

Identificación de fructooligosacáridos e inulinas en residuos de hojas de fique - *Furcraea macrophylla* Baker

Identification of fructooligosaccharides and inulin in fique leave wastes - *Furcraea macrophylla* Baker

Claudia Sofia Guevara Apraez* y Elkin Javier Vallejo Castillo

Facultad de Medicina, Universidad Cooperativa de Colombia. Sede San Juan de Pasto, Nariño, Colombia.

*Autora para correspondencia: claudia.guevara@campusucc.edu.co

Rec.: 16.01.2014 Acep.: 24.09.2014

Resumen

Colombia es un importante productor de cabuya, fibra natural extraída de fique (*Furcraea macrophylla* Baker). La explotación de esta planta se caracteriza por productos y procesos tradicionales, poco tecnificados, de bajo valor agregado y con un aprovechamiento limitado de la planta de fique, lo que se traduce en baja rentabilidad. No obstante, en los residuos de este proceso agroindustrial se encuentran muchas sustancias de interés, aun sin explorar, entre ellas los carbohidratos, específicamente los fructanos, como la inulina y los fructooligosacáridos (FOS) que son polímeros de fructosa considerados fibra dietaria y que por sus características se clasifican como prebióticos. En esta investigación se evidenció la presencia de FOS e inulinas en los residuos obtenidos durante el proceso de desfibrado de las hojas de fique a través de técnicas enzimáticas y espectro-fotométricas. Debido a las amplias aplicaciones en el sector alimentario se recomienda su cuantificación, extracción y caracterización con el fin de proporcionar valor agregado a través de la explotación de estos compuestos.

Palabras clave: Fique, FOS, fructanos

Abstract

Colombia is the largest producer of cabuya, natural fiber extracted from fique (*Furcraea macrophylla* Baker). The fique exploitation is characterized by traditional products and processes, low-tech, low value-added and limited plant use, resulting in low profitability. However, residues of this agroindustrial process contain many substances of interest, unexplored yet, including carbohydrates, specifically fructans, such as inulin and fructooligosaccharides which are fructose polymers that are considered dietary fiber and for their characteristics are classified as prebiotics. Through enzymatic and spectrophotometric techniques, in this research is evidenced the presence of FOS and inulin in the residues obtained during the fique leaves defibrating process. Given the wide applications in the food industry, quantification, extraction and characterization is recommended in order to provide added value through the exploitation of these compounds.

Keywords: Fique, FOS, fructans.

Introducción

En Colombia se cultiva el fique para la extracción de una fibra natural conocida como ‘cabuya’ la cual se utiliza en la fabricación de diferentes artículos artesanales, cordelería y sacos biodegradables para el transporte de productos agrícolas. Esta cadena productiva agroindustrial se caracteriza por procesos y productos tradicionales, poco tecnificados, de bajo valor agregado y con un aprovechamiento limitado de la planta. El aprovechamiento de la hoja de esta planta varía entre 4 y 6% (Peinado *et al.*, 2006), lo que se traduce en baja rentabilidad. No obstante a nivel nacional la expectativa frente al aprovechamiento de los residuos provenientes del fique es bastante significativa; los actores de la cadena reconocen el valor agregado de los productos derivados del jugo para aumentar sus ingresos a través de la comercialización (Castellanos *et al.*, 2009).

Mientras en Colombia se explota el fique casi exclusivamente como una fuente de fibra natural, en países como México utilizan el agave, una planta con características similares al fique y perteneciente a la misma familia (Agavaceae), para la obtención de una amplia variedad de productos aplicables a diferentes campos industriales. Jarabes de alta fructosa, fructosa cristalina, fibra dietética soluble y edulcorantes de bajo aporte calórico como los fructooligosacaridos (FOS) e inulinas, son algunas de las sustancias que se explotan para empleo como aditivos alimenticios y materia prima para la obtención por fermentación de etanol, ácido cítrico, sorbitol o ácido glucónico (Chacón *et al.*, 2014; Vargas-Vásquez, 2009).

Los FOS e inulinas son carbohidratos tipo fructanos, polímeros de fructosa, unidos mediante enlaces glucosídicos de tipo $\beta(2-1)$. Las inulinas poseen un grado de polimerización superior a 10 unidades y los FOS, también conocidos como oligofruktosas, tienen un grado de polimerización inferior, aproximadamente entre 3 y 7 unidades (Olvera *et al.*, 2007). Estos fructanos son considerados prebióticos, ya que no son digeribles por el tracto digestivo humano, poseen carácter bifidogénico (estimulan el crecimiento de bifidobacterias) y además, al ser consumidos con frecuencia, favorecen la absorción de minerales como calcio, contribuyen a la salud y bienestar del colon a través del fortalecimiento de su epitelio y previenen patologías colorrectales tales como cáncer (Aguilera-García *et al.*, 2008; Pool-Zobel y Sauer, 2007; Pool-Zobel *et al.*, 2002; Rafter *et al.*, 2007). El objetivo de este trabajo fue evaluar de manera cualitativa la presencia de inulinas y FOS en los residuos del desfibrado del fique, utilizando un método enzimático y espectrofotométrico.

Materiales y métodos

La presencia de FOS e inulinas en los residuos agroindustriales del desfibrado de fique, se determinó a través de métodos enzimáticos y espectrofotométricos, adaptados de la técnica descrita por Montañez (Montañez-Soto *et al.*, 2011) y empleada por Vargas (2009), que consistió en sustituir la hidrólisis ácida de la inulina por el uso de la enzima inulinasa para no sobreestimar la cuantificación de carbohidratos. Se utilizó la enzima invertasa EC 3.2.1.26, que cataliza la hidrólisis de restos terminales no reductores de los FOS, β -D-fructofuranosídicos de fructofuranosídicos, liberando sus azúcares reductores (AR) componentes. Para la identificación de la inulina se utilizó la enzima endoinulinasa o β -D-(2-1)-fructano fructohidrolasa (EC 3.2.1.7) que cataliza la hidrólisis de los enlaces internos de la molécula de inulina, originando una mezcla de fructooligosacaridos (Castillo-Calderon, 2010). Debido a que la endoinulinasa no posee actividad invertasa, la hidrólisis se realizó en dos etapas, la primera con endoinulinasa que permite transformar la inulina en FOS y la segunda con invertasa para la hidrólisis total de la inulina en sus azúcares reductores, glucosa y fructosa. Para determinar la absorbancia de los AR presentes se utilizó el método de Miller (Miller, 1959) mediante la formación del compuesto reducido ácido 3-amino-5-nitro-salicílico de color rojizo cuya absorbancia medida a una longitud de onda de 540 nm es proporcional a la cantidad de AR presente en la muestra. La existencia de diferencias significativas entre la medición de los AR iniciales, los provenientes de los FOS y los provenientes de inulina, demuestra la presencia de este último fructano.

Peinado *et al.* (2006) determinaron que el jugo de fique contiene azúcares reductores libres como glucosa y fructosa, por lo que en este estudio estos fueron determinados antes y después de la acción enzimática. La primera medición (AR inicial) es la línea base para calcular diferencias significativas, ya que un incremento en la liberación de AR prueba la existencia de FOS en los residuos del desfibrado de las hojas de fique.

El muestreo de los residuos agroindustriales del desfibrado de fique se realizó en el municipio de Chachagüí, un importante productor de fique en el Departamento de Nariño (Colombia) (DNP, 2007). Durante el desfibrado de fique (*F. macrophylla* Baker) se recolectaron el jugo y el bagazo producidos por 10 hojas seleccionadas al azar entre el total programado para cosecha en un día de trabajo. Estos residuos fueron homogeneizados con un procesador de alimentos eléctrico para tomar una muestra de 1 lt que fue refrigerada y transportada en un recipiente

ambar con el fin de evitar la degradación de los fructanos por efectos de la luz solar y la actividad de la microbiota autóctona de la planta (Benavides *et al.*, 2012) hasta el Laboratorio de Análisis Químico de la Universidad Cooperativa de Colombia sede Pasto. Para garantizar una mayor cantidad de fructanos en solución, la muestra se mantuvo en agitación magnética constante a 80 °C durante 1 h (Montañez-Soto *et al.*, 2011). Este procedimiento también contribuye a reducir la carga microbiológica de la muestra y con ello la fermentación de los carbohidratos. Una vez finalizado este tiempo, la muestra fue filtrada a vacío a través de papel filtro Whatman 90 mm, conservando en refrigeración el filtrado.

Los sólidos retenidos se resuspendieron en 100 ml de agua destilada, y fueron sometidos nuevamente a calentamiento y filtrado. Ambos filtrados fueron unidos y se completó el volumen a 1 lt de muestra para obtener así el extracto original, al cual se le determinaron la densidad y el pH y se le calificaron el color y el olor característicos con el fin de establecer posibles cambios por la fermentación bacteriana de los carbohidratos en la muestra. Debido a la intensidad de la coloración presentada por el extracto original y con base en pruebas preliminares de ésta investigación, éste fue diluido en proporción 1:20 de agua destilada.

Para reconocer de manera colorimétrica la presencia de azúcares reductores libres producidos por la planta y presentes en los residuos agroindustriales, en 5 ml de la muestra diluida se aplicó el método DNS (Miller, 1959). Para este procedimiento se empleó un espectrofotómetro (Spectroquant Pharo 300 de Merk) y los datos resultantes constituyeron la línea base de los azúcares reductores iniciales (ARI). Todas las mediciones se repitieron 10 veces. La hidrólisis de FOS se realizó empleando invertasa EC 3.2.1.26 y la de inulinas se hizo mediante endoinulinasas (β -D-(2-1)-fructano fructohidrolasa EC 3.2.1.7) combinada con invertasa, las dos enzimas son termoestables (Vargas-Vásquez, 2009). Para confirmar la presencia de los FOS se tomaron 5 ml de la muestra diluida y se agregó 1 mg de invertasa; a continuación, el conjunto resultante se incubó durante 90 min a 55 °C. Al finalizar este tiempo se aplicó el método de Miller (Miller, 1959) y se registraron los valores de la absorbancia de estas muestras.

Para la determinación de inulina se utilizó una muestra diluida de 5 ml y 10 μ L de endoinulinasas (EC 3.2.1.7) que fue incubada a 55 °C durante 1 hora, tiempo y temperatura en los que se consiguió el mejor rendimiento de azúcares reductores, de acuerdo con ensayos preliminares realizados. Se realizó una segunda etapa enzimática consecutiva con 2 mg de invertasa incubada durante 90 min a 55 °C. Posteriormente, se empleó el

método de Miller y se determinó la absorbancia de los AR presentes. En la Figura 1 se muestra de manera esquemática el procedimiento realizado para evidenciar la presencia de FOS e inulinas en residuos de fique.

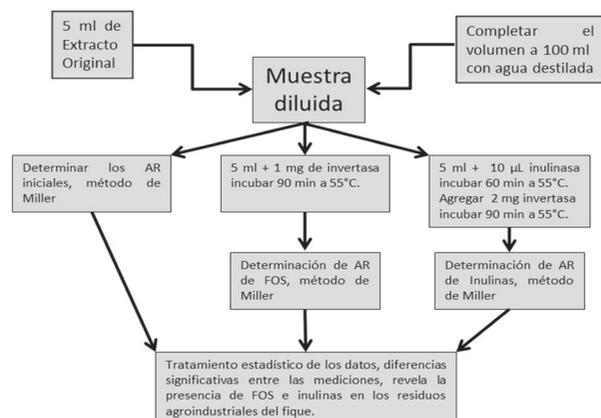


Figura 1. Esquema del procedimiento experimental para identificar la presencia de FOS e inulinas en residuos de fique.

Resultados y discusión

Los residuos agroindustriales del proceso de desfibrado de las hojas de fique se caracterizan por ser una mezcla líquida heterogénea compuesta por jugos, sólidos provenientes del tejido vegetal de la planta, fibra corta y bagazo.

El extracto original presentó un color verde intenso y un olor fuerte característico, con un pH de 5.48 y una densidad de 1.015 g/ml. Estas propiedades fueron monitoreadas diariamente y se encontró que después de 3 días, el pH empezó a disminuir hasta alcanzar un valor mínimo de 5 después de 8 días de almacenamiento. Es importante resaltar que todas las mediciones se realizaron durante los 2 días siguientes a la recolección de la muestra, para evitar subestimar la concentración de carbohidratos, que al ser metabolizados por microorganismos, liberan ácidos causantes de la reducción de pH de la solución. Algunos de los microorganismos que sobrevivieron al calentamiento realizado el día del muestreo pertenecen a la microbiota autóctona de la planta, la cual se calcula aproximadamente en 25 aislados bacterianos y 22 de levaduras (Benavides *et al.*, 2012), mientras que otros provienen del ambiente. Otras características como densidad, color y olor permanecieron estables durante el período de 8 días de observaciones.

Montañez *et al.* (2011) sugieren el empleo de la hidrólisis ácida para la cuantificación de inulinas, procedimiento que no es selectivo en cuanto al tipo de enlace glucosídico que hidroliza, razón por la cual en esta investigación se empleó endoinulinasas, que es específica para la hidrólisis de los enlaces β -D-(2-1)-fructosil fructosa. Debido a que

la inulinasa no posee actividad de invertasa, la totalidad de los AR provenientes de las inulinas resulta del proceso de hidrólisis en dos etapas enzimáticas, una por endoinulinasas y la otra por invertasa. Para obtener la mayor cantidad de AR provenientes de inulinas se utilizaron las condiciones resultantes del análisis de la cinética enzimática de las endoinulinasas realizado por Michel-Cuello *et al.* (2012).

En la Figura 2, se observan los resultados de las mediciones de absorbancia de los azúcares reductores iniciales (ARI), los azúcares reductores procedentes de los FOS (AR-FOS) y los azúcares reductores procedentes de las inulinas (AR-INU), calculados por el método de Miller.

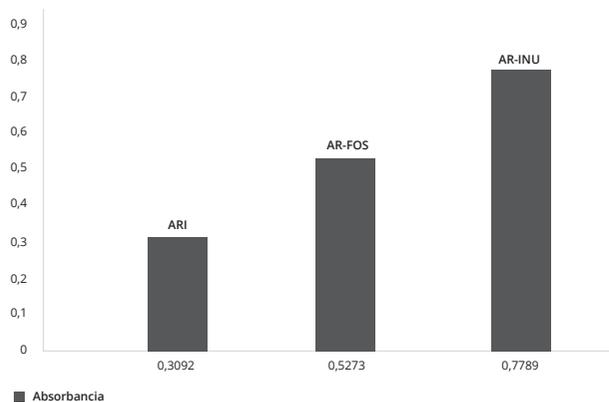


Figura 2. Absorbancia de los azúcares reductores obtenidos por el método de Miller.

ARI = azúcares reductores iniciales. AR-FOS = azúcares reductores procedentes de los FOS. AR-INU = azúcares reductores procedentes de las inulinas. Valores promedio de 10 repeticiones.

El incremento de absorbancia concuerda con la hipótesis de la presencia de FOS e inulinas en los residuos provenientes del desfibrado de fique. Los FOS son polímeros de fructosa que al hidrolizarse por acción de la invertasa liberan moléculas de fructosa y glucosa, las cuales son los azúcares reductores responsables del incremento en los valores de absorbancia respecto a los ARI. Igual proceso ocurre con el tratamiento con inulinasa-invertasa, la que actúa sobre la inulina presente para liberar FOS y estos posteriormente, fructosa y glucosa.

Al aplicar la prueba de Fischer con un nivel de significancia del 95% a los resultados obtenidos, se encontró que existen diferencias ($P < 0.05$) entre las muestras analizadas y cada grupo de mediciones es homogéneo, con lo cual se comprueba que el protocolo experimental propuesto presenta una buena repetibilidad. Además, este análisis estadístico muestra que las medias de absorbancia de cada grupo son independientes, es decir que el aumento en la cantidad de AR se debe al tratamiento enzimático propuesto.

Conclusión

Las plantas de fique cultivadas en el municipio de Chachagüí, Nariño (Colombia), almacenan inulinas y FOS en sus hojas. Esta característica, compartida con otras plantas de las familias *Furcraea* y *Agave*, supone la posibilidad de encontrar carbohidratos también en el tallo del fique, probablemente en mayor proporción. Este resultado es la base para iniciar estudios que cuantifiquen y caractericen la extracción de FOS e inulinas en este tipo de plantas.

Referencias

- Aguilera Garca, C.; Barberá Mateos, J. M.; Esperanza Díaz, L.; Duarte de Prato, A.; Gálvez Peralta, J.; Gómez, S.; y Zarzuelo Zurita, A. (2008). Alimentos Funcionales. *Aproximación a una nueva alimentación*. Dirección General de Salud Pública y Alimentación, Ed.. Madrid. Instituto de Nutrición y Trastornos Alimentarios.
- Benavides, O. L.; Arango, O.; Hurtado, A. M.; y Rojas, M. C. (2012). Cuantificación de Sapogeninas del jugo fresco y fermentado de fique (*Furcraea gigantea*) mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC-PDA). *Información Tecnológica* 23(3):67 - 76. doi:10.4067/S0718-07642012000300009
- Castellanos, O. F.; Torres P.; L. M.; y Rojas, L. 2009. Agenda prospectiva de investigación y desarrollo tecnológico para la cadena productiva de fique en Colombia. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. Bogotá D.C. Giro Editores Ltda. vol. 16.
- Castillo Calderón, A. y Chamy Maggi, R. 2010. Producción de inulinasa por levaduras de *Kluyveromyces marxianus*. *Sci. Agrop.* 1:235 - 245.
- Chacón V, A. 2006. Perspectivas agroindustriales actuales de los oligofruetosacáridos (FOS). *Agron. Mesoam.* 17(2):265 - 286.
- DNP (Departamento Nacional de Planeación). 2007. Agenda Interna para la Productividad y la Competitividad. Documento regional Nariño. Bogotá D.C.: Departamento Nacional de Planeación. Disponible en: <http://goo.gl/rt5LvH>
- Guevara Apráez, C. S. y Vallejocastillo, E. J. 2014. Potencialidades medicinales de los géneros *Furcraea* y *Agave*. *Rev. Cubana Plantas Med.* 19(1):248 - 263. Disponible en: <http://goo.gl/1bWIF3>
- Michel-Cuello, C.; Ortiz-Cerda, I.; Moreno-Vilet, L.; Grajales-Lagunes, A. *et al.* 2012. Study of enzymatic hydrolysis of fructans from *Agave salmiana* characterization and kinetic assessment. *Sci World J.* 2012, 863432. doi:10.1100/2012/863432
- Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* 31(III):426 - 428. doi:10.1021/ac60147a030
- Montañez-Soto, J.; Venegas-González, J.; Vivar-Vera, M.; y Ramos-Ramírez, E. 2011. Extracción, caracterización y cuantificación de los fructanos contenidos en la cabeza y en las hojas del *Agave tequilana*. *Bioagro* 23(3): 199 - 206. Disponible en: <http://goo.gl/01q1yM>
- Olvera, C.; Castillo, E.; y López-Munguía, A. 2007. Fructosiltransferasas, fructanas y fructosa. *Bio-*

- tecnología*. Vol.14, No. 3, 327 - 346. Disponible en <http://goo.gl/YVWDBT>
- Peinado, J. E.; Ospina, L. F.; Rodríguez, L.; Miller, J.; Carvajal, C.; y Negrete, R. 2006. Guía ambiental del subsector fiquero. Bogotá D.C.: Cadena Productiva Nacional del Fique - Cadefique. 2nd ed. vol. 21. Disponible en: <http://goo.gl/Mbw4EZ>
- Pool-Zobel, B. L. y Sauer, J. 2007. Overview of experimental data on reduction of colorectal cancer risk by inulin-type fructans. *J. Nutr.* 137(11) Suppl. 2580S - 2584S. Disponible en: <http://goo.gl/1MIPq1>
- Pool-Zobel, B.; van Loo, J.; Rowland, I.; y Roberfroid, M. B. 2002. Experimental evidences on the potential of prebiotic fructans to reduce the risk of colon cancer. *British J. Nut.* 87(S2), S273 – S281. doi:10.1079/BJN/2002548
- Rafter, J.; Bennett, M.; Caderni, G.; Clune, Y.; Hughes, R.; Karlsson, P. C.; y Collins, J. K. 2007. Dietary synbiotics reduce cancer risk factors in polypectomized and colon cancer patients. *Amer. J. Clin. Nutr.* 85(2): 488 - 496. Disponible en: <http://goo.gl/sbqMFQ>
- Vargas Vásquez, C. G. 2009. Obtención de insumos de interés industrial a partir de las fructanas del agave mezcalero potosino (*Agave salmiana*). Instituto Politécnico Nacional. Disponible en: <http://goo.gl/2THKVB>