

VALIDACIÓN DE UNA TÉCNICA ENZIMÁTICA PARA LA DETERMINACIÓN DE β -GLUCANOS TOTALES Y β -GLUCANOS SOLUBLES EN LA FRACCIÓN SOLUBLE ÁCIDA (FSA) DEL GRANO DE CEBADA (*HORDEUM VULGARE*)

Claudia Ariza Nieto¹, Olga Lucía Mayorga Mogollón², Germán Afanador Téllez³

Aceptado: Junio/2000

Keywords: β -glucan, acid-soluble β -glucan, hulled barley, hullless barley.

RESUMEN

Se validó y ajustó un método enzimático para la cuantificación del β -glucano total y β -glucano soluble en la fracción soluble ácida (FSA) del grano de cebada. La extracción completa del β -glucano se realizó utilizando ácido perclórico 50 mM (5 min.), mientras que para la determinación del β -glucano soluble en la FSA, primero se hizo una extracción con un buffer ácido, pH 1.5 (KCl-HCl) y luego se continuó con la extracción del β -glucano con ácido perclórico 50 mM. En ambos casos, el β -glucano fue hidrolizado con β -glucanasa (E.C. 3.2.1.4) del *Penicillium funiculosum* a oligosacáridos de alto peso molecular. Estos oligosacáridos fueron hidrolizados cuantitativamente a glucosa utilizando la β -glucosidasa purificada (E.C. 3.2.1.21) de almendras. La glucosa liberada se cuantificó usando el reactivo de glucosa oxidasa/peroxidasa. El porcentaje de hidrólisis obtenido con las enzimas utilizadas fue de 80,5%. El

método presentó una correlación de 0.98 entre la concentración de glucosa y la absorbancia (475 nm) en un rango de 0-10 μ g glucosa/ml, con límite de cuantificación de 1.66 μ g glucosa/ml y límite de detección de 1.41 μ g glucosa/ml. La α -amilasa y el almidón no fueron interferentes en el método. La recuperación del analito en la matriz fue de 96,2% al nivel de 3,44% de β -glucano en la muestra. El método se validó sobre 240 muestras de cebadas del banco de germoplasma de Corpoica, cosechadas en tres localidades de Cundinamarca. Los niveles de β -glucanos totales fueron de 1,82% y 1,29% para los genotipos desnudos y cubiertos, respectivamente. Los β -glucanos solubles de la FSA representaron 16,5% y 18,6% del β -glucano total de los granos desnudos y cubiertos, respectivamente.

ABSTRACT

An enzymatic method to quantitatively determine total β -glucan and soluble β -glucan in acid soluble fraction (ASF) was adjusted and validated using barley. Exhaustive extraction of glucans

1 Zootecnista, M.Sc. Programa Regional Pecuario, Corpoica, Tibaitatá km. 14 vía Mosquera 240142. Cariza@corpoica.org.co

2 Química. Programa Nacional de Nutrición Animal, Corpoica, lmayorga@corpoica.org.co

3 Médico veterinario y zootecnista, Ph.D., profesor de la Universidad Nacional de Colombia. German@col1.telecom.co

was conducted using perchloric acid (50 mM) while soluble β -glucan in ASF was conducted using an acid buffer, pH 1.5 (KCl -HCl) and perchloric acid (50 mM). β -glucanase (E.C. 3.2.1.4) from *Penicillium funiculosum* was used to hydrolyze β -glucan to high molecular weight oligosaccharides. These oligosaccharides were then quantitatively hydrolyzed to glucose using purified β -glucosidase (E.C. 3.2. 1.21) extracted from almonds. Glucose release in this step was specifically determined using glucose oxidase/peroxidase reagent. These two enzymes hydrolyzed 80.5% of the substrate. A correlation coefficient of 0.98 was found between glucose concentration and absorbance (475 nm) with a range of 0-10 μ g glucose/ml, with a quantification limit of 1.66 μ g glucose/ml and detection limit of 1.41 μ g glucose/ml. Starch and α -amylase do not interfere with the assay. Recovery of β -glucan in the matrix was 96.2%, with a sample concentration of 3.44% of β -glucan. Validation of this methodology was then conducted using 240 barley samples from Corpoica Gene bank, harvested at three locations of Cundinamarca. Total β -glucan concentration was 1.82% and 1.29% for hullless and hulled barley genotypes respectively. The soluble β -glucans in ASF represented 16.5% and 18.6% of the total β -glucans for the hullless and hulled barley, respectively.

INTRODUCCIÓN

El β -glucano es el mayor componente de la pared celular del endospermo del grano de cebada (*Hordeum vulgare*), y sus enlaces mixtos de (1-3), (1-4)- β -D-

-glucanos, representan aproximadamente 75% del total de carbohidratos de la pared celular (1). Los β -glucanos son hidrocoloides que se diferencian de la celulosa porque su estructura está construida sobre una molécula lineal que consiste en un bloque de (1-4)- β -oligoglucosidos unidos por enlaces (1-3), los cuales contienen 70% de enlaces β (1-4) y 30% de enlaces β (1-3); además, son de menor peso molecular y tienen la tendencia a formar soluciones viscosas y pegajosas cuando se mezclan con agua (2). Las cebadas cubiertas pueden contener típicamente de 3-7% de β -glucano (3) y las cebadas desnudas hasta 16% (4). Los β -glucanos solubles son los mayores componentes de la fibra dietaria soluble, la cual está implicada en procesos de hipocolesterolemia en pollos, humanos y ratas (5). En el caso particular de las aves, éstas no tienen la capacidad enzimática propia para digerir los β -glucanos presentes en los granos de cebada, y debido a que son carbohidratos de alta viscosidad, disminuyen la accesibilidad de nutrientes esenciales a la superficie mucosa del intestino, incrementan la viscosidad del bolo digestivo y producen una reducción de la digestibilidad de los nutrientes presentes en los demás recursos alimenticios de la dieta. Además, incrementan el consumo de agua, aumentando la humedad de las excretas, dificultando de esta manera el manejo ambiental en explotaciones intensivas de carne y huevo (6).

Los análisis bioquímicos muestran que la fracción soluble ácida (FSA) en KCl-HCl, pH 1.5, de la cebada contiene carbohidratos de peso molecular alto y bajo. Los carbohidratos de peso molecular alto son principalmente β -glucanos y en menor grado, almidón y pentosanos, mientras

que los carbohidratos de bajo peso molecular son: fructosa y sacarosa, con pequeñas cantidades de glucosa, xilosa, arabinosa, maltosa y rafinosa (7). Aastrup (8), reporta variaciones genotípicas en el contenido de β -glucanos solubles extraídos en la FSA, y su concentración ha sido asociada con la calidad cervecera del grano; en este sentido, Smith (7), muestra que hasta 67% del total de β -glucano fue soluble en cebadas malteras de pobre calidad comparado con cerca del 25% presente en los granos de cebada de buena calidad. Otros estudios estiman que la distribución de los β -glucanos solubles en agua (40°C) representan 21-39% y los solubles en la FSA (25°C) representan 27-47% del total de los β -glucanos (5).

Las limitantes señaladas para el uso de cebadas en alimentación animal hacen que el principal objetivo de los programas de mejoramiento genético de granos de cebadas desnudas sea la identificación y el establecimiento de variedades con bajos niveles de β -glucanos y con altos niveles de β -glucanasas endógenas. Como se ha descrito, las cebadas son ricas en otros carbohidratos que contienen glucosa, tales como maltosacáridos, sacarosa, almidón y celulosa; en consecuencia, el método por utilizar para la cuantificación de β -glucanos debe ser rápido, altamente específico y debe permitir analizar un gran número de muestras provenientes de los diferentes programas de mejoramiento genético de cebadas cubiertas y desnudas (9).

En general, se han sugerido varias técnicas de extracción y cuantificación para la determinación de β -glucano en granos de cereales. Los principales problemas que se tienen con estos métodos son la extracción incompleta o la deficiente hidró-

lisis de los β -glucanos, la falta de pureza de β -glucanasas y la escasa disponibilidad de estándares de referencia adecuados para la calibración de métodos como el espectrofluorométrico y los basados en la viscosidad (10).

Los procedimientos de extracción no han sido satisfactorios, básicamente por las dificultades en la extracción del componente hemicelulósico. Por ejemplo, varios métodos determinan solo el β -glucano soluble en agua a 40 o 65°C; de este modo no se tienen en cuenta componentes insolubles en agua y solubles en álcali o en urea (11). La extracción acuosa a 65°C de los β -glucanos no es muy efectiva y, aunque rompe algunos enlaces covalentes cruzados con la pared celular, no rompe el enlace proteína- β -glucano, haciéndolos inaccesibles a la enzima hidrolítica (12). El tratamiento con hidrazina permite la liberación completa de β -glucanos; sin embargo, a pesar de las 40 horas de extracción y la remoción de hidrazina por diálisis (20 horas), hay pérdidas de los enlaces de los oligosacáridos.

Otros métodos que involucran precipitación con sulfato de amonio (30% p/v) no precipitan todos los β -glucanos, y la extracción en condiciones alcalinas no incrementa necesariamente la solubilidad del componente hemicelulósico (13). El método de extracción de reflujo con etanol al 80% (v/v) por 2 horas se ha usado en una primera etapa de extracción, para luego tratar los residuos con NaOH 1N y agua a 100°C para extraer los β -glucanos totales y solubles en agua respectivamente (14). El método del ácido perclórico 50 mM a 96°C por 3 minutos usado en este estudio, fue desarrollado para la extracción de almidón y de β -glucanos. Este

tratamiento inactiva enzimas endógenas y no requiere una neutralización previa a la adición del buffer de acetato de sodio, permitiendo una medición rápida y directa del β -glucano. En estas condiciones, el porcentaje de recuperación del β -glucano de una preparación purificada (Biocon-Irlanda) fue de 99,4% 3,2% (15).

Las técnicas más comúnmente empleadas para la cuantificación de β -glucanos se basan en la utilización de β -glucanasas purificadas del *Bacillus subtilis* (9) y del *Penicillium funiculosum* (16). Estas β -glucanasas han sido recomendadas para la cuantificación del β -glucano por tener una mayor efectividad en la hidrólisis de este polímero y por ser estables al calor. De otra parte, las enzimas contaminantes por lo general son termolábiles y rápidamente inactivadas. Es así como se han desarrollado métodos en los que se utiliza sólo la β -glucanasa para el fraccionamiento del polímero de β -glucano, la cual hidroliza los enlaces (1-4)- β -D-glucano a unidades más pequeñas, principalmente celobiosa y oligosacáridos (11, 13). Igualmente, se ha propuesto la inclusión de la β -glucosidasa (E.C. 3.2.1.21), la cual completa la hidrólisis del β -glucano, al actuar en el extremo no reductor de los residuos de la β -D-glucósidos liberando β -D-glucosa (9). Otros métodos son: el fluorométrico que usa óptica resplandeciente con calcoflúor (17) y un sistema de análisis de inyección de flujo continuo basado en el enlace específico del fluorocromo (calcoflúor) al β -glucano (1). De otra parte, se han desarrollado otros métodos indirectos mediante los cuales se relaciona significativa y positivamente el contenido de β -glucanos con la viscosidad de la FSA de la cebada (5).

En cualquier proceso de validación de una técnica analítica, la norma ICH3 establece los criterios para el desarrollo metodológico, que son los mismos criterios que utiliza la cGMP-GLP-GALP-ISO 9000 (18), dando como definición general de la validación, el proceso que provee la evidencia documentada de algo que hace lo que intenta hacer. El principal objetivo de validar un método es obtener productos de calidad y calidad de los datos del estudio, con el fin de desarrollar y fabricar productos tecnológicos a través de actividades de investigación y desarrollo. Para establecer el grado de confiabilidad de la técnica y el resultado se consideraron en el desarrollo de la norma los siguientes parámetros: linealidad, sensibilidad, precisión, selectividad y exactitud (19).

El objetivo del presente trabajo fue validar en el contexto del desarrollo metodológico descrito por la norma ICH3 un método de cuantificación enzimático para determinar la concentración de β -glucano en el grano de cebada, basado en la técnica desarrollada por McCleary y Glennie-Holmes, (9) y oficializado por la AOAC (20), con modificaciones en la extracción utilizando ácido perclórico 50 mM (15) y en la utilización de β -glucanasa del *Penicillium funiculosum* (E.C. 3.2.1.4) en la primera etapa de hidrólisis del polisacárido (11) y en la segunda etapa la enzima β -glucosidasa (E.C. 3.2.1.21), de almendras, la cual ha sido recomendada específicamente para la cuantificación del β -glucano del grano de cebada (9).

PARTE EXPERIMENTAL

Materiales

Equipos: espectrofotómetro Milton Roy 601 longitud de onda variable uv-vis, liofilizador 18L Lyph-lock Labconco y baño termostataado Magni Whirl 25L.

Reactivos: ácido perclórico 50 mM, acetato de sodio, ácido acético, ácido clorhídrico 1N y cloruro de potasio, R.A.

Estándares: β -glucano de cebada, SIGMA Ref. G-6513. Solución estándar de glucosa de 1000 mg/l con 0,1% de ácido benzoico como preservativo Marca SIGMA Ref. 635-100. Almidón soluble R.A marca MERCK Ref. 8543810

Enzimas: endo- β -glucanasa (celulasa, liquenasa) E.C. 3.2.1.4 SIGMA C-0901 de *Penicillium funiculosum*, β -glucosidasa E.C. 3.2.1.21 de almendras SIGMA Ref. G-4511, enzimas PGO (mezcla enzimática de glucosa-oxidasa de *Aspergillus niger* y Peroxidasa de rábano) Sigma Ref. 510-6, O-dianisidina dihidroclorada SIGMA Ref. 510-50, Takadiastasa (E.C. 3.2.1.1) tipo X-A: fungal cruda del *Aspergillus oryzae* SIGMA Ref. A6211.

Muestras de cebadas: para validar y ajustar la técnica enzimática utilizada en la determinación de la concentración de β -glucanos totales y solubles en la FSA, se tomó una muestra de cebada representativa, para evaluar la matriz.

La metodología enzimática validada y desarrollada en el presente estudio fue aplicada a 240 muestras de cebadas provenientes de las mejores líneas de cebadas cubiertas y desnudas (10 líneas cubiertas, 10 líneas desnudas) del banco de germo-

plasma de Corpoica, cosechadas en tres municipios del departamento de Cundinamarca (Bojacá, Cucunubá y Subachoque). La metodología descrita fue aplicada para cuantificar el contenido de β -glucanos totales y solubles en la FSA de la cebada.

Métodos

Método enzimático para la cuantificación del β -glucano total y soluble en la FSA del grano de cebada (figuras 1 y 2)

Fase de preparación de la muestra:

Paso 1. Para cuantificar el β -glucano total y el soluble en la FSA en el grano de cebada, la cantidad de muestra que se tomó fue de 0,25 y 0,50 g respectivamente, con una humedad aproximada de 12%. Las muestras fueron molidas en un molino Wiley, tamizadas a 1 mm y procesadas por duplicado. A cada muestra se le adicionó 1 ml de etanol al 80% v/v, se agitó en vortex, se dejó decantar por 10 min., se centrifugó a 3000 r.p.m. por 30 min., se eliminó el sobrenadante y el precipitado se secó a 80°C por una hora.

Fase de extracción de β -glucano total y soluble en la FSA:

Paso 2a. El total de β -glucano de la muestra de cebada se extrajo utilizando el método propuesto por Ahluwalia y Ellis (14), el cual se basa en la adición de 5 ml de ácido perclórico 50 mM a la muestra. En el presente estudio se modificó la temperatura y el tiempo de extracción, llevando la muestra a autoclave a 120°C por 5 minutos, luego se centrifugó a 4000 r.p.m. por 30 (min.) y se tomó el sobrenadante. Al precipitado se le adicionó 1

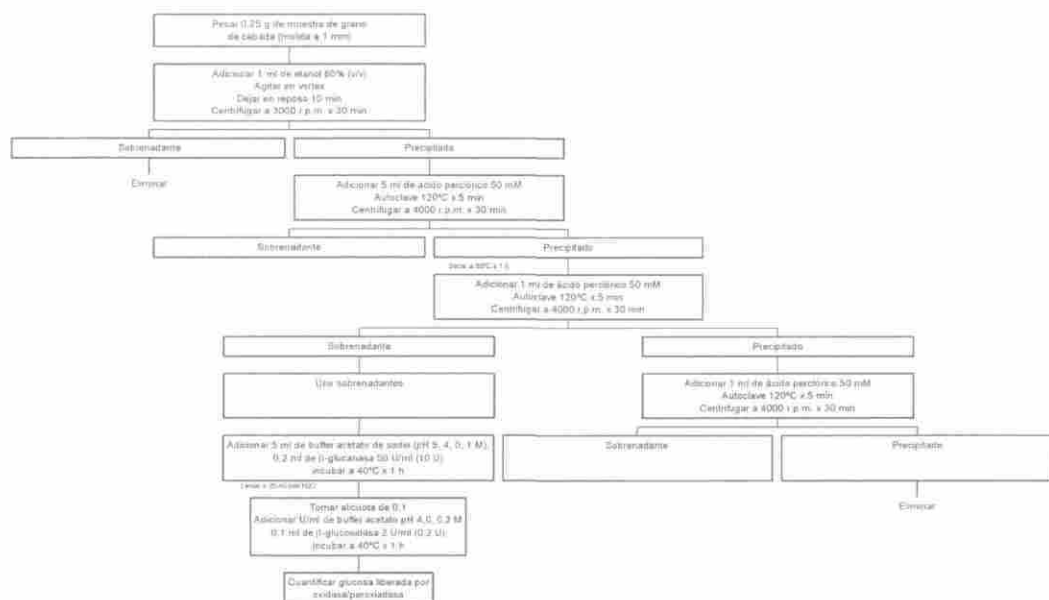


Figura 1. Método enzimático para la cuantificación de β -glucano total en grano de cebada.

ml de ácido perclórico 50 mM y se repitió el proceso de extracción. Por último se mezclaron los sobrenadantes.

Paso 2b. Los β -glucanos solubles en la FSA se extrajeron por el método propuesto por Bhatti, y col. (5), quienes utilizaron buffer ácido pH 1.5 (82,8 ml de HCl 1 N y 7,46 g de KCl). La extracción se llevó a cabo en una relación sólido-solución 1:10 p/v, se agitó en un agitador de brazo mecánico por 1 hora a temperatura ambiente, se centrifugó a 5000 r.p.m. por 30 min., se tomó el sobrenadante y se neutralizó con 0,2 ml de bicarbonato de sodio en relación 5% p/v, para evitar hidrólisis. Éste se congeló a -70°C por 48 horas, liofilizándolo durante 48 horas. En este punto se continuó con la extracción con ácido perclórico 50 mM como el paso 2a.

Fase de hidrólisis enzimática:

Paso 3. A los sobrenadantes del paso 2a y 2b se les adicionó 5 ml de buffer acetato de sodio (pH 5,4, 0,1 M) más 10 unidades (0,2 ml) de β -glucanasa (50 U/ml), disuelta en buffer acetato de sodio (pH 5,4, 0,1 M), se incubó a 40°C por una hora. Para determinar el total de β -glucanos, se ajustó a un volumen de 25 ml con agua destilada, mientras que para los β -glucanos solubles en la FSA, se ajustó a un volumen de 10 ml (16).

Paso 4. De la solución obtenida en el paso 3, se tomó una alícuota de 0,1 ml y se adicionó 0,1 ml de buffer acetato (pH 4,0, 0,2 M) más 0,2 unidades (0,1 ml) de β -glucosidasa (2 U/ml) disuelta en buffer



Figura 2. Método enzimático para la cuantificación de β -glucano soluble en la FSA del grano de cebada.

de acetato de sodio (pH 4,0, 0,2 M) y se incubó a 40°C por 15 min.

Fase de cuantificación de glucosa libre:

Paso 5. La concentración de glucosa de la solución obtenida en el paso 4 se determinó por el método glucosa oxidasa/peroxidasa, y la lectura se realizó a 475 nm (21).

Metodologías básicas

Determinación del total de carbohidratos: se empleó el método de antrona, ajustado a la modificación propuesta por McCleary y Glennie-Holmes (9).

Determinación de azúcares reductores: para determinación de azúcares reductores se utilizó la metodología de Nelson/Somogyi usando la modificación sugerida por McCleary y Glennie-Holmes (9).

Determinación de glucosa libre: se utilizó el método de Trinder, con la modificación reportada McCleary y Glennie-Holmes (9), que consiste en tomar 3,0 ml del reactivo de oxidasa/peroxidasa, la incubación se realizó a 40°C por 20 min.

Metodologías para la validación de la técnica enzimática de cuantificación de β -glucanos

Linealidad: "Se refiere a la proporcionalidad entre la concentración del analito y su respuesta, sirve para determinar además el rango lineal y a partir de este la concentración mínima y máxima del analito, a la cual es aplicable la medida" (19).

Para este estudio se generó una curva estándar de glucosa en un rango de 0 a 10 $\mu\text{g/ml}$ a partir del patrón de glucosa puro (1000 mg/l), seguido del procedimiento de oxidasa/peroxidasa vs. absorbancia (475 nm), permitiendo cuantificar el contenido de β -glucanos como equivalentes de glucosa; esta curva se asocia con la sensibilidad (límites de detección y cuantificación del método) y precisión (error estándar relativo del método), evaluando la respuesta de la glucosa, estableciéndose el intervalo máximo y mínimo de concentración del analito en un rango de 0 a 10% de β -glucano en la matriz, en la cual se validó el método.

Sensibilidad: "Hace referencia a la mínima cantidad de analito que puede producir un resultado significativo" (19). Los parámetros que se definieron para evaluar la sensibilidad de este método

fueron los límites de detección y los límites de cuantificación. El límite de detección (LD) se basa en la relación señal-ruido, con lo cual se establece la mínima concentración del analito que puede ser detectado; su determinación se estima a tres desviaciones estándar del blanco (relación señal-ruido 3:1). El límite de cuantificación (LC) se basa en la relación señal-ruido y establece como la mínima concentración del analito que puede cuantificarse con exactitud y precisión razona-

bles en las condiciones establecidas y se expresa también en unidades de concentración, efectuándose mediciones repetidas sobre el blanco, se mide su desviación estándar y se estima a diez desviaciones estándar del blanco (relación señal-ruido 10:1). Los límites de detección y cuantificación se estimaron a partir de la pendiente de la curva de calibración y del intercepto obtenido por extrapolación a concentración cero (intercepto), utilizando las siguientes ecuaciones:

$$LD = \frac{Yb1 + 3Sb1}{b}$$

Donde:

b = Pendiente de curva de calibración

Yb1 = Intercepto de curva de calibración obtenida a partir de tomar 3 puntos por triplicado de las menores concentraciones de analito (0,4, 1 y 2) vs. Absorbancia (475 nm).

$$LC = \frac{Yb1 + Sb1}{b}$$

Sb1 = Intercepto de curva de calibración obtenida a partir de la desviación estándar de cada punto vs. Concentración de glucosa ($\mu\text{g/ml}$).

Precisión: "Está relacionada con la dispersión de las medidas alrededor de su valor medio o central y corresponde al grado de concordancia entre ensayos individuales, cuando el método se aplica repetidamente a múltiples alícuotas de una muestra homogénea" (19). La precisión se expresa matemáticamente como la desviación estándar; se determinó la influencia de los diferentes pasos a los que se ve sometido el β -glucano, mediante 5 lecturas obtenidas a 4 niveles de concentración (4, 6, 8 y 10 g/ml) del estándar de glucosa y se cuantificó por el método de glucosa oxidasa/peroxidasa.

Selectividad: "Se refiere a la propiedad del método de producir una señal medible debida sólo a la presencia del analito, libre de interferencia de otros componentes en la matriz de la muestra" (19). Se evaluó independientemente: a) la

interferencia que pudiera causar el almidón presente en la cebada conjuntamente con los β -glucanos, b) la posible interferencia causada por la acción de α -amilasa contaminante de las enzimas empleadas en la técnica (β -glucanasa y β -glucosidasa) y la α -amilasa endógena presente en el grano de cebada.

a) *Interferencia del almidón:* se prepararon diferentes concentraciones de almidón soluble (0, 50, 75 y 100 $\mu\text{g/ml}$) disueltas en buffer acetato de sodio 20 mM (pH = 5,4). Luego se continuó con la metodología dada en los pasos 3, 4 y 5 para la cuantificación de β -glucanos.

b) *Interferencia de la amilasa:* para evaluar la acción posible de la α -amilasa, se empleó una preparación comercial impura llamada takadiastasa sobre el patrón

de β -glucano, la cual es una preparación enzimática obtenida del *Aspergillus Oryzae* con actividad α -amilasa, oligo 1-6 glucosidasa, invertasa, maltasa, y posiblemente melibiasa, preparándose una solución de β -glucano al 0,1% en buffer de acetato de sodio 20 mM (pH = 5,4). Una alícuota de 0,5 ml se llevó a 10 ml, incubándose con diferentes cantidades de takadiastasa (5, 10, 20 y 50 U) a 40°C por una hora; se tomó una alícuota de 0,1 ml para determinar la concentración de azúcares reductores liberados por el método Nelson/Somogyi, y el porcentaje de hidrólisis sobre el β -glucano se calculó por interpolación en la curva de calibración generada.

- *Exactitud*: "La exactitud del método corresponde a la diferencia del valor obtenido y el valor verdadero" (19). En este caso se hizo necesario evaluar la pureza del patrón de β -glucano, el grado de hidrólisis de las enzimas y el porcentaje de recuperación del estándar en la matriz para establecer un factor de corrección que indique la recuperación del analito, al final del proceso de cuantificación.

- *Pureza del patrón de β -glucano*: el patrón de β -glucano comercial se almacenó en un desecador con sílica gel por 24 horas y luego se tomó una muestra de 50 mg de β -glucano, la cual se humedeció con 1 ml de etanol al 80% v/v, se dejó por 10 min en reposo y se secó, luego se disolvió en 20 ml de buffer acetato de sodio 20 mM (pH = 5,4). Se adicionaron 10 unidades de β -glucanasa (0,2 ml de una solución de 50 U/ml) y se incubó a 40°C por 1 hora. El volumen se ajustó a 100 ml y se tomó por duplicado una alícuota de 0,1 ml. Una alícuota se trató con 0,2 unidades de β -glucosidasa (buffer acetato de

sodio 0,2 M (pH = 4,0) y se incubó a 40°C por 15 minutos. La glucosa liberada se midió con el procedimiento de oxidasa/peroxidasa utilizando una curva de calibración de 0, 2,5, 5,0, 7,5 y 10,0 g/ml de glucosa vs absorbancia (475 nm). A la otra alícuota de 0,1 ml se le determinó el contenido de carbohidratos totales, por el procedimiento de antrona, utilizando una curva de calibración de 0, 25, 50, 75 y 100 g/ml de glucosa vs absorbancia (610 nm).

- *Grado de hidrólisis con la β -glucanasa*: se evaluó la cantidad de β -glucanasa requerida de acuerdo con la concentración del analito en la matriz. Para esto, se preparó una solución de β -glucano (100 ml, 1%) en un buffer de acetato de sodio 20 mM (pH = 5,4), se incubó con diferentes cantidades de β -glucanasa (5, 10, 20 y 50 U), a 40°C por una hora, y se removió una alícuota de 20 ml de cada una, se incubaron a 100°C por 10 min. Una alícuota de 0,2 ml se diluyó 10 veces. De esta solución diluida se tomó una alícuota de 0,1 ml para la determinación de azúcares reductores (Nelson/Somogyi). Para determinar el grado de hidrólisis de la β -glucanasa se dividió el nivel de azúcares reductores por el total de carbohidratos y se expresó en porcentaje.

- *Grado de hidrólisis con la β -glucosidasa*: los niveles de β -glucosidasa requeridos para cuantificar el grado de hidrólisis del β -glucano en las cebadas se determinaron variando los niveles de β -glucosidasa a una concentración constante de β -glucano (1%). Se tomaron de la solución tratada con 10 U de β -glucanasa cuatro alícuotas de 0,1 ml, se incubaron con diferentes cantidades de β -glucosidasa (0,1, 0,2, 0,3 y 0,5 U), a 40°C por 15 min, y se determi-

nó la glucosa liberada por el método de glucosa oxidasa/peroxidasa. El porcentaje de hidrólisis sobre el β -glucano se calculó por interpolación en la curva de calibración generada.

– *Porcentaje de recuperación del β -glucano en la matriz (grano de cebada)*: para establecer el efecto que causa la matriz en la cuantificación y recuperación del analito en el proceso de extracción ácida (ácido perclórico 50 mM) e hidrólisis enzimática, se adicionaron diferentes niveles (0,99, 1,61 y 2,86%) del patrón de β -glucano a una muestra de cebada en la que se conocía previamente el contenido de β -glucano (2,45%). La muestra se sometió al procedimiento estándar de determinación de β -glucano y se estableció la relación del nivel adicionado del patrón de β -glucano, con la concentración de β -glucano obtenido en las muestras.

En la figura 3, se presenta un resumen de los parámetros y las metodologías que se han tenido en cuenta para validar la técnica analítica de cuantificación de β -glucanos en el grano de cebada.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Linealidad: El reactivo o-diadisisina utilizado en este estudio, varió en la intensidad del color (de incoloro a rosado), lo cual estuvo asociado con el tiempo de preparación. Este reactivo debe disolverse en agua destilada una vez abierto y no es posible su preparación diaria. En consecuencia fue necesario evaluar el efecto del tiempo de preparación sobre el aumento de la lectura por oxidación parcial del reactivo. En este sentido, se consideraron seis curvas de calibración de glucosa oscilando la lectura del blanco de reac-

tivos entre 0,001 de absorbancia en el primer día de preparación a 0,053 de absorbancia a los 30 días de preparación. Las comparaciones de interceptos y pendientes de las curvas, de la regresión combinada y de la regresión total se observan en la tabla 1. El análisis de las pendientes muestra que no hubo diferencias significativas ($P > 0,05$) entre las diferentes pendientes $F_{5,22}$: tabulado: 3,22; calculado: 1,61; así como cuando se analizaron los interceptos $F_{5,25}$: tabulado: 3,13; calculado: 0,021.

En consecuencia, se combinaron las diferentes curvas y se obtuvo una ecuación final de calibración de glucosa. Los resultados indicaron que en un rango de lectura de 0 a 10 μg glucosa/ml, se obtuvo una relación de tipo lineal entre la concentración de glucosa y la absorbancia (475 nm) (ecuación 1). El límite de confianza al 95% para la pendiente fue de $0,0359 \leq b \leq 0,0384$, y el nivel de confianza del intercepto fue $0,0297 \leq a \leq 0,0496$.

$$\text{Ecuación 1. } Y = 0,0372(\pm 0,0006) x + 0,0397(\pm 0,0049) \quad R^2 = 0,98 \quad n = 34 \quad \text{RSD} = 0,0196$$

Sensibilidad: A partir de las ecuaciones 2a y 2b, como se mencionó en la metodología, se estableció que el límite de detección del β -glucano fue de 1,41 μg glucosa/ml y el límite de cuantificación de 1,66 μg glucosa/ml. Esta técnica enzimática muestra una sensibilidad que permite analizar muestras que contienen baja concentración de β -glucanos.

$$\text{Ecuación 2a. } Y = 0,041(\pm 0,0075) x + 0,0519(\pm 0,0098) \quad R^2 = 0,984 \quad n = 9 \quad \text{RSD} = 0,0060$$

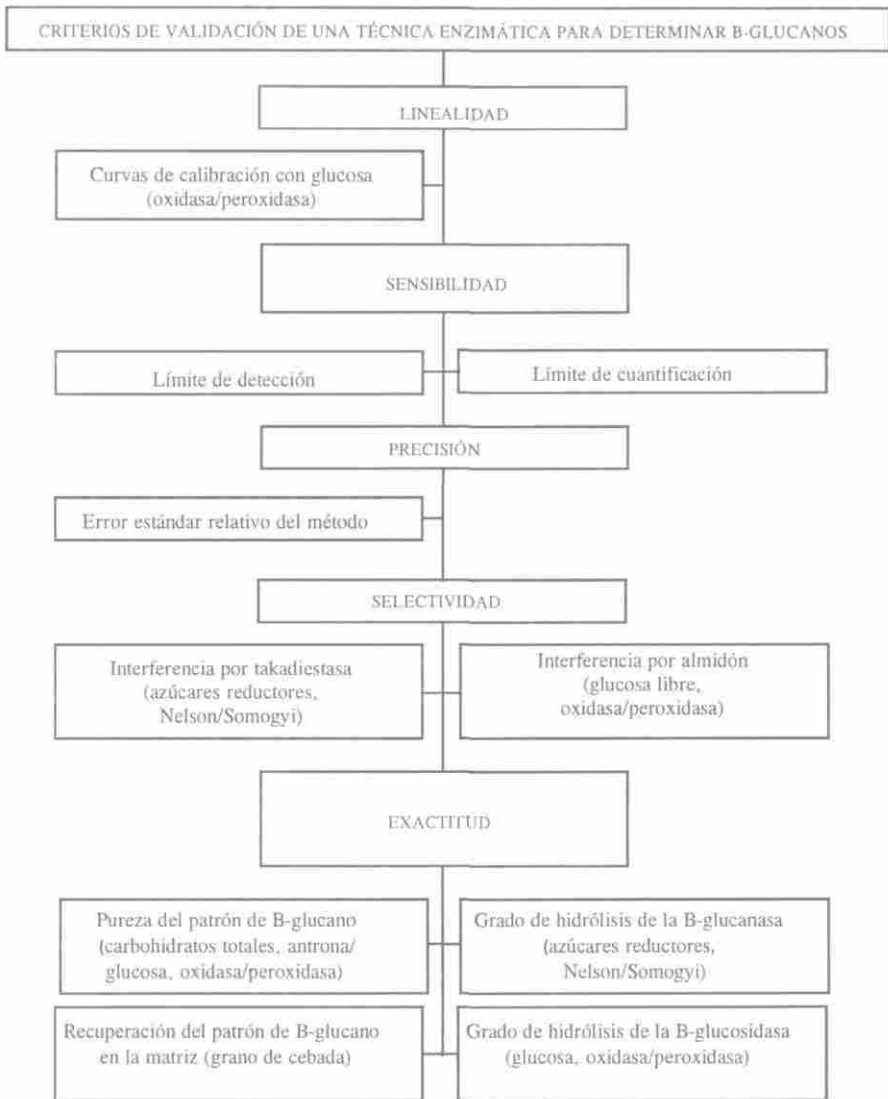


Figura 3. Diagrama de flujo para ajuste y validación de la técnica analítica para cuantificación de β -glucanos en el grano de cebada.

Ecuación 2b. $Y = 0,0102(\pm 0,008) x + 0,0014(\pm 0,0001)$ $R^2 = 0,594$ $n = 9$
 $RSD = 0,0096$

Precisión: Para los niveles analizados 4, 6, 8 y 10 μg glucosa/ml, la desviación

estándar fue: 0,017, 0,019, 0,013 y 0,022, respectivamente. Los diferentes estudios en granos de cebada demuestran escenarios contrastantes cuando se analiza este parámetro, por ejemplo, el método descrito por Henry (22), obtuvo una

Tabla 1. Evaluación de pendientes e interceptos de las seis curvas de calibración de glucosa.

	ΣX^2	ΣXY	ΣY^2	b	Residuales	GI residual
Regresión 1	121.2	6.023	0.3119	0.0413	0.01155	4
Regresión 2	220.0	10.102	0.4658	0.0417	0.00196	4
Regresión 3	220.0	9.348	0.3994	0.0383	0.00221	4
Regresión 4	220.0	9.129	0.3811	0.0372	0.00227	4
Regresión 5	121.0	5.406	0.2429	0.0421	0.00143	3
Regresión 6	121.0	5.336	0.2363	0.0421	0.00100	3
Pool de la regresión	--	--	--	--	0.02447	22
Regresión común	1023.16	45.345	2.0376	0.0443	0.02793	25
Regresión total	1023.16	45.345	2.0376	--	0.02805	32

desviación estándar de 0,033 y 0,016 en las variedades Clipper y Grimmatt, respectivamente, mientras que el método descrito por Ahluwalia y Ellis (15), que es reproducible y preciso en la hidrólisis enzimática del β -glucano, muestra una desviación estándar para 5 variedades de cebadas y malta de 0,19 y 0,24, respectivamente.

Selectividad: La selectividad permitió medir la interferencia del almidón como principal polisacárido de la cebada por la acción hidrolítica de las enzimas utilizadas en el proceso, sobre niveles de almidón 10 veces más altos de los que se podría encontrar en la matriz como β -glucano. Los datos muestran que ni la

β -glucanasa cruda, ni la β -glucosidasa presentaron acción hidrolítica sobre el almidón (tabla 2).

En el caso de la interferencia por actividad enzimática endógena o contaminante en las enzimas utilizadas, se determinó que la actividad hidrolítica de la takadiastasa sobre el patrón de β -glucano fue menor de 0,01 % (tabla 3), confirmando los resultados obtenidos por McCleary y Glennie-Holmes (9), quienes evaluaron el grado de interferencia de la amiloglucosidasa, maltasa e invertasa con niveles de 0,001, 0,01 y 0,3 %, respectivamente. Estos resultados muestran la especificidad del método para medir la concentra-

Tabla 2. Grado de interferencia del almidón por acción de las enzimas glucanasa/ β -glucosidasa.

Almidón (ug/ml) final	Absorbancia*	% almidón detectado por la acción enzimática (β -glucanasa/ β -glucosidasa)
50	0.126	0.00000
75	0.128	0.00000
100	0.137	0.00001

* Blanco = 0.126.

ción de β -glucanos presentes en el grano de la cebada.

Exactitud: La exactitud del método se evaluó a través de la pureza del patrón del β -glucano, el grado de hidrólisis de las enzimas utilizadas y porcentaje de recuperación del estándar en la matriz.

Tabla 3. Grado de hidrólisis de la takadiastasa sobre el patrón β -glucano.

Unidades de takadiastasa	Absorbancia*	Hidrólisis promedio %
5	0.020	0.000
10	0.021	0.001
20	0.020	0.000
50	0.020	0.000

* Blanco takadiastasa = 0,02; blanco β -glucano = 0,018

Pureza del patrón de β -glucano: En la determinación de la pureza del β -glucano como primer paso se cuantificó el contenido total de carbohidratos a través de la ecuación 3, generada de la curva de calibración obtenida por el método de antro-na, estableciéndose que la concentración de carbohidratos totales del patrón de β -glucano fue de 92,28%.

Ecuación 3. $Y = 0,006(\pm 0,0003) x + 0,051(\pm 0,0326)$ $R^2 = 0,99$ $n = 6$
RSD = 0,0557

Como segundo paso, se cuantificó el contenido de β -glucano en el patrón a través del método enzimático de oxidasa/peroxidasa. Se determinó que la concentración de β -glucano en el patrón fue de 75,77%. Utilizando la relación de total de β -glucano sobre el total de carbohidratos, se estableció que la pureza del patrón de

β -glucano utilizado fue de 82,10%, confirmando los resultados obtenidos por McCleary y Glennie-Holmes (9), quienes obtuvieron una pureza del 84%.

Poder de hidrólisis con las enzimas utilizadas

β -glucanasa: El poder de hidrólisis para los niveles 5, 10 y 20 U de β -glucanasa (E.C. 3.2.1.4) fue de 25,8, 28,4 y 28,1%, respectivamente (tabla 4). Incrementos mayores de niveles de β -glucanasa (50 U) muestran una hidrólisis de 6,25% restando la absorbancia que corresponde al blanco de β -glucanasa con 50 U que fue de 0,292.

Por lo anterior, se determinó que para asegurar la máxima hidrólisis de los β -glucanos se debería utilizar 10 U. Estos resultados fueron similares a los obtenidos por McCleary y Glennie-Holmes (9). Henry (22), utilizó un exceso de β -glucanasa para hidrolizar todo el β -glucano de la muestra en 1 hora de incubación y lo complementó usando comparativamente grandes cantidades de enzima en una muestra pequeña. Sin embargo, la hidrólisis por 4 horas no incrementó la cantidad de azúcares reductores producidos. Los resultados del presente estudio muestran que el porcentaje de hidrólisis del β -glucano utilizando 10U de β -glucanasa fue de 34,41%. Si se tiene en cuenta que el patrón de β -glucano sólo contiene 82,10% de β -glucanos, el porcentaje de hidrólisis fue de 41,91%. La actividad hidrolítica de la β -glucanasa no es completa a glucosa, por ser una endo-enzima

que sólo logra hidrolizar los enlaces (1,4) en el β -glucano que también contiene enlaces (1,3); por tanto, el uso de sólo esta enzima no es tan efectiva para la hidrólisis del β -glucano de la cebada, por esta razón se utilizó una segunda enzima (β -glucosidasa) con el objeto de estimar la concentración del β -glucano en el grano de cebada (9).

Tabla 4. Adición de β -glucanasa y efecto sobre la hidrólisis del patrón de β -glucano.

Unidades de β -glucanasa	Absorbancia*	Hidrólisis promedia %
5	0.409	25.81
10	0.418	28.37
20	0.417	28.09

* Blanco β -glucano = 0.016.

β -glucosidasa: El grado de hidrólisis para los niveles 0,1, 0,2 y 0,3 U de β -glucosidasa (E.C. 3.2.1.21) fue de 57,5%, 66,0% y 65,23%, respectivamente (tabla 5). Al adicionar 0,5 unidades de β -glucosidasa se observó que la lectura del blanco fue de 0,280; si se resta esta absorbancia, el porcentaje de hidrólisis fue de 49,73%. Por tanto se estimó que para asegurar la máxima hidrólisis a glucosa libre se utilizarían 0,2 U de β -glucosidasa, resultado que fue similar al obtenido por McCleary y Glennie-Holmes (9). Si consideramos que dicho patrón contiene 82% de β -glucanos, el porcentaje de hidrólisis del β -glucano producido por las dos enzimas fue de 80,5%.

Recuperación del patrón β -glucano en la matriz: el nivel de glucosa libre presente en el grano de cebada mostró una concentración cercana a 1%, confirmando los resultados obtenidos por McCleary y Glennie-Holmes (9). Sin embargo, para eliminar posibles errores en la cuantificación de los β -glucanos, la muestra de cebada fue tratada con etanol a 80% v/v teni-

niendo en cuenta que los di y monosacáridos son solubles en esta solución, mientras que los polisacáridos son insolubles. De otra parte, las enzimas endógenas también son inactivadas parcialmente durante el secado de las muestras y totalmente cuando son tratadas con una solución etanólica, la cual desnaturaliza las enzimas inhibiendo su actividad bio-

lógica. Bhatti y col. (5) obtuvieron altos valores de β -glucanos por la presencia de azúcares reductores endógenos.

Los resultados del presente estudio muestran que el porcentaje de recuperación del patrón de β -glucano puro fue de 98,5% teniendo en cuenta la corrección del poder de hidrólisis de las enzimas y la pureza del patrón de β -glucano. Estos re-

Tabla 5. Adición de la β -glucosidasa y su efecto sobre el patrón de hidrólisis del β -glucano a una concentración del 1%.

Unidades de β -glucosidasa	Absorbancia*	Hidrólisis promedia %
0,1	0,540	57,5
0,2	0,579	66,0
0,3	0,575	65,2

* Blanco β -glucano = 0.009.

sultados son similares a los obtenidos por Ahluwalia y Ellis (15), quienes reportaron porcentajes de recuperación del β -glucano del BIOCON (Irlanda) de 99,4%, mientras que McCleary y Glen-

centaje total de recuperación fue de 96,0% y 98,7%, respectivamente.

Aplicación de la metodología enzimática: En este estudio el nivel de β -glucanos

Tabla 6. Porcentaje de recuperación del β -glucano en el patrón y en la matriz.

Muestra	β -glucano adicionado %	β -glucano total %	β -glucano recuperado en la matriz %	Recuperación del patrón de β -glucano en la matriz %
Cebada L4	0	2,45	-	-
Patrón β -glucano	2,01	2,01	1,98	98,5
Cebada L4+ β -g1	0,99	3,44	3,31	96,2
Cebada L4+ β -g2	1,61	4,06	3,42	84,2
Cebada L4+ β -g3	2,86	5,31	4,26	80,2

nie-Holmes (9), con extracción acuosa, reportaron la recuperación del β -glucano de 99%.

El efecto de la matriz en la recuperación del analito fue observado cuando se adicionó 0,99%, 1,61% y 2,86% de β -glucano a una muestra de cebada y se obtuvo una recuperación del analito de 96,2, 84,2 y 80,2%, respectivamente (tabla 6); el menor porcentaje de recuperación al incrementar el contenido de β -glucano en la matriz puede ser causado por la saturación del sustrato sobre la enzima para las condiciones de hidrólisis establecidas. Por lo anterior, se sugiere que el contenido de analito en la matriz al momento de la extracción con ácido perclórico (50 mM) no debe ser superior a 34,4 mg/g muestra. Sin embargo, en un estudio realizado por McCleary y Glennie-Holmes (9) se señala que harinas estándares que contenían 2 y 4,5% de β -glucano fueron preparadas y analizadas, y el por-

centaje total de recuperación fue de 96,0% y 98,7%, respectivamente. *Aplicación de la metodología enzimática:* En este estudio el nivel de β -glucanos totales fue de 1,82% y 1,29% para las cebadas desnudas y cubiertas, respectivamente (tabla 7); son resultados similares a los reportados por Bhatti (23) con 1,7%, Bru-fau (24) con 1,8%, Francesh (25) con 2,5%, e inferiores a los reportados por Newman y Newman (26) con 5,8%, Villamide (27) con 3,9% y Yu (28) con 3,7%. Esta variación en los datos no sólo es debida al método empleado, sino que puede estar asociada con el genotipo de la cebada y factores ambientales relacionados con el crecimiento del grano (tiempo, localización geográfica). Los β -glucanos solubles de la FSA representaron 16,5% y 18,6% del β -glucano total de los granos desnudos y cubiertos, respectivamente (tabla 7). Aman y Graham (3) encontraron que cuando los β -glucanos de la muestra se extraen a 38°C, se solubilizan más β -glucanos que cuando se extraen con buffer pH = 1,5; igualmente reportaron que la cebada contiene en promedio 4,4% de β -glucano total y 2,4% (55%) de β -glucano soluble a 38°C. De otra parte, Carr y col. (14) extra-

Tabla 7. Concentración de β -glucano total y β -glucano soluble en la FSA de granos de cebada cosechados en tres municipios del departamento de Cundinamarca.

Tipo de cebada	Bojacá	Cucunubá	Subachoque	Promedio
β-glucano total (%)				
Desnuda	1,50 ^{Ba}	1,69 ^{Bb}	2,28 ^{Bc}	1,82 ^B
Cubierta	1,20 ^{Aa}	1,19 ^{Aa}	1,49 ^{Ab}	1,29 ^A
Promedio	1,35 ^a	1,44 ^b	1,89 ^c	--
β-glucano soluble en la FSA del grano (%)				
Desnuda	0,18 ^{Aa}	0,29 ^{Bb}	0,42 ^{Bc}	0,30 ^B
Cubierta	0,19 ^{Aa}	0,23 ^{Ab}	0,29 ^{Ac}	0,24 ^A
Promedio	0,19 ^a	0,26 ^b	0,35 ^c	--

Valores promedios en columnas con letras mayúsculas diferentes presentan diferencias significativas entre tipos ($P < 0,05$).

Valores promedios en filas con letras minúsculas diferentes presentan diferencias significativas entre localidades ($P < 0,05$).

jeron los β -glucanos solubles a 100°C, encontrando un rango de 0,49-3,9% de β -glucanos solubles y un total de β -glucanos de 0,58-8,86%. McCleary y Glenie-Holmes (9) reportaron una variación en el contenido de β -glucano total y soluble en el grano de cebada de 3,8-4,8% y 1-1,6%, respectivamente.

CONCLUSIONES

Las principales características de la técnica enzimática para la determinación de β -glucanos totales y solubles en la FSA del grano de cebada fueron: a) porcentaje de hidrólisis de las enzimas utilizadas: 80,5%; b) correlación entre la concentración de glucosa y la absorbancia (475 nm) en un rango de 0-16 μ g glucosa/ml: 0,98; c) límite de cuantificación: 1,66 μ g glucosa/ml y límite de detección: 1,41 μ g glucosa/ml; d) la α -amilasa y el almidón no fueron interferentes en el método; e) la recuperación del analito en la matriz fue:

96,2% al nivel de 3,44% de β -glucano en la muestra.

En este estudio se observó que, independientemente del ajuste y validación de la técnica con modificaciones en la extracción e hidrólisis del β -glucano de acuerdo con la norma ICH3, la concentración de β -glucano obtenida en cebadas cubiertas y desnudas fue baja, lo cual es fundamental para los grupos de mejoramiento del grano de cebada y para su inclusión en procesos de alimentación humana y animal.

BIBLIOGRAFÍA

- Sendra, J. M. and Carbonell, J. (1989). Determination of β -glucan in wort and beer by its binding with calcofluor, using a fluorometric flow-injection-analysis (FIA) method. *J. Inst. Brew.* **95** 327.

2. Stone, B. A. (1984). Noncellulosic β -glucans in cell wall. In: Structure, function and biosynthesis of plant cell walls. *Proceedings of the Seventh Annual Symposium in Botany*. p. 52.
3. Aman, P. and Graham, H. (1987). Analysis of total and insoluble mixed-linked (1-3),(1-4)- β -glucans in barley and oats. *J. Agric. Food Chem.* **35** (5) 704.
4. Newman, R. K.; Lewis, S. E.; Newman, C. W.; Bork, R. J. and Rannage, R. T. (1989). Hypocholesterolemic effect of barley foods on healthy men. *Nutr. Rep. Int.* **39** 749.
5. Bhatti, R. S.; Mc Gregor, A. W. and Rossnagel, B. G. (1991). Total and acid soluble β -glucan content of hullless barley and its relationship to acid extract viscosity. *Cereal Chem.* **68** (3) 221.
6. Antoniou, T. C. and Marquardt, R. R. (1982). The utilization of rye by growing chicks as influence by autoclave treatment, water extraction and water soaking. *Poultry Sci.* **62** (1) 91.
7. Smith, D. B.; Morgan, A. G. and S. Aastrup, A.. (1980). Variation in the biochemistry composition of acid extracts from barley of contrasting malting quality. *J. Inst. Brew.* **86** 277.
8. Aastrup, S. (1979). The relationship between the viscosity of an acid flour extract of barley and its β -glucan content. *Carlsberg Res. Commun.* **44** 289.
9. McCleary, B. V. and Glennie, H. M. (1985). Enzymatic quantification of (1-3),(1-4)- β -D-glucan in barley and malt. *J. Inst. Brew.* **91** 285.
10. Wood, P. J.; Weiz, J. and Blackwell, B. (1991). Molecular characterization of cereal β -Dglucan. Structural analysis of oat β -D β -glucan and rapid structural evaluation of β -D-glucans from different sources by high-performance liquid chromatography of oligosaccharides released by lichenase. *Cereal Chem.* **68** (1) 31.
11. Bamforth, C. W. (1982). Barley β -glucans, their role in malting and brewing. *Brew. Dig.* **57** (1) 22.
12. Forrest, J. S.; Wainwright, T. and Lewis, B. A. (1977). The mode of binding of β -glucans and pentosans in barley endosperm cell walls. *J. Inst. Brew.* **83** 279.
13. Bass, E. J. and Meredith, W. O. S. (1955). Enzymes that degrade barley gums III. Studies of β -polyglucosidases of green malt. *Cereal Chem.* **32** (4) 374.
14. Carr, J. M.; Glatter, S.; Jeraci, J. L. and Lewis, B. A. (1990). Enzymatic determination of β -glucan in cereal base food products. *Cereal Chem.* **67**. (3) 226.
15. Ahluwalia, B. and Ellis, E. E. (1984). A rapid and simple method for the determination of starch and β -glucan barley and malt. *J. Inst. Brew.* **90** 254.
16. Bamforth, C. W. (1983). *Penicillium funiculosum* as a source of soluble β -glucanase for the estimation of barley β -glucan *J. Inst. Brew.* **89** 391.

- of barley β -glucan *J. Inst. Brew.* **89** 391.
17. Wood, P. J. and Weaiz, J. (1984). Use of calcofluor in analysis of oat β -glucan. *Cereal Chem.* **61** (1) 73.
18. International Organization for Standardization ISO 9000, Case postdate 56, CH-1211 Geneva, Switzerland, and other national standards organizations.
19. Quattrocchi, O. A.; Albelaira, S. I. and Laba, R. F. (1992). *Introducción a la HPLC. Aplicación y práctica*, Artes Gráficas Farro S.A., p. 301.
20. Association of Official Analytical Chemists, AOAC. (1995). Official Methods of Analysis. Cereal foods. Chapter 32.2.06. p. 25.
21. Kunst, A. (1984). In: Method Enzymology Analytical (Bergmeyer, ed.). **178**.
22. Henry, R. J. (1984). A simplified enzymatic method for the determination of (1-3),(1-4)- β -glucans in barley. *J. Inst. Brew.* **90** 178.
23. Bhatti, R. S. (1996). Production of food malt from hull-less barley. *Cereal Chem.* **73** (1) 75.
24. Brufau, J. (1989). La cebada como materia prima para piensos. En: *La Cebada*, Ed. Molina J. L. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. pp. 215-233.
25. Francesh, M.; Pérez-Vendrell, A. M.; Gracia, E. and Brufau, J. (1991). Prediction of metabolizable energy of Spanish barley's from chemical and physical characteristics. Department of Nutrition Animal. Institute de Recerca Tecnologia Agroalimentaries, Spain.
26. Newman, R. K. and Newman, C. W. (1991). Barley as a food grain. *Am. Asso. Cereal Chem.* **36** 800.
27. Villemide, M. J.; Fuente, J. M. Pérez, P. and Flores, A. 1997. Energy evaluation of eight barley cultivars for poultry: Effect of dietary enzyme addition. *Poultry Sci.* **76** (6) 834.
28. Yu, B.; Hsu, J. C. and Chiou, P. W. S. (1998). Effects of β -glucanase supplementation of barley diets on growth performance of broiler. *Anim. Feed Sci. Technol.* **70** (4) 353.