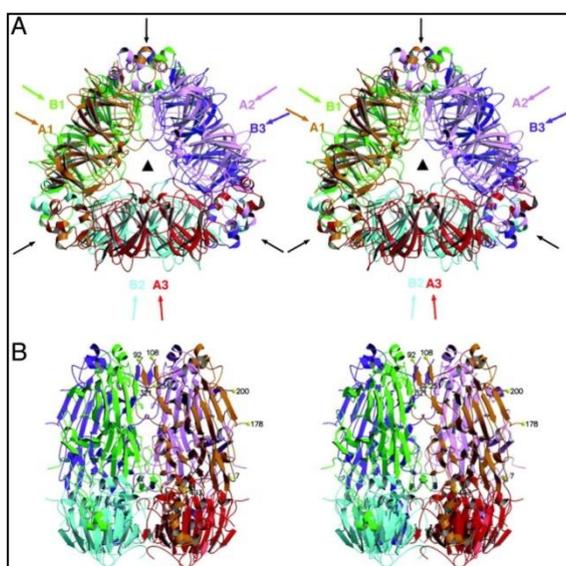


Fig. 2. 1 Representación en diagrama de cintas de la estructura de un homohexámero de glicinina (11S) (Adachi et al., 2001).

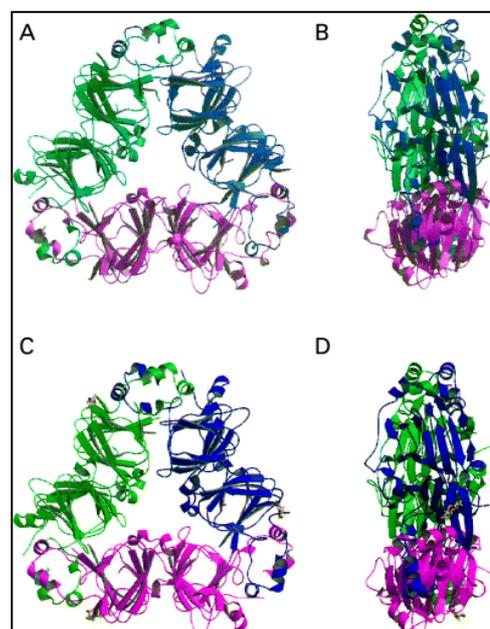


Fig. 2. 2 Representación en diagrama de cintas de la estructura de un homotrímero de β -conglicinina (Maruyama et al., 2001).

La relación (11S/7S) ha sido tomada como indicador de la aptitud de sojas para la elaboración de tofu. Es controvertida la interpretación del cociente 11S/7S (Murphy *et al.*, 1997), sin embargo, se continúa tomando como indicador de la calidad de la proteína de soja para la elaboración de tofu. Además de las propiedades de proteínas en la preparación de alimentos, a las proteínas de soja se le atribuyen propiedades fisiológicas como la de reducción del LDL-colesterol en sangre, efecto por el cual la Administración Americana de

Alimentos y Drogas aprobó la sugerencia de consumir 25 g de proteína de soja por día como parte de una dieta para reducir el riesgo de enfermedades cardíacas (Anthony, 2000).

Los aminoácidos son moléculas orgánicas con una función amino (-NH₂), una función carboxilo (-COOH) y una cadena lateral (-R). Son veinte los aminoácidos sintetizados por los seres vivos nueve de los cuales no pueden ser sintetizados por el organismo humano y se consideran de naturaleza esencial en la nutrición de mamíferos. Por tal razón, estos aminoácidos deben ser incorporados en alimentos o suplementos (WHO, 2002). Sin embargo, algunos autores sugieren considerar también a los aminoácidos “no esenciales” para definir la calidad de las proteínas, pues ellos participan en pasos fundamentales dentro del metabolismo (Wu *et al.*, 2012). La soja es el único vegetal que posee todos los aminoácidos esenciales sin presentar limitantes (Eggum y Beames, 1985). El valor de la proteína de soja en cuanto a la cantidad de aminoácidos esenciales corregidos por su digestibilidad (en comparación con los requerimientos diarios de aminoácidos esenciales) se encuentra entre 80.3 y 91%, siendo 66% para la avena, 73% para el maíz y 97% para la proteína del huevo (Zarkadas *et al.*, 2007).

Carbohidratos

El extracto libre de nitrógeno del poroto de soja se compone de carbohidratos estructurales y no estructurales (Karr-Lilienthal *et al.*, 2005). Celulosa, pectina, hemicelulosa, mananos, galactanos, xiloglucanos son algunas de las macromoléculas estructurales de cotiledones y cascarilla de la semilla de soja. Estas macromoléculas no pueden ser digeridas por el sistema digestivo de los animales monogástricos razón por la cual constituyen la fibra de los granos. La fibra es un componentepreciado en los alimentos, ya que una dieta rica en fibras y carbohidratos complejos contribuye positivamente a la salud general del organismo. La fibra da volumen a los alimentos, contribuye a la saciedad, da volumen a las heces, agiliza el tránsito intestinal, y está asociada a la disminución del colesterol en sangre, más allá de la reducción de lípidos totales atribuida al incremento porcentual en fibra (Van Horn, 1997). Las leguminosas son una fuente importante de fibra. Los valores de fibra cruda en soja rondan el 6% en materia seca (MS) (Karr-Lilienthal *et al.*, 2005).

Dentro de los carbohidratos no estructurales se distinguen azúcares solubles (mono-, di-, y oligo-sacáridos) y polisacáridos. Los monosacáridos glucosa y fructosa se encuentran en el orden de 0.09-0.19 y 0.11-0.25 g 100 g⁻¹ MS (Grieshop *et al.*, 2003), disacárido principalmente sacarosa de 3.0 a 10.7 g 100 g⁻¹ MS (Hymowitz y Collins, 1974) y oligosacáridos estaquiosa 1.2-4.5 g 100 g⁻¹ MS, rafinosa 0.04-1.80 g 100g⁻¹ MS, y verbascosa en valores muy pequeños. Polisacáridos como el almidón se encuentra en cantidades menores al 1% sobre base seca (Karr-Lilienthal *et al.*, 2005).

La sacarosa es el azúcar deseado en el grano pues confiere sabor agradable a los porotos y a los alimentos derivados del mismo (Taira, 1990). Contrariamente, los oligosacáridos de galactosa (RFO) (estaquiosa y rafinosa principalmente en soja) han sido descritos como compuestos no deseados por ser los responsables de ocasionar malestar gástrico. Los RFO son tri-, tetra- y penta-sacáridos (rafinosa, estaquiosa y verbascosa, respectivamente) de sacarosa unida a una, dos o más galactosas mediante un enlace α -1-6 (Fig. 2.3). Los monogástricos no disponen de la enzima encargada de la ruptura de este enlace, por lo que los RFO pasan directamente al intestino grueso donde son digeridos por las bacterias allí presentes que sí poseen α -1-6 galactasa. Esta digestión produce la formación de gases como metano, CO₂, H₂ entre otros. Paralelamente, los RFO son reconocidos por sus propiedades prebióticas bifidogénicas de proteger la flora benéfica del intestino y el epitelio intestinal sano (Domínguez-Vergara *et al.*, 2009). Crittenden y Playne (1996) describen la producción de oligosacáridos a escala industrial para ser incorporados en alimentos, donde la soja es usada para la obtención de los RFO mencionados.

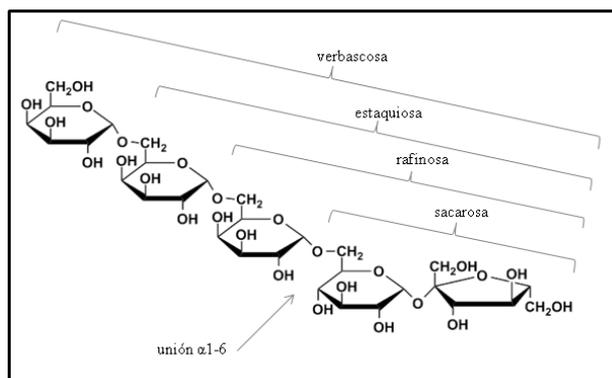


Fig. 2. 3 Galacto-oligosacáridos presentes en el grano de soja.

Minerales

Los minerales representan la menor fracción de los componentes del grano. Sin embargo entre ellos se encuentran sustancias de importancia nutricional, de inocuidad y reológica en la elaboración de alimentos. Los minerales son elementos indispensables en la dieta animal y humana pues dependemos exclusivamente de su incorporación a través de los alimentos, donde las plantas constituyen una fuente importante de los mismos (Graham *et al.*, 2010). Los elementos minerales esenciales de actividad biológica conocida se clasifican de acuerdo a la cantidad diaria requerida (Joint FAO/WHO, 2005) en:

1. Macroelementos: son requeridos en cantidades de 0,3 a 2 g/día. A ellos pertenecen el Ca, Mg, K, P, Cl, S, Na.
2. Microelementos y oligoelementos: son requeridos en cantidades menores a 0,1 g/día: V, Cr, Mn, Fe, Co, Cu, Zn, Mo, Se, F, I, Al, B, Ni, Ba, Li, Cs, Sr, Rb.

Existen otros minerales como As, Cd y Pb cuya función biológica no está aún definida o se encuentra bajo estudio, pero sí se conoce que en cantidades altas manifiestan toxicidad en el organismo humano y animal. La presencia de estos elementos en alimentos se encuentra regulada por entidades oficiales siendo las concentraciones máximas admitidas en grano maduro de soja de 0.20 mg/kg MS (Resolución GMC N° 102/94 y 35/96).

En la soja se encuentra de forma mayoritaria K (1797 mg 100 g⁻¹ MS), seguido por P (704 mg 100 g⁻¹ MS), Mg (280 mg 100 g⁻¹ MS), Ca (277 mg 100 g⁻¹ MS), Fe (15.7 mg 100 g⁻¹ MS), Zn (4.9 mg 100 g⁻¹ MS) y Na (2 mg 100 g⁻¹ MS) (USDA, 2015). La cascarilla de soja es rica en Fe y se ha usado en la fortificación de panes (Lykken *et al.*, 1987).

Los minerales en las semillas de soja, además de aportar a su valor nutritivo y definir la inocuidad de los granos, se encuentran relacionados a efectos en los procesos de la elaboración de alimentos. Se ha observado una asociación positiva entre la concentración de Ca y la rigidez de la corteza de la semilla de soja, afectando el tiempo de imbibición de agua, factor deseado en semillas para conservas pero no para la elaboración de leche de soja y tofu (Saio, 1976). A su vez, menor concentración de Ca, Mn y Bo se

asocia a una mejor apariencia en natto (alimento consumido en Asia elaborado con granos de soja fermentada) (Yoshikawa, *et al.*, 2014). La presencia de metales como Fe, Cu, Mn afecta la estabilidad oxidativa de la materia grasa afectando el tiempo de almacenamiento (Anderson, 1998; Cazzoli *et al.*, 2012; Knothe y Dunn, 2003). El P se encuentra principalmente en la forma de ácido fítico (más del 50 % del P de la semilla). El ácido fítico puede afectar la biodisponibilidad de minerales, sin embargo, en la elaboración de tofu, contribuye a un mayor rendimiento durante su elaboración (Lolas *et al.*, 1976; Shurtleff y Aoyagi, 2013).

La variabilidad de estos compuestos en el grano de soja es de esperar dependa, como en el caso de los aceites y otros compuestos de la fase no oleosa (Dardanelli *et al.*, 2006), en mayor o menor magnitud, de efectos ambientales, de efectos genotípicos, y para algunos componentes de la interacción entre ambos. La interacción, cuando existe puede ser con cambio de rango o sin cambio de rango (Balzarini *et al.*, 2005). En el primer caso, la performance de un genotipo puede posicionarlo como el mejor en un ambiente y, entre los peores, en otro. Si la interacción no es de este tipo, entonces se asocia con variaciones en la magnitud de las diferencias entre un genotipo y otro a través de los ambientes, siendo el desempeño promedio a través de los ambientes un indicador del comportamiento del genotipo en sentido amplio.

El crecimiento de la industria alimenticia junto al surgimiento de necesidades cada vez más específicas en materia de insumos para la elaboración de productos ha llevado a la especialización de los genotipos de cultivos sembrados cada vez más dirigida al destino final de producción. La soja constituye una materia prima utilizada para la elaboración de múltiples productos. Los programas de mejoramiento se han orientado al desarrollo de genotipos especiales en función del destino productivo en el que la soja comercial transgénica destinada a la obtención de aceite y expeller proteico no llega a cubrir los requisitos de calidad para la elaboración de alimentos (Chen, 2004). Pueden mencionarse a modo de ejemplo los genotipos especiales más populares con destino a alimentos de naturaleza no transgénicos para la elaboración de tofu, leche de soja, salsa de soja, miso, brotes de soja y natto (Chen, 2004).

El presente capítulo está orientado a la caracterización en sentido amplio de genotipos de distintos tipos (especiales y comerciales) en relación a los compuestos bioactivos presentes en la fracción no oleosa del grano.

MATERIALES Y METODOS

Se usaron semillas de soja especial (ALIM3.14) y comercial (DM4600). ALIM 3.14 (de ciclo V indeterminado) es una línea intermedia de desarrollo no transgénica alta en proteína perteneciente al programa de mejoramiento de la soja del INTA Marcos Juárez (Soldini, 2011). DM4600 (IV) es un cultivar comercial transgénico (RG), elegido por su amplia difusión en la Argentina a modo de control (PICTO BID FONCyT (N° 08-12949), 2002; PNCER 2345, 2006; PNCER 24022, 2006).

Los materiales fueron sembrados en un diseño en bloques completos al azar en ocho localidades a lo largo de la región sojera argentina, en dos fechas de siembra durante dos campañas consecutivas, (2006/2007 y 2007/2008). Las localidades de siembra pertenecen a Estaciones Experimentales Agropecuarias (EEA) del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA): EEA INTA Barrow, EEA INTA Bordenave, EEA INTA Cerrillos, EEA INTA Cerro Azul, EEA INTA Famaillá, EEA INTA Manfredi, EEA INTA Paraná, EEA INTA Reconquista. Se definió como ambiente a la combinación de localidad, año y fecha de siembra. Algunos ambientes se perdieron por inclemencias climáticas, factores bióticos y durante el proceso de recolección de muestras resultando un total de veinte ambientes a evaluar. Los ensayos a campo y la toma de datos fueron parte del proyecto nacional integrado PNCER 2345 y PNCER 24022: “Manejo y ecofisiología para calidad diferenciada en cereales y oleaginosas”, “Desarrollo de ideotipos de cereales y oleaginosas para ambientes productivos y demandas específicas”, proyecto específico “Desarrollo de germoplasma de soja” año 2006-2011. Además se dispuso de fondos de la Fundación Argentina del Laboratorio de Calidad de Granos de la EEA INTA, Manfredi.

Determinación de glicininas y β -conglucininas de las proteínas de soja

Extracción de proteínas

Las proteínas fueron solubilizadas y extraídas en medio alcalino para su posterior separación electroforética en geles de poliacrilamida con detergente dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE). Se pesaron 300 mg de harina de soja previamente desgrasada en tubos plásticos de 15 mL. Allí se añadieron 3 mL de agua desionizada, se agitó bien y se llevó a pH entre 8 y 9 con NaOH 1N. Los tubos se dispusieron en un agitador mecánico durante 1 hora a 4 °C. Luego fueron centrifugados por 20 minutos a 14000 g a 4 °C. El sobrenadante con las proteínas disueltas fue colectado en un nuevo tubo.

Para conocer la concentración proteica de cada extracto se realizó una prueba rápida colorimétrica de Bradford (1976) siguiendo los pasos del protocolo Quick Start Bradford Protein Assay (BioRad, Hercules, CA). A tal fin, se colocaron 250 μ L de reactivo más 5 μ L del extracto proteico en tubos Eppendorf de 1.5 mL. Se realizó una curva de calibración utilizando el kit de BioRad. Luego de 5 minutos, las soluciones se dispusieron en platos para leer su absorbancia por espectrofotometría a una longitud de onda de 595 nm en un espectrofotómetro FlexStation[®] 3 (Molecular Devices Corporation, California, Estados Unidos). La concentración proteica obtenida para cada extracto fue luego ajustada a un valor final de 2 mg mL⁻¹ con buffer fosfato (Mujoo *et al.*, 2003).

Separación mediante SDS-PAGE

Preparación de geles: Las proteínas fueron separadas en electroforesis discontinua con gel de separación en gradiente de concentración de acrilamida de 8 a 16%. Para el gel de separación se prepararon las dos concentraciones por separado usando 4 mL Tris-HCl 1.5 M, pH 8.8 con 0.4% SDS, 0.16 mL SDS al 10%, 0.22 y 0.42 mL glicerol (respectivamente para el gel de 8% y para el gel de 16%), 3.2 y 6.4 mL de acrilamida, 8 μ L Tetramethylethylenediamine (TEMED), 30 y 60 μ L persulfato de amonio (APS) al 10%, y 8.34 y 4.94 mL agua destilada. Para el gel concentrador se usaron 5.63 mL 0.5 M Tris-HCl, pH 6.8, 0.4% SDS, 2.25 mL acrilamida, 0.23 mL SDS 10%, 22.5 μ L TEMED, 100

μL APS 10% y 14.4 mL agua destilada. Para lograr el gel en gradiente (8 a 16%) se usó una bomba acoplada a un sistema de conductos siguiendo el principio de vasos conductivos. Una vez preparados los geles se dejaron solidificar por término de una hora aproximadamente.

Preparación de las muestras: 100 μL de la solución proteica ajustada de 2 mg mL⁻¹ fueron tomados y mezclados junto a 100 μL de buffer de muestra (0.15 M Tris-HCl, pH 6.8, 4% SDS, 5% β -mercaptoetanol) en tubos Eppendorf de 1.5 mL. Las muestras fueron sumergidas en baño térmico a 95 °C por 10 minutos. Una vez a temperatura ambiente 20 μL de la muestras fueron inyectados en los canales del gel. Los solventes y reactivos tris-base, SDS, Coomassie Brilliant Blue R-250, acrilamida (37%) y el marcador molecular (6.5-200 kDa) fueron adquiridos en Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA); los reactivos glicerol, β -mercaptoetanol, TEMED y APS fueron comprados en Sigma-Aldrich® (St. Louis, MO, USA); el ácido acético y el etanol, en Fisherbrand (Pittsburg, PA, USA).

Corrida electroforética: las proteínas fueron separadas dentro de los geles en cubas electroforéticas BioRad Protean II (ANEXO 1) a 100 V por una hora y luego a 125 V hasta lograr la separación completa de las proteínas (6 horas aproximadamente) (Laemmli, 1970). Una vez concluida la corrida, los geles fueron sumergidos en una solución de etanol y Coomassie Brillant Blue hasta quedar completamente teñidos. Seguidamente fueron desteñidos sumergidos en una solución de ácido acético, etanol y agua destilada (50:30:20 v/v) reemplazando esta solución una vez hasta lograr un gel de fondo translúcido con bandas teñidas.

Cuantificación de las fracciones proteicas y cálculo de coeficiente 11S/7S

Los geles fueron dispuestos en una placa y sometidos a densitómetro para medir el área de cada banda en un equipo GS BioRad, Molecular Bioscience Group, Hercules, CA. Se usó el programa Image Lab para escanear las bandas correspondientes a las proteínas 11S y 7S y calcular sus áreas. Las áreas de las bandas pertenecientes a cada grupo de

proteínas fueron sumadas y luego divididas para el cálculo del coeficiente (Nagano *et al.*, 1985; Wang y Chang, 1985; Liu y Chang, 2004).

Determinación de aminoácidos

Hidrólisis Proteica y ajuste de pH

Para la determinación de aminoácidos en muestras de soja se puso a punto la metodología propuesta por el Instituto Nacional de Ciencias de la Salud, Japón (NIHS). Las semillas fueron seleccionadas, molidas con molinillo y tamizadas por malla de 240 μm . Las muestras molidas y tamizadas fueron desgrasadas mediante Soxhlet en un sistema de extracción automático SOXHTERM, Gerhardt Analytical Systems® usando éter de petróleo 60/80 como solvente. 20 ± 0.5 mg de harina desgrasada de soja (proporcional a 9 mg de proteína aproximadamente) fueron pesados y digeridos en 4 mL de ácido clorhídrico 6 N 0.1% fenol en estufa a 110 °C durante 24 horas. La hidrólisis se realizó en atmósfera inerte burbujando nitrógeno gaseoso sobre la muestra para prevenir eventuales oxidaciones. Se usaron tubos de ensayo con tapa de teflón completamente herméticos, controlando hermeticidad para evitar pérdidas de sustancia. Transcurrido el tiempo, el hidrolizado se dejó enfriar a temperatura ambiente y se centrifugó a 10000 rpm por 10 minutos para remover los residuos de la hidrólisis en suspensión. El sobrenadante con los aminoácidos disueltos fue utilizado para su posterior análisis.

Se tomó 1 mL del sobrenadante junto a 1 mL de buffer de corrida en tubos calibrados donde se ajustó el pH a 2.2 ± 0.05 usando 7 N NaOH. Se colocaron 600 μL de la muestra con pH ajustado en un vial donde se agregó 10 μL de norleucina (estándar interno) y buffer de carga hasta completar el volumen de 1 mL. Las muestras (20 μL) fueron inyectadas y analizadas mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Determinación de aminoácidos mediante HPLC

La separación cromatográfica se llevó a cabo en un equipo Amino Acid Analyzer BioChrom 30 con inyector automático Midas usando una columna de intercambio

catiónico con derivatización post-columna usando ninhidrina como agente derivatizante. El sistema consta de dos bombas, un horno de columna (gradiente térmico 52 a 90 °C), y una celda individual con divisor de haz óptico para lograr lecturas a 570 nm para el conjunto de aminoácidos y a 440 nm para el aminoácido prolina. La columna utilizada para la separación de aminoácidos fue una columna PEEK de alta presión de resina ultra compacta número 8 de intercambio catiónico, forma sódica, acoplada a un sistema de calefacción/refrigeración Peltier. Se usaron estándares de aminoácidos para la cuantificación y calibración que fueron preparados individualmente a una concentración final de 25 $\mu\text{Mol mL}^{-1}$. Se utilizó buffer de carga como diluyente. El principio operativo básico de flujo cromatográfico continuo se basó en el procedimiento desarrollado por Spackman *et al.* (1958).

Se usaron estándares de aminoácidos Sigma-Aldrich® (St. Louis, MO, USA) AA-18 amino acid standards, L-ácido cisteico monohidrato, L-metionina sulfóxido, L-metionina sulfona, Trypto&173.phan, L-ornitina monohidro-cloruro, pureza próxima a 99%. Los solventes y reactivos pertenecen a Biochrom Ltd. (Cambourne, Reino Unido).

Determinación de azúcares solubles

Extracción de azúcares a partir de harina de soja

Para la extracción de los azúcares solubles en el grano de soja se puso a punto la metodología optimizada por Giannocaró *et al.* (2006) y empleada por Hou *et al.* (2009), con modificaciones. Los granos de soja fueron seleccionados, molidos y tamizados por malla de 180 μm . En tubos Falcon de 50 mL, se pesó 1 gramo de harina de soja y se agregó agua destilada en una relación soluto/solvente 1:5. Los tubos fueron dispuestos en agitador húmedo y fueron agitados a 120 rpm durante 15 minutos a 45 °C. La solución de azúcares fue separada mediante centrifugación a 10.000 rpm durante 10 minutos a 18 °C. Se tomaron 2 mL sobrenadante de azúcares y se colocaron en un nuevo tubo Falcon de 50 mL donde se añadieron 3 mL de acetonitrilo grado HPLC (Merck, Alemania) para precipitar las proteínas extraídas dejándose reposar durante 30 minutos. La solución fue centrifugada a 10.000 rpm por 10 minutos a 18 °C. Se tomó una alícuota de 1 mL del

sobrenadante en tubo Eppendorf, que fue luego liofilizada. La película resultante conteniendo los azúcares fue re-suspendida en agua destilada, filtrada con filtro de 0.2 μm y analizada mediante HPLC.

Determinación de azúcares mediante HPLC

Para determinar los azúcares solubles se utilizó un equipo con bomba e inyector automático Waters E2695 (Milford, MA), detector de índice de refracción (Waters 410) y columna de separación Sugar Pak 1 (Waters). EDTA cálcico 0.05 M se usó como fase móvil a un caudal de 0.5 mL min^{-1} , La temperatura de la columna fue de 85 °C, temperatura del detector 45 °C, temperatura de la muestra 8 °C. El volumen inyectado fue de 20 μL . Se utilizaron estándares de los azúcares como verbascosa, estaquiosa, rafinosa, sacarosa, glucosa, fructosa y galactosa para la determinación y cuantificación. Los estándares fueron adquiridos en Sigma-Aldrich® (St. Louis, MO).

Determinación de fibra cruda

La determinación de fibra cruda se realizó siguiendo el método oficial AOCS Ba 6a-05 (AOCS, 2008), Laboratorio de Bromatología, Sección Química de la EEAOC. La fibra cruda es el residuo remanente luego de una digestión ácida y básica con soluciones diluidas de ácido sulfúrico e hidróxido de sodio, intentando reproducir químicamente la digestión de los seres monogástricos. Durante las digestiones son removidos principalmente proteínas, azúcares y almidones. Una porción de los carbohidratos estructurales como hemicelulosa, lignina y celulosa son también disueltos en las digestiones. Por esta razón, éste es un método estimativo de la fracción no digerible de los granos que, si bien subestima el valor real de los compuestos no digeribles, el error es menor en granos y legumbres por su menor proporción de hemicelulosas y ligninas. Es un componente que se sigue exigiendo en la rotulación de alimentos (VanSoest y McQueen, 1973).

Las muestras de soja fueron molidas y tamizadas entre mallas de 250 y 180 μm , granulometría que asegura la digestión completa de las partículas sin pérdida de material por granulometría pequeña o por falta de digestión en partículas grandes. Se utilizaron

bolsitas filtrantes de polietileno F58 (Ankom, NY) para digestión de fibra cruda. Se pesó 1 g de muestra en cada bolsita y se selló con sellador eléctrico. Las bolsitas fueron sumergidas en éter de petróleo para extraer la materia grasa durante 20 minutos. El solvente fue luego evaporado en campana. El procesamiento se llevó a cabo en un equipo ANKOM Fiber Analyzer A200 (Ankom, NY). Las muestras desgrasadas fueron digeridas con 0.255 N H₂SO₄ primero, luego enjuagadas y digeridas nuevamente con 0.313 N NaOH. El residuo fue lavado, secado en estufa, pesado, incinerado y pesado nuevamente. La fibra cruda se calculó a partir de los pesos del residuo obtenido luego de la incineración utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Fibra Cruda (\%)} = \frac{((ps\ mtra - (cr\ f - cr\ i) - (p\ mtra\ i * c\ bco))}{MS\ mtra} * 100$$

donde:

MS mtra: materia seca de la muestra

cr f: peso del crisol final, luego de la incineración

cr i: peso del crisol inicial

p mtra i: peso de la muestra inicial

c bco: coeficiente del blanco calculado como el cociente entre la bolsa sin muestra luego de la digestión sobre la bolsa sin muestra antes de la digestión.

Fibra cruda resultante expresada en % de semilla de soja en MS.

Determinación de minerales

El material a utilizar para la determinación de minerales fue lavado y acondicionado conforme al protocolo de rutina de lavado del Laboratorio de Metales, CEPROCOR, Córdoba. Luego del lavado convencional y enjuague con agua destilada, el material fue sumergido entre 8 y 12 hs en solución 20% v/v de HNO₃, enjuagado con agua Mili-Q 3 veces y secado a temperatura menor a 70 °C.

La determinación de los minerales en soja se realizó sobre las muestras incineradas y digeridas. Para ello 1 g de granos de soja seleccionados y limpios se colocaron en

crisoles sin tapa en estufa a 100 °C de un día para el otro para eliminar la humedad remanente del grano. Al día siguiente, las muestras fueron incineradas en mufla siguiendo una rampa térmica hasta llegar a un máximo de 600 °C sostenido por un período de 2 a 3 hrs (<8 hs.). Los crisoles conteniendo las muestras incineradas se coloraron en disecador hasta tomar temperatura ambiente y luego fueron pesados para el cálculo de cenizas.

Los crisoles con las cenizas fueron depositados sobre una placa calefactora a 100 °C bajo campana, se agregó 1 mL de HNO₃ al 65% para digerir las cenizas dejándolos sobre la placa hasta evaporar completamente el ácido. Una vez evaporado el ácido, los crisoles se llevaron nuevamente a mufla donde la muestra fue nuevamente incinerada hasta resultar en cenizas blancas lo que indica que la digestión ha sido completa, sin restos de carbono por digerir. Las cenizas blancas fueron diluidas con 1 mL de HNO₃ 1 M y trasvasadas cuantitativamente a tubos Falcon de 50 mL, con lavados sucesivos de agua grado Mili Q, hasta un peso final de 25 g. Las minerales fueron determinados mediante espectrometría de masas con plasma inductivamente acoplado (ICP-MS), utilizando un equipo Agilent Technologies 7500c series, con celda de colisión. El ácido nítrico utilizado a diferentes diluciones fue previamente destilado en el Laboratorio de Metales, CEPROCOR, Córdoba.

Análisis estadístico

Se ajustaron modelos lineales y mixtos (LMM) (West, 2007) para estimar efectos del ambiente y del genotipo para cada componente nutricional y bioactivo en la semilla de soja: el efecto cultivar (especial versus comercial) fue considerado como fijo y el efecto ambiente (resultante de la combinación de localidad, año y fecha de siembra), así como la interacción entre cultivar y ambiente (G×A), fueron tomados como efectos aleatorios. Se analizaron los componentes de la varianza como evaluación del cociente de probabilidad (Molenberghs y Verbeke, 2007). Los valores p en cada test de hipótesis fueron corregidos siguiendo el criterio de Bonferroni para un nivel de probabilidad del 95%. Los contenidos de minerales en grano se correlacionaron mediante el coeficiente de correlación de Pearson y las medias genotípicas para todos los compuestos fueron comparadas mediante la prueba

de la diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. El análisis estadístico se llevó a cabo usando el software Infostat (DiRienzo *et al.*, 2011).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La interacción entre genotipo y ambiente (G×A) para las concentraciones de aminoácidos no fue estadísticamente significativa ($P>0.05$). Los promedios en sentido amplio a través de los ambientes de las concentraciones de aminoácidos para cada genotipo se presentan en la Tabla 2.1. Glutamato, aspartato y arginina fueron los aminoácidos no esenciales presentes en mayor concentración. Dentro de los aminoácidos esenciales, los mayoritarios fueron lisina, leucina y fenilalanina. Los de menor concentración fueron cisteína, ácido cisteico, metionina y triptófano. La concentración de lisina fue, en promedio en sentido amplio de cultivares y localidades, de $3.49 \text{ g } 100\text{g}^{-1} \text{ MS}$, valor que excede al 2.97% en base seca para harina de soja desgrasada de Argentina (Karr-Lilienthal *et al.*, 2004) y al 3.36% mínimo recomendado para raciones de porcinos (NCR, 2012). La concentración de aminoácidos totales ($53.96 \text{ g } 100\text{g}^{-1}$) y esenciales ($23.35 \text{ g } 100\text{g}^{-1}$) superó los valores reportados (45.7 y $21.5 \text{ g } 100\text{g}^{-1}$) para harina de soja desgrasada de Argentina.

Karr-Lilienthal *et al.* (2004) compararon harinas de soja desgrasadas provenientes de los cinco mayores productores de soja y concluyeron que la soja argentina tiene menor concentración de aminoácidos totales y esenciales en comparación con la soja proveniente de los principales productores mundiales (Brasil, Estados Unidos, China e India). Los resultados aquí presentados provenientes de sojas evaluadas en veinte ambientes diferentes a lo largo de la región sojera argentina fueron superiores a los valores publicados en ese estudio. La concentración de aminoácidos esenciales y totales estuvo en el rango de valores descrito para harinas de soja desgrasadas de diez plantas de procesamiento de Estados Unidos (Grieshop *et al.*, 2003). Cabe aclarar que parte de las fluctuaciones en la concentración final de aminoácidos individuales entre harinas de soja puede atribuirse al método usado para la elaboración de la harina de soja (Chang *et al.*, 1987).

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas, según ajuste por Bonferroni, entre tipo de cultivares para los aminoácidos aspartato ($p < 0.0001$), arginina (p

=<0.0001) y prolina ($p = <0.0001$) con variaciones inferiores al 25% entre medias (Tabla 2.1). También se observaron diferencias significativas ($p = 0.0013$) para el cociente entre aminoácidos totales (AAT) y esenciales (AAE) (Tabla 2.1). Zarkadas *et al.* (2007) obtuvieron diferencias significativas en el contenido de arginina, tercer aminoácido en concentración, asumiendo el valor de $7.7 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$ de proteína en el cultivar para tofu Harovinton. El promedio de arginina en nuestro estudio fue de $7.5 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$ de proteína.

Tabla 2.1. Aminoácidos en harina desgrasada de soja de dos cultivares en $\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$ de harina de soja desgrasada en base seca. Valores promediados sobre 20 ambientes.

	Soja especial		Soja comercial		P valor*
Aminoácidos no esenciales					
Glutamato	9.39	(6.29-12.94)	9.29	(5.22-11.19)	0.7861
Aspartato	6.91	(5.76-8.32)	6.28	(5.05-7.45)	<0.0001
Arginina	4.32	(3.39-5.57)	3.85	(3.00-4.55)	<0.0001
Serina	3.52	(2.48-4.70)	3.50	(2.21-4.21)	0.8984
Glicina	3.42	(2.14-6.12)	2.69	(2.05-5.04)	0.0083
Prolina	2.88	(2.14-4.07)	2.50	(1.54-2.98)	<0.0001
Alanina	2.45	(1.98-2.93)	2.43	(2.07-2.93)	0.6847
Tirosina	2.10	(1.68-2.49)	2.07	(1.69-2.47)	0.4764
Ac. Cist.	0.04	(ND-0.07)	0.04	(ND-0.16)	0.5184
Cisteína	0.93	(0.55-1.63)	0.83	(0.59-1.51)	0.1324
Aminoácidos Esenciales					
Leusina	4.36	(3.54-5.11)	4.14	(3.44-4.79)	0.0142
Lisina	3.54	(2.89-4.21)	3.45	(2.85-3.97)	0.1913
Fenilalanina	2.93	(2.37-3.53)	2.73	(2.22-3.20)	0.0027
Valina	2.57	(2.07-2.95)	2.52	(2.05-3.00)	0.3175
Isoleusina	2.25	(1.79-2.63)	2.19	(1.81-2.67)	0.2894
Histidina	1.73	(1.40-2.21)	1.71	(1.41-2.04)	0.5282
Treonina	1.54	(1.09-2.10)	1.58	(1.05-1.97)	0.4598
Metionina	0.66	(0.52-0.83)	0.66	(0.330.90)	0.8707
Triptofano	0.01	(ND-0.06)	0.02	(ND-0.09)	0.0413
AAT	55.54	(45.69-67.68)	52.50	(43.82-60.73)	0.0066
AAE	23.90	(19.66-28.51)	22.84	(18.94-26.43)	0.0324
AAE/AAT (%)	43.04	(41.75-44.01)	43.49	(42.23-44.80)	0.0013

Abreviaturas: AAT, aminoácidos totales; AAE, aminoácidos esenciales totales. ND (no detectado): aminoácidos cuyas áreas no fueron detectadas en el análisis por HPLC. *Valores de p iguales o menores a 0.002 (0.05/22, corrección por Bonferroni) indican diferencias significativas entre genotipos.

La soja es la única legumbre que aporta todos los aminoácidos esenciales requeridos en la dieta humana. Los resultados obtenidos en harina desgrasada de soja

fueron referidos al contenido en grano de soja a los fines de comparar el aporte de aminoácidos esenciales en 100 g de soja cruda con respecto a la IDR para adultos (Tabla 2.2). Se observó que 100 g de soja cruda cubrieron las recomendaciones diarias de aminoácidos esenciales en adultos. La única excepción fue la del aminoácido triptófano. La concentración proporcional de aminoácidos azufrados en la soja es reducida, razón por la cual suele sugerirse combinarla con cereales para balancear sus aminoácidos (Young and Pellet, 1994). Se conoce también que la concentración final de aminoácidos azufrados y del triptofano depende del proceso de determinación usado.

Tabla 2.2. Requerimiento diario de aminoácidos esenciales en adultos, y concentración de aminoácidos esenciales en los dos cultivares de soja. Valores promediados sobre 20 ambientes.

Aminoácidos Esenciales	IDR [†] (g/kg/día)	IDR [‡] (g/día)	ALIM (g/100g)	DM
Histidina	0.010	0.75	1.36 ± 0.15	1.32 ± 0.15
Isoleucina	0.020	1.50	1.77 ± 0.16	1.70 ± 0.18
Leucina	0.039	2.93	3.43 ± 0.30	3.20 ± 0.31
Lisina	0.030	2.25	2.79 ± 0.25	2.66 ± 0.26
Metionina + Cisteína	0.015	1.13		
Metionina	0.010	0.75	0.66 ± 0.06	0.66 ± 0.09
Cisteína	0.004	0.30	0.93 ± 0.35	0.83 ± 0.20
Fenilalanina + Tirosina	0.025	1.88	3.96 ± 0.36	3.71 ± 0.38
Treonina	0.015	1.13	1.22 ± 0.22	1.22 ± 0.16
Valina	0.026	1.95	2.03 ± 0.18	1.95 ± 0.19
Triptófano	0.004	0.30	0.01 ± 0.01	0.02 ± 0.02
TEAA	0.184	13.80	18.83 ± 1.69	17.65 ± 1.78

[†]Ingesta diaria recomendada (IDR) de aminoácidos esenciales para adultos en base a un requerimiento promedio proteico de 0.66 g de proteína por kilo de peso de adulto por día.

[‡]Cálculo de IDR de aminoácidos para un adulto de 75kg.

Investigaciones previas demostraron la pérdida de aminoácidos y destrucción parcial, principalmente de los aminoácidos aromáticos, durante el proceso de hidrólisis proteica (Albin *et al.*, 2000). En el estudio de Zarkadas *et al.* (2007) donde se compararon aminoácidos de 13 muestras de soja diferentes, utilizaron un método semejante de hidrólisis ácida al detallado previamente en este capítulo. Los aminoácidos metionina,

cisteína y triptófano fueron determinados separadamente con ácido perfórmico, y tras hidrólisis alcalina el triptófano. Ellos expresaron la concentración de aminoácidos en g de aminoácidos por kg de proteína, calculando el total de proteínas como la sumatoria de los aminoácidos determinados corregidos por un factor. Tomando el valor de aminoácidos totales de la Tabla 2.1 como análogo al contenido total de proteínas de nuestra harina desgrasada de soja se obtuvo una estimación de valores expresados en las mismas unidades a modo de poder comparar los resultados de ambos estudios. De esta forma se observó que los valores obtenidos por Zarkadas *et al.* (2007) en concentración de aminoácidos fueron semejantes a los aquí presentados para todos los aminoácidos excepto los azufrados y el triptófano cuyos valores fueron superiores encontrándose 2.241g, 2.054g y 1.276 g de cisteína, metionina y triptofano por 100 g de proteínas, respectivamente (Zarkadas *et al.*, 2007); en comparación con 1.629, 1.222 y 0.037 g por 100 g de AAT o 2.161, 1.621, 0.044 g por 100 g de proteína utilizando los valores de proteínas reportados por Carrera *et al.* (2011). La concentración de triptófano fue la más afectada, por lo que debería considerarse este resultado en análisis futuros.

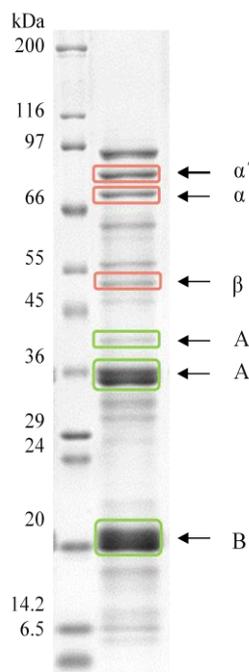


Fig. 2. 5 Sub unidades proteicas de la proteína de soja separada en gel en gradiente de acrilamida (8-16%) SDS-PAGE. En naranja se señalan las subunidades α' , α y β de las β -conglucininas (7S). En verde se señalan las subunidades ácidas (A) y básicas (B) de las conglucinas (11S). A la izquierda se indican los pesos moleculares del marcador usado en kilo Daltons (kDa).

Respecto a la separación de las fracciones de proteínas por electroforesis, en la Figura 2.4 se observan las distintas bandas detectadas entre las que se encuentran las correspondientes a las subunidades de glicininas (11S) y β -conglucininas (7S).

Las fracciones correspondientes a las proteínas 11S y 7S fueron medidas por densidad y área de las bandas en geles de SDS-PAGE, sumadas y expresadas en proporción relativa mediante el cociente 11S/7S. Los valores obtenidos para el cociente 11S/7S se ubicaron entre 1.53 y 5.79. Estos valores fueron semejantes y en algunos casos muy superiores a los previamente reportados por Cai y Chang (1999) entre 1.64 y 2.51 para trece líneas de soja evaluadas en Estados Unidos. Murphy y Resurrección (1984) obtuvieron valores entre 2.1 y 3.4 atribuyendo la variabilidad a factores tanto genéticos como ambientales. Los valores promedios del cociente 11S/7S resultaron estadísticamente diferentes ($P \leq 0.05$) entre localidades sin presentar interacción $G \times A$. Los valores promedios obtenidos por genotipo se presentan en la Tabla 2.3.

El rango obtenido en el presente estudio es amplio para este tipo de coeficientes. Murphy *et al.* (1997) afirma que largos periodos de almacenamiento en frío de las semillas de soja pueden provocar una reducción en la extracción de proteínas. Las semillas aquí utilizadas fueron cosechadas en los años 2007 y 2008 y luego almacenadas en cámaras de frío. Conforme a lo expuesto, se realizaron adicionalmente extracciones de proteínas con SDS tal como lo realizaron otros investigadores (Kong y Chang, 2013) para lograr una mejor extracción proteica y evaluar si ocurrían cambios en los coeficientes. Las pruebas mostraron una mejor recuperación de proteínas en la extracción, sin embargo, la relación 11S/7S se mantuvo sin diferencias entre ambas extracciones (con SDS y sin SDS) tal como se observó en los resultados de Kong y Chang (2013). Otra causa de altos valores en 11S/7S podría deberse a la ocurrencia de agregados proteicos tras condiciones adversas de almacenamiento (Kong y Chang, 2013). Estos agregados deberían observarse en la sección superior de los geles, correspondientes a proteínas que no pudieron ser separadas. Ninguno de los geles realizados manifestó la existencia de agregados, tal como se muestra a modo de ejemplo en la Figura 2.5.

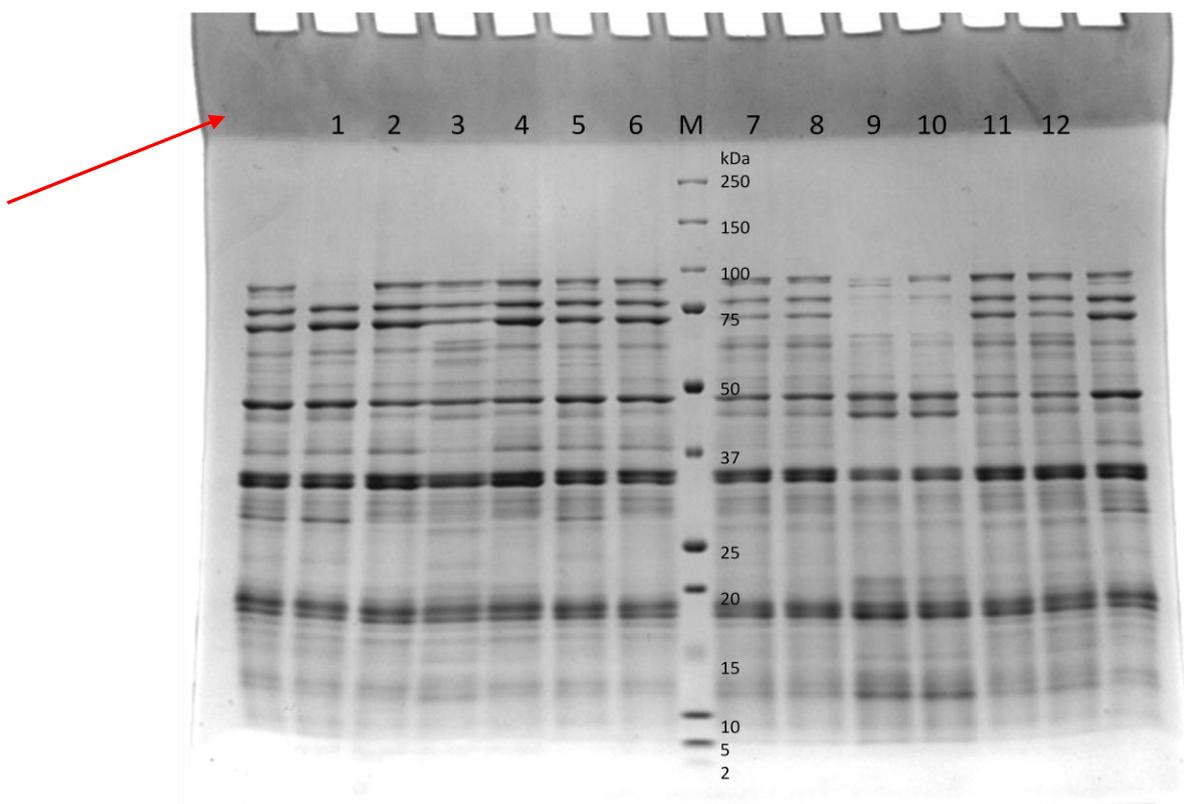


Fig. 2. 6 Patrón electroforético de proteínas de soja separadas en gel en gradiente de acrilamida (8-16 %). Cada calle del gel presenta proteínas de soja del cultivar Alim3.14 de distinta procedencia en cuanto a localidad, año y fecha de siembra en sus dos repeticiones a campo como se indica a continuación: líneas 1 y 2 lugar Cerrillos, segundo año, primer fecha de siembra, repeticiones 1 (I913) y 2 (I916). Líneas 3 y 4 Cerrillos, segundo año 2, segunda fecha de siembra, repeticiones 1 (I928) y 2 (I939). Líneas 5 y 6 Famaillá, primer año, segunda fecha de siembra, repeticiones 1 (H1357) y 2 (H1385). Líneas 7 y 8 Manfredi, primer año, primera fecha de siembra, repeticiones 1 (H1060) y 2 (H1067). Líneas 9 y 10 Manfredi, primer año, segunda fecha de siembra, repeticiones 1 (H1075) y 2 (H1084). Líneas 11 y 12 Manfredi, segundo año, segunda fecha de siembra, repeticiones 1 (I857) y 2 (I877). M: Marcador de peso molecular de proteínas BioRad.

Se observa en la Tabla 2.3 el rango de variación del cociente 11S/7S es menor dentro de cada cultivar con valores inferiores en el material especial (1.53 a 4.31) que en el comercial (2.46 a 5.79) cuyas diferencias fueron significativas a lo largo de los ambientes evaluados. Cai y Chang (1999) observaron correlaciones positivas y significativas entre la relación 11S/7S y atributos como rendimiento en tofu y calidad sensorial, aunque aplicable en algunos métodos de elaboración de tofu. Esta correlación se atribuye al hecho que la fracción 11S presenta mayor concentración de aminoácidos azufrados capaces de formar

puentes di-sulfuro en el gel de tofu (Utsumi y Kinsella, 1985). Los resultados indican que el cultivar comercial presenta mejores aptitudes para la elaboración de tofu con un mejor perfil nutricional en cuanto a aminoácidos azufrados. Sin embargo, no se observaron diferencias estadísticamente significativas para los aminoácidos azufrados aunque el valor de cisteína fue levemente superior en el cultivar comercial ALIM (0.93-1.63) (Tabla 2.1).

Tabla 2.3. Relación entre glicininas (11S) y β -conglucininas (7S) de proteínas de soja de dos cultivares. Valores promedios, mínimos y máximos.

	Especial	Comercial
11S/7S	2.57 (1.53-4.31)	3.86* (2.46-5.79)

En la Figura 2.6 se observan los azúcares extraídos y sus tiempos de retención para las condiciones cromatográficas utilizadas. En orden de concentración se presentaron: sacarosa, estaquiosa, rafinosa, glucosa, fructosa y verbascosa (Fig. 2.7). El pentasacárido verbascosa es el oligosacárido que se encuentra en menor cantidad en la soja, junto con la fructosa, tal como lo reportan otros autores (Kummar *et al.*, 2010).

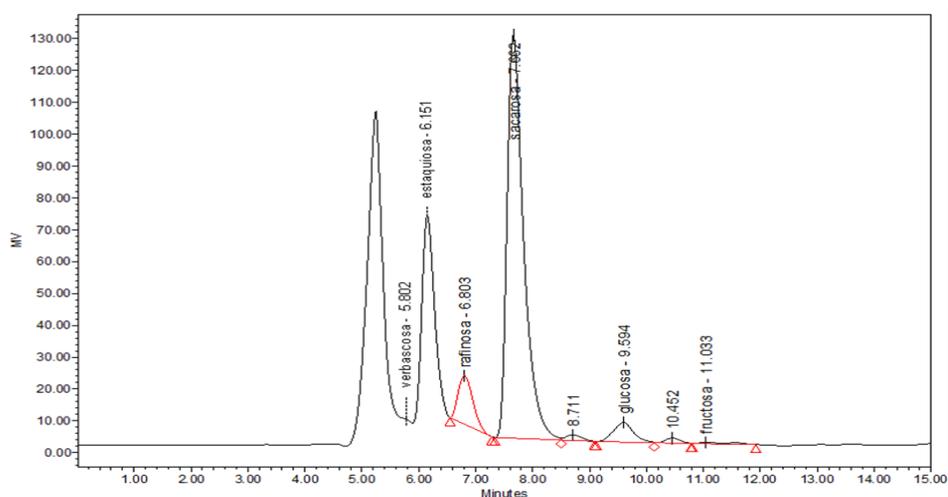


Fig. 2. 7 Cromatograma de azúcares solubles de una muestra de soja.

En relación a azúcares y a la fibra cruda, sólo se observó interacción G×A para rafinosa y fibra cruda siendo la componente de varianza del efecto de localidad el de mayor contribución a esta interacción que los efectos de FS y año. Los promedios para rafinosa y fibra cruda fueron obtenidos por genotipo por localidad (Tabla 2.4). Hubo diferencia significativa entre genotipos en las localidades de Cerro Azul y Paraná en el caso de la rafinosa, y en Cerro Azul y Manfredi para la fibra cruda, con cambio de rango en ambos casos razón por la cual no se presentan medias totales a lo largo de los ambientes para cada genotipo.

Tabla 2.4. Concentración de rafinosa y fibra cruda en dos genotipos de soja en ocho localidades.

Loc.	Rafinosa		FC	
	Esp	Com	Esp	Com
	g kg ⁻¹ *			
BW	4.29	4.96	97.45	101.55
BO	Sd	3.80	Sd	89.09
CA	6.41	9.11*	86.99	101.34*
CE	4.57	4.39	80.54	76.91
FA	4.52	3.78	79.67	89.89
MA	4.24	4.74	99.95*	89.68
PA	4.79*	4.09	94.65	76.72
RQ	5.01	5.02	95.53	93.56

*g kg⁻¹: gramos por kilogramo de soja en MS.

Abreviaturas: Loc., localidades; BW, Barrow; BO, Bordenave; CA, Cerro Azul; CE, Cerrillos; FA, Famaillá; MA, Manfredi; PA, Paraná; RQ, Reconquista; FC, fibra cruda; Esp, especial; Com, comercial.

Los azúcares extraídos que no presentaron interacción G×A fueron promediados por genotipo a través de los ambientes (Tabla 2.5). El total de azúcares solubles extraídos definido como la sumatoria de los azúcares determinados fue entre 64.09 y 113.63 g kg⁻¹ MS y estuvo dentro del rango total de azúcares previamente reportado por Hou *et al.* (2009) quien estudió azúcares en 241 cultivares de soja. La sacarosa representó aproximadamente el 50% del total de azúcares determinados. Las concentraciones de

glucosa, fructosa y verbascosa en algunos casos fueron muy reducidas impidiendo ser determinadas por el método descrito por lo tanto se reportaron como valores trazas, tal como ha sido publicado previamente (Kuo *et al.*, 1997; Hou *et al.*, 2008 y 2009; Hymowitz *et al.*, 1974; Gianoccaro *et al.*, 2008).

Tabla 2.5. Azúcares solubles en semillas de soja de dos cultivares. Valores promediados sobre 20 ambientes.

Azúcar	Esp		Com		P valor*
	g kg ⁻¹				
Estaquiosa	25.12	(14.37-29.68)	37.34	(25.55-48.41)	<0.0001
Sacarosa	46.54	(9.08-69.88)	47.61	(18.02-63.83)	0.5364
Glucosa	2.24	(ND-19.66)	5.13	(1.09-16.93)	0.0010
Fructosa	2.72	(ND-22.37)	2.59	(ND-16.75)	0.8986
Verbascosa	0.49	(ND-4.48)	0.02	(ND-0.27)	0.0086
RFO	28.87	(17.76-34.27)	42.32	(32.77-52.48)	<0.0001
Sac/RFO	15.23	(5.11-23.55)	11.19	(5.13-17.03)	<0.0001
Az. Sol. Tot	81.97	(64.09-103.91)	97.85	(71.16-113.63)	<0.0001

Abreviaturas: RFO, oligosacáridos de rafinosa representados como la sumatoria de estaquiosa y rafinosa; Sac, sacarosa; Az. Sol. Tot., azúcares solubles totales; Esp, especial; Com, comercial; ND, no detectado bajo las condiciones cromatográficas empleadas. Entre paréntesis valores mínimos y máximos de concentración para cada genotipo. *Valores de *P* iguales o menores a 0.006 (0.05/8) indican diferencias significativas entre medias según corrección por Bonferroni.

Las concentraciones de estaquiosa y rafinosa se presentan sumadas en algunos trabajos previos y de esta forma denominadas en total como RFO (Kumar *et al.*, 2010). Se consideran a los RFO como el factor causante de malestar gástrico. Los resultados de este estudio mostraron que la estaquiosa representó aproximadamente el 80% de RFO, por lo tanto, también hubo diferencia significativa entre cultivares para la variable RFO, siendo el cultivar especial el de menor concentración (Tabla 2.5). De acuerdo a Jaureguy *et al.* (2011) el efecto de genotipo es más evidente en la concentración de estaquiosa que en la de rafinosa, comparable a los resultados aquí presentados.

La sacarosa, la estaquiosa y la rafinosa fueron los azúcares solubles mayoritarios. A partir de estos se estimó el cociente entre sacarosa y RFO (Kumar *et al.*, 2010). El cultivar especial tuvo una concentración estadísticamente inferior de azúcares solubles que el comercial. Sin embargo el perfil de azúcares en el genotipo especial fue cualitativamente más apto para su uso en consumo directo o en alimentos debido a su mayor concentración relativa de sacarosa, ya que la sacarosa es un azúcar deseado para la elaboración de alimentos por conferir sabor agradable a los mismos (Taira, 1990). En cambio, el genotipo comercial, con mayor concentración de RFO sería interesante para la extracción de oligosacáridos considerados compuestos bifidogénicos (Domínguez-Vergara *et al.*, 2009).

Como carbohidratos estructurales se determinó la concentración de fibra cruda que presentó valores entre 76.72 y 101.55 g kg⁻¹ MS (Tabla 2.4) ligeramente superiores a los reportados previamente (Karr-Lilienthal *et al.*, 2005). La fibra cruda de un alimento corresponde al residuo orgánico insoluble remanente, del material inicialmente desgrasado, luego de ser sometido a hidrólisis ácida y alcalina. El método de determinación de fibra cruda usado solubiliza parte de otras fibras presentes en el grano, principalmente hemicelulosas (85%) y lignina (50-90%), algo de celulosa (0-50%), y todas las pectinas, gomas y mucílagos (Van Soest y McQueen, 1973). A pesar de sus limitaciones, este método continúa siendo elegido por muchos laboratorios para el etiquetado de alimentos por la sencillez de su realización (Van Soest, 1977).

El contenido total de cenizas en soja fluctuó entre 39.69 y 61.34 g kg⁻¹ MS. Dentro de la fracción de cenizas se cuantificaron los minerales. La interacción G×A fue estadísticamente significativa para los elementos minerales P, Mg, Na, Mo, Co y Pb. La componente de varianza de localidad fue mayor que la de FS y año. Los promedios por genotipos fueron comparados, para estos minerales dentro de cada localidad (Tabla 2.6). Mas allá de las variaciones en la magnitud de las diferencias entre genotipos para las distintas localidades se observaron cambios de rango en el ordenamiento de los cultivares para P, Mg y Mo. Los promedios de los minerales con interacción G×A que no presentaron cambio de rango a través de los ambientes son presentados junto a los promedios de otros minerales donde la interacción G×A no fue estadísticamente significativa (Tabla 2.7).

Tabla 2.6. Concentraciones de minerales por genotipo, especial y comercial, para ocho localidades con interacción G×A significativa.

Loc.	P		Mg		Na		Mo		Pb		Co	
	Esp	Com	Esp	com	Esp	com	esp	Com	Esp	Com	Esp	Com
	g kg ⁻¹						m g kg ⁻¹				μg kg ⁻¹	
BW	8.39	6.16	2.26	2.33	0.54	0.85	0.72	1.45	0.08	0.39	79.90	107.90
BO	sd	8.30	Sd	2.67	Sd	0.34	sd	3.32	Sd	0.15	sd	149.14
CA	8.95	7.56	2.71	3.07	0.54	0.43	0.17	0.45	0.25	0.74	236.05	302.72
CE	8.62	6.84	2.26	2.58	0.43	0.85	4.94	5.28	0.07	0.44	92.06	147.55
FA	8.48	9.67	2.40	3.36	0.56	0.55	6.34	6.72	0.26	0.49	131.05	222.40
MA	8.77	7.83	2.23	2.48	0.54	0.63	22.79	14.01	0.18	0.28	52.99	65.43
PA	8.79	7.37	2.24	2.49	0.51	0.58	1.86	1.14	0.24	0.47	174.59	270.33
RQ	8.68	8.71	2.30	3.18	0.52	0.52	6.11	4.88	0.16	0.52	297.65	442.65
Media	8.69	7.45	2.34	2.72	0.51	0.66	7.39	5.25	0.17	0.48	139.04	206.46

Abreviaturas: Loc., localidades; BW, Barrow; BO, Bordenave; CA, Cerro Azul; CE, Cerrillos; FA, Famaillá; MA, Manfredi; PA, Paraná; RQ, Reconquista; esp, especial; com, comercial.

El potasio fue el mineral de mayor concentración en la soja superando ampliamente el resto de los valores hallados para otros minerales con una concentración de 17.68 g kg⁻¹ MS promedio de todas las muestras evaluadas; este valor para potasio representó más del 50% del contenido total de minerales analizados (32.54 g kg⁻¹ MS promedio) por kilogramo de semillas en MS (Tabla 2.7). En orden de concentración, luego del potasio se encontró el fósforo (8.10 g kg⁻¹ MS promedio) y muy por debajo el calcio (3.44 g kg⁻¹), magnesio (2.52 g kg⁻¹) y sodio (0.58 g kg⁻¹). Estos valores fueron semejantes a los reportados para la caracterización del grano de soja por USDA (2015), con la diferencia que el USDA reporta concentración mayor de magnesio que de calcio y menor concentración de sodio. Bellaloui *et al.* (2011) también reportaron valores de Ca superiores a los de Mg, pero la concentración en P (0.61 g 100g⁻¹) fue inferior a la del presente estudio.

Tabla 2.7. Cenizas y minerales en porotos de soja de dos cultivares. Valores promediados sobre 20 ambientes.

Mineral	Especial	Comercial	<i>P</i> valor*
	g kg^{-1}		
Cenizas	53.45 (46.99-61.34)	52.09 (39.69-57.01)	0.0974
K	19.43 (15.14-25.21)	15.73 (9.60-22.23)	<0.0001
Ca	2.99 (1.76-4.84)	3.93 (2.07-6.77)	<0.0001
Mg	2.34 (1.94-2.98)	2.72 (2.19-3.73)	<0.0001
	mg kg^{-1}		
Fe	106.85 (74.76-156.94)	98.13 (77.17-141.16)	0.0018
Zn	43.64 (23.82-85.40)	48.24 (24.74-140.45)	0.3360
Mn	38.34 (21.70-70.05)	41.00 (17.24-100.51)	0.6865
Cu	14.32 (8.05-23.82)	16.24 (9.66-24.83)	0.0238
Al	13.95 (2.62-28.38)	7.56 (2.29-30.94)	<0.0001
Pb	0.17 (0.01-0.45)	0.48 (0.13-1.24)	<0.0001
Cd	0.04 (0.01-0.11)	0.04 (0.02-0.09)	0.0595
	$\mu\text{g kg}^{-1}$		
Co	139.04 (39.23-430.20)	206.46 (60.90-536.00)	0.0001
Se	70.81 (1.40-374.40)	64.34 (ND-413.30)	0.7340

Entre paréntesis valores mínimos y máximos de concentración de minerales para cada genotipo. *Valores iguales o menores a 0.003 (0.05/16, corregido según criterio de Bonferroni) indican diferencias significativas entre medias de genotipos.

Como elementos minoritarios, el hierro fue el de mayor concentración ($102.73 \text{ mg kg}^{-1}$) seguido por cinc (45.84 mg kg^{-1}), manganeso (39.59 mg kg^{-1}), cobre (15.23), aluminio (10.93) y molibdeno (6.38). Los metales pesados se presentaron en concentraciones menores, a saber: plomo (0.31 mg kg^{-1}), cadmio (0.04 mg kg^{-1}), cobalto (0.17 mg kg^{-1}) y selenio (0.06 mg kg^{-1}), sin residuos de arsénico en ninguna de las muestras examinadas. La mayoría de los minerales son incorporados en las semillas de acuerdo a la genética de la semilla y, principalmente, de la disponibilidad del elemento en la solución de suelo. Se observaron diferencias significativas entre cultivares para la mayoría de los elementos estudiados con excepción del manganeso, selenio y cadmio. También se observó un amplio rango de concentraciones para la mayoría de los elementos estudiados, efecto que indica que la concentración de minerales está condicionada por factores ambientales. El contenido de elementos menores como el Fe, Zn, Cu, Mn, Mo, Co y Se se relaciona directamente con la concentración disponible en el suelo (Wiersma y Moraghan, 2013), particularmente para el selenio, ya que no se conoce aún un

requerimiento específico de las plantas por selenio. La amplia variación observada en micronutrientes indica la posibilidad de sustanciales diferencias de los mismos en la solución de suelo entre localidades (Karr-Lilienthal *et al.*, 2004).

La presencia de metales pesados en alimentos se encuentra regulada por entidades oficiales siendo el máximo valor admitido en poroto maduro de soja, crudo y seco de $0.20 \text{ mg kg}^{-1} \text{ MS}$ para arsénico, cadmio y plomo (GMC, 2012). Puede observarse en la Tabla 2.7 que el máximo valor alcanzado en cadmio fue de $0.11 \text{ mg kg}^{-1} \text{ MS}$ a lo largo de los ambientes evaluados, valor que se ubica muy por debajo del máximo admitido ($0.20 \text{ mg kg}^{-1} \text{ MS}$). Para el plomo la situación se presentó diferente, los valores hallados en promedio resultaron en $0.31 \text{ mg kg}^{-1} \text{ MS}$ con un valor mínimo de $0.01 \text{ mg kg}^{-1} \text{ MS}$ y máximo de $1.24 \text{ mg kg}^{-1} \text{ MS}$. Estudiando los resultados particionados por cultivar se observaron tendencias diferentes entre ambos. Si bien el valor máximo obtenido fue elevado, la distribución de frecuencias de los valores obtenidos indicó que el 74% de los valores de plomo en soja especial estuvieron por debajo del límite máximo admitido, y sólo el 15% en la soja comercial. La diferencia en la concentración de plomo en las semilla de soja entre los cultivares estudiados fue estadísticamente significativa ($p \leq 0.0001$; Tabla 2.7).

Lavado (2006) realizó un estudio en la Región Pampeana argentina y encontró altos niveles de plomo en sojas ($0.45 \text{ mg kg}^{-1} \text{ MS}$) sembradas en áreas próximas a zonas urbanas con alto contenido de plomo en suelo. Sin embargo su resultado fue muy inferior a los obtenidos por Salazar *et al.*, (2012) en áreas próximas a industrias con valores de plomo en soja superiores a $1.5 \text{ mg kg}^{-1} \text{ MS}$, muy por encima de los valores aquí presentados. En otro estudio en la misma región comparando dos sistemas de siembra, se observaron valores en grano de 0.85 y $0.80 \text{ mg kg}^{-1} \text{ MS}$ bajo siembra directa y labranza convencional, respectivamente (Lavado *et al.*, 2001). Las localidades sembradas en el presente estudio corresponden a áreas rurales sin industrias en los alrededores.

Más de la mitad del fósforo en la semilla de soja se encuentra en forma de ácido fítico (Lolas *et al.*, 1976). El ácido fítico tiene la propiedad de unirse a los cationes divalentes de los coagulantes usados para la elaboración de tofu colaborando en un mayor

rendimiento (Shurtleff y Aoyagi, 2013). Se encontraron diferencias significativas para la mayoría de los minerales analizados entre las líneas evaluadas. ALIM3.14 presentó una concentración superior de P e inferior de Ca y Pb ($P \leq 0.0001$) indicando mejor potencialidad para la elaboración de tofu (Saio, 1976; Shurtleff y Aoyagi, 2013) con mejor inocuidad. Para confirmar este resultado sería apropiada la elaboración comparativa de tofu con estas líneas de soja, que no fue posible de realizarse en este estudio porque las líneas de mejoramiento de soja se evalúan con reducido volumen de semillas inferior al necesario para elaborar tofu.

En el análisis de correlación entre los minerales presentes en el grano de soja se observó una elevada y significativa correlación entre la mayoría de los cationes analizados (Tabla 2.8). La presencia de calcio estuvo alta y positivamente correlacionada ($P \leq 0.0001$) con la de magnesio, hierro, cinc, cobre, manganeso, cobalto y plomo. De manera semejante, estudios previos hallaron positiva y alta correlación entre calcio y magnesio en semillas de soja (Kleese *et al.*, 1968; Raboy *et al.*, 1984; Gibson y Mullen, 2001). El potasio demostró una alta y positiva correlación con el fósforo ($P \leq 0.0001$) y en menor grado con el hierro, aluminio y manganeso, y de forma negativa con el sodio. Se observaron correlaciones positivas entre el cinc y el calcio ($P \leq 0.0001$), cinc y magnesio ($P = 0.0004$) y cinc con manganeso ($P \leq 0.0001$). El selenio se correlacionó de forma positiva con el molibdeno ($P \leq 0.0001$), y de manera negativa con el cobre ($P \leq 0.0001$). El selenio es indispensable para la formación de selenoproteínas y actúa reforzando el sistema inmune, observándose mayor incidencia de enfermedades en áreas deficientes en selenio (Rayman, 2012). Cataldo *et al.* (1983) observó la existencia de absorción competitiva entre el cadmio, cinc e hierro por participar en el mismo sitio de transporte. En el análisis, la correlación entre cadmio, cinc y hierro fue negativa pero no significativa ($P > 0.003$). El cinc y el hierro son elementos esenciales para prevenir malformaciones y anemia, por lo que se ha considerado la fortificación de cultivos con estos elementos (Graham *et al.*, 2007).

Tabla 2.8. Coeficientes de correlación de Pearson entre minerales presentes en la semilla de soja.

	Ca	K	Mg	Na	P	Fe	Al	Zn	Cu	Mn	Mo	Co	Se	Pb
K	0.13													
Mg	0.87*	0.09												
Na	-0.10	-0.42*	0.04											
P	0.03	0.71*	0.09	-0.39*										
Fe	0.43*	0.46*	0.27	-0.16	0.25									
Al	-0.07	0.29	-0.26	0.01	0.03	0.64*								
Zn	0.49*	0.37	0.44*	-0.16	0.05	0.20	-0.04							
Cu	0.62*	0.25	0.61*	0.22	-0.07	0.66*	0.26	0.14						
Mn	0.66*	0.31*	0.55*	-0.24	0.14	0.43*	0.06	0.52*	0.46*					
Mo	-0.25	-0.09	-0.23	-0.05	0.11	-0.33	-0.10	0.15	-0.59*	-0.25				
Co	0.74*	0.47*	0.60*	-0.09	0.07	0.43*	-0.04	0.01	0.62*	0.44*	-0.41*			
Se	-0.27	0.00	-0.28	-0.05	0.08	-0.30	-0.11	0.16	-0.56*	-0.34	0.76*	-0.40		
Pb	0.67*	-0.24	0.63*	0.19	-0.36	0.07	-0.17	0.32	0.43*	0.39*	-0.21	0.45*	-0.24	
Cd	-0.15	-0.05	-0.18	0.12	-0.09	-0.17	-0.08	-0.02	-0.29	-0.33	0.33	-0.15	0.28	-0.04

* $P \leq 0.003$ (0.05/15, corrección por Bonferroni).

CONCLUSIONES

Los análisis químicos realizados para aminoácidos, 11S/7S, azúcares solubles, fibra cruda y minerales en soja varían con el genotipo y con el ambiente pero con baja interacción $G \times A$. Esta interacción es importante para minerales y para Rafinosa y en ambos casos determinada por diferencias entre genotipos dependientes de los efectos de localidad. El mayor rango relativo de variación se da en las concentraciones de minerales. Existen diferencias significativas entre genotipos en algunos de los atributos. ALIM3.14 presenta mayor concentración de P, menor de RFO, Ca y Pb y mejor relación sacarosa/RFO con respecto al genotipo comercial, deseados atributos para la elaboración de tofu.

BIBLIOGRAFÍA

- Adachi M., Kanamori J., Masuda T., Yagasaki K., Kitamuras K., Mikami B. and Utsumi S. 2003. Crystal structure of soybean 11S globulin: glycinin A3B4 homohexamer. PNAS, 100 (12): 7395-7400.
- Albin D.M., Wubben J.E., Gabert V.M. 2000. The influence of hydrochloric acid concentration and measurement method on the determination of amino acid levels in osya bean products. Animal Feed Science and Thechnology 87: 173-186.
- AOCS, American Oil Chemists' Society. 2008. Method Ba 6a-05. Official Method and Recommended Practices of the AOCS, 4th ed. AOCS, Champaign, IL.
- Anderson K. 1998. Influence of reduced oxygen concentrations on lipid oxidation in food during storage. Tesis doctoral. Chalmers University of Technology and the Swedish Institute for Food and Biotechnology. Chalmers Reproservice. Sweden.
- Anthony M.S. 2000. Soy and cardiovascular disease: cholesterol lowering and beyond. J. Nutr., 130(3): 662S-663S.
- Balzarini M., Bruno C., Arroyo A. 2005. Análisis de ensayos agrícolas multiambientales. Ejemplos en Info-Gen. Ed. ISBN 987-05-0349-7. Córdoba, Argentina. pp. 141.
- Bradford M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry, 72: 248-254.
- Cai T., Chang K-C. 1999. Processing effect on soybean storage proteins and their relationship with tofu quality. J. Agric. Food Chem., 47: 720-727.
- Carrera C.S. 2011. Variación ambiental de componentes químicos en genotipos de soja con características diferenciales para calidad nutricional. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de Córdoba, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Córdoba, Argentina, 150 pp.
- Carrera C., Martínez M.J., Dardanelli J., Balzarini M. 2009. Environmental variation and correlation of seed components in non-transgenic soybeans: protein, oil, unsaturated fatty acids, tocoferols, and isoflavones. Crop Sci., 51:1-10.
- Cazzoli A.F., Tapiz L.M., Tosi E.A., Osoreo A.A. 2012. Efecto de la concentración de hierro sobre la estabilidad oxidativa del aceite comestible de soja. IV Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Córdoba, Argentina. Disponible online: <http://www.mincytalimentos.cba.gov.ar/LibrodeActas/pdf/libro-pdf.pdf>
- Chang C.J., Tanksley T.D.Jr., Knabe D.A., Zebrowska T. 1987. Effects of different heat treatments during processing on nutrient digestibility of soybean meal in growing swine. J. Anim. Sci., 65: 1273-1282.
- Chen P. 2004. Developing high quality identity-preserved soybean for the specialty soyfood market. En: Production and marketing of identity-preserved soybean. American Soybean Association, USA. pp. 23-31.
- Crittenden R.G. and Playne M.J. 1996. Production, properties and applications of food-grade oligosaccharides (A review). Trends in Food Sci. & Tech., 7: 353-360.
- Dardanelli J. L., Balzarini M., Martínez M. J., Cuniberti M., Resnik S., Ramunda S. F., Herrero R. and Baigorri H. 2006. Soybean maturity groups, environments, and their interaction define mega-environments for seed composition in Argentina. Crop Sci. 46:1939-1947.

- Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M., Robledo C.W. InfoStat versión 2011. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>
- Domínguez-Vergara A.M., Vázquez-Moreno L. y Ramos-Clamont Montfort G.R. 2009. Revisión del papel de los oligosacáridos prebióticos en la prevención de infecciones gastrointestinales. Archivos Latinoamericanos de Nutrición, 59 (4): 358-368.
- Eggum B.O., Beames R.M. 1985. The nutritive value of seed proteins. En: Seed proteins. Gottschalk W., Muller H.P., (ed.). Nijhoff/Junk, The Hague, Holanda, pp. 499-531.
- Garbulsky M.F. y Deregibus V.A. 2004. Perfiles por país del recurso pastura/forraje: Argentina. Publicado en internet. Disponible en: [http://www.fao.org/ag/agp/AGPC/doc/Counprof/spanishtrad/argentina sp/argentina s p.htm#soilmap](http://www.fao.org/ag/agp/AGPC/doc/Counprof/spanishtrad/argentina_sp/argentina_s p.htm#soilmap) . 04 de marzo de 2015.
- Giannoccaro, E., Wang, Y.-J. and Chen, P. 2006. Effects of solvent, temperature, time, solvent-to-sample ratio, sample size, and defatting on the extraction of soluble sugars in soybean. J Food Sci, 71: C059-C064.
- Giannoccaro E., Wang Y.J., Chen P. 2008. Comparison of two HPLC systems and an enzymatic method for quantification of soybean sugars. Food Chem., 106:324-330.
- Gibson, L.R., Mullen, R.E. 2001. Mineral concentrations in soybean seeds produced under high day and night temperature. Can. J. Plant. Sci. 81, 595-600, 10.4141/P00-177.
- GMC (Grupo Mercado Común). 2012. Resoluciones 102/94 y 35/96, 2012 Publicado en internet. Disponible en: www.anmat.gov.ar/alimentos/codigoa/Capitulo_III.pdf 04 de Junio de 2015.
- Graham, R.D., Welch, R.M., Saunders, D.A., Ortiz-Monasterio, I., Bouis, H.E., Bonierbale, M., De Haan, S., Burgos, G., Thiele, G., Liria, R., Meisner, C.A., Beebe, S.E., Potts, M.J., Kadian, M., Hobbs, P.R., Gupta, R.K., Twomlow, S. 2007. Nutritious subsistence food systems. Advances in Agronomy 92, 1-74.
- Grieshop C.M., Kadzere C.T., Clapper G.M., Flickinger E.A., Bauer L.L., Frazier R.L., Fahey G.C. 2003. Chemical and nutritional characteristics of the United States soybeans and soybean meals. J. Agric. Food Chem., 51: 7684-7691.
- Hou A., Chen P., Alloatti J., Li D., Mozzoni L., Zhang B., Shi A. 2009. Genetic variability of seed sugar content in worldwide soybean germplasm collections. Crop Sci., 49:903-912.
- Hou, A., Chen, P., Shi, A., Zhang, B., and Wang, Y-J. 2008. Sugar variation in soybean seed assessed with a rapid extraction and quantification method. Int. J. Agron., ID 484571, 8 pp.
- Huber S.V. and Israel D.W. 1982. Biochemical basis for partitioning of photosynthetically fixed carbon between starch and sucrose in soybean (*Glycine max* L. Merr.) leaves. Plant Physiol., 69: 691-696.
- Hymowitz, T., & Collins, F. I. 1974. Variability of sugar content in seed of *Glycine max* (L.) Merrill and *G. soja* Sieb. and Zucc. Agronomy Journal, 66:239-240.
- INTA 1990. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Atlas de suelos de la Republica Argentina. 2 tomos, 677 páginas.
- Jaureguy L.M., Chen P., Scaboo A.M. 2011. Heritability and correlations among food grade traits in soybeans. Plant Breeding 130:647-652.
- Joint FAO/WHO. 2005. Vitamin and mineral requirements. 2 Ed. Joint FAO/WHO Expert consultation on vitamin and mineral requirements. World Health Organization. Dept. of Nutrition for Health and Development. Génova. 341 pp. Publicado en internet, disponible en: <http://www.who.int/iris/handle/10665/42716>

- Karr-Lilienthal L.K., Grieshop C.M., Merchen N.R., Mahan D.C., Fahey G.C.Jr. 2004. Chemical composition and protein quality comparisons of soybeans and soybean meal from five leading-producing countries. *J. Agric. Food Chem.*, 52: 6193-6199.
- Karr-Lilienthal L.K., Kadzere C.T., Grieshop C.M., Fahey G.C.Jr. 2005. Chemical and nutritional properties of soybean carbohydrates as related to non-ruminants: A review. *Livestock Production Science*, 91: 1-12.
- Kirimura J., Shimizu A., Ninomiya T., Katsuya N. 1969. Contribution of peptides and amino acids to the taste of foods. *J. Agric. Food Chem.*, 17(4): 689-695.
- Kleese, R.A., Rasmusson, D.C., Smith, L.H. 1968. Genetic and environmental variation in mineral element accumulation in barley, wheat, and soybeans. *Crop Sci.* 8, 591-593.
- Knothe G., Dunn R.O. 2003. Dependence of oil stability index of fatty compounds on their structure and concentration and presence of metals. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 80 (10): 1021-1026.
- Kumar V., Rani A., Goyal L., Dixit A.K., Manjaya J.G., Dev J., Swamy. M. 2010. Sucrose and raffinose family oligosaccharides (RFOs) in soybean seeds as influenced by genotype and growing location. *J. Agric. Food Chem.*, 58 (8): 5081-5085.
- Kuo T.M., Lowell C.A., Smith P.T. 1997. Changes in soluble carbohydrates and enzymatic activities in maturing soybean seed tissues. *Plant Sci.*, 125:1-11.
- Laemmli U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-686.
- Lavado R., Porcelli C.A., Alvarez R. 2001. Nutrient and heavy metal concentration and distribution in corn, soybean and wheat as affected by different tillage systems in the Argentine Pampas. *Soil and Tillage Research*, 62: 55-60.
- Lavado R.S. 2006. Concentration of potentially toxic elements in field crops grown near and far from cities of the Pampas (Argentina). *J. of Environ. Manag.*, 80: 116-119.
- Liu Z.S. and Chang S.K.C. 2004. Effect of Soy Milk Characteristics and Cooking Conditions on Coagulant Requirements for Making Filled Tofu. *J. Agric. Food Chem.* 52: 3405-3411
- Liu J.-J. J., Krenz D.C., Galvez A.F., Lumen B.O. de. 1998. Galactinol synthase (GS): increased enzyme activity and levels of mRNA due to cold and desiccation. *Plant Sci.*, 134: 11:20.
- Lolas G.M., Palamidis N., Markakis P. 1976. The phytic acid-total phosphorous relationship in barley, oats, soybeans and wheat. *Cereal Chemistry* 53(6): 867-871.
- Lowell C.A. and Kuo T.M. 1989. Oligosaccharide metabolism and accumulation in developing soybean seeds. *Crop. Sci.*, 29: 459:465.
- Lykken, G. I.; Hunt, J. R.; Nielsen, E. J.; Dinizis F. R. Availability of soybean hull iron fed to humans in a mixed, Western meal. *J. Food Sci.* 1987, 52 (6), 1545–1548.
- Maestri D.M., Labuckas D.O., Meriles J.M., Lamarque A.L., Zygadlo J.A. and Guzmán C.A. 1998. Seed composition of soybean cultivars evaluated in different environmental regions. *J. of the Sci. of Food and Agric.*, 77 (4): 494:498.
- Maruyama N., Adachi M., Takahashi K., Kohno M., Takenaka Y., Okuda E., Nakagawa S., Mikami B. and Utsumi S. 2001. Crystal structures of recombinants and native soybean β -conglycinin β homotrimers. *Eur. J. of Biochem.*, 268 (12): 3595-3604.
- Molenberghs G., Verbeke G. 2007. Likelihood ratio, score, and wald test in a constrained parameter space. *The Am. Stat.*, 61(1): 22-27.
- Mujoo R., Trinh D.T. and Ng P.K.W. 2003. Characterization of storage proteins in different soybean varieties and their relationship to tofu yield and texture. *Food Chemistry* 82: 265–273.

- Murphy P., Chen H.P., Hauck C.C. y Wilson L.A. 1997. Soybean protein composition and tofu quality. *Food Tech.*, 59 (3): 86-89.
- Murphy P.A., Resurrección A.P. 1984. Varietal and environmental differences in soybean glycinin and β -conglycinin content. *J. Agric. Food Chem.*, 32: 911-915.
- Nagano N.C. 1985a. Structure of soy proteins. In A.M. Altshul, & H.L. Wilcke (Eds.), *New protein foods 5: seed storage proteins* (pp. 27). New York: Academic Press.
- Nielsen N.C. 1985. The structure and complexity of the 11S polypeptide in soybean. *J. Am. Oil Chemists Society*, 49: 2733-2740.
- NIHS. 2002. Publicado en internet. Disponible en: <http://www.nihs.go.jp/dbcb/Bio-Topic/amino.pdf>
- Panigatti J.L. 2010. Argentina 200 años, 200 suelos. Ed. INTA Buenos Aires. 345 pp.
- PICTO BID FONCyT (N° 08-12949). 2002. Caracterización del germoplasma de soja en Argentina, de alta calidad industrial y nutricional a través de nuevas tecnologías. Período 2004- 2008.
- PNCER 2345. 2006. Proyecto nacional de cereales y oleaginosas INTA. Manejo y ecofisiología para calidad diferenciada en cereales y oleaginosas 2006-2011. Publicado en internet, disponible en: <http://www1.inta.gov.ar/proyectos2006/publico/pe1.asp>
- PNCER 240. 2006. Desarrollo de ideotipos de cereales y oleaginosas para ambientes productivos y demandas específicas, proyecto específico Desarrollo de germoplasma de soja, 2006-2011. Publicado en internet, disponible en: <http://www1.inta.gov.ar/proyectos2006/publico/pe1.asp>
- Raboy, V., Dickinson, D.B., Below, F.E. 1984. Variation in seed total phosphorus, phytic acid, zinc, calcium, magnesium, and protein among lines of Glycine max and G. soja. *Crop Sci.* 24 (3): 431-434.
- Rayman, M. 2012. Selenium and human health (a review). *Lancet*, 379 (9822): 1256-1268.
- Resolución GMC N° 102/94 y N° 35/96. Reglamento técnico MERCOSUR sobre límites máximos de contaminantes inorgánicos en alimentos. 21 de enero de 2013. Disponible online: http://www.anmat.gov.ar/alimentos/codigoa/Capitulo_III.pdf Marzo de 2015.
- Saio K. 1976. Soybeans resistant to water absorption. *Cereal Foods World* 21: 168-173.
- Salazar M.J., Rodríguez J.H., Nieto G.L., Pignata M.L. 2012. Effects of heavy metal concentrations in agricultural soils near different emission sources on quality, accumulation and food safety in soybean [*Glycine max* (L.) Merrill]. *J. of Hazardous Materials*, 233-234: 244-253.
- SAMLA. 2004. Recopilación de técnicas de laboratorio. 1st ed. Dirección de agricultura, Buenos Aires, AR, CD-ROM.
- Saravitz D.M., Pharr D.M. and Carter T.E. Jr. 1987. Galactinol synthase activity and soluble sugars in developing seeds of four soybean genotypes. *Plant Physiol.*, 83 (1): 185-189.
- Shurtleff W., Aoyagi A. 2013. History of tofu and tofu products (965 CE to 2013). Soyinfo center, Eds. 324 pp.
- Smith L.S. 1938. Calcium Phosphorous relationships in canning peas. Tesis. Publicado en internet. Disponible en: https://circle.ubc.ca/bitstream/id/144040/UBC_1938_A4_S6_C2.pdf
- Soldini D.O. 2011. Nuevo cultivar de soja: para alimentarte mejor. INTA Informa. INTA expone cuyo. 25 de febrero de 2011. Disponible en: <http://intainforma.inta.gov.ar/?p=4756>

- Taira H. 1990. Quality of soybeans for processed foods in Japan. *Jpn. Agric. Res. Q.*, 24: 224-230.
- USDA. Nutritional nutrient database for standard reference. Publicado en internet. Disponible en: <http://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show/4820?manu=&fgcd=>. Activo Febrero de 2015.
- Utsumi S., Kinsella J.E. 1985. Forces involves in soy protein gelation: effects of various reagents on the formation, hardness and solubility of heat induced gels made from 7S, 11S, y soy isolates. *J. Food Sci.*, 50(5): 1278-1282.
- Van Horn L. Fiber, lipids, and coronary heart disease. A statement for health professionals from de nutrition committee, American Heart Association. *Circulation*, 95, 2701:2704.
- Van Soest P.J. and McQueen R.W. 1973. The chemistry and estimation of fibre. Symposium on fibre in human nutrition. *Proc. nutr. soc.*, 32: 123-130.
- Wang C.C.R. and Chang S.K.C. 1985. Physicochemical properties and tofu quality of soybean cultivar proto. *J. Agr. Food. Chem.*, 33: 297-303.
- West B.T., Welch K.B., Galecki A.T. 2007. *Linear Mixed Models. A Practical Guide Using Statistical Software*. New York, NY, USA: Chapman & Hall CRC Press.
- WHO. 2002. Protein and amino acid requirements in human nutrition: report of a joint FAO/WHO/UNU expert consultation. Publicado en internet. Disponible en: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/43411/1/WHO_TRS_935_eng.pdf.
- Wiersma J.V., Moraghan, J.T. 2013. Within-seed distribution of selected mineral elements among soybean genotypes that vary in iron efficiency. *Crop Sci.*, 53: 2051-2062.
- Yoshikawa Y., Chen P., Zhang B., Scaboo A., Orazaly, M. 2014. Evaluation of seed chemical quality traits and sensory properties of natto soybean. *Food Chemistry* 153(15): 186-192.
- Young V.R., Pellet P.L. 1994. Plant proteins in relation to human protein and amino acid nutrition. *Am. J. Clin. Nutr.*, 59: 1203S-1212S.
- Zarkadas C.G., Cagnon C., Poysa V., Khanizadeh S., Cober E.R., Chang V., Gleddie S. 2007. Protein quality and identification of the storage protein subunits of tofu and null soybean genotypes, using amino acid analysis, one- and two-dimensional gel electrophoresis, and tandem mass spectrometry. *Food Res. Int.*, 40: 111-128.
- Zossi, S.B., Cárdenas, G.J., Sorol, N. and Sastre M. 2010. Influencia de compuestos azúcares y no azúcares en la calidad industrial de caña de azúcar en Tucumán (R. Argentina). Parte 1: caña limpia y despuntada. *Rev. Ind. y Agríc. de Tucumán*, 87 (1): 15-27.

CAPITULO III

EFECTO DEL AMBIENTE SOBRE LA VARIABILIDAD DE LA COMPOSICION NUTRICIONAL DEL GRANO DE SOJA

INTRODUCCIÓN

En el presente capítulo se presenta la evaluación del efecto ambiental sobre los componentes nutricionales y de importancia bioactiva del grano de soja. En la República Argentina las fechas de siembra arrancan entre mediados del mes de septiembre y octubre en latitudes más altas hasta mediados de enero o principios de febrero a medida que bajamos en latitud (Giorda y Baigorri, 1997). El inicio del período reproductivo es estimulado por la longitud del fotoperiodo, es decir, a medida que los días se acortan a un dado umbral de horas de luz se induce la floración del cultivo. Así, se siembran ciclos cortos en latitudes altas y ciclos largos a medida que disminuyen los grados de latitud (Giorda y Baigorri, 1997). La floración (R1) da inicio al período reproductivo del cultivo, donde ocurrirá el período crítico de llenado de granos definido entre los estadios R5 de inicio de llenado de granos y R7 de madurez fisiológica (Fehr y Caviness, 1977). Esta particularidad nos indica que el período reproductivo de la soja, más puntualmente el período crítico ocurre bajo diferentes condiciones ambientales. La tasa de ocurrencia de los procesos fisiológicos donde intervienen enzimas, es en algunos casos más o menos afectada por las condiciones externas de temperatura, luz, agua y disponibilidad de nutrientes. Por lo tanto, la composición relativa de los componentes del grano de soja puede ser variables entre ambientes. El objetivo de este estudio es evaluar variables ambientales que afectan la composición del grano identificando aquellas variables externas con mayor efecto y definir la relación entre ambas.

La composición porcentual de las subunidades proteicas del grano de soja, así como su composición en aminoácidos, varían entre genotipos y en función del ambiente (Mujoo *et al.*, 2003; Utsumi y Kinsella, 1985). La partición de CO₂ hacia la producción de azúcares o almidón está afectada por el fotoperiodo pero primeramente definida por

características asociadas al genotipo (Huber e Israel, 1982), pudiendo diferenciarse genotipos con un perfil de azúcares deseado en líneas de mejoramiento (Hou *et al.*, 2009). A su vez, la concentración de cada azúcar individual es afectada por las condiciones ambientales reinantes. Se ha observado que el contenido de sacarosa está más influenciado por cambios en la temperatura del aire que los contenidos de rafinosa y estaquiosa; así se determinó que temperaturas más frescas a lo largo del crecimiento del cultivo resultan en mayores contenidos de sacarosa en grano (Kumar *et al.*, 2010; Hou *et al.*, 2009; Hartwig *et al.*, 1997; Guo & Oosterhuis, 1995; Parson *et al.*, 2000), con resultados variables para rafinosa y estaquiosa (Kumar *et al.*, 2010; Jaureguy *et al.*, 2013).

La formación de oligosacáridos de la familia de rafinosa (RFO) en semillas de soja depende de la enzima galactinol sintetasa (GS) (Saravitz *et al.*, 1987). Se ha observado que esta enzima incrementa su actividad hacia etapas finales del desarrollo de la semilla (Lowell y Kuo, 1989). Condiciones ambientales causantes de estrés por bajas temperaturas y deshidratación estimulan la actividad de la GS (Liu *et al.*, 1998). Como consecuencia, se ha propuesto que los RFO actúan como osmoreguladores frente a bajas temperaturas y salinidad (Liu *et al.*, 1998) y protectores frente a estrés oxidativo (Nishizawa *et al.*, 2008).

La concentración de la porción residual de la semilla de soja, haciendo referencia a los carbohidratos en su conjunto (azúcares solubles y CHO estructurales), se ve reducida ante incrementos en la temperatura del aire, y afectada de manera negativa por baja disponibilidad hídrica durante el período de llenado de granos (Rotundo y Westgate, 2009). La acumulación de aceite y de carbohidratos, a diferencia de la de proteínas, depende principalmente de la fotosíntesis (Yamagata *et al.*, 1987). Por lo tanto, la ocurrencia de estrés hídrico en el período de llenado de granos afecta más negativamente el contenido de CHO que el de proteínas (Rotundo y Westgate, 2009); el cual depende primeramente de la movilización del nitrógeno de las hojas.

El contenido de minerales en las semillas, a diferencia de los fotoasimilados, está en estrecha relación a su incorporación desde la solución del suelo. Algunos estudios han asociado la concentración de elementos como arsénico y selenio en semillas de soja con la presencia de estos minerales en el suelo donde la semillas fueron sembradas (Wauchope,

1978). A su vez, la disponibilidad de ciertos compuestos puede estar afectada por la presencia de otros minerales. Arvejas crecidas en suelos con buena disponibilidad de Ca manifestaron mayor contenido de P (Smith, 1938). En sentido general, ambientes con menor temperatura resultaron en semillas con menor concentración de elementos inorgánicos (Jaureguy *et al.*, 2013).

En Argentina se ha estudiado el efecto del ambiente sobre la proteína cruda y materia grasa (Maestri *et al.*, 1998; Martínez *et al.*, 2005; Dardanelli *et al.*, 2006; Carrera *et al.*, 2011a), isoflavonoides, ácidos grasos, tocoferoles y aminoácidos en genotipos comerciales (Carrera *et al.*, 2011b; Carera *et al.*, 2014; Martinez *et al.*, 2015, 2009a, 2009b, 2007). La soja ha sido cultivada principalmente por su contenido de proteínas y lípidos para la producción de harina para alimento animal y de aceite, respectivamente (Wilcox y Shibles, 2001). En consecuencia, numerosos estudios se han realizado explorando el comportamiento de estos componentes del grano (Rotundo y Westgate, 2009). La presente investigación pretende profundizar el estudio del efecto del ambiente sobre el comportamiento aún no explorado de otros compuestos del grano (subunidades proteicas, aminoácidos, azúcares solubles, CHO estructurales, cenizas y minerales) que acentúan el valor del grano de soja para nutrición tanto humana como animal. Granos de sojas desarrolladas localmente y sembrados a lo largo de la región sojera argentina serán utilizados en el presente trabajo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los datos analizados provienen de muestras extraídas de un ensayo multiambiental conducido según un diseño de bloques completamente aleatorizados llevados a cabo en ocho Estaciones Experimentales Agropecuarias (EEA) pertenecientes al Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) que se encuentran distribuidas a lo largo de la región sojera argentina (PNCER 2345, 2006). Estas estaciones fueron: EEA INTA Barrow, EEA INTA Bordenave, EEA INTA Cerrillos, EEA INTA Cerro Azul, EEA INTA Famaillá, EEA INTA Manfredi, EEA INTA Paraná, EEA INTA Reconquista. En cada ensayo se recolectaron granos de dos cultivares de soja, uno especial (ALIM 3.14) proveniente del programa de mejoramiento de la soja de EEA INTA Marcos Juárez, no transgénico

caracterizado por su alta concentración de proteínas, y otro comercial de amplia difusión en la región sojera argentina (DM4600). Las muestras de grano fueron recolectadas durante dos años consecutivos. Cada parcela (unidad experimental) fue de 2 surcos distanciados a 0,52 m por 1 m de largo, con una densidad de 25 semillas por m². El ensayo también incluyó dos fechas de siembra clasificadas como tempranas y tardías que fueron elegidas a modo de representar las condiciones reales que enfrentan los productores en la producción en secano. El período medio de separación entre fechas de siembra fue de 33 días, con un mínimo de 27 días (Paraná y Reconquista) y un máximo de 63 días (Manfredi). Los distanciamientos entre fechas de siembra definieron condiciones ambientales diferentes aún dentro de cada localidad. Los ambientes productivos quedaron definidos por la combinación de localidad, año y fecha de siembra. Las prácticas culturales a campo se realizaron de manera homogénea en todas las estaciones experimentales siguiendo recomendaciones de la Red Nacional de Soja (RECSO) del INTA (Fuentes, com.pers.). El control de enfermedades, insectos y malezas se realizaron con productos específicos para el cultivo de soja no transgénica.

Variables ambientales

Para cada ensayo realizado en las EEA INTA se midieron las siguientes variables climáticas diariamente durante todo el período reproductivo de la soja desde inicio de floración R1 hasta madurez fisiológica R7 (Fehr y Caviness, 1977): temperatura máxima (Tmx), media (Tm) y mínima diaria (Tmn) (°C), radiación solar (RS) (MJ m⁻²), precipitación (PP) (mm), evapotranspiración potencial (pEVT) (mm) así como un indicador de balance hídrico (BH) (mm) obtenido a partir de la sustracción entre PP y pEVT para indicar la disponibilidad hídrica (Carrera *et al.*, 2011).

Análisis de suelos

En cada una de las localidades se tomaron muestras compuestas de suelo de 0 a 30 cm de profundidad. Las muestras fueron analizadas según parámetros de rutina siguiendo las especificaciones descritas en SAMLA (2004). Se determinaron: capacidad de intercambio catiónico, cationes intercambiables (Ca, K, Na, Mg), materia orgánica y pH.

De la fracción disponible de los suelos se midió la concentración de Zn, Fe, Mn, Cu, Co, Al, Mo, Pb, Cd y As utilizando EDTA disódico como agente extractante (Garrabants, 2000). A partir de 15 g de suelo molido y tamizado en malla de 2 mm se le agregaron 30 mL de EDTA disódico 0.2 M. La solución de suelo fue agitada a 100 rpm durante 30 minutos, filtrada y luego llevada a volumen en matraz de 50 mL. La concentración de metales fue medida mediante espectrometría de absorción atómica de llama (AAAnalyst 100 PerkinElmer, Waltham, MA), a excepción del Mo y el As que fueron analizados por espectrometría de absorción atómica con horno de grafito para Mo (HGA 900 AAAnalyst 100 PerkinElmer, Waltham, MA) y espectrometría de absorción atómica con generación de hidruro para el As (FIAS 400 AAAnalyst 100 PerkinElmer, Waltham, MA). La recuperación del método se evaluó realizando fortificaciones por duplicado con soluciones de concentración conocida. Las soluciones de suelo debieron ser diluidas para obtener concentraciones de los minerales dentro del rango de determinación del espectro. Las cantidades a agregar se definieron realizando el siguiente cálculo indicado como ejemplo para el caso de Arsénico y Plomo.

$$\text{Cantidad de solución a agregar (mL)} = \frac{0.01 \text{ mg.L}^{-1} \times 50 \text{ mL}}{1 \text{ mg.L}^{-1}} = 0.5 \text{ mL}$$

donde:

0.01 mg.L⁻¹: concentración de As y de Pb leído

50 mL: volumen final de muestra

1 mg.L⁻¹: concentración del patrón inicial

Análisis estadístico

Se usaron los datos obtenidos de los análisis de aminoácidos, azúcares solubles, fibra cruda, elementos minerales y relación de proteínas de reserva glicininas y β-conglicininas sobre soja especial y comercial detallados en el Capítulo II. Se ajustaron modelos lineales y mixtos (LMM) para estimar el componente de la varianza atribuido a

efectos del ambiente para cada componente en la semilla de soja: el efecto cultivar (especial versus comercial) fue considerado como fijo y el efecto ambiente (resultante de la combinación de localidad, año y fecha de siembra), así como la interacción entre cultivar y ambiente, fueron tomados como efectos aleatorios. Se analizaron los componentes de la varianza como evaluación del cociente de probabilidad (Molenberghs y Verbeke, 2007). Los valores P en cada test de hipótesis fueron corregidos siguiendo el criterio de Bonferroni para un nivel de probabilidad del 95%. La contribución del ambiente a la variabilidad total de cada compuesto considerada como la desviación estándar ambiental se expresó como porcentaje del valor promedio de cada compuesto.

Las asociaciones existentes entre las variaciones de los compuestos del grano de soja, su interacción con el ambiente y las co-variables ambientales fueron exploradas a través de regresiones de los cuadrados mínimos parciales (PLS) (Aasveit y Martens, 1986). El análisis de PLS se basa en la construcción de variables artificiales, que son los factores, para la predicción o explicación del comportamiento de otras variables, consideradas como respuesta. En nuestro estudio la variable respuesta fue creada a partir de los residuos de modelos aditivos contemplando los componentes del grano y el efecto ambiental (por ejemplo, un estimador de la interacción entre evento y ambiente), y los factores o predictores relacionados a la explicación de esa interacción fueron las variables del suelo y climáticas medidas durante el período de llenado de granos. El gráfico en coordenadas cartesianas ortogonales resultante de la regresión PLS permitió la identificación de aquellas co-variables climáticas asociadas a interacciones particulares entre eventos y ambiente. Vectores de las co-variables orientados en la misma dirección a vectores de eventos particulares, se consideran como positivamente correlacionados.

Luego de la identificación de las variables climáticas asociadas a cambios en los eventos (compuestos) del grano de soja, se realizaron análisis de árboles de regresión (Breiman *et al.*, 1984) para establecer umbrales definidos por las variables climáticas que maximizan o minimizan las concentraciones de compuestos en grano. En los árboles de regresión la variable respuesta (cada compuesto del grano de soja) fue trabajada como un modelo basado en umbrales de las distintas predictoras. El conjunto de valores originales para cada evento fue primero separado en dos sub categorías en base al valor umbral

estimado para la variable predictora que explicó el mayor incremento o reducción de la varianza explicada para cada variable respuesta. Cada sub categoría (o nodo) fue luego analizada de manera independiente usando el mismo sistema de partición binaria donde cada división subsecuente efectivamente superó el criterio de mejora predefinido. Las variables ambientales involucradas en la definición de umbrales para los primeros tres nodos fueron usadas para definir las condiciones ambientales óptimas para cada compuesto. Las regresiones fueron luego ajustadas resumiendo al uso sólo de la variable climática divisoria del primer nodo. Las condiciones ambientales óptimas fueron determinadas a partir de aquellas variables tendientes a maximizar o minimizar la concentración del compuesto en grano conforme a su importancia. La respuesta predicha para la concentración del compuesto bajo el umbral propuesto fue luego comparada con la media de dicho compuesto en el grano mediante una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis (Conover, 1999) y un nivel de significancia de 0.05.

Por último, se calcularon coeficientes de correlación múltiple de Pearson entre los valores promedios de los compuestos evaluados en grano con un nivel de significación del 5% corregido según el criterio de Bonferroni. Para atender la multiplicidad de pruebas que se realizaron, se utilizó el programa estadístico InfoStat (DiRienzo *et al.*, 2011) para la ejecución de los análisis descriptos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La Figura 3.1 muestra un mapa de Argentina con la distribución de suelos, clasificados a nivel de orden, sobre el cual se ubicaron las localidades de la región sojera donde se produjeron los granos analizados en este estudio. Los suelos que se utilizaron para los ensayos fueron molisoles en su mayoría a excepción de Cerrillos (Provincia de Salta) y Cerro Azul (Provincia de Misiones) que correspondieron al orden incesptisol y ultisol, respectivamente. Conforme a los análisis realizados, todos demostraron buena aptitud para el desarrollo de la actividad agrícola (Tabla 3.1). Las características climáticas reinantes durante el período reproductivo de la soja para cada ambiente definido como la combinación de localidad, año y fecha de siembra, se resumen en la Tabla 3.2. Los elementos minerales en las muestras de suelos presentaron un amplio rango de variación

entre localidades (Tabla 3.3). Se destaca que los valores de metales As, Cd, Pb y Zn se encontraron por debajo de los límites máximos admitidos para suelos de uso agrícola definidos según Ley Nacional N° 24051 (1992) (Tabla 3.4).

Tabla 3.1. Características de los suelos de las ocho localidades estudiadas en la región sojera argentina.

Loc.	Suelo†	Textura	pH	Salinidad	MO	CIC
				(dS m ⁻¹)	(%)	(Cmol kg ⁻¹)
BW	Argiudolpetrocálcico	franco	6.4	0.4	2.3	21.5
BO	Haplustol típico	arenoso franco	6.8	0.6	1.4	14.9
CE	Ustocreptes údico	franco	6.2	0.5	1.1	10.4
CA	Kandiudultes róxico	franco arcilloso	5.7	0.5	2.4	28.7
FA	Hapludol típico	franco arenoso	6.0	0.4	1.9	11.3
MA	Haplustol éxico	franco limoso	6.9	0.4	2.0	19.7
PA	Argiudol áxico	franco arcilloso	6.2	0.5	3.2	30.8
RQ	Argiudol típico	franco arcilloso	6.2	0.3	1.5	15.5

Abreviaturas: Loc., localidades; MO, material orgánica; CIC, capacidad de intercambio catiónico; BW, Barrow; BO, Bordenave; CA, Cerro Azul; CE, Cerrillos; FA, Famaillá; MA, Manfredi; PA, Paraná; RQ, Reconquista. †Clasificación realizada a nivel de gran grupo.

El análisis de regresiones mediante mínimos cuadrados parciales hizo posible el análisis simultáneo de la relación entre las variables ambientales durante el período de llenado de granos (regresoras o independientes) y las variables de componentes del grano de soja (predichas o dependientes). El gráfico resultante de la regresión PLS fue un triplot (Balzarini *et al.*, 2005) y en él se representan las proyecciones correspondientes a las variables regresoras (líneas continuas terminadas en puntos llenos) y a las variables predichas (líneas discontinuas terminadas en cruces) en un plano de coordenadas cartesianas ortogonales (Fig. 3.2, Fig. 3.3 y Fig. 3.4). Las líneas pertenecientes a las proyecciones de las variables predichas se representan con líneas discontinuas pues indican

proyecciones de regresiones graficadas a partir de los residuos resultantes del análisis de varianza realizado bajo el marco teórico de los modelos lineales y mixtos.

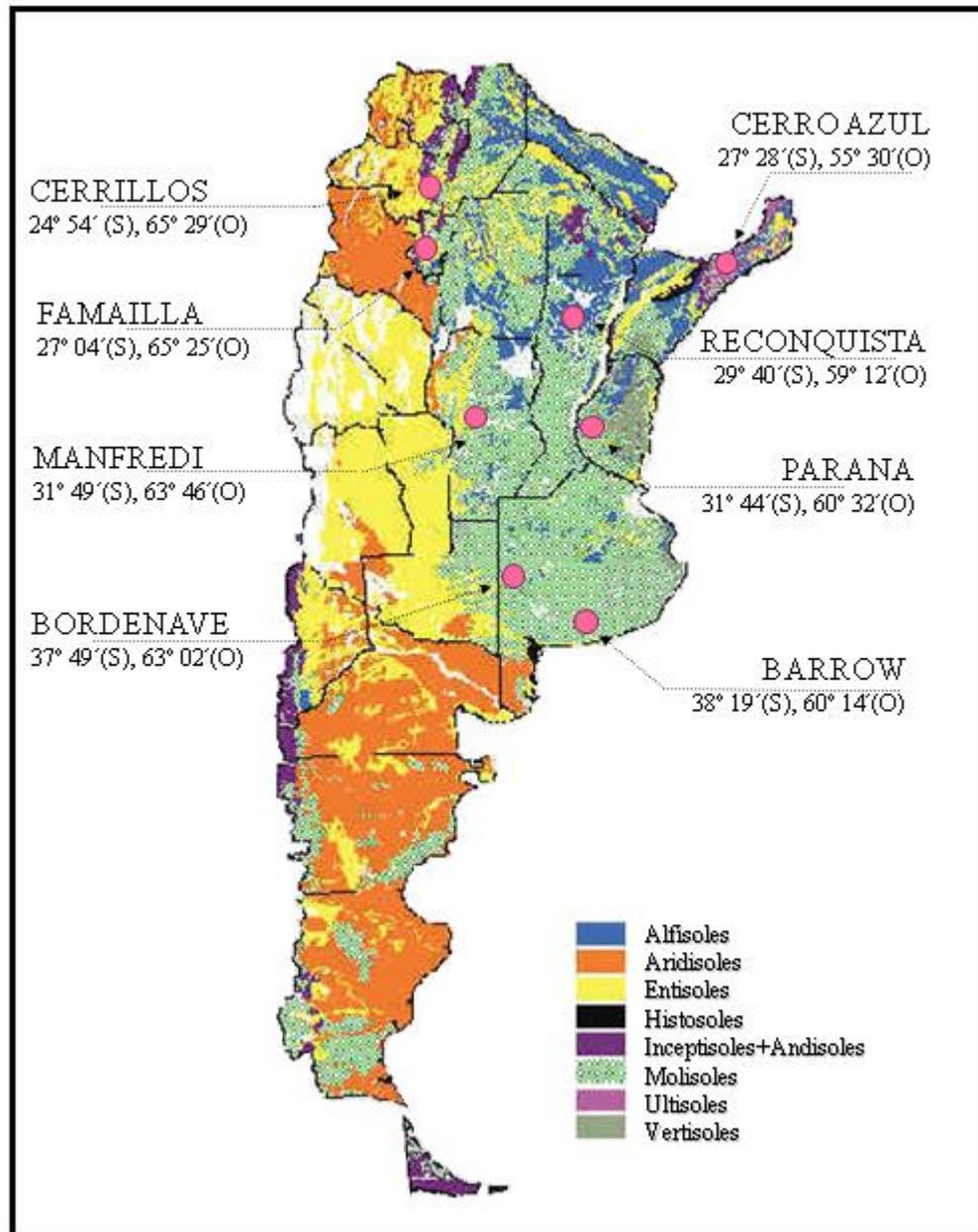


Fig. 3. 1 Mapa de suelos de Argentina indicando las 8 localidades involucradas en este estudio a lo largo del área sojera argentina.

http://geointa.inta.gov.ar/visor/?p=model_suelos

Tabla 3.2. Características climáticas de los ambientes definidos por la combinación de localidad, año y fecha de siembra. Medias de valores diarios tomados durante R5 y R7.

Localidad	Año	Fecha Siembra	Variables climáticas				
			Tmx	T	Tmn	RS	pp-EVTp
			(°C)			(MJ m ⁻²)	(mm)
BW		Temprana	25.0	18.4	11.9	19.69	60.3
		Tardía	23.6	17.6	11.5	17.27	-17.9
BO		Temprana	25.0	18.4	11.9	18.26	66.7
CE		Temprana	26.0	21.4	16.8	16.15	24.2
		Tardía	24.3	20.2	16.0	13.43	5.5
CA		Temprana	30.2	25.1	19.9	22.70	92.2
		Tardía	30.1	25.1	20.1	20.76	91.3
FA	2006	Tardía	26.8	22.0	17.2	11.53	6.4
MA		Temprana	27.0	22.0	16.8	20.98	-27.7
		Tardía	25.6	20.8	16.0	16.14	79.0
PA		Temprana	26.9	22.2	17.5	16.64	337.1
		Tardía	25.1	21.0	16.9	13.40	401.7
RQ		Temprana	30.1	25.0	19.9	20.39	201.3
		Tardía	28.6	23.9	19.2	17.35	-15.7
BO		Tardía	25.0	17.8	10.6	15.67	-28.6
CE		Temprana	24.7	19.5	16.0	13.28	199.7
		Tardía	24.5	19.4	16.2	14.50	47.6
CA		Tardía	29.7	24.6	19.5	20.13	47.5
FA	2007	Temprana	29.7	24.3	19.0	16.95	158.2
		Tardía	27.6	22.8	18.0	13.52	253.3
MA		Temprana	27.4	22.1	16.7	19.24	8.3
		Tardía	25.6	19.5	13.4	15.25	30.3
PA		Tardía	27.3	21.1	14.9	17.61	-63.0

Abreviaturas: BW, Barrow; BO, Bordenave; CA, Cerro Azul; CE, Cerrillos; FA, Famaillá; MA, Manfredi; PA, Paraná; RQ, Reconquista.

Tabla 3.3. Elementos minerales en muestras de suelos de ocho localidades.

ME	Udad.	Localidad							
		BA	BO	CE	CA	FA	MA	PA	RQ
P	Ppm	8.7	66.4	22.4	2.8	21.5	36.8	32.6	13.4
Na	Cmol kg ⁻¹	0.3	1.3	0.2	0.3	0.3	0.4	0.8	0.3
K	Cmol kg ⁻¹	1.9	1.6	0.3	0.2	0.7	2.3	1.7	0.5
Ca	Cmol kg ⁻¹	12.2	6.9	6.5	16.9	5.3	10.6	16.7	7.7
Mg	Cmol kg ⁻¹	3.6	3.2	2.2	6.4	2.5	2.9	3.6	2.4
Fe	mg kg ⁻¹	189.7	134.2	546.3	138.7	246.4	150.4	94.1	193.7
Cu	mg kg ⁻¹	1.8	1.5	10.4	1.4	3	1.9	2.1	1.3
Zn	mg kg ⁻¹	1.5	1.8	71.8	0.9	3.4	125.3	1.4	0.8
Co	mg kg ⁻¹	3.2	1.2	46.3	1.1	1.5	2.5	4.5	3.6
Mo	mg kg ⁻¹	0.06	0.07	0.09	0.09	0.15	0.48	0.32	0.29
Mn	mg kg ⁻¹	196.1	96.0	1773.6	158.6	214	284.1	511.6	408.6
As	mg kg ⁻¹	0.01	0.02	<LD*	0.17	0.15	0.09	0.15	0.05
Cd	mg kg ⁻¹	0.03	0.03	0.02	0.03	0.04	0.35	0.08	0.02
Pb	mg kg ⁻¹	1.00	0.40	1.92	1.17	6.25	2.29	3.36	3.57

Abreviaturas: Loc., localidades; BW, Barrow; BO, Bordenave; CA, Cerro Azul; CE, Cerrillos; FA, Famaillá; MA, Manfredi; PA, Paraná; RQ, Reconquista; <LD, valor por debajo del límite de detección.

Tabla 3.46. Concentración máxima admitida de metales en suelos para uso agrícola según Ley 24051 (1992).

	As	Cd	Pb	Zn
Conc. (mg kg ⁻¹)	20	3	375	600

Abreviatura: conc., concentración máxima.

Se observó una asociación positiva entre la mayoría de los aminoácidos determinados, incluyendo las variables AAT y AAE, a excepción de los aminoácidos glicina (Gly), cisteína (Cys), triptófano (Trp) y ácido cisteico (Ac Cys) y el cociente 11S/7S. Se ha propuesto previamente la existencia de un efecto compensatorio entre aminoácidos, los cuales estarían afectados por las variables ambientales de manera diferencial individualmente (Carrera *et al.*, 2011).

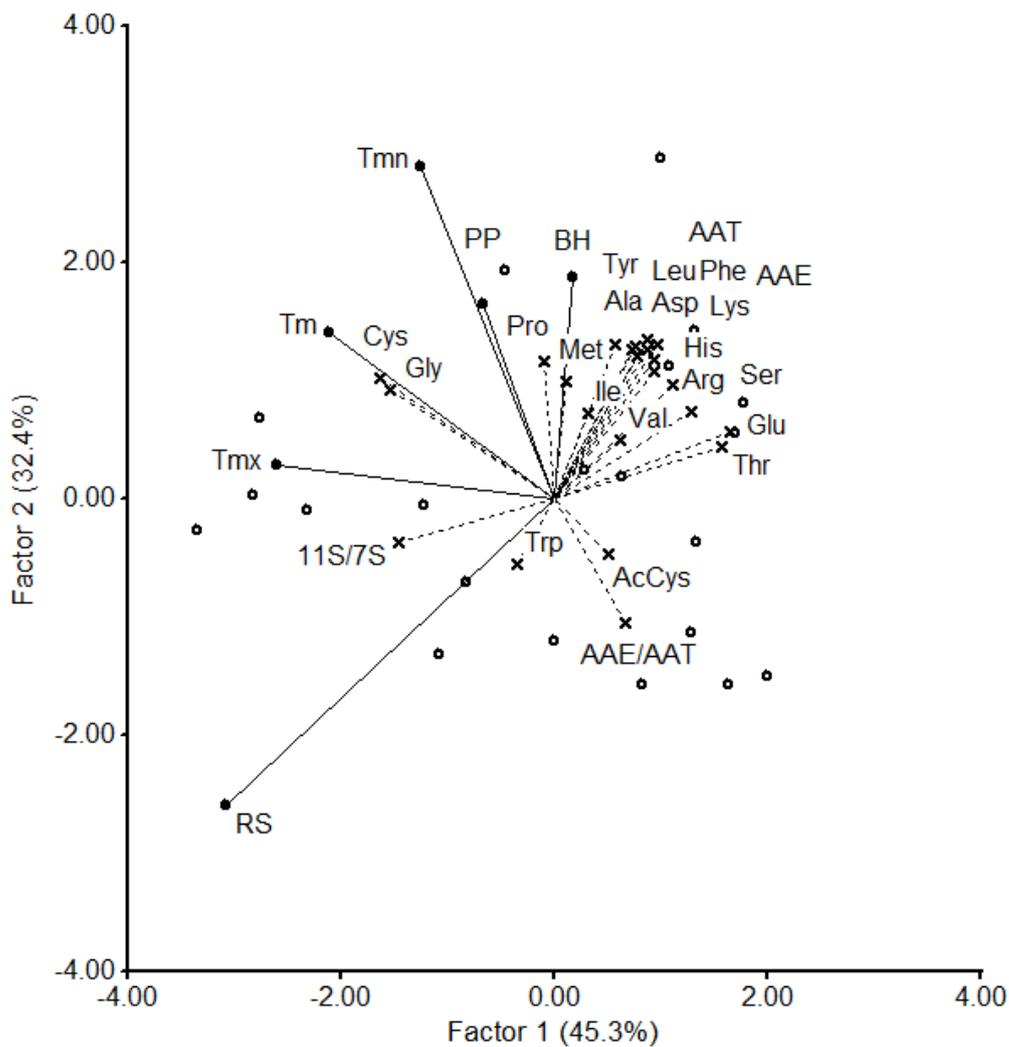


Fig. 3. 2 Representación gráfica del análisis de regresión PLS. Líneas continuas = proyecciones de las variables predictoras (variables climáticas) y líneas discontinuas = proyecciones de las variables predichas (concentración de aminoácidos en soja y relación proteica 11S/7S). Los puntos vacíos = distribución de los ambientes.

En las regresiones obtenidas se observó en general una fuerte asociación negativa entre la mayoría de los aminoácidos y la radiación solar, medida durante el período de llenado de granos, y una relación positiva con la variable balance hídrico (Fig. 3.2). De manera semejante Carrera *et al.* (2011) observaron que la radiación solar durante el período de llenado fue la variable elegida para predecir cambios en las concentraciones de histidina (His), treonina (Thr) y triptófano (Trp), también con relación negativa (Carrera *et al.*, 2011). En cambio, la predicción de cambios en las concentraciones de Ile, Phe y Lys fue mejor modelada por la temperatura media del aire ante la cual Ile y Phe mostraron

incrementos ante aumentos en temperatura hasta los umbrales de 21 °C y 16 °C, respectivamente, a partir de los cual sus concentraciones decrecieron, y una relación inversa negativa para la Lys con incrementos luego de los 22 °C (Carrera *et al.*, 2011). La radiación solar fue también la variable selecta para predecir cambios en la concentración del aminoácido Val, para el cual previamente no se encontraron variables climáticas regresoras que modelaran cambios en su concentración (Carrera *et al.*, 2011). El efecto de la radiación fue confirmado mediante árboles de regresión a partir de los cuales se establecieron condiciones ambientales óptimas (CAO) que maximizaron la concentración de las variables predichas (aminoácidos en soja y cociente 11S/7S). Incrementos significativos ($p \leq 0.001$) en las concentraciones de isoleucina (Ile), fenil alanina (Phe), valina (Val), lisina (Lys) y AAT se observaron a valores de radiación solar diaria inferiores a umbrales determinados (Tabla 3.5).

La temperatura media del aire tuvo una relación positiva con las concentraciones de los aminoácidos Gly y Cys. Según Carrera *et al.* (2011) la temperatura media del aire durante el período de llenado de granos fue la variable explicativa para la variación de la mayoría de los aminoácidos. En las regresiones obtenidas mediante árboles de regresión, la precipitación ocurrida entre R5 y R7 fue mejor predictor para la concentración de Met, con incrementos significativos ante PP superiores a 380.5 mm (Tabla 3.5). Cys y metionina (Met) son los aminoácidos azufrados en soja de los cuales la Met es considerada como esencial. Incrementos en la concentración de aminoácidos azufrados en soja fueron obtenidos en ambientes cálidos con temperaturas medias diurnas de 33 °C y nocturnas de 28 °C (Wolf *et al.*, 1982). Incrementos en la concentración de Cys también se observaron tras incrementos en la temperatura media del aire junto a un balance hídrico positivo durante el período de llenado de granos (Carrera *et al.*, 2011).

Tabla 3.5. Condiciones ambientales óptimas (CAO) definidas a partir de umbrales de variables climáticas que maximizan la concentración de aminoácidos en harina desgrasada de soja ($\text{g } 100\text{g}^{-1}$ MS) en comparación al valor promedio obtenido sobre dos cultivares de soja en 21 ambientes evaluados.

AA	CAO					Valores de AA	
	Tmax	Tm	Tmin	PP	RS	CAO	Promedio
His				>380.5		1.87	1.71
Ile			≤ 16.1		$\leq 20.2^*$	2.39	2.23
Leu					≤ 14.9	4.51	4.25
Met				>380.5*		0.74	0.66
Phe					$\leq 14.9^*$	3.02	2.83
Thr	$\leq 29.8^*$		≤ 11.3			1.79	1.56
Trp			≤ 11.3			0.06	0.02
Val			≤ 16.1		$\leq 20.2^*$	2.75	2.56
Lys					$\leq 14.9^*$	3.69	3.49
AAE	$\leq 29.8^*$		≤ 16.1			25.21	23.36
AAT					$\leq 14.9^*$	57.35	53.94
11S/7S				> 111.5*	>14.9*	3.94	3.41

*Significativo para un $\alpha = 0.05$.

A partir de la Figura 3.2 se podría estimar que hubo una mayor concentración de aminoácidos ante un balance hídrico positivo. Esta correlación positiva contradice resultados previos que afirman que la concentración de AAT es mayor ante la presencia de déficit hídrico (Dornbos y Mullen, 1992; Kumar *et al.*, 2006). Sin embargo, las variables hídricas PP y BH no fueron elegidas para la división de medias significativas por los árboles de regresión, a excepción de la Met y del cociente 11S/7S (Tabla 5).

El cociente 11S/7S es un indicador de la calidad de la proteína de soja para la elaboración de geles como el tofu. Las proteínas 11S poseen mayor concentración de aminoácidos azufrados (Met y Cys) deseados para la formación de geles más firmes y estables por su capacidad de establecer uniones tipo puentes disulfuro. Es decir que, a

mayor cociente 11S/7S, mayor concentración de aminoácidos azufrados (Utsumi y Kinsella, 1985). En la Tabla 3.5 se observa que PP superiores a 111.5 mm durante el

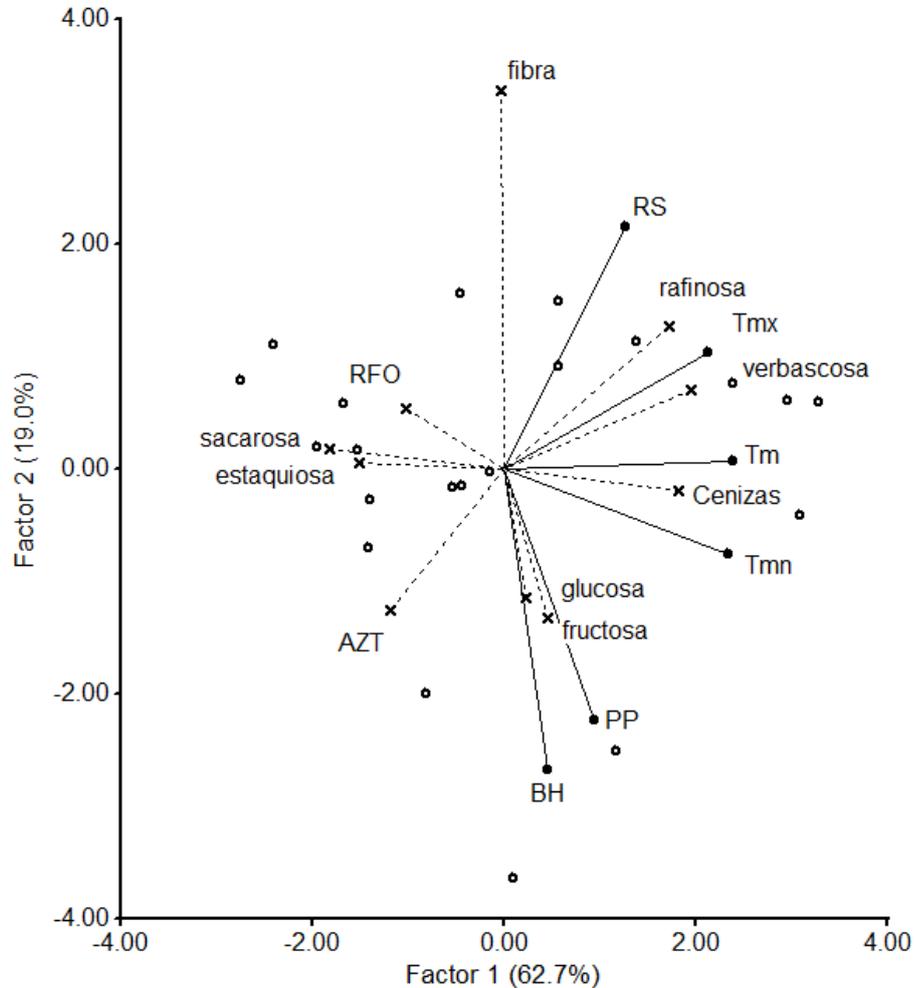


Fig. 3. 3 . Representación gráfica del análisis mediante regresión PLS. Las líneas continuas representan las proyecciones correspondientes a las variables predictoras (variables climáticas). Las líneas discontinuas representan las proyecciones de las variables predichas (concentración de azúcares, fibra cruda y cenizas en soja). Los puntos vacíos indican la distribución de los ambientes.

período de llenado de granos resultaron en proteínas con mayor cociente 11S/7S asociadas a mejor calidad para la elaboración de tofu y mayor concentración de aminoácidos azufrados como Met. Esta regresión obtenida de la PP sobre el cociente 11S/7S con efecto significativo sobre las medias estimadas, no se evidencia en el triplot del análisis mediante PLS. Este efecto puede ocurrir dado a las desviaciones de las proyecciones en su

representación en un plano de dos ejes (Arroyo *et al.*, 2005). La comparación de regresiones realizada y las diferencias encontradas permiten afirmar que la elección de variables regresoras en la modelación de aminoácidos individuales es dependiente del conjunto de factores que definen las condiciones climáticas reinantes más allá de sus relaciones individuales.

Las concentraciones de los azúcares presentaron un amplio rango de variación a lo largo de los ambientes evaluados, indicando un posible efecto del ambiente sobre la concentración de dichas azúcares. Mediante el análisis PLS se observó que las variables ambientales medidas durante el período crítico del cultivo explicaron más del 80% de la variación total de la concentración de las azúcares (Fig. 3.3). Las proyecciones de las variables de temperatura del aire sobre el triplot sugieren correlación positiva de éstas con la concentración de rafinosa y verbascosa, y negativa con las concentraciones de sacarosa y estaquiosa. Las concentraciones de glucosa y fructosa estuvieron menos relacionadas a cambios en la temperatura del aire, manifestando mejor asociación con las variables PP y BH. Sobre la componente Factor 3.2 se proyecta la concentración de fibra en sentido opuesto a la disponibilidad de agua indicando que se obtuvieron granos más fibrosos cuando la disponibilidad hídrica fue limitante. Conforme a las proyecciones sobre la componente Factor 1 podría estimarse que a temperaturas más frescas hubo mayor concentración de sacarosa y estaquiosa y a temperaturas más elevadas mayor concentración de rafinosa y verbascosa en los granos de soja. También, se observó una relación estrecha y positiva entre el contenido de rafinosa y la radiación solar. Los vectores representando la sacarosa y la estaquiosa indican que ambos azúcares se correlacionaron positivamente, en tanto la rafinosa no manifestó tener una relación estadísticamente significativa con la sacarosa, pero sí una pequeña relación positiva con la verbascosa. La variable azúcares totales se correlacionó positivamente con la sacarosa y la estaquiosa puesto que son los azúcares solubles mayoritarios de la soja.

Estudios previos han demostrado que los RFO en las semillas actúan no solo como osmoreguladores sino también como agentes de actividad antioxidante (Nishizawa *et al.*, 2008). Se ha observado que la actividad de la GS, enzima involucrada en la formación de RFO (Saravitz *et al.*, 1987), aumenta a bajas temperaturas y ante situaciones de estrés

hídrico (Liu *et al.*, 1998). Los resultados hallados en este estudio confirmaron los publicados previamente ya que la concentración total de RFO se correlacionó de manera negativa con la temperatura media (Fig. 3.3). La posición de la proyección de la variable RFO es más próxima a la de estaquiosa, puesto que es el RFO mayoritario. Pero si analizamos estaquiosa y rafinosa por separado ambos azúcares mostraron un comportamiento opuesto. La mayoría de los trabajos presentados sobre RFO en soja analizan estos azúcares, rafinosa y estaquiosa, como la sumatoria de ellos y no por separado. Posiblemente otras enzimas, más allá de la GS, involucradas en la formación de estaquiosa y rafinosa tengan una respuesta diferencial a cambios en las condiciones ambientales durante el período de llenado de granos.

Tabla 3.6. Condiciones ambientales óptimas (CAO) definidas a partir de umbrales de variables climáticas durante el período de llenado de granos de la soja (R5R7) que maximizan la concentración de azúcares, fibra y cenizas en soja ($\text{g } 100\text{g}^{-1}$ MS) en comparación a los valores promedios obtenidos sobre dos cultivares de soja en 21 ambientes.

Azúcar	CAO					Valores		
	Tmax	Tm	Tmin	PP	RS	BH	CAO	Promedio
Estaquiosa			≤ 15.4	$\leq 254.6^{*\dagger}$			3.76^{\ddagger}	3.18
Rafinosa	$> 30.1^*$						0.79	0.48
Sacarosa		$\leq 19.4^*$					6.19	4.82
Glucosa						> 74.6	0.53	0.36
Fructosa						$> 74.6^*$	0.44	0.24
AzTot.		≤ 19.4					10.58	9.11
Fibra					$> 16.9^*$	≤ 16.8	9.31	8.87
Cenizas	> 19.4				> 20.2		5.51	5.24

\dagger Precipitación ocurrida durante el período reproductivo completo (R1R7). \ddagger Valor estimado a partir de PP_{R1R7} . *Significativo para $\alpha = 0.05$.

Para definir las condiciones ambientales bajo las cuales se espera obtener un perfil favorable de azúcares solubles en el grano, se estimaron mediante árboles de regresión los umbrales para las variables climáticas medidas. Se definieron las condiciones ambientales óptimas (CAO) que maximizaron la concentración de azúcares (Tabla 3.6). Los tetra- y tri-sacáridos estaquiosa y rafinosa se comportaron de manera semejante. Ante baja disponibilidad hídrica durante el período reproductivo, con temperatura media máxima alta (> 24.6) durante el llenado de granos (R5-R7), el contenido de estaquiosa fue mayor al

promedio, mientras que bajo condiciones de disponibilidad hídrica suficiente desde floración, el contenido de estaquiosa fue menor a la de la media (Tabla 3.6). De manera similar, temperaturas máximas medias mayores a 30.1 °C entre R5 y R7 resultaron en cantidades mayores de rafinosa, condición que fue revertida ante menores temperaturas máximas medias y mejor disponibilidad hídrica durante el período de llenado. Cabe aclarar, que si bien se eligieron las variables medidas durante el período de llenado de granos R5-R7, en el caso de los RFO se observó que la incorporación del balance hídrico ocurrido a lo largo de todo el período reproductivo resultó en mejores predicciones. Por esta razón, sólo en este particular análisis se estuvo involucrada la variable PP y BH entre R1 y R7.

Considerando las variables de disponibilidad hídrica, si bien la asociación con los RFO es menor, se puede apreciar que la concentración de RFO tuvo una relación inversa a la disponibilidad hídrica, semejante a los resultados de Liu *et al.* (1998). Se observó una reducción en el nivel de RFO en granos de soja a favor del contenido de sacarosa a temperaturas medias templadas (≤ 19.4 °C) durante el período crítico del cultivo, con precipitaciones superiores a 254.6 mm.

La sacarosa es un azúcar deseado en el grano, pues se le atribuyen propiedades organolépticas positivas a la soja para su uso alimenticio (Taira, 1990). Temperaturas medias inferiores a 19.4 °C durante el período de llenado resultaron en mayor contenido de sacarosa en grano (Tabla 3.6) y de azúcares totales, siendo la sacarosa el azúcar soluble mayoritario en el grano de soja (Himowitz y Collins, 1974). Las CAO definidas para glucosa y fructosa tuvieron una tendencia semejante entre sí. Contenidos de glucosa y fructosa superiores a la media ocurrieron con un balance hídrico positivo superior a 75 mm durante el llenado de granos resultaron en contenidos inferiores de estos monosacáridos (Tabla 3.6).

En cuanto a la fibra, valores de radiación solar diaria superior a 16 MJ m⁻² resultaron en mayor concentración de esta fracción en el grano en condiciones de déficit hídrico ($P=0.0129$), aunque este umbral no resultó en diferencias significativas ($P=0.0570$) (Tabla 3.6). Si bien la fibra es necesaria en la dieta diaria, a mayor contenido de fibra en el

grano menor porcentaje de los compuestos nutritivos como proteínas, aceite y azúcares (Hymowitz *et al.*, 1972). Por esta razón se estimaron las CAO para menor concentración de fibra y se obtuvo que menor radiación solar ($\leq 16 \text{ MJ m}^{-2}$) junto a un aporte de precipitaciones superior a los 427 mm durante el llenado de granos contribuyeron a la obtención de granos menos fibrosos.

El valor para cenizas manifestó baja variabilidad entre el máximo y mínimo valor predicho. Sin embargo, la concentración de cenizas fue reducida ante temperaturas máximas medias inferiores a $19.4 \text{ }^\circ\text{C}$ durante el período R5-R7 (Tabla 3.6). De forma similar, Jaureguy *et al.*, (2013) observaron mayor concentración de cenizas totales en sojas expuestas a temperaturas más altas en siembras tempranas.

La Figura 3.4 muestra el gráfico de PLS para la concentración de minerales en el grano de soja (variables predichas) a partir de condiciones climáticas y de suelo (variables predictoras). Se observa una estrecha asociación positiva entre la variación de las concentraciones de Ca, Fe, Mg en el grano con las variables de temperaturas del aire, así como con su disponibilidad en el suelo. En general, la mayoría de los elementos analizados se asociaron positivamente a su presencia en la solución de suelo. Para algunos elementos la correlación de presencia en grano y en suelo fue alta, como en el molibdeno y el cadmio, en cambio para el fósforo y el potasio fue casi insignificante, donde las proyecciones representando concentración en grano y en suelo formaron un ángulo próximo a 90° . Se conoce que el tipo de reacción de la solución de suelo (pH) tiene un marcado efecto en la disponibilidad de los elementos minerales para las plantas (Jensen, 2010). Valores crecientes de pH en los suelos (entre 5.7 y 6.9) se relacionaron con una concentración mayor de molibdeno, cadmio y selenio en suelo y en grano, tal como ha sido previamente observado en granos de trigo (Zhao *et al.*, 2009).

El efecto de la temperatura sobre la concentración de minerales en el grano de soja ha sido evaluado anteriormente. Granos de soja con mayores concentraciones de calcio resultaron bajo períodos de cultivo a temperaturas elevadas (Bellaloui *et al.*, 2011; Gibson y Mullen, 2001). De manera semejante, Jaureguy *et al.* (2013) observaron mayor concentración de Ca, K, Mg, Mn y Fe en sojas provenientes de siembras tempranas,

asociadas a temperaturas más altas. El efecto observado en el análisis de PLS de la temperatura sobre la concentración de minerales en el grano fue estudiado en detalle a través de la construcción de árboles de regresión. Este análisis permitió obtener umbrales para las variables climáticas sobre los cuales resultaron concentraciones de minerales significativamente diferentes ($P \leq 0.05$) en comparación a la media total del elemento en grano (Tabla 3.7). Estos umbrales definieron CAO que maximizaron la concentración de elementos nutricionalmente deseados y minimizaron aquellos potencialmente tóxicos como plomo y cadmio (Lavado *et al.*, 2006) o de consumo restringido como el sodio. Se observaron diferencias significativas en las concentraciones de minerales en grano bajo el efecto de la mayoría de los umbrales establecidos por las CAO (Tabla 3.7). El fósforo fue el único elemento cuya concentración en grano se mantuvo sin cambios significativos ante diferentes condiciones ambientales durante el período de llenado de grano. Existieron algunas diferencias entre las regresiones establecidas mediante PLS y árboles de regresión atribuidas a las desviaciones propias de las proyecciones en las técnicas de reducción de dimensión (Arroyo *et al.*, 2005).

Temperaturas máximas del aire superiores a 30.1 °C durante el período de llenado de granos estimularon un incremento significativo en las concentraciones de calcio ($p < 0.0001$), magnesio ($p < 0.0001$), manganeso ($p = 0.0005$) y plomo ($p < 0.0001$). Temperaturas máximas superiores a 28 °C indicaron un incremento en la concentración de hierro ($p < 0.0001$) y cobalto ($p < 0.0001$). De acuerdo con Raper y Kramer (1987), temperaturas próximas a 30 °C promueven una acumulación óptima de materia seca en soja, que podría indicar mayor acumulación de nutrientes en general. Gibson y Mullen (2001) también observaron este efecto de la temperatura pero sobre la concentración de sodio; sin embargo, en nuestro análisis el sodio demostró estar negativamente correlacionado con la temperatura (Fig. 3.4), aunque el análisis por árboles de regresión no puntualizó umbrales con efecto significativo en el grano de soja.

La radiación solar fue la variable climática regresora de preferencia luego de la temperatura del aire para predecir cambios en las concentraciones de minerales (Tabla 3.7). Si observamos la Figura 3.4, las proyecciones correspondientes a las variables radiación

período reproductivo del cultivo no tuvieron un efecto significativo sobre la concentración de minerales en el mismo (Tabla 3.7).

Tabla 3.7. Condiciones ambientales óptimas definidas a partir de umbrales de variables climáticas durante el período de llenado de granos de la soja (R5R7) que maximizan la concentración de minerales en soja en comparación al valor promedio obtenido sobre dos cultivares de soja en 21 ambientes.

Min.	Tmx	CAO				Valores	
		T	Tmn	PP	SR	CAO	Promedio
						(g kg ⁻¹ MS)	
Ca	>30.1*		>17.1*			5.10	3.44
K		>20.5*			<=14.8	20.75	17.68
Mg	>30.1*		>17.1*			3.14	2.52
Na	<=26.3*					0.62	0.57
P	>27.1					8.60	8.11
						(mg kg ⁻¹ MS)	
Fe	>28.0*					122.98	102.73
Al	<=30.1		>16.7*			13.35	10.93
Zn					>18.1*	53.52	45.84
Cu		>22.1*				19.69	15.23
Mn	>30.1*		>17.1*			71.52	39.59
Mo				<=179.4		18.79	6.38
Co†	>28*					309.97	156.10
Se†				<=188.8	>18.4*	245.99	63.11
Pb	<=30.1*		<=16.4*		<=17.8*	0.20	0.31
Cd			>17.0*			0.03	0.04

Abreviaturas: CAO, condiciones ambientales óptimas; Min., minerales. †Co y Se expresado en ug kg⁻¹ MS. *Significativo para $\alpha = 0.05$.

CONCLUSIONES

Variaciones ocurridas en las concentraciones de compuestos nutricionales en granos de soja pueden ser explicadas como consecuencia de variaciones en variables ambientales medidas durante el período de llenado de granos.

A través de los análisis realizados es posible establecer condiciones ambientales óptimas maximizando las concentraciones de compuestos químicos deseados en el grano de soja.

Temperaturas medias máximas superiores a 30.1°C se asocian a incrementos significativos ($p \leq 0.05$) de rafinosa en grano (0.79 vs 0.48 g 100g⁻¹ MS), de Ca (5.10 vs 3.44 g kg⁻¹ MS), Mg (3.14 vs 2.52 g kg⁻¹ MS), Mn (71.52 vs 39.59 mg kg⁻¹ MS). Máximas mayores a 28 °C se relacionan con incrementos significativos en Fe (122.98 vs 102.73 mg kg⁻¹ MS) y Co (309.97 vs 156.10 ug kg⁻¹ MS). Temperaturas medias menores a 19.4 °C se relacionan con incrementos significativos ($p \leq 0.05$) en la concentración de sacarosa (6.19 vs 4.82 g 100g⁻¹ MS).

Variaciones en las concentraciones de aminoácidos son modeladas tras variaciones en la radiación solar recibida. Valores de radiación solar inferiores o iguales a 20.2 MJ m⁻² se relacionan con una mayor concentración de Ile (2.39 vs 2.23 g 100g⁻¹ harina desgrasada de soja en MS) y Val (2.75 vs 2.56 g 100g⁻¹ harina desgrasada de soja en MS), y menores a 14.9 MJ m⁻² a valores mayores de Phe (3.02 vs 2.83 g 100g⁻¹ harina desgrasada de soja en MS), Lys (3.69 vs 3.49 g 100g⁻¹ harina desgrasada de soja MS) y AAT (57.35 vs 53.94 g 100g⁻¹ harina desgrasada de soja en MS) de manera significativa ($p \leq 0.05$).

La relación proteica 11S/7S también está afectada por las condiciones climáticas durante llenado de granos. Precipitaciones superiores a 111.5 mm se relacionan con un mayor coeficiente proteico y mayores a 380.5 mm mayor concentración de Met, ambos parámetros relacionados y deseados para la elaboración de geles proteicos de soja, como el tofu. Precipitaciones superiores a 254.6 mm se asocian a una reducción en la concentración de estaquiosa como atributo positivo para la soja con destino alimenticio y productos en base a soja.

Las relaciones presentadas contribuyen a un mejor entendimiento de las variaciones ocurridas sobre componentes deseados en el grano de soja con destino alimenticio y para nutrición animal.

BIBLIOGRAFÍA

- Aastveit H., Martens H. 1986. ANOVA interactions interpreted by partial least squares regression. *Biometrics*, 42: 829-844.
- Arroyo A., Bruno C., Di Rienzo J., Balzarini M. 2005. Árboles de expansión mínimos: ayudas para una mejor interpretación de ordenaciones en bancos de germoplasma. *Interciencia*, 30 (9): 51-63.
- Balzarini M.G., Di Rienzo J.A. InfoGen versión 2012. FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. Available online at: <http://www.info-gen.com.ar/>
- Bellaloui N., Smith J.R., Gillen A.M., Ray J.D. 2011. Effect of maturity, genotypic background, and temperature on seed mineral composition in near-isogenic soybean lines in the early soybean production system. *Crop Sci.*, 51: 1161-1171.
- Breiman L., Friedman J., Olsen R., Stone C. 1984. Classification and regression trees, Wadsworth.
- Carrera C., Martínez M. J., Dardanelli J. and Balzarini M. 2009. Water deficit effect on the relationship between temperature during the seed filling period and soybean seed oil and protein concentrations. *Crop Sci.* 49: 990-998.
- Carrera C., Martínez M. J., Dardanelli J. and Balzarini M. 2011a. Environmental effect and correlation of seed components in nontransgenic soybeans: protein, oil, unsaturated fatty acids, tocopherols, and isoflavones. *Crop Sci.* 51:1-10.
- Carrera C.S., Reynoso C.M., Funes G.J., Martínez M.J., Dardanelli J., Resnik S.L. 2011b. Amino acid composition of soybean seeds as affected by climatic variables. *Pesq. Agrop. Bras.*, 46 (12): 1579-1587.
- Conover W.J. 1999. Practical nonparametric statistics. 3a Ed. Wiley. 584 pp.
- Dardanelli J. L., Balzarini M., Martínez M. J., Cuniberti M., Resnik S., Ramunda S. F., Herrero R. and Baigorri H. 2006. Soybean maturity groups, environments, and their interaction define mega-environments for seed composition in Argentina. *Crop Sci.* 46:1939-1947.
- Dornbos D.I., Mullen R.E. 1992. Soybean seed protein and oil contents and fatty acid composition adjustments by drought and temperature. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 69 : 228-231.
- Fehr W.R., Caviness C.E. 1977. Stages of soybean development. Ames, Iowa State University of Science and technology. Special report, 80, 11pp.
- Gibson L.R., Mullen R.E. 2001. Mineral concentrations in soybean seeds produced under high day and night temperature. *Can. J. Plant. Sci.*, 81: 595-600.
- Giorda L., Baigorri H.E.J. (Eds). 1997. El cultivo de soja en Argentina. Editar. Argentina. 425pp.
- Garrabrants A.C., Kosson D.S. 2000. Use of a chelating agent to determine the metal availability for leaching from soils and wastes. *Waste manage.*, 20: 155-165.
- Hymowitz T.F., Collins F.I., Panczner J., Walker W.M. 1972. Relationship between the content of oil, protein, and sugar in soybean seed. *Agron J* 64: 613-616.
- Hymowitz, T., Collins, F. I. 1974. Variability of sugar content in seed of *Glycine max* (L.) Merrill and G. soja Sieb. and Zucc. *Agronomy Journal*, 66:239–240.
- Jaureguy L.M., Ledesma Rodríguez F., Zhang L., Chen P., Brye K., Oosterhuis D., Mauromoustakos A., Clark J.R. 2013. Planting date and delayed harvest effects on soybean seed composition. *Crop Sci.*, 53: 1-14.

- Jensen T.L. 2010. Soil pH and the availability of plant nutrients. Plant nutrition TODAY (IPNI), Fall 2010, 2. Publicado en internet. Disponible en: www.ipni.net/pnt (01/06/15)
- Ley Nacional 24051. 1992. Régimen de desechos peligrosos. In Decreto Nacional reglamentario 831/93. Anexo II, Tabla 9. Secretaria de Ambiente y Desarrollo Sustentable, Poder Ejecutivo Nacional, Argentina. Publicado en internet. Disponible en: http://www2.medioambiente.gov.ar/mlegal/residuos/dec831/dec831_anxII_t9.htm
- Martinez M.J., Cuniberti M., Herrero R., Córdoba M., Balzarini M. 2015. Biochemical composition of soybean grains from Argentina. ICC/AISTEC Conference “Grains for Feeding the World”. 2015. 1 al 3 de Julio de 2015. Milán-Italia. Pg.156.
- Martínez M.J., Carrera C., Balzarini M., Dardanelli J.L. 2009a. Chemical evaluation of soybean grains from different environments of the argentinean crop region with focus on oil, protein, fatty acids and isoflavonoids. World Soybean Research Conference VIII. 10 al 16 de Agosto. Beijing, China.
- Martínez M.J., Carrera C., Balzarini M., Dardanelli J.L. 2009b. Relaciones entre el contenido de ácidos grasos omega 3,6 y 9 e isoflavonoides del grano de soja y variables climáticas en la Argentina. En: Pag 224. En: Volumen II Actas del III Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos. 15 al 17 de abril de 2009. Córdoba, Argentina.
- Martinez M.J., Carrera C., Manzur M., Dardanelli J., Balzarini M., Turco M., Ferrayoli. C. 2007. Modelos de regresión para isoflavonoides del grano de soja en argentina utilizando variables meteorológicas. En: Pág. 122-123. En: Workshop Internacional de Ecofisiología Vegetal Aplicada al Estudio de la determinación del rendimiento y la calidad de los cultivos de granos. 6 y 7 de Septiembre de 2007. Mar del Plata, Argentina.
- Martínez M.J., Cuniberti M., Balzarini M., Dardanelli J.L., Ramunda S.F., Resnik S., Herrero R., Baigorri H. 2005. Interacción grupo de madurez-ambiente para aceite y proteína en granos de soja de Argentina. En: Pág 100-102. En: Proceedings del XI Congreso Latinoamericano de Grasas y Aceites, ASAGA. 16 al 18 de Noviembre de 2005. Buenos Aires, Argentina.
- Molenberghs, G.; Verbeke, G. 2007. Likelihood ratio, score, and wald tests in a constrained parameter space. *Am. Stat.*, 61 (1): 22-27.
- Rotundo J.L., Westgate M.E. 2009. Meta-analysis of environmental effects on soybean seed composition. *Field Crop Res.*, 110 (2): 147-156.
- Taira H. 1990. Quality of soybeans for processed foods in Japan. *Jpn. Agric. Res. Q.* 24:224-230.
- Utsumi S., Kinsella J.E. 1985. Forces involves in soy protein gelation: effects of various reagents on the formation, hardness and solubility of heat induced gels made from 7S, 11S, y soy isolates. *J. Food Sci.*, 50(5): 1278-1282.
- Wolf R.B., Cavins J.F., Kleiman R., Black L.T. 1982. Effect of temperature on soybean seed constituents: oil, protein, moisture, fatty acids, amino acids and sugars. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 59:230-232.
- Yamagata M., Kouchi H., Yoneyama T. 1987. Partitioning and utilization of photosynthate produced at different growth-stages after anthesis in soybean (*Glycine max* L. Merr.) – Analysis by long –term C-13 labeling experiments. *J. Experimental Botany*, 28: 1247-1259.

CAPITULO IV

ELABORACION DE TOFU Y DETERMINACIÓN DE SU CALIDAD QUÍMICA Y SENSORIAL UTILIZANDO GRANOS DE SOJA NO-GMO

INTRODUCCIÓN

El tofu: origen y expansión en América

El tofu es un producto alimenticio originario de Asia, resultante de la coagulación de las proteínas presentes en el extracto de soja. Es muy valorado por su composición nutricional y tiene flexibilidad para ser incorporado en diversas dietas para los humanos. Si bien no es claro el lugar exacto de invención, se estima que su aparición surgió por accidente de forma análoga a nuestro pan leudado. Los escritos coinciden en que su invención ocurrió en China. Algunos le atribuyen el descubrimiento al Rey Liu An de Huai Nang (Dinastía de Han) 178-122 BC. Otra teoría, posiblemente más acertada, dicta que la coagulación ocurrió por accidente al intentar dar sabor al extracto acuoso de soja, más conocido como leche de soja, con agua salada de mar o *nigari* (AD 600) (Shurtleff y Aoyagi, 2004).

En América, el primer registro de tofu data del año 1770 en una carta enviada por Benjamin Franklin junto a semillas de soja con una receta relatando la manera en que los chinos consumían la soja en forma de queso “tau-fu”. La inmigración asiática en América del Norte trajo consigo sus usos y costumbres, y en 1905 cinco “tofu shops” ya eran atendidos en el estado California en manos de japoneses. Wang (1984) afirma que el tofu junto al tempeh son los productos de la soja mejor aceptados por los consumidores orientales. La producción de tofu se fue expandiendo hacia estados limítrofes hasta el día de hoy donde ya no es exclusivo de tiendas asiáticas y se puede conseguir tofu en los supermercados a lo largo de Estados Unidos (Shurtleff y Aoyagi, 2013). En cambio, para el resto de América, la historia fue diferente y la venta de tofu se encuentra en expansión.

En Brasil es posible conseguir tofu en supermercados y tiendas y en Argentina su venta aún se limita en casas de venta de productos nutracéuticos/nutricionales, mayormente en las grandes urbes, siendo desconocido en gran parte del interior del país.

Tipos de tofu. Composición química del tofu firme.

Los ingredientes del tofu son básicamente semillas de soja y agua, a partir de los cuales se obtiene el extracto acuoso de soja, y un coagulante. Se diferencian cuatro tipos de coagulantes (Shurtleff y Aoyagi, 2013):

- * tipo “*nigari*” o tipo cloruro, donde están incluidos el *nigari* natural (constituido principalmente por cloruro de magnesio), cloruro de magnesio (*nigari* refinado; $MgCl_2 \cdot 6H_2O$), cloruro de calcio ($CaCl_2$) y agua de mar;
- * tipo sulfato, se incluyen el sulfato de calcio ($CaSO_4 \cdot 2H_2O$; también llamado “*gypsum*”, del gr. *chalk*, tiza) y sulfato de magnesio ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$; también llamado sales de Epsom);
- * glucano delta lactona (GDL o lactona);
- * coagulantes ácidos como el jugo de limón, vinagre, ácido láctico agua fermentada de maíz.

En términos generales, como resultado de la coagulación de proteínas se obtiene un producto de consistencia de gel, como un flan y de sabor un tanto insípido, dependiendo estas condiciones del tipo de coagulante y de proceso que se use.

En el mercado, el tofu se clasifica en suave, firme y extra firme. Conforme al proceso usado se clasifica en regular (prensado, firme o extra firme), sedoso “*silken*”, suave y sedoso de relleno (Chang y Hou, 2004). El tofu firme o prensado es predominante en la cocina china y tofu blando, suave o “de relleno” es mayoritariamente elegido por la cocina japonesa (Shurtleff y Aoyagi, 2013). En la preparación del tofu firme el extracto de soja se coagula y el cuajo es cortado y prensado para eliminar el suero quedando una torta compacta. En cambio, los tipos de tofu suave o de relleno se obtiene al añadir el coagulante al extracto acuoso de soja sin prensado posterior resultando una consistencia semejante a un flan. En esta tesis se hará referencia al tofu prensado o firme.

La composición química del tofu prensado, su apariencia física y atributos sensoriales son variables afectadas de acuerdo al tipo de procesamiento, coagulante y calidad de granos de soja (Cai y Chang, 1998). En general el 70-80% del producto es agua, y la materia seca está compuesta por un 50-60% de proteínas, 20-30% de aceite, 10-18% carbohidratos (incluidos fibra y azúcares) y el resto cenizas (USDA, 2014). A mayor concentración de proteínas en la soja, mayor concentración de proteínas en el tofu y mejor firmeza y elasticidad (Kim y Wicker, 2005; Shurtleff y Aoyagi, 2013). El color de hilo de la semilla afecta la apariencia del tofu resultando en color poco atractivo al consumidor (Khatib *et al.*, 2001; Kim y Wicker, 2005; Wang *et al.*, 1983). Por lo tanto, el mejoramiento genético con destino a la producción de tofu se ha orientado en obtener sojas con hilo claro de alto contenido proteico (Wang *et al.*, 1982).

La composición relativa de las subunidades proteicas de reserva glicininas y β -conglucininas en la semilla de soja afecta las propiedades texturales de firmeza y elasticidad en geles de proteínas de soja aisladas (Kim y Wicker, 2005; Saio *et al.*, 1969). Las condiciones ambientales afectan la composición relativa de proteínas de reserva, tal como fue observado en el Capítulo 2 y 3, y entre materiales de soja (Tezuka *et al.*, 2000) afectando las propiedades finales de los geles proteicos. La concentración de ácido fítico en la semilla, también afecta el rendimiento en tofu (Shurtleff y Aoyagi, 2013). Además, se ha observado que las diferencias en textura entre piezas de tofu dependen del proceso de elaboración usado desde la obtención del extracto de soja hasta el tipo de prensado (Cai y Chang, 1999; Mujoo *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 1982).

El tiempo de almacenamiento y las condiciones de almacenamiento de las semillas también tienen efecto sobre la capacidad de las semillas para producir un tofu de calidad y buen rendimiento (Shurtleff y Aoyagi, 2013). Condiciones óptimas de almacenamiento de los granos deberían contemplar una temperatura media del aire de 15 °C y humedad relativa inferior al 50% para un período de hasta 18 meses (Kong *et al.*, 2008; Shurtleff y Aoyagi, 2013), aunque algunos autores sostienen que el almacenamiento óptimo sería a -20 °C (Kong y Chang, 2013). Las semillas almacenadas en condiciones adversas de humedad relativa superior a 60% y temperatura media de aire superior a 20 °C resultan en inferior recuperación proteica en el extracto acuoso de soja debido a procesos de

agregación de proteínas ocurridos en las semillas (Kong y Chang, 2013). Estos cambios en las proteínas de las semillas alteran las proporciones de coagulante usado y tiempo de mezclado en la elaboración de tofu (Kong *et al.*, 2008; Shurtleff y Aoyagi, 2013).

Percepción sensorial de productos de soja

La soja y sus productos derivados experimentan algunas limitantes en la aceptación por parte de los consumidores de países occidentales como Argentina. Además de falta de conocimiento en cómo preparar los alimentos y de su asociación a organismos genéticamente modificados, la falta de familiaridad con el consumo de soja y sus derivados genera muchas veces el rechazo de alimentos relacionados con la soja. La descripción más popular es la presencia de un sabor a frijol o poroto crudo (verde) o inmaduro. Este sabor no deseado disminuye con el tiempo de cocción en el extracto “leche de soja” (Yuan y Chang, 2007). En cuanto al tofu, la presencia de este sabor es casi imperceptible debido a procesos que ocurren durante la coagulación de las proteínas en donde los posibles compuestos responsables del sabor no deseado quedan retenidos en la matriz del cuajo resultando en un producto desabrido (Mahfuz *et al.*, 2004).

El análisis sensorial de un producto alimenticio constituye un paso importante para la definición de sus propiedades organolépticas y de su aceptación general por el público (Torres-Penaranda, 1998). Por lo tanto es muy importante evaluar la aptitud de muestras de soja desarrolladas localmente para la elaboración de un tofu. La composición química en antioxidantes también fue evaluada, ya que esto influye en la estabilidad del producto y es beneficiosa para los consumidores porque estos componentes de origen vegetal promueven un estado general sano en el cuerpo humano (Halliwell, 1996). En función de esto se planteó el objetivo de elaborar tofu con variedades no-GMO y de determinar contenido de proteínas totales y de reserva, antioxidantes, textura y aceptabilidad de tofu derivado.

En respuesta al cuarto objetivo de la presente tesis se desarrolla el siguiente capítulo donde se propone al tofu como producto alimenticio bajo costo y que sirve para dar valor agregado a la soja. Sobre las muestras de tofu resultante se evaluó la composición

química y aceptación sensorial entre muestras preparadas con granos de soja no-GMO en comparación con muestras elaborados con granos transgénicos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se usaron semillas de soja frescas de grado alimenticio cosechadas en el mismo año (2014). Ha sido comprobado que con el tiempo de almacenamiento o bajo condiciones adversas ocurren cambios graduales en las proteínas de las semillas afectando las características del tofu resultante (Kong *et al.*, 2008; Kong y Chang, 2008). Los materiales usados fueron: ALIM5.09, ALIM18.01 y FN3.85. Se usó también ALIM5.09 cosechada en 2010 a fin de observar el efecto almacenamiento (Tabla 4.1). Los materiales ALIM son sojas de grado alimenticio no transgénicas desarrolladas a partir de progenitores aptos para obtención de extracto de soja y tofu por el programa de mejoramiento de la EEA-INTA Marcos Juárez. Estos materiales se caracterizan principalmente por un mayor contenido proteico y por la presencia de hilo claro. Las muestras pertenecen al Grupo de Mejoramiento Genético de la Soja de INTA Marcos Juárez, Argentina, que desde hace unos años se ha orientado al desarrollo de genotipos de naturaleza no transgénica con características especiales (Soldini, 2011a). Este es un atributo importancia de apariencia para la elaboración de extracto de soja (y consiguiente tofu) pues evita se observen pequeñas partículas oscuras. El material FN corresponde a soja transgénica usada como control a campo y en esta parte del estudio constituyó una muestra control como referencia comparativa para los estudios sobre tofu. Las sojas fueron sembradas en la EEA-INTA Marcos Juárez, cosechadas, limpiadas y almacenadas a -20 °C hasta su procesamiento.

Tabla 4.7. Muestras de soja usadas para elaboración de tofu.

Línea	ALIM5.09	ALIM5.09	ALIM18.01	FN3.85
Genotipo	No-GMO	No-GMO	No-GMO	GMO-GR
Año de cosecha	2010	2014	2014	2014
Propósito	Alimento	Alimento	Alimento	Aceite/Proteína

Elaboración de tofu firme

Para la elaboración de tofu firme se siguió la metodología puesta a punto en el laboratorio del Dr. Sam K. C. Chang (Chang y Hou, 2004). Es una metodología sencilla y estandarizada, usada para evaluar la aptitud de cultivares de soja para la elaboración de tofu firme. El procedimiento se inicia con el remojo de 300 g de soja limpia y seleccionada durante 12 a 16 horas en agua potable en una relación 1:5 (m/m). Este volumen de soja permite la obtención de dos piezas de tofu (Fig. 4.1). Transcurrido el tiempo de remojo, las semillas fueron enjuagadas y pesadas para agregar agua nuevamente en una relación 1:9 (m/m). Las semillas remojadas junto al agua agregada fueron procesadas en licuadora a máxima velocidad durante 4 minutos. La mezcla obtenida se filtró a través de una muselina previamente humedecida hasta lograr separar el máximo volumen de extracto acuoso de soja por un lado y residuo sólido (*okara*) por el otro. El extracto resultante se pesó para calcular el rendimiento en extracto acuoso de soja y luego se tomó una cantidad proporcional a 130 g de soja seca que fue calentada inicialmente a baño María por 10 minutos y luego a fuego directo por 5 minutos a ebullición revolviendo constantemente. Una vez transcurrido el tiempo de cocción el extracto fue retirado del fuego y colocado bajo agitación hasta llegar a una temperatura de 85 °C. Entonces, se añadió el coagulante (2.5% del peso de las semillas secas), sulfato de calcio di-hidratado 99% (Sigma-Aldrich, St Louise, MO), previamente disuelto en agua, y se mezcló la suspensión por 15 segundos. La mezcla fue cubierta con tapa y se dejó en reposo bajo abrigo térmico (para evitar la pérdida excesiva de temperatura) por 12 minutos. Luego del reposo, tras observar la

formación de un coágulo o gel continuo (como un flan) como indicador de que el coagulante actuó de manera uniforme, se prosiguió con el prensado. El gel fue cortado en el mismo recipiente con una espátula en trozos bien pequeños y se dejó reposar un minuto hasta observar el desprendimiento del suero. Para el prensado se usó un molde de madera, previamente humedecido, cubierto por una muselina humedecida. Las dimensiones del molde de tofu usado fueron 10 x 10 x 7 cm. La muselina fue doblada sobre el cuajado y sobre esto se colocó la tapa del molde y una pesa de 5.5 kg por 15 minutos seguida de una de 11 kg por otros 15 minutos más. Los geles prensados o tofu prensados listos se colocaron en fuentes con agua y se conservaron heladera a 2 a 4 °C hasta su consumo o uso para análisis. Del procesamiento de una muestra de 300 g de soja se obtienen 2 piezas de tofu de 380 – 420 g aproximadamente cada uno.

El rendimiento en extracto de soja se obtuvo calculando la relación entre las semillas de soja usadas y el extracto acuoso resultante, expresando los valores en kg de extracto por kg de soja:

$$\text{Rendimiento en extracto de soja} = \frac{M1}{M2}$$

Donde:

M1= masa de extracto acuoso de soja

M2= masa de semillas de soja (secas, peso inicial)

El rendimiento en tofu fue calculado en relación a las semillas de soja usadas mediante, expresado en kg de tofu por kg de soja:

$$\text{Rendimiento en tofu} = \frac{M1 \cdot M3}{M2 \cdot M4}$$

Donde:

M1= masa de extracto acuoso de soja

M2= masa de semillas de soja (secas, peso inicial)

M3= masa de tofu

M4= masa de extracto acuoso de soja usado para la elaboración de tofu (equivalente a 130 g de soja)

Análisis de textura en tofu

Las muestras de tofu fueron analizadas según su textura usando un equipo Instron® (Norwood, MA, Estados Unidos). Se evaluaron parámetro de firmeza, expresada en unidad Newton (N), elasticidad y fragilidad. Con un cortador de forma circular de 2.5 cm de diámetro y 1.5 cm de alto se hicieron recortes en el centro de cada pieza de tofu descartando la piel del tofu (Yuan y Chang, 2010). Se denomina piel de tofu a una fina capa que recubre la pieza de tofu que se forma principalmente en las caras superior e inferior producto del prensado (Yuan y Chang, 2010).

Análisis químico de tofu y de soja

De cada pieza de tofu obtenida a partir de cada muestra de soja se tomaron porciones de tofu fresco que fueron colectadas en vasitos plásticos para ser liofilizadas proceso por el cual se determinó el porcentaje de humedad de las muestras de tofu. A las muestras de tofu y de semillas de soja se les determinó: (a) el contenido de proteínas a través del método de Kjeldahl usando 6.25 como factor de conversión de nitrógeno. En las semillas de soja, también se analizó mediante SDS-PAGE la relación entre las subunidades 11S y 7S siguiendo la metodología descrita en el Capítulo 2. La presencia de compuestos con actividad antioxidante fue determinada midiendo el contenido de fenoles totales (TPC), contenido de taninos condensados (CTC) y contenido de flavonoides totales (TFC), por métodos colorimétricos siguiendo la metodología descrita por Xu *et al.*, 2007. Se utilizó un espectrofotómetro robotizado FlexStation® 3 de detección múltiple con fluido de transferencia integrado (Molecular Devices Corporation, Estados Unidos). Los datos fueron procesados usando el software SoftMax® Pro 5 Microplate Data Acquisition and Analysis (Molecular Devices Corporation, Estados Unidos). Las muestras de soja fueron pulverizadas en molinillo Retsch® Ultra Centrifugal Mill ZM 200 (Haan, Alemania). La capacidad antioxidante de muestras de soja y tofu fue evaluada mediante el ensayo con

2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) y mediante la capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC).

Extracción de compuestos fenólicos a partir de semillas de soja molidas y tofu liofilizado:

Para la extracción de compuestos fenólicos se pesaron 0.5 g de muestra en tubo para centrifuga (15 mL) donde se agregaron 5 mL de acetona:agua destilada 50:50 (v/v) (Xu *et al.*, 2007). La suspensión fue agitada a temperatura ambiente durante 3 horas y luego centrifugada a 5000 rpm por 10 minutos. El sobrenadante fue colectado en un nuevo tubo. El pellet remanente fue re suspendido en 5 mL de solvente de extracción (acetona:agua destilada 50:50 v/v) y se dejó en agitación durante toda la noche. Luego fue centrifugada y el sobrenadante fue colectado junto al sobrenadante extraído previamente. Las extracciones se realizaron por triplicado. Los extractos fueron conservados al abrigo de la luz a 4 °C hasta ser usados.

Contenido de fenoles totales (TPC): Fue determinado por el método de Folin-Ciocalteu a partir de los extractos tomados usando Ácido Gálico como estándar. Se colocaron 60 µL de extracto en un tubo Eppendorf junto a 600 µL de agua destilada, 50 µL de reactivo de Folin-Ciocalteu y 150 µL de NaCO₃ 7%. La mezcla fue agitada y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 8 minutos. Seguidamente se agregaron 140 mL de agua destilada, se agitó nuevamente y dejó reposar durante 2 horas. Posteriormente, se tomaron 200 µL de la solución resultante que fueron colocados en cada pocillo de la placa multipocillo y se midió en espectrofotómetro su absorbancia a una longitud de onda de 765 nm usando agua destilada como blanco. La curva de patrones fue preparada con soluciones diluidas de de Ácido Gálico de 1000, 750, 500, 250, 175, 125 y 75 µg mL⁻¹. Los resultados se expresaron en miligramos de equivalentes de ácido gálico por gramo de MS de muestra (mg EAG g⁻¹).

Contenido de flavonoides totales (TFC): Se empleó el método colorimétrico de Heimler *et al.* (2005) usando catequina como estándar. Se colocaron 200 µL del extracto de fenoles en un tubo Eppendorf junto a 50 µL de agua destilada y 13 µL de NaNO₂ 5%. La solución fue agitada y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 6 minutos. Luego, 30 µL AlCl₃.6H₂O al 10% fueron agregados y se agitó nuevamente dejando reposar 5 minutos

más. A esta solución se le adicionaron 100 µL NaOH 1M y 500 µL de agua destilada y se midió la absorbancia de la mezcla resultante en espectrofotómetro a una longitud de onda de 500 nm usando agua destilada como blanco. Se prepararon soluciones de catequina para la obtención de la curva de estándares. Los resultados fueron expresados en miligramos de equivalentes de catequina por gramo de MS de muestra (mgECQ g⁻¹).

Contenido de taninos condensados (CTC): Se empleó el método colorimétrico de Broadhurst y Jones (1978) con modificaciones. Se tomó una alícuota de 10 µL de extracto que fue colocada junto a 600 µL de vainillina en metanol 4% y 300 µL HCl 37% en un tubo Eppendorf de 1.5 mL. La solución fue agitada y se dejó reposar a temperatura ambiente por 15 minutos. Se midió la absorbancia en espectrofotómetro a una longitud de onda de 500 nm usando metanol como blanco. Se preparó una curva de patrones usando distintas concentraciones de solución de catequina en metanol. Los valores fueron reportados como miligramos de equivalentes de catequina por gramo de MS de muestra (mg ECQ g⁻¹).

Evaluación de la capacidad secuestrante de radicales libres (DPPH) en soja y tofu: 20 mL de extracto se mezclaron junto a 380 µL de solución de DPPH en etanol y la solución resultante se dejó reposar al abrigo de la luz durante 30 minutos. Se tomaron 200 µL de la solución que fueron colocados en un plato para lectura por espectrofotometría donde se midió la absorción a 517 nm usando etanol como blanco. Se realizó una curva de calibración midiendo la capacidad antioxidante de Trolox (Hoffman-LaRoche,®Inc.) como estándar. La actividad antioxidante del extracto de soja fue calculada a partir de la medición del secuestro de radicales libres según la siguiente ecuación cuyos resultados se expresaron en µM de equivalente de Trolox (Hoffman-LaRoche, ®Inc.) por g de MS de muestra (µM ETrolox g⁻¹).

$$\text{Actividad secuestrante de DPPH} = \frac{(\text{Absorbancia del blanco} - \text{Absorbancia de la muestra})}{\text{Absorbancia del blanco}}$$

Capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC) en soja y tofu: En este análisis se utilizó 2,2'-azo-bis (2-amidino-propano) dihidrocloruro (AAPH) como generador de radicales libres. Los extractos de las muestras fueron diluidos 50 veces en solución buffer

fosfato (PBS) previo a su análisis. Se tomaron 20 μL de muestra, Trolox (Hoffman-LaRoche,®Inc.) o buffer PBS (blanco) y se colocaron en cada pocillo de la placa multipocillo para análisis colorimétrico junto a 200 μL de solución de fluoresceína y 20 μL de solución de AAPH. Se corrió un programa en el espectrofotómetro iniciando con 30 segundos de agitación e incubación por 30 minutos a 37 °C. Se tomaron datos durante 60 ciclos de 40 segundos cada uno a una longitud de excitación de 485 nm y 520 nm de emisión. La solución buffer fosfato fue preparada en una relación 61.6:38.9 (v/v) de K_2HPO_4 0.75 M y NaH_2PO_4 . Una vez mezcladas las preparaciones se agregó agua destilada 1:9 (v/v) logrando a una concentración de 75 nM a pH 7.0. Esta solución de fosfato fue conservada a 4 °C hasta su uso. La solución Trolox (Hoffman-LaRoche,®Inc.) estándar se preparó disolviendo 25 mg de Trolox (Hoffman-LaRoche,®Inc.) en 100 mL de PBS para lograr una concentración inicial de 1 mM que luego se diluyó para la elaboración de la curva patrón a 50 μM , 37.5 μM , 25 μM y 12.5 μM . La solución de fluoresceína fue preparada a partir de la combinación de dos soluciones en el momento del análisis. La solución 1 se preparó disolviendo 22.5 mg en 50 mL de PBS. La solución 2 se realizó tomando 50 mL de solución 1 en 10 mL de PBS. La solución de trabajo de fluoresceína se obtuvo a partir de 1.6 mL de solución 2 en 100 mL de PBS. Para la solución de AAPH se pesaron 0.216 g de AAPH que fueron diluidos en 5 mL de PBS previamente incubados a 37 °C. Los resultados se expresaron en μM de equivalentes Trolox (Hoffman-LaRoche,®Inc.) por g de MS de muestra ($\mu\text{M ET g}^{-1}$).

Análisis sensorial de tofu

Se empleó el método de análisis sensorial descriptivo Spectrum™ (Meilgaard *et al.*, 2006; Rutledge y Hudson, 1990). El diseño, análisis y recolección de resultados del método fueron semejantes a los descriptos para análisis descriptivos-cuantitativos originalmente desarrollados para la evaluación de perfiles de sabor y textura en alimentos (Stone y Joel, 2004). El panel estuvo constituido por 16 jueces (8 hombres y 8 mujeres) familiarizados con el consumo diario de tofu de nacionalidades china, taiwanesa e india. La elección de los jueces se realizó en función de su disponibilidad para la participación constante a lo largo del entrenamiento y evaluación, capacidad para diferenciar atributos en tofu y capacidad para expresar las diferencias de manera activa (Grosso y Resurrección,

2002). Para la participación en el panel cada miembro debió exponer su consenso declarando no padecer alergias a la soja o sus productos derivados, ni a ninguno de los ingredientes usados. Se presentó además una nota en la cual se declaraba un consenso particular de cada panelista para la evaluación de productos transgénicos. Solo uno de los panelistas no participó en la evaluación de muestras procedentes de materiales transgénicos.

Los materiales de soja a evaluar se presentan en la Tabla 4.1. Como estándares se usaron tofu de venta comercial disponibles en el mercado en Starkville, Mississippi, Estados Unidos. Se usaron dos tipos de tofu para comparar los parámetros establecidos. Tofu tipo blando marca NaSoya® (Ingredientes: agua, semillas enteras de soja orgánica, sulfato de calcio y nigari); tofu tipo extra firme marca NaSoya® (Ingredientes: agua, semillas enteras de soja orgánica, nigari y sulfato de calcio). Como estándar de astringencia se usó jugo de cranberry presentado en tres diluciones 1/10x, 1/20x y 1/50x (Mahfuz *et al.*, 2004). Para evaluar el grado de dulzor se usó solución de sacarosa al 2 y 5% (v/v en agua potable). La intensidad de los atributos se midió en una escala lineal no estructurada de 150 mm. Los atributos evaluados fueron los siguientes:

- Apariencia:
 - ⌘ Color (escala de color desde blanco papel hasta amarillo pálido)
 - ⌘ Homogeneidad: distribución uniforme de partículas pequeñas en ausencia de espacios vacíos o agregados mayores.
 - ⌘ Sinéresis: extracción o expulsión de un líquido de un gel, fenómeno por el cual el gel pasa de ser una sustancia homogénea a una segregación de componentes sólidos y de componentes líquidos, a mayor sinéresis mayor expulsión de líquido.
- Textura:
 - ⌘ Firmeza: fuerza requerida para comprimir el alimento completamente entre la lengua y el paladar.
 - ⌘ Elasticidad: propiedad del material de volver a su forma original luego de la aplicación de una fuerza externa (presionar con la cuchara acostada).
- Sensación en la boca:
 - ⌘ Suavidad: grado de escurrimiento del producto entre la lengua y el techo del paladar justo antes de deglutir.

- ⌘ Astringencia: sensación de aspereza y de boca seca luego de haber estado el producto en boca al menos quince segundos en contacto con la lengua y las paredes de la boca.
- Sabor:
 - ⌘ Cocido: sabor a nuez tostada.
 - ⌘ Sabores no deseados (“*off-flavors*”): presencia de sabor desagradable o no deseado, como “afrijolado” (poroto crudo o inmaduro), rancio o a moho.
 - ⌘ Dulce
- Aceptación general: para evaluar este atributo se definió la calidad de tofu firme prensado. Un tofu de alta calidad debería combinar un grado de homogeneidad alto (sin espacios vacíos o agregados grandes), baja sinéresis, de textura caracterizada por media a alta firmeza y elasticidad, y de sabor balanceado combinando dulce, astringencia, sabor a cocido y ausencia de sabores no deseados.

El entrenamiento de los atributos descriptos se realizó usando las muestras comerciales de tofu blando y extra firme. Para evitar variaciones en los productos por número de lote o fecha de elaboración de los productos comerciales, se realizó una compra única adquiriendo la cantidad necesaria de productos para el tiempo de entrenamiento y evaluación y se los conservó en heladera a 4 °C. A lo largo del entrenamiento se llegó a un consenso sobre las posiciones de los estándares de tofu usados en las escalas hedónicas presentadas para facilitar el análisis y evaluación de los jueces (ANEXO 1). El entrenamiento de los panelistas se llevó a cabo durante los meses de diciembre de 2014 y enero de 2015 en una sala de entrenamiento para análisis descriptivo localizada en el departamento de *Food Science Nutrition and Health Promotion* (FSNHP), de la Universidad del Estado de Misisipi, Misisipi, Estados Unidos liderado por Dr. Sam Chang como experto en análisis sensorial de tofu.

La evaluación de los atributos sobre las muestras de tofu elaboradas a partir de las líneas de soja descriptas (Tabla 4.1) se realizó comparando los valores consensuados para los estándares. En cada sesión de evaluación se presentó a los jueces una bandeja conteniendo 5 muestras totales de tofu: dos pertenecientes a los estándares comerciales de tofu blanco y tofu extra firme, una muestra de tofu elaborado a partir de una línea

americana específica para la elaboración de tofu (SB270) y tres muestras de tofu elaboradas con soja no transgénica ALIM5.09 (cosecha 2010 y 2014) y ALIM18.01. Para aquellos panelistas que presentaron conformidad para la evaluación de organismos transgénicos se presentó una sexta muestra elaborada con soja transgénica del tipo GR. Los estándares grado de dulzor y astringencia también fueron ofrecidos en cada sesión como se muestra en la Figura 4.1. La evaluación individual por parte de los jueces fue desarrollada en cabinas independientes del laboratorio de análisis sensorial del departamento de *Food Science Nutrition and Health Promotion* (FSNHP), Mississippi State University, Misisipi, Estados Unidos.

Las muestras de tofu se presentaron en porciones de 45 g en recipientes de plástico transparente con tapa para evitar la posible contaminación y pérdida de compuestos volátiles (Fig. 4.1) (Torres-Penaranda *et al.*, 1998). Se usaron números de tres cifras asignados al azar para nombrar las muestras. El atributo sinéresis se evaluó considerando que el tiempo entre la preparación de las muestras y la evaluación sean lo más homogéneos y acotados posibles. Por lo tanto, este trabajo se realizó en un período de tiempo inferior a una hora.



Fig. 4. 1 Bandeja presentada a los panelistas para evaluación sensorial de muestras de tofu.

Análisis estadístico

Se realizaron análisis de varianza (ANOVA) a partir de los cuales se compararon las medias obtenidas mediante análisis de Fisher para un nivel de significancia del 0.5%. Se estimaron coeficientes de correlación de Pearson entre variables analizadas y se establecieron correlaciones significativas a un 95% nivel de confianza. Se utilizó el software estadístico Infostat (Di Rienzo *et al.*, 2014).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis químicos en soja y tofu

El contenido de humedad de las muestras de tofu varió entre 81.88 – 83.22 % (Tabla 4.2), semejante a valores publicados para tofu firme (Wang *et al.*, 1983). La concentración de proteínas de las muestras de soja tomó valores entre 36.00 y 41.31 g 100g⁻¹ MS, siendo la muestra FN3.85 la de menor concentración proteica sin observarse diferencias significativas entre las muestras ALIM usadas ($p=0.001$) (Tabla 4.2). Cabe aclarar que FN3.85 es un cultivar comercial aceitero, en cambio ALIM son sojas para uso alimenticio de alta proteína. Los valores en proteína de ALIM fueron semejantes a los reportados para cultivares específicos de tofu como Proto o Vinton (Ji *et al.*, 1999). La relación proteica 11S/7S resultó en valores próximos a los obtenidos para semillas de soja (Cai y Chang, 1999; Mujoo *et al.*, 2003). ALIM5.09-14 fue la de mayor coeficiente con un valor de 2.61 ($p\leq 0.05$).

El tofu elaborado a partir de FN3.85 resultó en un contenido proteico significativamente inferior al resto de las piezas de tofu. No se observaron diferencias significativas para rendimiento en tofu medido como kg de tofu por kg de semillas de soja, en cambio sí hubo diferencias para el rendimiento en extracto de soja siendo la soja FN3.85 la de menor rendimiento con 8.47 kg de extracto de soja por kg de semilla de soja. Las muestras de soja ALIM dieron tofu con mayor concentración proteica que la muestra FN3.85. Los parámetros evaluados de firmeza, fragilidad y elasticidad fueron muy

variables dentro de cada pieza de tofu, por lo tanto si bien se observaron diferencias, las mismas no fueron significativas (Tabla 4.2).

Tabla 4.2. Contenido de proteína en muestras de soja y tofu, rendimiento en extracto de soja y tofu en kg de semillas de soja. Parámetros de textura medidos en tofu mediante INSTRON.

Muestra	Soja				Tofu				
	Proteína	11S/7S	RE	RT	Proteína	Hum.	Firm.	Frag.	Elast.
Unidad	g 100g ⁻¹	-	kg kg ⁻¹	kg kg ⁻¹	g 100g ⁻¹	g 100g ⁻¹	N	G	-
ALIM18.01	41.31	2.34	8.76	2.48	59.78**	82.90	59.09	1550	0.87
ALIM 5.09-09	40.88	2.00	8.72	2.80	58.84	81.88	88.90	2950	0.87
ALIM 5.09-14	40.20	2.61*	8.74	2.61	57.62**	83.03	40.99	875	0.60
FN3.85	36.00**	2.05	8.47*	2.31	53.05**	83.22	67.47	2216.67	0.82

Abreviaturas: RE, rendimiento en extracto de soja; RT, rendimiento en tofu; Hum., humedad; Firm., firmeza; Frag., fragilidad; Elast., elasticidad. *Significativo para $p \leq 0.05$. **Significativo para $p \leq 0.001$.

Los parámetros químicos y físicos medidos fueron correlacionados mediante coeficientes de correlación de Pearson y se observaron correlaciones significativas entre algunos de ellos (Tabla 4.3). La concentración proteica de la semilla de soja se correlacionó positivamente con la concentración proteica del tofu conforme a observaciones previas donde a mayor concentración proteica en semilla, mayor proteína en tofu (Wang *et al.*, 1982). La proteína en soja se correlacionó también positivamente con el rendimiento en extracto de soja y este último con el rendimiento en tofu, pero no hubo correlación directa entre rendimiento en tofu y proteínas en soja. Wang *et al.* (1982) tampoco encontraron correlación entre proteína y rendimiento en tofu, aunque ellos no publicaron sus valores en rendimiento en extracto de soja. El rendimiento en kg de tofu por kg de semilla de soja parece ser más dependiente del tipo de tofu elaborado y del procesamiento usado (Cai y Chang, 1999). Es probable que la correlación observada entre la proteína y el rendimiento en extracto de soja sea dependiente del procesamiento aplicado en este estudio, siendo que el grado de recuperación de proteínas es también dependiente de la metodología usada (Cai y Chang, 1999). El cociente 11S/7S se correlacionó

negativamente con el parámetro fragilidad. Fragilidad y firmeza estuvieron positivamente correlacionadas. No se observó correlación entre firmeza y el cociente 11S/7S. Estudios sobre geles elaborados a partir de proteínas 11S y 7S mostraron que las proteínas 11S producen geles más firmes y que las 7S geles más elásticos (Saio *et al.*, 1969). Sin embargo, los resultados en tofu son inconsistentes en cuanto a la correlación entre proteínas de reserva y firmeza dando a entender que otras sustancias además de las proteínas, presentes en la suspensión compleja del extracto acuoso de soja, estarían participando en la firmeza del gel (Ji *et al.*, 1999; Mujoo *et al.*, 2003), que también es dependiente del procesamiento usado (Cai y Chang, 1999).

Los distintos materiales evaluados no mostraron diferencias significativas en rendimiento obtenido en tofu (Tabla 4.2). La muestra ALIM5.09-09, almacenada durante tres años a temperatura ambiente, dio resultados de rendimiento en tofu comparables a las otras muestras evaluadas. Investigaciones previas demostraron pérdidas en rendimiento en tofu a medida que el tiempo de almacenamiento fue mayor (Kamizake, 2012; Kong *et al.*, 2008). En esos estudios de almacenamiento, las semillas fueron expuestas a condiciones desfavorables combinando temperaturas superiores a 20 °C y humedad relativa ambiente mayor a 50%. En este estudio, en cambio, la muestra no fue expuesta a condiciones prolongadas desfavorables tal como evaluaron esos autores, razón por la cual posiblemente no hayan ocurrido cambios en la calidad química de la semilla que afecten la elaboración de tofu.

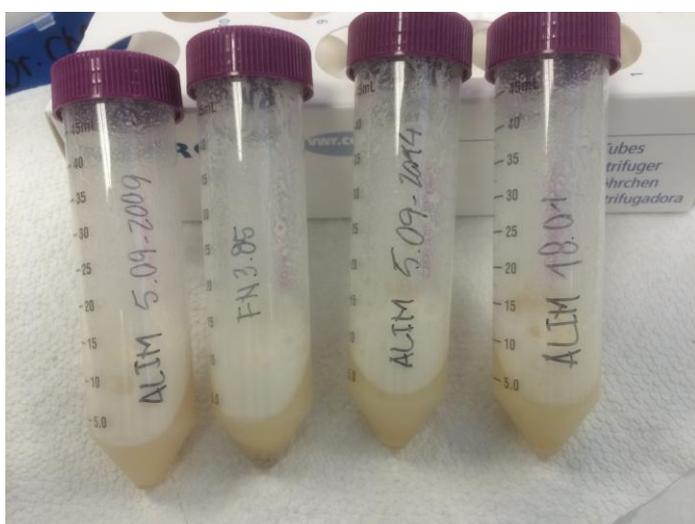


Fig. 4.2. Extracción compuestos fenólicos para análisis de contenido de fenoles totales (TPC), flavonoides totales (TFC), taninos condensados (CTC) y actividad antioxidante por DPPH. Se observa en el tubo rotulado FN3.85 partículas oscuras al fondo del tubo correspondiente a semillas de soja con hilo oscuro. El resto de los materiales son grado alimenticio con hilo claro.

Tabla 4.3. Coeficientes de correlación de Pearson entre componentes químicos del grano y tofu, y los parámetros de textura.

	Prot. Soja	Prot. Tofu	Hum. Tofu	11S/7S	RE	RT	Firm.	Frag.
Prot. Tofu	0.9936**							
Hum. Tofu	-0.5432	-0.5358						
11S/7S	0.3668	0.3134	0.4665					
RE	0.9796*	0.9581*	-0.4127	0.5411				
RT	0.7262	0.6746	-0.8668	0.0126	0.6874			
Firmeza	-0.0187	0.0222	-0.7592	-0.9280	-0.2053	0.3438		
Fragilidad	-0.1541	-0.1166	-0.6879	-0.9618*	-0.3331	0.2617	0.9901*	
Elasticidad	0.0002	0.0967	-0.4024	-0.8070	-0.1924	-0.0771	0.7902*	0.7588*

Abreviaturas: Prot. tofu, concentración proteica en tofu; Hum. tofu, contenido de humedad en tofu; RE, rendimiento en extracto de soja; RT, rendimiento en tofu; Firm., firmeza; Frag., fragilidad. *Significativo para $p \leq 0.05$. Significativo para $**p \leq 0.01$.

Tras el procesamiento de las muestras para la extracción de compuestos fenólicos se observaron pequeñas partículas oscuras al fondo del tubo de extracción correspondiente a la muestra FN3.85 (Fig. 4.4), que corresponde a un cultivar transgénico de hilo negro que se utiliza con fines productivo para obtener aceite y proteína. La presencia de partículas oscuras es una cualidad no deseada en genotipos destinados para elaboración de leche de soja y tofu, pues afecta las propiedades de apariencia del producto final. En cambio, son preferidos para este propósito los genotipos de hilo y tegumento claro (Chen, 2004).

En la Tabla 4.4 se resumen los resultados obtenidos de los análisis de compuestos con actividad antioxidante y de la capacidad antioxidante medida mediante DPPH que implica la capacidad secuestrante de radicales libre que tiene una sustancia. La soja FN3.85 fue la que presentó mayor concentración total de compuestos fenólicos, flavonoides, taninos condensados y mejor actividad antioxidante de manera significativa ($p < 0.05$). Dentro de las sojas ALIM, la 5.09 cosecha 2014 demostró menor capacidad antioxidante y contenido de compuestos antioxidantes, en general. Las muestras de tofu presentaron resultados variables. No obstante, hubo una correlación positiva entre la capacidad antioxidante de las semillas y contenidos de compuestos con actividad antioxidante en tofu. Así el tofu elaborado a partir de FN3.85 presentó mayores valores de TFC y TPC pero no de DPPH. Sin embargo, el rango de variación para los análisis

realizados fue menor entre muestras de tofu y en algunos casos no hubo diferencias significativas como en el contenido de flavonoides totales. Rekha y Vijayalakshmi (2010) encontraron diferencias en actividad antioxidante en tofu medida como DPPH, encontrando valores del 63.1% de inhibición de radicales libres.

Tabla 4.4. Contenido de fenoles totales, flavonoides totales y taninos condensados totales, y potencialidad antioxidante medida como DPPH en muestras de soja y tofu.

Muestra	Soja				Tofu		
	TPC	TFC	CTC	DPPH	TPC	TFC	DPPH
	mgEAG g ⁻¹	mgECQ g ⁻¹	mgECQ g ⁻¹	uM ETrolox g ⁻¹	mgEAG g ⁻¹	mgECQ g ⁻¹	uM ETrolox g ⁻¹
ALIM18.01	2.04b	1.36b	0.58b	2.86b	0.67b	0.07a	4.67b
ALIM 5.09-09	1.89c	1.32b	0.73a	2.76b	0.85a	0.13a	5.69a
ALIM 5.09-14	1.89c	0.75c	0.60b	1.45c	0.68b	0.08a	4.50b
FN3.85	2.48a	1.69a	0.81a	3.73a	0.96a	0.15a	4.58b

Abreviaturas: TPC, contenido de fenoles totales; TFC, contenido de flavonoides totales; CTC, contenido de taninos condensados; DPPH, actividad antioxidante por DPPH.

Comparando los valores obtenidos de antioxidantes con los publicados para otras leguminosas (Xu *et al.*, 2007), se observó que la soja amarilla tuvo una concentración menor de compuestos con actividad antioxidante y de capacidad antioxidante DPPH en relación a legumbres como lentejas y soja negra, pero mayor que las arvejas (Fig. 4.5). Xu *et al.* (2007) publicaron resultados en soja amarilla cuyos valores también fueron levemente inferiores a los aquí presentados para otros cultivares de soja amarilla. Por otra parte, se encontró que el tofu, como producto elaborado a partir de semillas de soja amarilla, presentó valores menores de actividad antioxidante y de compuestos con actividad antioxidante a los de las semillas usadas como materia prima. En el caso de contenido de taninos condensados, no se pudo detectar en tofu por el método colorimétrico empleado.

El análisis de actividad antioxidante por ORAC resultó en valores irregulares para las muestras de soja. En tofu no se realizó este análisis por los reducidos valores obtenidos en los análisis previos. Sólo dos de las muestras de soja dieron valores repetibles a lo largo

de las cuatro repeticiones realizadas por muestra resultando en $65.96 \mu\text{M ET g}^{-1}$ para ALIM18.01 y $65.73 \mu\text{M ET g}^{-1}$ en ALIM5.09-14. Valores hallados en otros estudios sobre actividad antioxidante en soja amarilla fueron entre $38.73 \mu\text{M ET g}^{-1}$ (Xu *et al.*, 2007) y $111.48 \mu\text{M ET g}^{-1}$ (Figueiredo de Rezende, 2012) sobre base seca de semilla de soja. A su vez, ambos estudios encontraron correlaciones positivas entre los análisis de actividad antioxidante realizados DPPH y ORAC y los contenidos de compuestos con actividad antioxidante. El método de extracción empleado es influyente en la concentración de antioxidantes resultante (Figueiredo de Rezende, 2012; Xu y Chang, 2007) lo que podría explicar las diferencias en los valores leídos para soja amarilla.

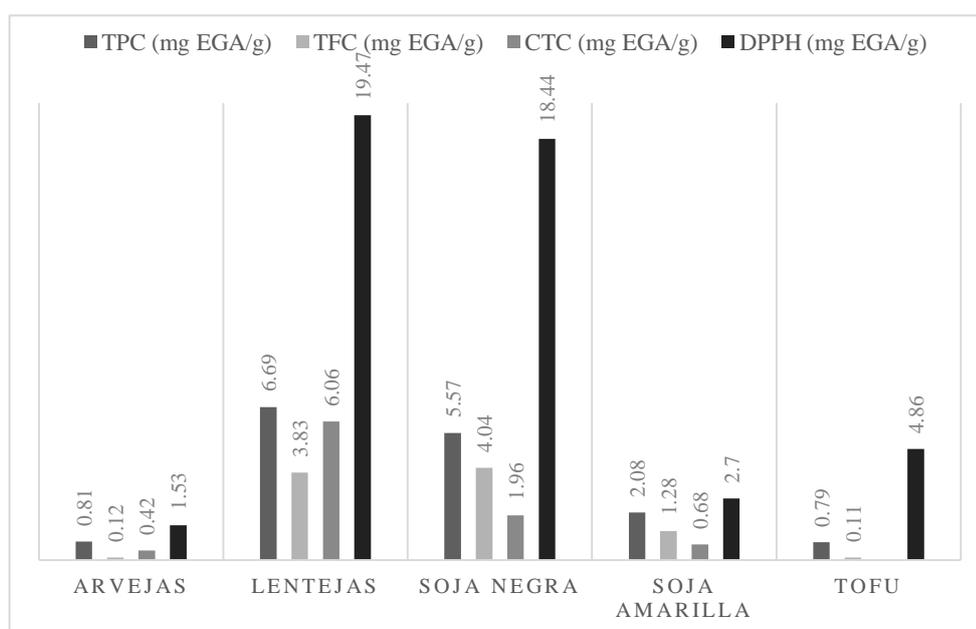


Fig. 4.3. Comparación de los contenidos de fenoles totales (TPC), flavonoides totales (TFC), taninos condensados (CTC) y actividad antioxidante por DPPH en diferentes semillas de leguminosas (Xu *et al.*, 2007) y muestras de soja amarilla y tofu correspondientes a promedios de las muestras evaluadas en este estudio.

Análisis sensorial en tofu

Se obtuvieron diferencias significativas para los atributos color, firmeza, elasticidad, homogeneidad y suavidad entre las muestras de tofu (Fig. 4.6). La muestra FN3.85 fue la de color más oscuro y SB270 la más clara. No se encontraron diferencias significativas entre las otras muestras. FN3.85 es una soja comercial de hilo negro, la

presencia de hilo oscuro da al tofu una apariencia menos atractiva (Khatib *et al.*, 2001; Kim y Wicker, 2005; Wang *et al.*, 1983). FN3.85 presentó menor firmeza y elasticidad. Conforme a resultados de investigaciones previas, la concentración de proteínas en las semilla se correlaciona positivamente con las propiedades texturales de firmeza y elasticidad en tofu (Kim y Wicker, 2005).

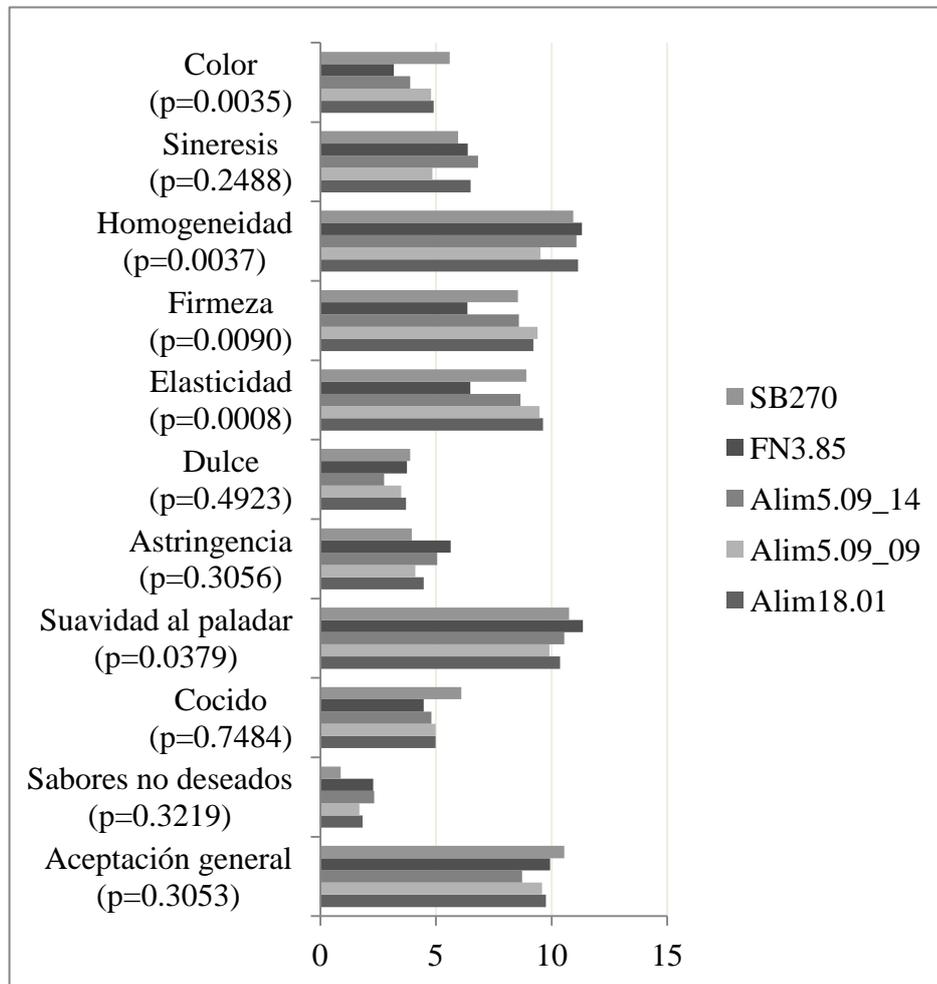


Fig. 4.4. Atributos evaluados en muestras de tofu elaborados a partir de diferentes variedades de soja. Valores de $p \leq 0.05$ indican diferencias significativas.

El tofu obtenido a partir de la soja ALIM5.09-09 fue significativamente menos homogéneo y de menor suavidad al paladar que el resto. FN3.85 y SB270 fueron las muestras más suaves. En general se ha advertido que los consumidores occidentales de tofu prefieren tofu de textura suave y apariencia uniforme. Murphy *et al.* (1997) observaron que semillas de sojas provenientes de almacenamiento, es decir, no frescas,

produjeron tofu de inferiores características texturales. El almacenamiento influye sobre la capacidad de extracción proteica afectando las propiedades finales del tofu, aunque este efecto es también dependiente de la variedad de soja usada (Murphy *et al.*, 1997).

Las semillas de soja conservadas bajo condiciones controladas de temperatura y humedad conservan su aptitud para la elaboración de tofu de calidad hasta 18 meses de almacenamiento, período a partir del cual la calidad en tofu decae (Hou y Chang, 2005). El análisis sensorial del tofu resultante de la soja ALIM 5.09 cosechada en el año 2010 obtuvo comentarios como “muy desagradable” o con “sabor a aceite de soja”. Hou y Chang (1998) obtuvieron un incremento significativo de sabores no deseados en sojas almacenadas más de 45 días a elevada humedad y temperatura. A su vez, el uso de semillas frescas de ALIM 5.09 (cosechado en el mismo año de uso 2014) resultó en tofu de color más oscuro.

Los atributos sinéresis, dulzor, sabor a cocido, presencia de sabores indeseados, astringencia y aceptación general no presentaron diferencias significativas entre muestras (Fig. 4.7). Dentro de las variedades evaluadas se incluyó una línea de soja especial mejorada para la elaboración tofu. Conforme a los resultados obtenidos, las piezas de tofu elaboradas a partir de soja argentina ALIM5.09, ALIM18.01 y FN3.85 fueron de calidad general aceptable y comparable a la de tofu elaborado con soja específicamente desarrollada para elaboración de tofu. Este resultado indica que las muestras de soja usadas para la elaboración de tofu obtuvieron tofu de calidad aceptable por el panel de jueces entrenado. Los resultados presentados confirman los previamente publicados por Ji *et al.* (1999) y Wang *et al.* (1983) donde no se encontraron diferencias significativas entre calidades de tofu de distintos cultivares de soja y contradicen los reportes de Kim y Wicker (2005), Poysa y Woodraw (2002), Poysa, Woodraw y Yu (2005) donde las diferencias en atributos texturales de tofu son atribuibles al genotipo. Sin embargo, también se considera que las diferencias entre calidad de tofu y entre muestras de soja son más dependientes del tipo de metodología usada en la elaboración del tofu (Poysa y Woodraw, 2002; Wang *et al.*, 1983).

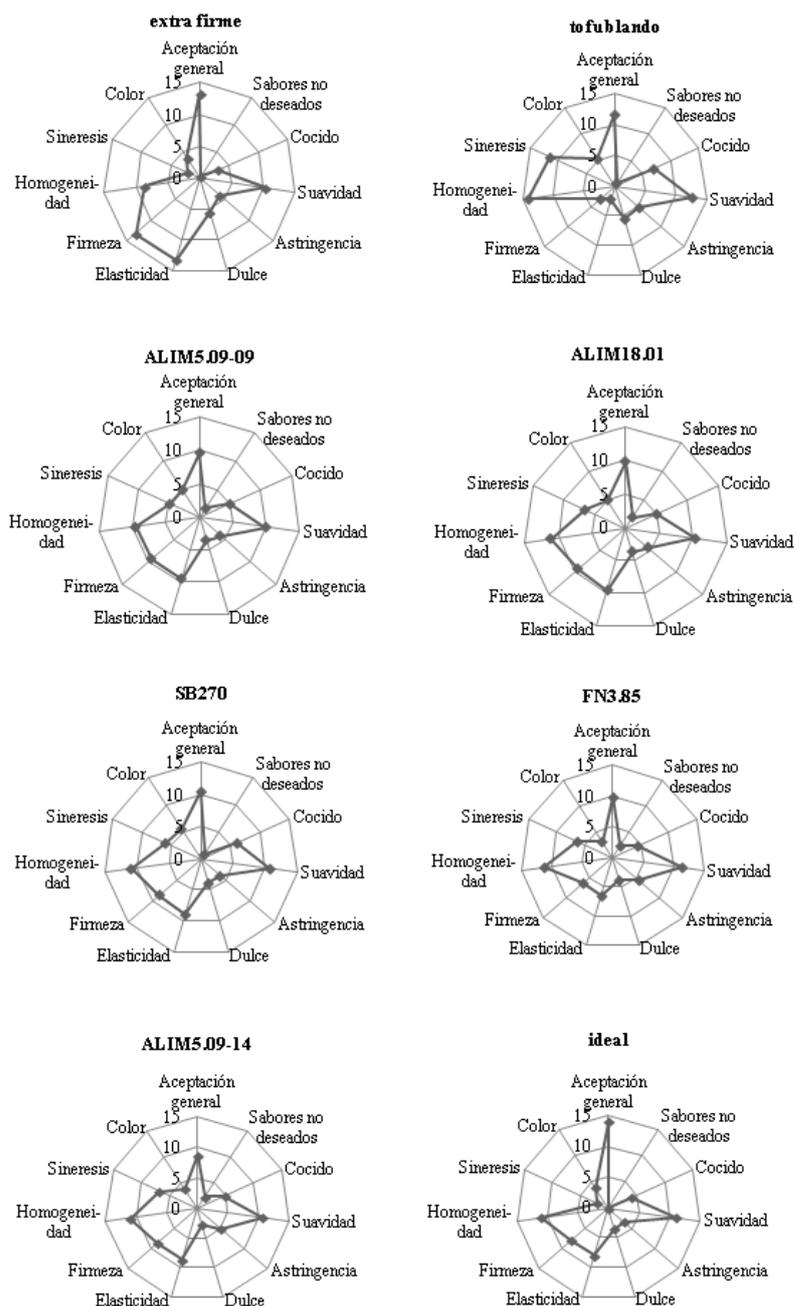


Fig. 4.5. Gráficos en radar indicando los perfiles de intensidades de atributos evaluados en muestras de tofu elaboradas a partir de diferentes muestras de soja. Extra firme y blando corresponden a los estándares comerciales de Nasoya®, “SB270” variedad específicamente desarrollada para tofu, “ideal” representa el perfil deseado en calidad de tofu, “ALIM5.09” y “ALIM18.01” son variedades mejoradas altas en proteína, “FN3.85 es una variedad transgénica comercial.

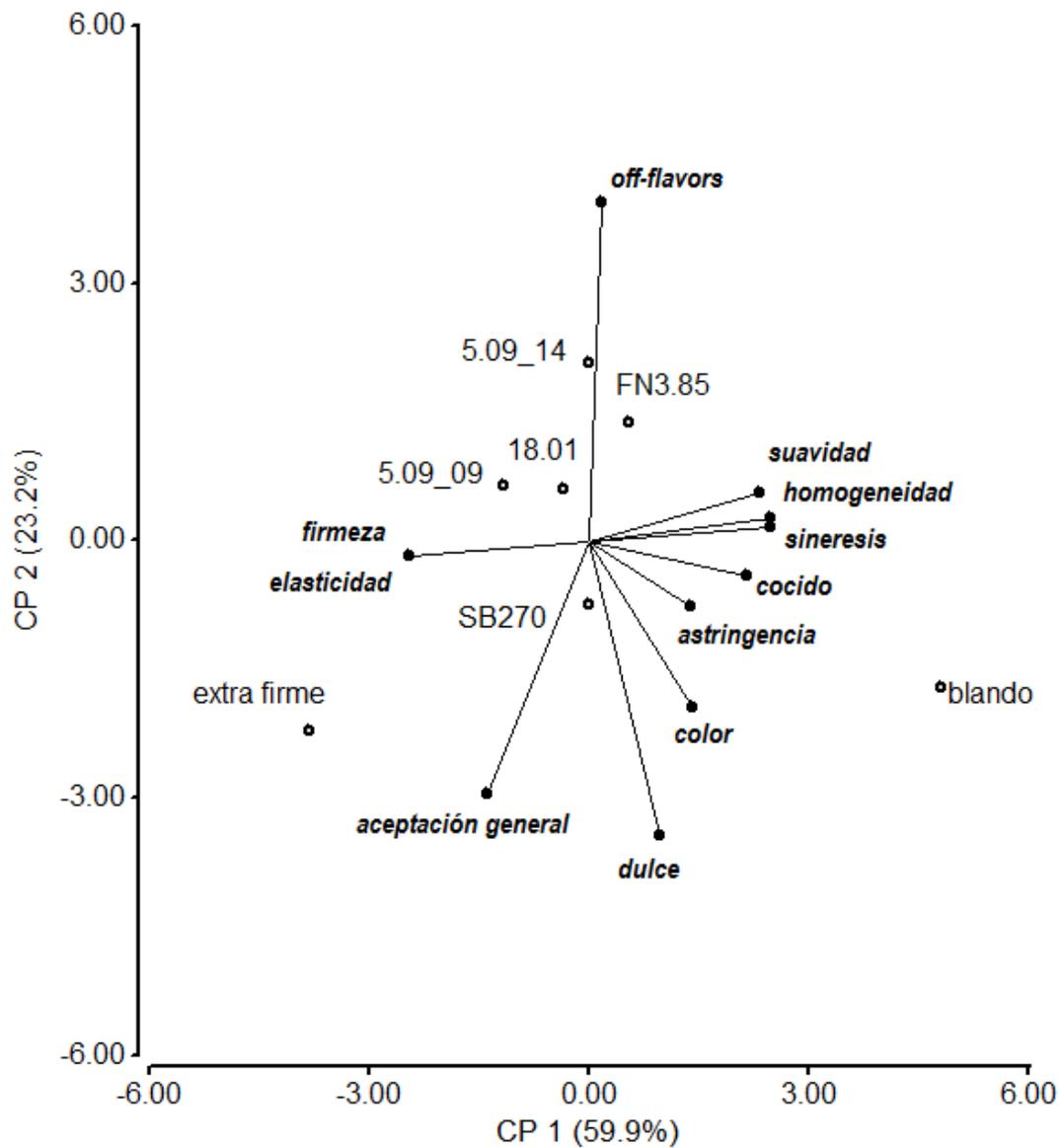


Figura 4.6. Análisis de componentes principales de las variables atributos sensoriales en diferentes muestras de tofu.

Mediante un análisis de componentes principales se estudió el grado de asociación de los atributos evaluados en las muestras de tofu. El gráfico de componentes principales (Figura 4.8) muestra que los atributos firmeza y elasticidad estuvieron alta y positivamente correlacionados y ambos se correlacionaron de manera negativa con los atributos sinéresis, homogeneidad y cocido. Se observó que la aceptación general estuvo positivamente ligada al sabor dulce y a la ausencia de sabores no deseados. Los comentarios obtenidos por los jueces indicaron que la intensidad de dulce fue un atributo buscado por los panelistas. La semilla de soja tiene en promedio un 10% de sacarosa que otorga un sabor dulce a los productos de soja, principalmente observable en el extracto de soja y tofu blando (tipo de tofu que conserva el suero). La solubilidad de este disacárido determina que en el tofu

prensado se pierda mayoritariamente en el suero, por lo tanto la intensidad de dulce no es un parámetro característico del tofu tipo prensado firme.

CONCLUSIONES

A partir de las muestras de soja provenientes de variedades desarrolladas en la República Argentina se puede preparar tofu firme prensado de contenido de humedad entre 81.88 – 83.22% y con un contenido proteico entre 53.05 y 59.78% sobre base seca.

La concentración de fenoles totales, flavonoides totales y taninos condensados es menor en el tofu firme elaborado que en las semillas de soja usadas como materia prima. La concentración de proteínas, fenoles, flavonoides y taninos totales en tofu se correlaciona positivamente con la concentración de estos componentes en la semilla de soja.

La soja ALIM18.01 tiene mejores resultados de calidad en la elaboración de tofu, con tofu de mayor concentración proteica, combinando atributos de firmeza, elasticidad, homogeneidad, suavidad al paladar, sabor dulce y baja astringencia, aunque muchos de estos no difieren significativamente de tofu preparados con otros granos de soja.

El tofu preparado a partir de variedades de soja desarrolladas en la República Argentina es de aceptación general satisfactoria. A futuro se debería considerar lograr mayor concentración proteica en nuevas líneas con destino a la elaboración de tofu.

BIBLIOGRAFÍA

- Batalova J. 2011. Asian immigrants in the United States. Migration Policy Institute. Disponible online: <http://www.migrationpolicy.org/article/asian-immigrants-united-states> (4 de agosto de 2015)
- Brodhurst R.B., Jones W.T. 1978. Analysis of condensed tannins using acidified vanillin. *J. Sci. Food Agric.* 29: 788-794.
- Cai T., Chang K.-C. 1998. Characteristics of production-scale tofu as affected by soymilk coagulation method: propeller blade size, mixing time and coagulant concentration. *Food Res. Int.* 31(4): 289-295.
- Cai T., Chang K.-C. 1999. Processing effect on soybean storage proteins and their relationship with tofu quality. *J. Agric. Food Chem.* 47: 720-727.
- Chang K.C., Hou H.J. 2004. Science and technology of tofu making. En: Handbook of vegetable preservation and processing. Hui Y.H., Ghazala S., Murrell K.D., Nip W.-K. New York, Estados Unidos. Marcel Dekker, Inc. pp 443-478.
- Chen P. 2004. Developing high quality identity-preserved soybean for the specialty soyfood market. En: Production and marketing of identity-preserved soybean. American Soybean Association, USA. pp. 23-31.
- Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M., Robledo C.W. InfoStat versión 2014. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>
- Figueiredo de Rezende D. 2012. Estudio comparativo de características físico-químicas e nutricionais da soja preta e amarela. Tesis Magister. Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil. 135 pp.
- Grosso N.R., Resurrección A.V.A. 2002. Predicting consumer acceptance ratings of cracker-coated and roasted peanuts from descriptive analysis and hexanal measurements. *J. Food Sci.* 67: 1530-1537.
- Halliwel B. 1996. Antioxidants in human health and disease. *Annual Review of Nutrition* 16: 33-50.
- Heimler D., Vignolini P., Dini M.G., Romani A. 2005. Rapid tests to assess the antioxidant activity of *Phaseolus Vulgaris* L., dry beans. *J. Agric. Food Chem.* 53: 3053-3056.
- Hou H.J., Chang K.C. 1998. Yield and quality of soft tofu as affected by soybean physical damage and storage. *J. Agric. Food Chem.* 46(12): 4798-4805.
- Hou H.J., Chang K.C. 2004. Storage conditions affect soybean color, chemical composition and tofu qualities. *J. Food. Processing and Preservation* 28(6): 473-488.
- Ji M.P., Cai T.D., Chang K.C. 1999. Tofu yield and textural properties from three soybean cultivars as affected by ratios of 7S and 11S proteins. *J. Food Sci.* 64(5): 763-767.
- Kim Y., Wicker L. 2005. Soybeans cultivars impact quality and function of soymilk and tofu. *J. Sci. Food and Agric.* 85(15): 2514-2518.
- Kong F., S.K.C. Chang, Liu Z., Wilson L.A. 2008. Changes of soybean quality during storage as related to soymilk and tofu making. *J. Food Sci.*, 73(3): S134-S144.
- Kong F., Chang S.K.C. 2013. Changes in protein characteristics during soybean storage under adverse conditions as related to tofu making. *J. Agric. Food Chem.*, 61: 387-393.
- Mahfuz A.Al, Tsukamoto C., Kudou S., Ono T. 2004. Changes of astringent sensation of soymilk during tofu curd formation. *J. Agric. And Food Chem.*, 52: 2070-2074.

- Meilgaard M., Civille G.V., Carr B.T. 2006. Sensory evaluation techniques. 4ta ed. CRC press, Inc. Boca Raton, FL, Estados Unidos. pp. 464.
- Mujoo R., Trinh D.T., Ng P.K.W. 2003. Characterization of storage proteins in different soybean varieties and their relationship to tofu yield and texture. *Food Chem.* 82: 265-273.
- Murphy P., Chen H.-P., Huack C., Wilson L.A. 1997. Soy protein composition and tofu quality. *Food Technol.* 51(3): 86-88, 110.
- Poysa V., Woodrow L. 2002. Stability of soybean seed composition and its effect on soymilk and tofu yield and quality. *Food Res. Int.* 35: 337-345.
- Poysa V., Woodrow L., Yu K. 2006. Effect of soy protein composition on tofu quality. *Food Res. Int.* 39: 309-317.
- Rutledge K.P., Hudson J.M. 1990. Sensory evaluation: method for establishing and training a descriptive flavor analysis panel. *Food Tech.*, 44(12): 78-84.
- Saio K., Kamiya M., Watanabe T. Food processing characteristics of soybean 11S and 7S proteins. 1969. Part I. Effect of difference of protein components among soybean varieties on formation of tofu-gel. *Agric. Biol. Chem.* 33: 1301-1308.
- Shurtleff W. y Aoyagi A. 2004. History of tofu. En: *History of soybeans and soy foods, 1100 BC to the 1980s AD.* Soyfoods Center, Lafayette, CA. Disponible online: <http://www.soyinfocenter.com/HSS/tofu1.php> (18 de junio de 2015)
- Shurtleff W., Aoyagi A. 2013. History of tofu and tofu products (965 CE to 2013). *Soyinfo center*, Eds. 324 pp.
- Soldini D. 2011a. Avances en la soja para consumo humano. Disponible online: <http://www.cadena3.com/contenido/2011/06/06/78321.asp> (5 de agosto de 2015)
- Soldini D. 2011b. Nuevo cultivar de soja: para alimentarte mejor. Disponible online: <http://intainforma.inta.gov.ar/?p=4756> (5 de agosto de 2015)
- Stone H., Joel S. 2004. Sensory evaluation practices. 3er ed. Food science and technology, int. series. Taylor S. Ed. Redwood City, CA, Estados Unidos.
- Tezuka M., Taira H., Igarashi Y., Yagasaki K., Ono T. 2000. Properties of tofus and soy milks prepared from soybeans having different Subunits of glycinin. *J. Agric. Food. Chem.* 48: 1111-1117.
- Torres-Penaranda A.V., Reitmeier C.A., Wilson L.A., Fehr W.R., Narvel J.M. 1998. Sensory characteristics of soymilk and tofu made from lipoxygenase-free and normal soybeans. *J. Food Sci.* 63(6): 1084-1087.
- USDA (United States Department of Agriculture), Agricultural Research Service, Nutrient Data Laboratory. USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 27. Edición Agosto de 2014. Disponible online: <http://www.ars.usda.gov/ba/bhnrc/ndl>
- Wang H.L., Swan E.W., Kwolek W.F., Fehr W.R. 1983. Effect of soybean varieties on the yield and quality of tofu. *Cereal Chem.* 60(3): 245-248.
- Wang H.L. 1984. Tofu and tempeh as potential protein sources in the western diet. *JAOCS* 61(3): 528-534.
- Xu B.J., Yuan S.H., Chang S.K.C. 2007. Comparative analysis of phenolic composition, antioxidant capacity, and color of cool season legumes and other selected food legumes. *J. Food Sci.* 72 (2), S167-S177.
- Yuan S., Chang S.K.-C. 2007. Selected odor compounds in soymilk as affected by chemical composition and lipoxygenases in five soybean materials. *J. Agric. Food Chem.* 55: 426-431.

Yuan S., Chang S.K.C. 2010. Standardization of physical parameters for Instron texture analysis for tofu quality evaluation. En: Chemistry, texture, and flavor of soy. ACS Symposium series (Eds), vol. 1059, pp 231-248.

CONCLUSIONES GENERALES

La metodología propuesta para la determinación de aminoácidos, cociente 11S/7S, azúcares solubles, fibra cruda y minerales en granos de soja y harina de soja desgrasada muestra resultados satisfactorios y aplicables para ser utilizada en futuros estudios.

Los valores de los análisis químicos realizados sobre granos de soja y harinas de soja desgrasada procedentes de ensayos multi-ambiental presentan un amplio rango de variación. La mayor variación se encuentra en los elementos minerales, posiblemente por su dependencia de la disponibilidad en suelo y variabilidad propia de los suelos.

El análisis multi-ambiental a partir de variables climáticas y de suelo medidas permite explicar gran parte de la variación atribuida al ambiente. Se establecieron las condiciones ambientales óptimas (CAO) que permiten maximizar la calidad e inocuidad del grano de soja. Las CAO quedan definidas por umbrales de temperaturas (máximas, medias y mínimas), radiación solar, precipitación y balance hídrico que afectan la calidad de la soja durante el período de llenado de granos. Los contenidos de rafinosa, Ca, Mg, Mn, Fe y Co alcanzan un máximo a temperaturas medias máximas superiores a 28 °C. A su vez, temperaturas medias menores a 19.4 °C resultan en un perfil deseable de azúcares solubles a favor de mayor contenido de sacarosa.

Conforme a las características deseadas en el grano de soja para la elaboración de tofu, granos expuestos a temperaturas medias máximas inferiores a 28 °C resultan en menor concentración de calcio durante el período de llenado de granos.

Las variaciones en la composición de aminoácidos podrían ser explicadas por variaciones en la radiación solar. Valores de radiación solar inferiores o iguales a 20.2 MJ m⁻² se relacionan con mayores concentraciones de isoleucina y valina. En cambio, cuando

los valores de radiación solar son menores a 14.9 MJ m^{-2} se observan mayores contenidos de fenilalanina, lisina y de aminoácidos totales.

Por otra parte, la relación proteica 11S/7S y la concentración de metionina podrían estar relacionadas a la disponibilidad hídrica durante llenado de granos. Cuando las precipitaciones son superiores a 111.5 mm se observa un mayor coeficiente proteico mientras que cuando son mayores a 380.5 mm se registra mayor concentración de metionina. Estos dos componentes son deseados cuando se trata de materiales para la elaboración de geles proteicos de soja, como el tofu. Precipitaciones superiores a 254.6 mm están relacionadas a menor contenido de estaquiosa, que es un atributo positivo para la soja que se destina como alimento o para la preparación de productos en base a soja.

La soja es un alimento que responde a las necesidades nutricionales del hombre. La promoción de alternativas de productos alimenticios a partir de granos de esta leguminosa donde se puedan maximizar el aprovechamiento de sus propiedades resulta de interés para los consumidores y la industria de los alimentos. El tofu es una alternativa de alimento nutritivo, de fácil preparación y bajo costo de producción y en donde se aprovechan las propiedades nutricionales de las proteínas de la soja. El tofu preparado a partir de muestras de soja desarrolladas en la República Argentina tiene una aceptación satisfactoria. El material de soja ALIM18.01 es promisorio para la elaboración de tofu de buena calidad combinando alta concentración proteica, firmeza, elasticidad, homogeneidad, suavidad al paladar.

La identificación de ambientes óptimos para la obtención de sojas especiales desarrolladas para la elaboración de tofu, constituye un desafío para futuros proyectos de investigación. Obtener un producto de calidad en soja, no solo implica el desarrollo de variedades sino también la identificación del ambiente donde producirlo.

ANEXO 1

Ficha presentada a los panelistas para análisis sensorial de tofu firme.

Evaluación sensorial descriptiva de tofu firme

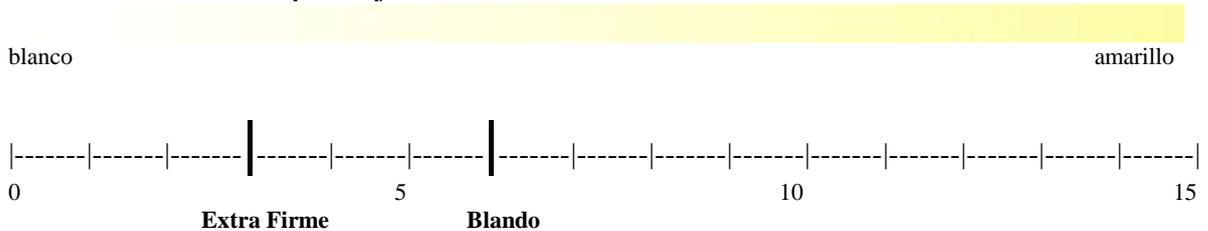
Nombre _____

Fecha ____ / ____ / ____

APARIENCIA

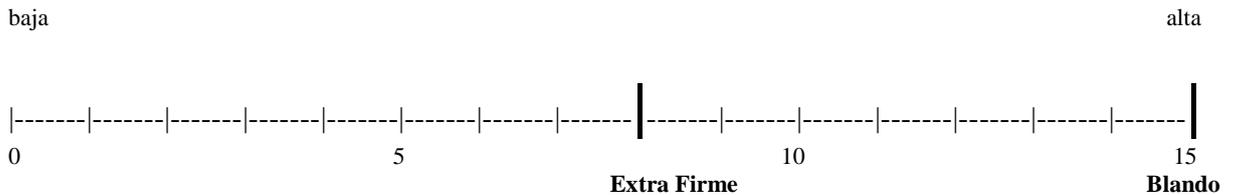
Color

Posición en la escala que mejor describa el color de tofu.



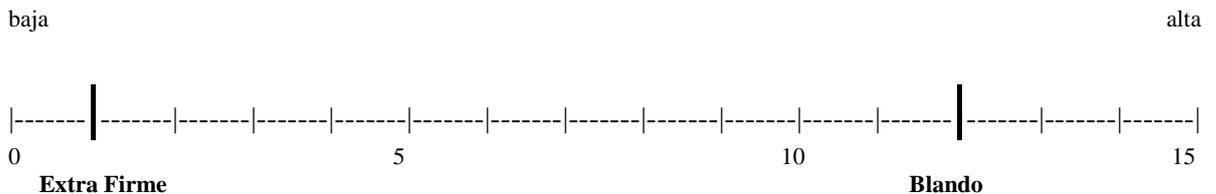
Homogeneidad

Tamaño de partículas pequeñas distribuidas de manera uniforme con ausencia de espacios vacíos u formación de agregados. (Alta homogeneidad se define como apariencia de manteca: 15; baja homogeneidad como una esponja natural: 0).



Sineresis

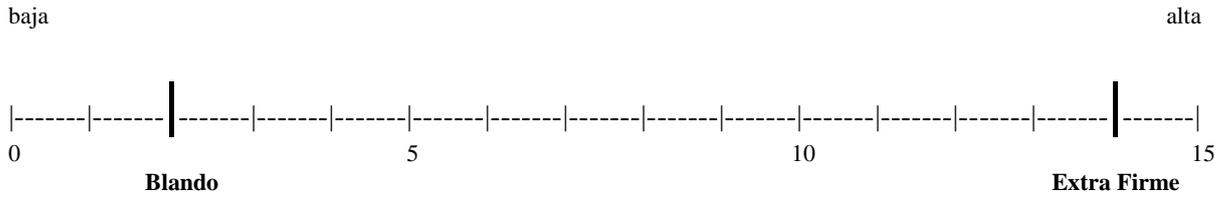
Expulsión de un líquido de un gel.



TEXTURA

Firmeza

Fuerza requerida para comprimir completamente el producto entre la lengua y el paladar.



Elasticidad

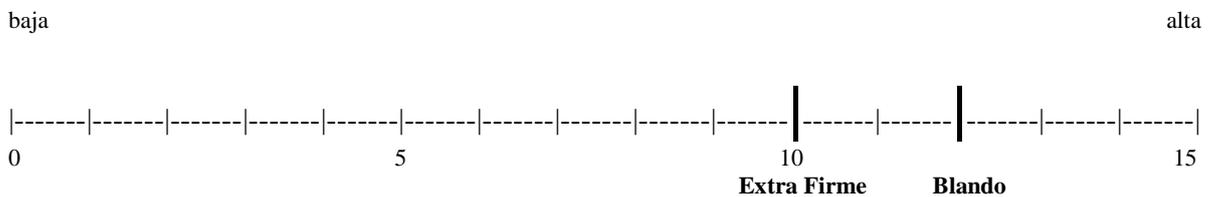
Propiedad de la materia de volver a su forma original luego de haberse aplicado una fuerza externa.



SENSACIÓN EN LA BOCA

Suavidad

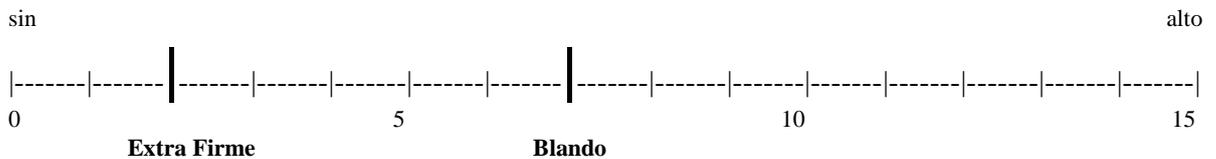
Sensación resbaladiza entre la lengua y el techo del paladar justo antes de deglutir.



SABOR

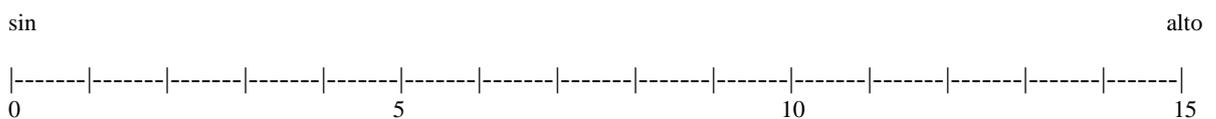
Cocido

Sabor a nuez tostada.



Sabores no deseados

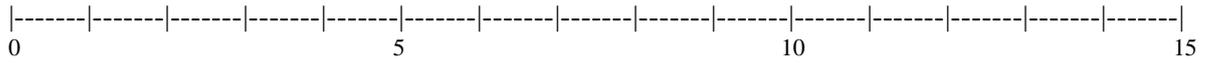
Precencia de sabores desagradables como afrijolado, poroto verde inmaduro, rancio, a moho.



Dulzura

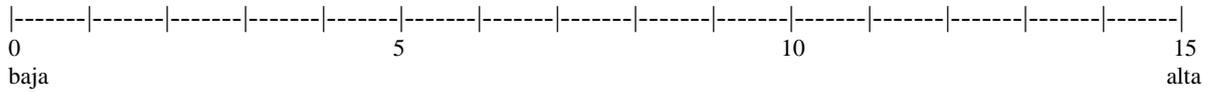
Grado de dulzura del producto en comparación con soluciones de sacarosa al 2% y al 5% (2% = 5, 5% =12).





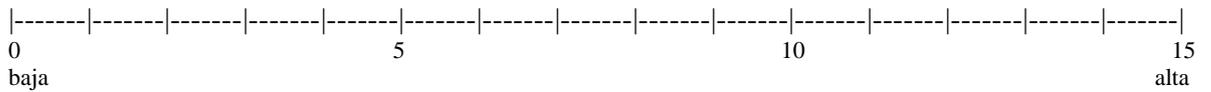
Astringencia

Sensación de boca seca o áspera luego de por lo menos 15 segundos que el product estuvo en la boca en contacto con la mucosa. Como refercia se presenta junto de cranberry diluído (v/v). (1/50 = 4, 1/20 = 9 and 1/10 = 13).



ACEPTACIÓN GENERAL

El tofu prensado firme de alta calidad deberá presentar la combinación de una homogeneidad aceptable, balanceado sabor (dulzura, astringencia, cocido), sin sabores no deseados, y de mediana a alta firmeza y elasticidad.



COMENTARIOS y OBSERVACIONES
