



UNIDAD IZTAPALAPA

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Departamento de Biotecnología

**ESTUDIO DE LA DEXTRINIZACIÓN Y SACARIFICACIÓN DEL ALMIDÓN DEL GRANO
DE AMARANTO (*Amaranthus hypochondriacus* L.) PARA LA PRODUCCIÓN DE
JARABE DE GLUCOSA.**

T E S I S

Para Obtener el grado de

Maestra en Biotecnología

P R E S E N T A:

E.B. Nayeli Barrón Álvarez

Director:

Dr. Jorge Soriano Santos.

MEXICO, D.F. 2017

“La Maestría en biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluida en el Padrón Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del Conacyt, con la referencia 001465”

Este trabajo contó con el apoyo del Conacyt a través de la beca 300456

El H. Jurado designado por la
División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa
Aprobó la tesis

**“Estudio de la dextrinización y sacarificación del almidón del grano de amaranto
(*Amaranthus hypochondriacus* L.) para la producción de jarabe de glucosa”**

Que presenta

E en B. Nayeli Barrón Álvarez

Comité Tutorial:

Director: Dr. Jorge Soriano Santos

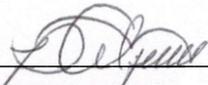
Asesor: Dra. Edith Ponce Alquicira

Asesor: Dra. Ruth Pedroza Islas

Jurado:

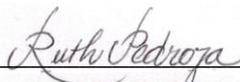
Presidente:

Dra. Edith Ponce Alquicira



Secretario:

Dra. Ruth Pedroza Islas



Vocal:

Dr. Ramón Verde Calvo



Vocal:

Dra. Deni Nava Arenas



México, D. F., a 23 de Febrero del 2017



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00283
Matrícula: 2133804352

ESTUDIO DE LA DEXTRINIZACIÓN Y SACARIFICACIÓN DEL ALMIDÓN DEL GRANO DE AMARANTO (*Amaranthus hypochondriacus* L.) PARA LA PRODUCCIÓN DE JARABES DE GLUCOSA

En la Ciudad de México, se presentaron a las 12:00 horas del día 23 del mes de febrero del año 2017 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

- DRA. EDITH PONCE ALQUICIRA
- DR. JOSE RAMON VERDE CALVO
- DRA. DENI NAVA ARENAS
- DRA. RUTH PEDROZA ISLAS



NAYELI BARRON ALVAREZ
ALUMNA

Bajo la Presidencia de la primera y con carácter de Secretaria la última, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRA EN BIOTECNOLOGIA
DE: NAYELI BARRON ALVAREZ

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

aprobar

REVISÓ

LIC. JULIO CESAR DE LARA ISASSI
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

Acto continuo, la presidenta del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS

DRA. EDITH PONCE ALQUICIRA

PRESIDENTA

DRA. EDITH PONCE ALQUICIRA

VOCAL

DR. JOSE RAMON VERDE CALVO

VOCAL

DRA. DENI NAVA ARENAS

SECRETARIA

DRA. RUTH PEDROZA ISLAS

“Haz lo necesario para lograr tu más ardiente deseo
y acabarás lográndolo”

♪Ludwing Van Beethoven♪

Agradecimientos

A mis padres Héctor y Artemia por su apoyo incondicional, su gran amor, paciencia, confianza, gracias a ustedes soy lo que soy ahora y por la oportunidad de tener una excelente educación en el transcurso de mi vida sobre todo por ser un gran ejemplo a seguir. Los amo.

A mis otros padres Gerardo y Sara por su gran apoyo y cariño que me han brindado desde siempre. Los quiero muchísimo

A mi hermana bt por su apoyo, la motivación que me ha brindado, y por ser importante en mi vida, gracias por hacerme feliz cuando más lo necesito, I flana you.

Al Doctor Jorge por el apoyo, enseñanzas, consejos y confianza que me ha brindado a lo largo de este proyecto.

A la Doctora Deni por su calidez humana, su amistad y su gran apoyo incondicional tanto en los buenos momentos como en los malos, porque sin bullying no hay amistad.

A Ara y Oscar gracias por brindarme su amistad, su apoyo, sobre todo por aceptarme como soy y por motivarme a seguir adelante en los momentos más difíciles, porque sin ustedes no estaría donde estoy, los quiero mucho.

A mis compaÑEROS de la pp1 Jenny, Frida, Zac, Jack, Ale y Belem, por hacer de mi estancia el mejor de los lugares y ser una segunda familia para mí, los quiero mucho.

RESUMEN

La utilización de enzimas en procesos industriales biotecnológicos adquiere cada vez mayor importancia a medida que se requieren nuevos y mejores productos destinados a satisfacer necesidades y mercados altamente exigentes. Diferentes industrias como las de panadería, cervecera, detergentes, vinos y jugos de frutas están desarrollando nuevas tecnologías enzimáticas, así como el almidón hidrolizado enzimáticamente surge de la necesidad de sustituir ciertas materias primas para ofrecer productos de gran competitividad que generan diversas opciones en el mercado, por ejemplo: jarabes con azúcares de mayor poder de disolución las cuales aportan sustancias en la preparación del color caramelo que aportan resistencia a la decoloración térmica, dan cuerpo y acentúan los sabores de las frutas, así como mejoran el color y las texturas de algunos alimentos. Los jarabes de glucosa, particularmente, tienen un enorme mercado potencial por lo que actualmente son importantes en la industria alimentaria y farmacéutica.

En este trabajo se describe el uso del almidón de amaranto (*Amaranthus hypocondriacus* L) para la obtención de jarabes de glucosa, debido a que actualmente se sobre explota al maíz y se busca una fuente alternativa para la obtención de almidón para la producción de jarabes; las condiciones de hidrólisis se compararon con el almidón de maíz. La extracción de almidón de amaranto se realizó por el método alcalino en el cual se obtuvo un 43.83% de rendimiento y un 96.69% de recuperación. El proceso de hidrólisis consistió de dos etapas 1) la dextrinización y 2) la sacarificación. Para la dextrinización se probaron algunas variables que la afectan, como son, la concentración de α -amilasa, CaCl_2 , pH, temperatura, velocidad y tiempo de dextrinización. Siendo las condiciones experimentales para la dextrinización 45 KU de α -amilasa, 150 ppm de CaCl_2 con pH 6 a una temperatura de 90°C a 60 rpm durante una hora de hidrólisis. Los equivalentes de dextrosa (ED) se definen como la cantidad de azúcares reductores presentes. El ED para la dextrinización fue de 14 con una V_{\max} de la α -amilasa de 1.284 ± 0.17 g/L*min y una K_m de 56.697 ± 0.24 g/L. De manera similar se evaluaron las mismas variables para la sacarificación siendo las condiciones experimentales 15 U de amiloglucosidasa: 30 U de pulalanasa con pH de 4.5 a una temperatura de 60°C durante 24 horas de hidrólisis. Lo cual resultó en un jarabe de 98 g de glucosas/L con una V_{\max} de 1.283 ± 1.03 y una K_m de 70.659 ± 0.75 . La cuantificación de glucosa se midió por medio del método colorimétrico GOD-POD. El almidón de amaranto resulta ser una buena alternativa para

la producción de jarabes de glucosa que podría ser utilizado en la industria alimentaria así como para la producción de bioetanol.

Abstract

The use of enzymes in industrial biotechnological processes becomes increasingly important as new and better products are required to meet highly demanding needs and markets. Different industries such as bakeries, breweries, detergents, wines and fruit juices are developing new enzymatic technologies, as enzymatically hydrolyzed starch arises from the need to substitute certain raw materials to offer products of great competitiveness that generate diverse options in the market, For example: syrups with sugars of greater dissolution power which contribute substances in the preparation of the caramel color that contribute resistance to the thermal discoloration, give body and accentuate the flavors of the fruits, as well as improve the color and textures of some foods. Glucose syrups, in particular, have a huge potential market so they are currently important in the food and pharmaceutical industry.

This work describes the use of amaranth starch (*Amaranthus hypocondriacus* L) to obtain glucose syrups, because corn is currently being exploited and an alternative source is sought for the production of starches for the production of syrups; The hydrolysis conditions were compared to the corn starch. The extraction of amaranth starch was performed by the alkaline method in which 43.83% yield and 96.69% recovery were obtained. The hydrolysis process consisted of two stages 1) dextrinization and 2) saccharification. For the dextrinization, some variables that affect it, such as the concentration of α -amylase, CaCl_2 , pH, temperature, speed and dextrinization time were tested. Being the experimental conditions for the dextrinization 45 KU of α -amylase, 150 ppm of CaCl_2 with pH 6 at a temperature of 90 ° C to 60 rpm during one hour of hydrolysis. Dextrose equivalents (ED) are defined as the amount of reducing sugars present. The ED for dextrinization was 14 with an α -amylase V_{max} of $1,284 \pm 0.17 \text{ g / L} \cdot \text{min}$ and a K_m of $56,697 \pm 0.24 \text{ g / L}$. Similarly, the same variables were evaluated for saccharification with the experimental conditions being 15 U of amyloglucosidase: 30 U of pulalanasa with pH 4.5 at a temperature of 60 ° C for 24 hours of hydrolysis. This resulted in a syrup of 98 g of glucose / L with a V_{max} of $1,283 \pm 1,03$ and a K_m of $70,659 \pm 0.75$. Glucose quantification was measured by the GOD-POD colorimetric method. Amaranth starch proves to be a good alternative for the production of glucose syrups that could be used in the food industry as well as for the production of bioethanol.

Contenido

RESUMEN	i
Abstract.....	iii
Índice de Figuras.....	iv
Índice de Tablas.	vi
INTRODUCCIÓN.	1
1. Grano de amaranto (<i>Amaranthus hypocondriacus L</i>).....	1
1.1 Composición del grano de amaranto.....	3
1.2 Almidón.....	4
1.2.1 Amilosa	8
1.2.2 Amilopectina	10
1.2.3 Organización del grano de almidón.....	12
2. Producción de jarabes glucosados	15
2.1 Hidrólisis química.....	15
2.2 Hidrólisis enzimática	15
2.3 Gelatinización.....	16
2.4 Dextrinización.	17
2.5 Sacarificación.....	18
2.6 Enzimas amilolíticas.....	19
2.6.1 α -amilasa.	20
2.6.2 Amiloglucosidasa.....	21
2.6.3 Pulalanasa	21

2.6.4 Mecanismo de acción de las enzimas amilolíticas.....	21
3. Justificación	23
4. Hipótesis	24
5. Objetivos.....	24
5.1 General.....	24
5.2 Particulares.....	24
6. Materiales y métodos.....	24
6.1 Reactivos.....	24
6.2 Equipos.....	25
6.3 Plan general de trabajo.....	25
6.4 Obtención de la harina de amaranto.....	26
6.5 Obtención de almidón de amaranto por método alcalino (MA).....	26
6.6 Obtención de almidón por el método alcalino combinado con digestión con proteasa (MAP).....	27
6.7 Obtención de almidón con etanol.....	28
6.8 Cuantificación de almidón.....	29
6.8.1 Cuantificación de azúcares reductores y cálculo del almidón total.....	29
6.8.2 Cuantificación de almidón por el método enzimático.....	31
6.9 Caracterización de la dextrinización del almidón de amaranto.....	32
6.9.1 Selección de la concentración de α -amilasa.....	33
6.9.2 Selección de la concentración de Cloruro de Calcio.....	33
6.9.3 Selección del pH.....	33
6.9.4 Selección de la temperatura.....	34

6.9.5. Selección de la velocidad de agitación.	34
6.9.6 Tiempo de reacción.	34
6.10 Caracterización de la sacarificación	34
6.10.1 Relación amiloglicosidasa/pulalanasa.	35
6.10.2 Selección del pH.	35
6.10.3 Selección de la temperatura.	36
6.10.4 Tiempo de reacción.	36
6.11 Cinética y estudio de la concentración de sustrato.	36
6.12 Análisis estadístico.	37
7. Resultados y Discusión.	38
7.1 Obtención de almidón de amaranto.	38
7.2 Dextrinización del almidón de amaranto.	39
7.3 Sacarificación de las dextrinas del almidón de amaranto.	48
8. Conclusiones.	55
9. Recomendaciones.	56
10. Bibliografía.	57
Apéndices.	64
Apéndice A	64
Apéndice B	65
Apéndice C	66

Índice de Figuras

Figura 1 Estructura del grano de amaranto..... 2

Figura 2 Estructura química de amilosa y amilopectina 6

Figura 3 Micrografía electrónica de los gránulos de almidón de diferentes fuentes botánicas.. 7

Figura 4. Ilustración esquemática del complejo helicoidal amilosa-lípido. 9

Figura 5 La amilopectina y el gránulo de almidón.. 11

Figura 6. Seis niveles supramoleculares del grano de cereales, destacando la contribución estructural microscópica del almidón. 13

Figura 7 Cruz de malta. Estructura del almidón de papa visto bajo la luz polarizada. 14

Figura 8. A) Diferentes patrones de difracción de rayos X del almidón, B) Patrón de difracción de rayos X de almidón de amaranto 14

Figura 9. Gelatinización del almidón 17

Figura 10. Mecanismos de retención e inversión de las GH..... 22

Figura 11. Mecanismo de retención de doble desplazamiento de la formación del enlace covalente 22

Figura 12. Mecanismo de inversión de un solo desplazamiento de las GH..... 23

Figura 13. Esquema general de trabajo 26

Figura 14. Esquema general de la obtención de almidón de amaranto por el MA..... 27

Figura 15. Esquema general de la obtención de almidón de amaranto por el método MAP. 28

Figura 16. Esquema general de la obtención de almidón de amaranto con etanol..... 29

Figura 17. Mecanismos de acción de DNS. 30

Figura 18. Mecanismo de acción del método enzimático GOD-POD. 31

Figura 19. Esquema escalonado para las mejores condiciones de la dextrinización.....	32
Figura 20. Esquema escalonado para las mejores condiciones de la sacarificación.....	35
Figura 21. (A) Curva de avance de reacción. (B) Cinética de Michaelis-Menten.....	37
Figura 22. Equivalentes de dextrosa producidos de la hidrólisis del almidón de amaranto y maíz usando diferentes concentraciones de α -amilasa.....	40
Figura 23. Efecto de la concentración de iones calcio (Ca^{2+}) sobre la dextrinización del almidón de amaranto y maíz.....	41
Figura 24. Efecto del pH sobre la dextrinización del almidón de amaranto y maíz.....	42
Figura 25. Efecto de la temperatura sobre la dextrinización del almidón de amaranto y maíz.....	42
Figura 26. Efecto de la velocidad de agitación sobre de dextrinización de almidón de amaranto y maíz.....	43
Figura 27. Curva de dextrinización usando diferentes concentraciones de almidón. (A) Amaranto, (B) Maíz.....	45
Figura 28. Grafica de Lineawere-Burk o doble recíproco de almidón de Amaranto y Maíz.....	47
Figura 29. Efecto de la relación amiloglucosidasa/pulalanasa sobre la producción de glucosa usando almidón de amaranto y de maíz.....	49
Figura 30. Efecto del pH sobre la producción de glucosa usando almidón de amaranto y maíz.....	50
Figura 31. Efecto de la temperatura sobre la producción de glucosa usando almidón de amaranto y maíz.....	51
Figura 32. Curva de sacarificación para la producción de glucosa durante 24 horas. (A) Amaranto, (B) Maíz.....	52
Figura 33. Grafica de Lineawere-Burk o doble recíproco de almidón de Amaranto y Maíz.....	53

Índice de Tablas.

Tabla 1. Principales estados productores de amaranto en la República Mexicana	2
Tabla 2. Composición nutrimental de Amaranthus spp	3
Tabla 3 Características de la amilosa y amilopectina.....	5
Tabla 4. Características de los gránulos de almidón de diferentes fuentes.....	7
Tabla 5. Proporción de amilosa/amilopectina de diferentes cereales	8
Tabla 6. Temperatura de gelatinización de diferentes cereales	16
Tabla 7. Factores que afecta la hidrólisis enzimática del almidón.....	18
Tabla 8. Clasificación de las enzimas amilolíticas en familias	20
Tabla 9. Extracción y rendimiento del almidón obtenido de harina de amaranto.....	38
Tabla 10. Parámetros cinéticos de la dextrinización del almidón de amaranto.....	47
Tabla 11. Parámetros cinéticos para la sacarificación de las dextrinas de amaranto y de maíz.....	53

INTRODUCCIÓN.

1. Grano de amaranto (*Amaranthus hypocondriacus* L).

Desde hace algunos años, el amaranto ha sido "redescubierto" como una planta útil y prometedora, sobre todo porque se ve como un candidato interesante para aliviar la creciente demanda de alimentos por parte de algunos países del mundo en desarrollo. El amaranto es resistente a la sequía, el clima caliente, y varias plagas. El grano contiene proteína, grasa, fibra, cenizas, minerales en cantidades más altas que en los cereales comunes además no es deficiente en lisina.

El amaranto se cultivaba en América desde hace 5 000 a 7 000 años, probablemente los primeros en utilizarlo como un cultivo altamente productivo fueron los mayas de quienes otros pueblos de América, entre ellos los aztecas y los incas aprendieron su consumo. Los indígenas llamaban al amaranto *huautli* o *huauquilitl* y los conquistadores lo denominaron bledo (Becerra, 2000; Hernandez y Herrerías, 1998).

La palabra amaranto significa "inmarcesible" que no se marchita y viene del griego *Amarantón* de *a* (sin) y *marainein* (marchitar, palidecer). (Hernandez y Herrerías, 1998).

El amaranto pertenece a la familia *Amaranthaceae* que comprende más de 60 géneros y aproximadamente 800 especies de plantas herbáceas, de las cuales tres son las principales: el *Amaranthus hypochondriacus*, *Amaranthus cruentus* y *Amaranthus caudatus* cultivados en México, Guatemala y Perú (Hernandez y Herrerías, 1998).

Una de las características más importantes del amaranto es, sin duda, su alto valor nutritivo. El amaranto, además, se pueden aprovechar de múltiples formas, como grano, verdura o forraje. Es también un cultivo altamente eficiente que puede prosperar en condiciones agroclimáticas adversas, tales como sequía, altas temperaturas y suelos salinos. La semilla presenta una gran versatilidad, pudiéndose utilizar en la preparación de diversos alimentos y tiene, además, un prometedor potencial de aplicación industrial, tanto en la industria de los alimentos como en la elaboración de cosméticos, colorantes y hasta plásticos biodegradables (Becerra, 2000).

Técnicamente la semilla de amaranto es considerada como un pseudocereal, ya que tiene características similares a las semillas de cereales verdaderos de las monocotiledóneas, sin embargo, por ser una dicotiledónea, no es considerado como un

cereal verdadero ya que presenta un ligero contenido de azúcares mayor comparado con los azúcares de los cereales verdaderos (Arendt y Zannini, 2013). La semilla de amaranto es casi esférica con un diámetro de alrededor de 1 mm (Figura 1) con propiedades nutricionales notables, ya que contiene 63% de almidón con carácter “ceroso” que se encuentra almacenado en el perispermo y el embrión, 15% de proteínas con un contenido significativo de aminoácidos azufrados y lisina, también es buena fuente de lípidos. (Becerra, 2000; González et al., 2007).

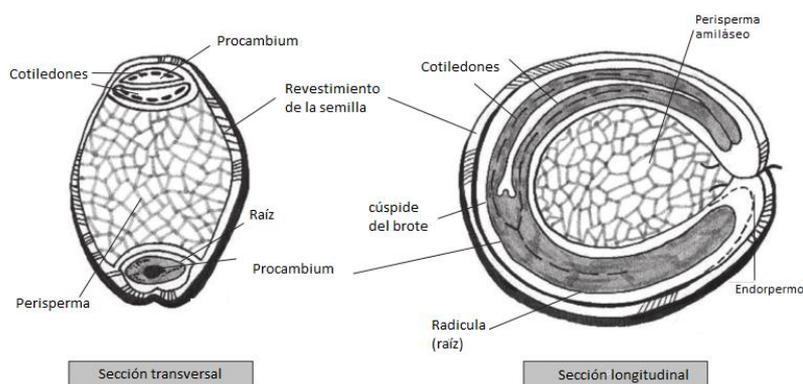


Figura 1 Estructura del grano de amaranto (Arendt y Zannini, 2013).

En la República Mexicana, las zonas de producción y cultivo de amaranto son las mismas de la época precolombina, en la Tabla 1 se muestra la producción de algunas de estas zonas.

Tabla 1. Principales estados productores de amaranto en la República Mexicana (Datos obtenidos de <http://infosiap.siap.gob.mx>)

Ubicación	Superficie sembrada (ha)	Superficie cosechada (ha)	Producción (T)	Rendimiento (T/ha)
Distrito Federal	142.20	142.20	161.18	1.13
Durango	6.00	6.00	7.80	1.30
Morelos	223.00	223.00	300.90	1.35
México	148.00	148.00	300.60	2.03
Oaxaca	43.05	43.05	68.06	1.58
Puebla	1,950.00	1,950.00	2,188.70	1.12
Querétaro	7.00	7.00	5.95	0.85

San Luis Potosí	22.00	4.00	4.50	1.12
Tlaxcala	2,491.00	2,491.00	3,509.40	1.41

Anuario Estadístico de Producción Agrícola 2014. SAGARPA

1.1 Composición del grano de amaranto.

Hoy en día, el amaranto se conoce principalmente como “alegría”, aunque su consumo no está muy difundido. Apenas hace unos cuantos años se redescubrió su enorme valor alimenticio. El grano de amaranto contiene altas cantidades de proteína, tiene abundante lisina, que es el aminoácido más escaso en otros cereales como el maíz, arroz y trigo, por lo que, al combinar un poco de amaranto con estos, la lisina excedente complementa la proteína de los otros cereales, logrando una importante mejoría en la nutrición. El amaranto puede consumirse casi desde la siembra, en forma de germinado, de hojas tiernas en ensalada o molidas para servirse en modo de sopa. Su digestibilidad es alta alcanzando entre el 80 y el 92% (Hernandez y Herrerías, 1998). La tabla 1 muestra el contenido nutricional de la semilla del amaranto.

Tabla 2. Composición nutrimental de *Amaranthus* spp (Caselato-Sousa; Amaya-Farfán, 2012; Koehler y Wieser, 2013).

Nutriente	Unidad	Valor por cada 100 g
Agua	g	11.29
Energía	kcal	371
Energía	kJ	1554
Proteína	g	13.56
Lípidos totales (grasa)	g	7.02
Ceniza	g	2.88
Carbohidratos	g	65.25
Fibra dietética total	g	6.7
Azúcares totales	g	1.69
Almidón	g	57.27
Calcio (Ca)	mg	159
Fierro (Fe)	mg	7.61
Magnesio (Mg)	mg	248
Fosforo (P)	mg	557
Potasio (K)	mg	508

Zinc (Zn)	mg	2.87
Manganeso (Mn)	mg	3.333
Vitamina C (ácido ascórbico total)	mg	4.2
Tiamina	mg	0.116
Riboflavina	mg	0.200
Niacina	mg	0.923
Folato total	mg	82
Vitamina E (Alfa-tocoferol)	mg	1.19
Vitamina B6	mg	0.591
Total de ácidos grasos saturados	g	1.459
Total de ácidos grasos monoinsaturados	g	1.685
Total de ácidos grasos polinsaturados	g	2.778
Ácidos grasos, 18:3 n-3 c,c,c (ALA)	g	0.042
Fitoesteroles	mg	24
Escualeno en aceite de amaranto	%	2.4-8.0

1.2 Almidón.

El almidón es sintetizado en forma de gránulos semi cristalinos los cuales son almacenados en diferentes órganos de la plantas incluyendo semillas, hojas, raíces, tubérculos y frutas, el tamaño de los gránulos varía de 1-100 μm . El tamaño, la morfología, la composición química y estructura del gránulo varía dependiendo el origen botánico.

Representa una fracción importante en un gran número de productos agrícola como son el maíz, arroz y trigo; el almidón también constituye el componente principal del grano de amaranto y juega un papel importante en sus aplicaciones en los alimentos, (espesantes, sustitutos de grasa, salsas, cereales de desayuno, panadería, galletas, aperitivos, pastas, etc). Otros usos comerciales actuales y potenciales de almidón son en cosméticos, películas biodegradables, recubrimientos de papel y almidón de lavandería. En general el almidón además puede ser despolimerizado mediante hidrólisis química o enzimática para la fabricación de jarabes de glucosa, ciclodextrinas y derivados de maltodextrinas (El-fallal et al., 2012).

La cantidad de almidón en los granos varía, por lo general es entre el 60 y 75% del peso del grano y proporciona el 70-80% de la energía consumida por los seres humanos en todo el mundo. El contenido de almidón en los granos de amaranto difiere dependiendo de la especie, por ejemplo *A. currentus* tiene 42% mientras que *A. hypocondriacus* tiene 62% de almidón (Lee et al., 2006; Rastogi y Shukla, 2013).

El análisis del almidón de amaranto revela dos grandes diferencias en comparación con los cereales. En primer lugar, el almidón comprende el componente principal de hidratos de carbono en el amaranto, pero se encuentra en cantidades inferiores a otros cereales, en segundo lugar, el almidón de amaranto no se encuentra en el endospermo sino en el perispermo, donde las partículas de almidón son generados en los amiloplastos (orgánulos en células de plantas que sintetizan polímeros de almidón en forma de gránulos) (Schoenlechner et al., 2008; Thomas y Atwell, 1999)

Químicamente el almidón está unido mediante el enlace glucosídico, en el cual el oxígeno del carbono 1 de una molécula de glucosa está unido al oxígeno del carbono 4 de la segunda molécula de glucosa; este enlace es estable a valores de pH altos, pero se hidroliza a valores de pH bajos. Al final de la cadena polimérica hay un grupo aldehído activo, al cual se le conoce como extremo reductor (El-fallal et al., 2012).

El almidón se compone de dos tipos de polímeros de glucosa: amilosa y amilopectina (Figura 2). Las diferencias estructurales entre estos dos polímeros contribuyen a las diferencias significativas en las propiedades y funcionalidad del almidón. La Tabla 3 muestra algunas características importantes de la amilosa y la amilopectina (Coulter, 2009; Thomas y Atwell, 1999).

Tabla 3 Características de la amilosa y amilopectina (Robyt, 2008).

Característica	Amilosa	Amilopectina
Forma	Lineal	Ramificado
Enlaces	α -(1-4) a veces α -(1-6)	α -(1-4) y α -(1-6)
Peso molecular	100 kDa	10^4 - 10^6 kDa
Película	Fuerte	Débil
Formación de gel	Firme	No gelificante a suave

Color con yodo	Azul	Marrón rojizo
En solución	Hélice extendida o enrollada	Esfera irregular
Estabilidad en soluciones acuosas	Retrograda	Estable
Acomplejamiento	Con facilidad	Con dificultad
Retrogradación	Rápida	Muy lenta
Formación de complejos	Favorable	Desfavorable
Patrón de rayos X	Amorfo	Cristalino
Longitud de onda máxima	660 mn	530-550 nm

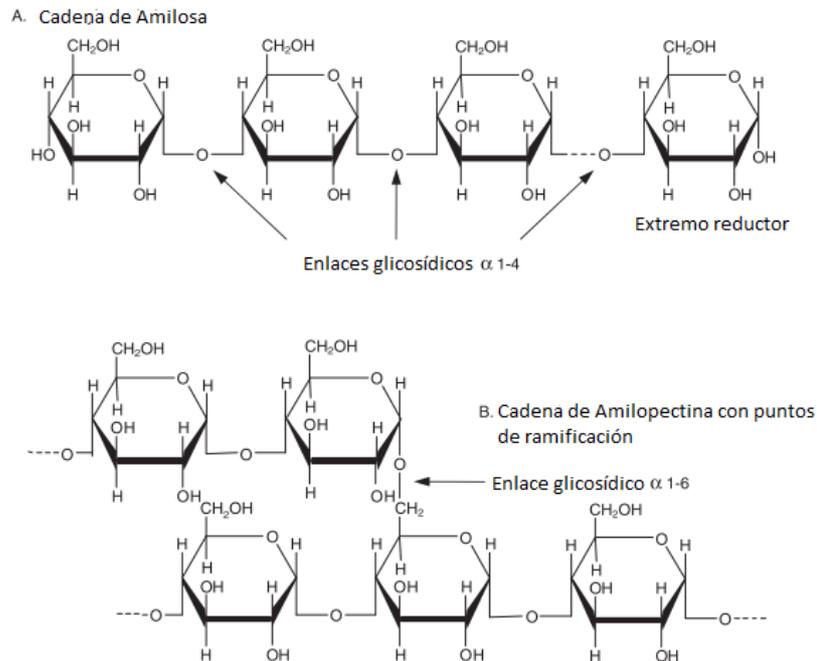


Figura 2 Estructura química de amilosa (A) y amilopectina (B) (Coultate, 2009).

La amilosa y amilopectina no existen libres en la naturaleza se encuentran como componentes cristalinos y amorfos en el gránulo de almidón cada uno con diferentes morfologías, pueden ser regulares (por ejemplo, esférica, ovoide, o angulares) o bastante irregulares (Figura 3 y Tabla 4).

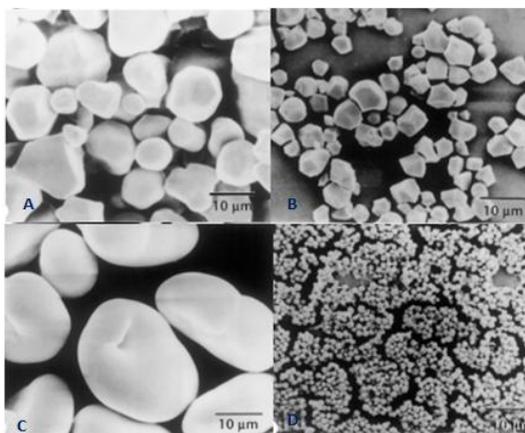


Figura 3 Micrografía electrónica de los gránulos de almidón de diferentes fuentes botánicas. (A) maíz, (B) Arroz, (C y D) amaranto (Robyt, 2012).

Tabla 4. Características de los gránulos de almidón de diferentes fuentes (Buléon et al., 1998; Rastogi y Shukla, 2013; Tester et al., 2004; Tester et al, 2004a; Xia et al., 2015).

Almidón	Tamaño (µm)	Patrón de rayos X	Forma
Cebada	15-25	A	Lenticular
Maíz	2-30	A	Esférico/poliédrico
Avena	15	A	Compuesto
	3-10	B	Poliédrico
Arroz	5-10	B	Esférico
	10-40	A	Lenticular
Papa	5-100	B	Lenticular
Sorgo	5-20	A	Esférico
Trigo	2-10	B	Lenticular

	15-35	A	Lenticular
Amaranto	1-3	A	Esférico/poligonal

La relación de amilosa/amilopectina dentro de un determinado tipo de almidón es un punto muy importante ya que afecta su funcionalidad en los alimentos. El contenido y la estructura de amilosa y amilopectina afectan a los gránulos de almidón, gelatinización, pasta y atributos de textura. La proporción amilosa/amilopectina de varios cereales se muestra en la Tabla 5. Mediante el uso de técnicas clásicas de reproducción así como biología molecular ahora es posible obtener almidones de diversas fuentes de plantas híbridas que contienen proporciones variables de amilosa y amilopectina (Gago et al., 2013; Thomas y Atwell, 1999).

Tabla 5. Proporción de amilosa/amilopectina de diferentes cereales (Robyt, 2008)

Fuente de almidón	Contenido de amilosa (%)	Contenido de amilopectina (%)
Maíz	25	75
Maíz ceroso	<1	>99
Tapioca	17	83
Papas	20	80
Maíz de alta amilosa	55-70 (o más)	45-30 (o menos)
Trigo	25	75
Arroz	19	81
Amaranto	5	95

1.2.1 Amilosa

Cadena de glucosas que es esencialmente lineal con enlaces glucosídicos α -(1-4) con muy pocos enlaces α -(1-6) (aproximadamente 1%) con un grado de polimerización de aproximadamente 500-6000 unidades de glucosa, tiene un peso molecular aproximado

de 1×10^5 - 1×10^6 Dalton (Da) dependiendo del origen botánico (Bijttebier et al., 2008; Espinosa Solis, 2008; Ratnayake y Jackson, 2008).

Aunque típicamente la amilosa se ilustra como una estructura de cadena lineal es en realidad a menudo helicoidal, la cual presenta entre 6-8 moléculas de glucosa por vuelta. El interior de la hélice contiene átomos de hidrógeno y es hidrófobo, lo que permite a la amilosa formar un tipo de complejo con ácidos grasos libres, glicéridos, algunos alcoholes y yodo (ligando) estas uniones están estabilizadas por puentes de hidrogeno y fuerzas de van der Waals de los residuos de glucosa, moléculas de agua y el ligando (Obiro et al., 2012).

El complejo con los lípidos, en particular los mono y diglicéridos, es una propiedad bien conocida de la hélice de amilosa (Figura 4). La formación y la integridad estructural de los complejos de lípido-amilosa son funciones de varios factores incluyendo la temperatura, el pH, el contacto y/o el tiempo de mezcla entre el polímero de amilosa y la estructura del ácido graso o glicérido; además permite modificar las temperaturas de gelatinización de almidón, alterar los perfiles de textura, viscosidad de la pasta resultante y limitar la retrogradación (Thomas y Atwell, 1999).

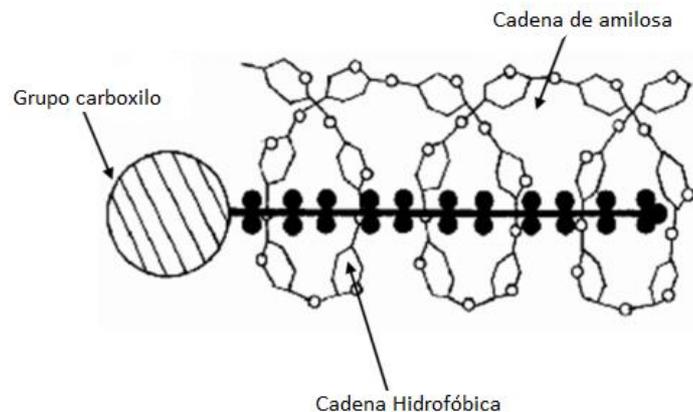


Figura 4. Ilustración esquemática del complejo helicoidal amilosa-lípido (lípido al interior de la cadena).

La amilosa y el yodo forman un complejo de color azul oscuro que es usado para cuantificar el contenido de amilosa en los almidones cuando es medido a una longitud de onda de máxima absorción entre 620-640 nm. La amilosa tiene una capacidad de unión con el yodo del orden de 20 mg de yodo por 100 mg de amilosa. La intensidad del color azul del complejo amilosa-yodo proporciona además información acerca de longitud de la cadena (Espinosa Solis, 2008).

1.2.2 Amilopectina

Polímero de glucosas que es altamente ramificado (5-6%) estas ramificaciones son cortas con enlaces glucosídicos α -(1-4) y α -(1-6) cada 20-25 unidades de glucosa con grado de polimerización de 9,600-15,900 y peso molecular de aproximadamente 3×10^7 a 3×10^9 dependiendo del origen botánico (Buléon et al., 1998; Ratnayake y Jackson, 2008; Tester et al., 2004).

La amilopectina representa el mayor componente del grano de almidón de amaranto, tiene bajos niveles de capacidad de unión con yodo lo que indica que tiene cadenas cortas de ramificación (Bello-Pérez et al., 1996).

Se ha encontrado que la molécula de amilopectina consiste en dos tipos de cadena, la más abundante tiene alrededor de 15 unidades de glucosa y la otra cadena alrededor de 40 unidades, esto se refiere a las cadenas A y B respectivamente (Figura 5.A) llamado modelo ramificado que fue propuesto por Robin en 1974 y es ahora ampliamente aceptado. Su característica esencial es un esqueleto compuesto principalmente por cadenas ramificadas A que llevan grupos de cadenas B. En cada molécula hay una cadena que tiene un único extremo reductor, como se muestra en la Figuras 5.B y 5.C. Se cree que las moléculas de amilopectina están orientadas radialmente en el gránulo de almidón con el extremo reductor terminal hacia el centro, posiblemente cerca del hilum que constituye el centro de nucleación alrededor del cual se desarrolla el gránulo (Coultate, 2009).

Se cree que los grupos de cadenas cortas para ser distribuidos en la cadena de esqueleto B como se muestra en la Figura 5.B conduce a la formación de regiones cristalinas, las cadenas de polisacáridos que se alternan con regiones amorfas (sombreadas en la Figura 5.B) en el cual se encuentran la mayoría de los puntos de ramificación 1-6. En las regiones cristalinas (Figura 5.D), se cree que los pares de cadenas vecinas necesitan de 6 unidades de glucosa por vuelta en cada cadena para formar dobles hélices cortas, el 70 % del almidón está en la región amorfa en donde se encuentra la mayor parte de amilosa y una pequeña fracción de amilopectina, mientras que el 30% restante se encuentra en la región cristalina con alto contenido de amilopectina y una fracción pequeña de amilosa (Coultate, 2009).

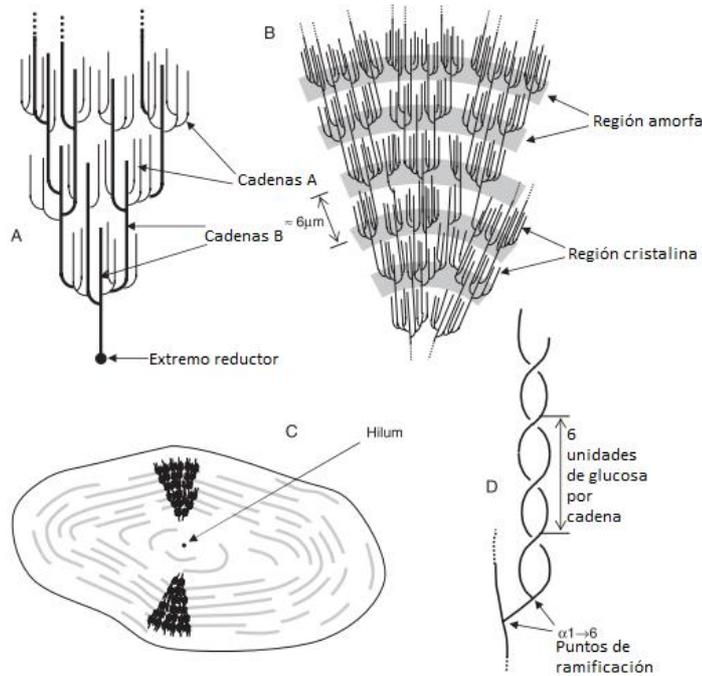


Figura 5 La amilopectina y el gránulo de almidón. (A) Las características esenciales del modelo de clúster primero propuesto por Robin en 1974. (B) La organización de las regiones amorfas y cristalinas (o dominios) de la estructura de la generación de las capas concéntricas que contribuyen a los “anillos de crecimiento” visibles por microscopía de luz. (C) La orientación de las moléculas de amilopectina en una sección transversal de todo un gránulo. (D) La estructura de doble hélice probable ocupado por las cadenas vecinas y dando lugar al extenso grado de cristalinidad en el gránulo (Coultate, 2009).

El pequeño tamaño del gránulo de almidón, así como su alto contenido de amilopectina explica la mayor parte de las propiedades físicas del almidón de amaranto. En comparación con otros cereales, muestra excelente estabilidad a la congelación-descongelación y a la retrogradación, mayor temperatura de gelatinización, mayor capacidad de retención de agua, mayor capacidad de sorción en valores de actividad de agua más altas, así como mayor solubilidad, mayor poder de hinchamiento y susceptibilidad a enzimas (Bello-Pérez et al., 1998; Kong et al., 2009; Schoenlechner et al., 2008).

1.2.3 Organización del grano de almidón.

En la naturaleza la amilosa y la amilopectina se encuentran en forma semi-cristalina ordenados en forma de gránulos de almidón, su estructura puede observarse en 6 niveles que van desde los nm hasta los mm, es decir 6 órdenes de magnitud (Figura 6):

Nivel 1: Ramificaciones individuales. Esta es la distribución en la cual se determinan las longitudes y las distribuciones de las cadenas, la escala de longitud se mide en nm.

Nivel 2: Moléculas de almidón enteras. Estructura de las moléculas ramificadas, con ellos se puede conocer en promedio el peso molecular o la distribución y tamaño de la molécula.

Nivel 3: Estructura de láminas. La estructura del almidón nativo forma dobles hélices que a su vez crean regiones cristalinas y amorfas.

Nivel 4: Los gránulos. La estructura interna de los gránulos de almidón se acomodan en anillos concéntricos crecientes de un espesor de 100-400 nm; están separados por las regiones amorfas y cristalinas, estos anillos de crecimiento hacen que el tamaño del granulo tenga un tamaño de alrededor de 15-30µm.

Nivel 5: Endospermo. Comprende los gránulos de almidón junto con proteínas y lípidos.

Nivel 6: Grano entero. Ultimo nivel que incluye las estructuras de nivel alto como son el endospermo, cascara, etc. El papel del grano es la de almacenar la energía para la germinación.

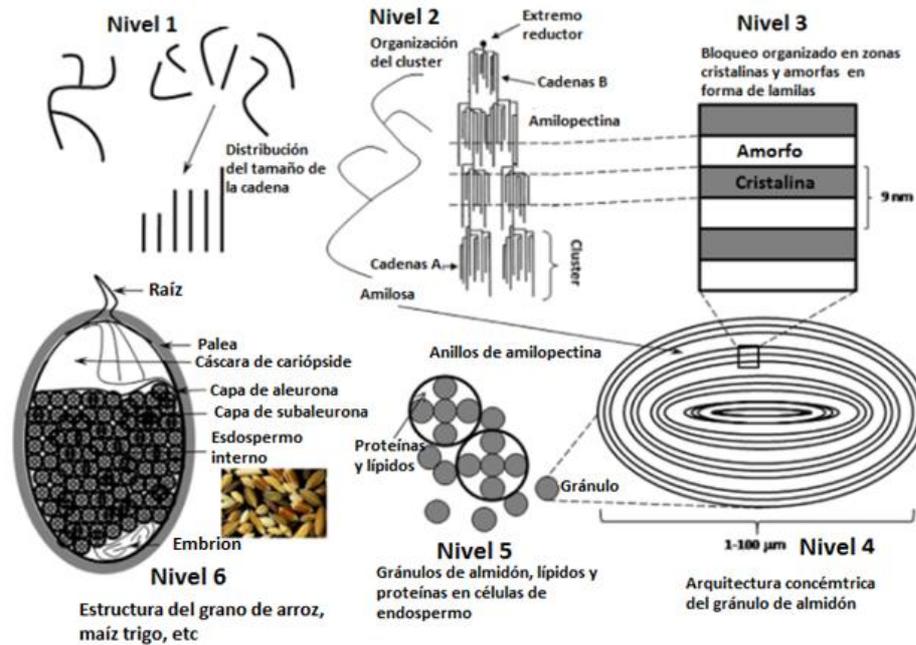


Figura 6. Seis niveles supramoleculares del grano de cereales, destacando la contribución estructural microscópica del almidón (Dona et al., 2010).

Las cadenas de amilopectina representan las regiones cristalinas mientras que las regiones amorfas están formadas por los puntos de ramificación de las moléculas de amilopectina y por la amilosa, esto se puede observar mediante un patrón de difracción de rayos X; cuando los gránulos son sometidos a la luz polarizada muestran un patrón de birrefringencia (descomposición del haz de luz en dos rayas cuando pasa por un tipo de material cristalino) llamada cruz de malta (Figura 7) que muestran el grado de orden molecular dentro del gránulo (Ratnayake y Jackson, 2008).

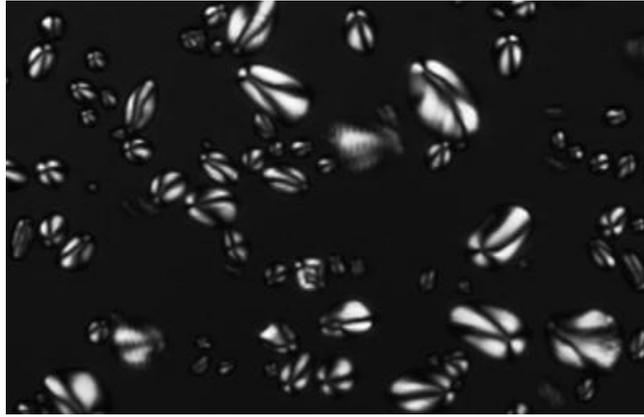


Figura 7 Cruz de malta. Estructura del almidón de papa visto bajo la luz polarizada (Ratnayake y Jackson, 2008).

Mediante esta técnica se han encontrado tres diferentes patrones de cristalinidad A, B y C, dependiendo el origen del almidón presentara un patrón de difracción diferente (Figura 8.A), por ejemplo los patrones A son característicos de los almidones de cereales como el maíz, maíz ceroso, trigo, arroz y amaranto. Los patrones B son característicos de tubérculos y frutas, son gránulos más pequeños y más esféricos de alrededor de 3 μm de diámetro. El patrón C que corresponden a una combinación entre los patrones A y B, se encuentran en raíces, frijoles y guisantes (Linden y Lorient, 1999; Ratnayake y Jackson, 2008; Robyt, 2012; Thomas y Atwell, 1999).

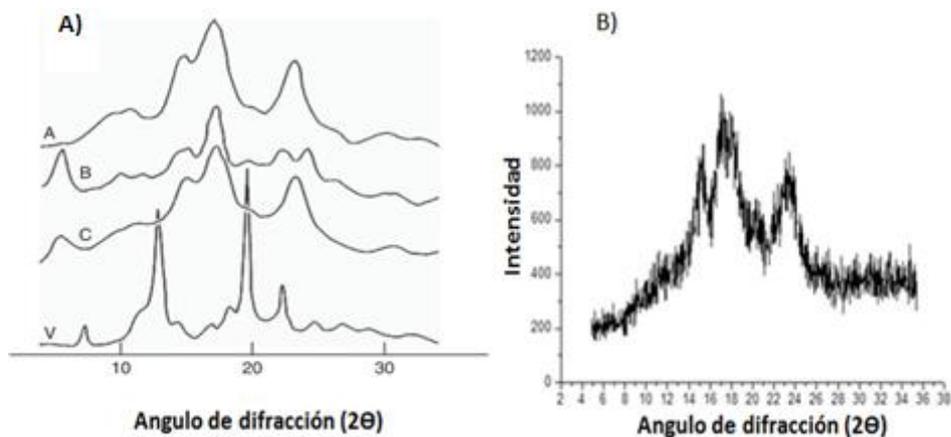


Figura 8. A) Diferentes patrones de difracción de rayos X del almidón, B) Patrón de difracción de rayos X de almidón de amaranto (Ratnayake y Jackson, 2008; Xia et al., 2015).

2. Producción de jarabes glucosados

Los jarabes de glucosa son soluciones concentradas acuosas de varios azúcares como glucosa, maltosa y otros sacáridos obtenidos de la hidrólisis ácida o enzimática del almidón; aunque recientemente la hidrólisis ácida ha sido sustituida por la enzimática, debido a que la hidrólisis ácida requiere de materiales corrosivos que dan colores y sabores no deseados (Ramachandran et al., 2013). Actualmente la industria del almidón es la segunda mayor consumidora de enzimas, y debido a ello se han realizado varios estudios empleando enzimas para obtener jarabes de glucosa a partir de almidón, ya sean comerciales o aisladas, así como sistemas de inmovilización, retención de membrana, etc, con el fin de mejorar la economía del proceso. Las enzimas más utilizadas para la conversión de almidón a glucosa son la α -amilasa en algunos casos β -amilasa, glucoamilasa y pulalanasa (Bettín y Quintero, 2010).

2.1 Hidrólisis química

En la industria de la hidrólisis del almidón se utilizan ácidos calientes para despolimerizar al almidón. Generalmente el ácido clorhídrico (HCl), ácido sulfúrico (H_2SO_4) y ácido oxálico ($C_2H_2O_4$) se usan para la hidrólisis ácida. El calentamiento (gelatinización) es necesario para lograr la despolimerización (Lee et al., 2006). En el pasado se utilizaban ácidos combinados con presión para llevar a cabo la misma reacción que las enzimas hoy en día, la ventaja de usar esta hidrólisis en la rápida transformación del almidón en azúcares (50-70%) lo que facilita la continua hidrólisis, pero la recuperación del ácido es muy bajo, esto se debe a que esta técnica es extremadamente peligrosa y requiere vasos resistentes a la corrosión y por lo tanto da como resultado un alto contenido de sales debido a la neutralización, además se generan productos como el furfural y el hidroximetil furfural (HMF) (Bajpai, 2013; Duvernay et al., 2013; Jacques et al., 2003).

2.2 Hidrólisis enzimática

Para la producción de jarabes de glucosa son necesario 2 o 3 pasos. El primer paso es la gelatinización del almidón, el segundo es la producción de dextrinas denominado dextrinización por medio de α -amilasa, el tercer paso es la sacarificación (o producción de glucosa) usando amiloglicosidasa (William y Pigman, 1944).

El proceso enzimático presenta ventajas frente a la hidrólisis química, los principales son: mayor rendimiento en azúcares (75-95%), no utiliza agentes químicos, además la

producción de subproductos puede ser controlada y las necesidades de energía son relativamente bajas.

2.3 Gelatinización

Los granos de almidón son insolubles en agua fría, debido a que su estructura altamente organizada de gran estabilidad debido las múltiples interacciones que existen con sus dos polisacáridos, sin embargo cuando se calienta empieza un proceso lento de absorción de agua en las regiones amorfas que son las menos organizadas y las más accesibles, ya que los puentes de hidrógeno no son tan numerosos ni rígidos como en las regiones cristalinas. A medida que se aumenta la temperatura se retiene más agua y el gránulo empieza a hincharse y aumenta su volumen. La temperatura de gelatinización varía de acuerdo a la estructura y al tipo de almidón (Tabla 6) en donde el gránulo alcanza su volumen máximo, pierde el patrón de difracción de rayos X así como la propiedad de birrefringencia y la viscosidad se incrementa; si se aumenta la temperatura, el gránulo hinchado se rompe parcialmente y ambos polímeros se dispersan en la disolución (Figura 9) (Linden y Lorient, 1999; Badui, 2006; Ratnayake y Jackson, 2008).

Tabla 6. Temperatura de gelatinización de diferentes cereales (Jacques eta al., 2003; Ratnayake y Jackson, 2008).

Fuente	Temperatura de gelatinización (°C)
Amaranto	63-78
Maíz común	62-72
Cebada	52-59
Centeno	57-70
Arroz	68-77
Trigo	58-64

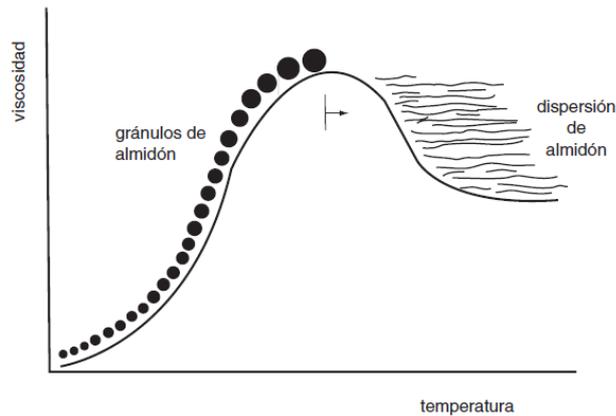


Figura 9. Gelatinización del almidón; los gránulos se hinchan y retienen un máximo de agua hasta que se rompen y producen una dispersión de moléculas de amilosa y amilopectina (Badui, 2006).

2.4 Dextrinización.

Se realiza mediante la hidrólisis del almidón a altas temperaturas (80°C-110°C) y pH entre 5.5-6.0 (dependiendo de la fuente de la enzima) por medio de α -amilasas termoestables produciendo dextrinas, maltosa, maltotriosa y maltopentosa que son solubles. Aunque un exceso de enzima no incrementa el rendimiento de maltosa, se recomienda el segundo paso de dextrinización (dependiendo del sustrato utilizado). Por ejemplo para conseguir un 70% de conversión del almidón de arroz es necesario realizar 2 veces el paso de licuefacción, en el primer paso se requiere una temperatura de 50-80°C por 1-180 min, mientras que el segundo paso involucra el calentamiento a altas temperaturas (>100°C) durante 1-60 min. Una posible proporción almidón:agua:CaCl₂: α -amilasa en la licuefacción puede ser 1:1-1.5:0.0025-0.0035:0.0025-0.0035. Debido a que este proceso utiliza a altas temperaturas es necesario adicionar algunas mezclas de NaCl, CaSO₂, CaCl₂, NaH₂PO₄ y Na₂HPO₄ para activar y estabilizar el sitio activo de la enzima. Se utilizan generalmente α -amilasas en lugar de β -amilasas porque las primeras producen dextrinas de bajo peso molecular que son fácilmente degradadas en la etapa de sacarificación, además de que se reducen los tiempos de hidrólisis del almidón. Cuando se utilizan temperaturas alrededor de 121°C, la gelatinización y la degradación enzimática ocurren al mismo tiempo, así la enzima puede ser absorbida rápidamente en los gránulos gelatinizados (Rendón-Villalobos et al., 2011; Tomasik y Horton, 2012).

2.5 Sacarificación.

Es la conversión de las dextrinas a glucosa. Se utilizan amiloglucosidasas y enzimas desramificadoras (pulalanasas) para liberar glucosa a partir de los productos de la dextrinización a temperaturas de entre 60°C y 70°C a pH 4-5 para la producción de jarabes de glucosa o maltosa con equivalentes de dextrosa (ED) de 96 y 40 respectivamente. Este proceso es más lento que la dextrinización, ya que puede durar de 45-90 minutos hasta 6 horas (dependiendo de las condiciones de hidrólisis). La hidrólisis enzimática sufre una inhibición por sustrato y por producto al final, lo que puede afectar la liberación de glucosa, también una alta concentración de glucosa puede resultar en la represión catabólica de las enzimas (NMX-F-217-1975; Tomasik y Horton, 2012; Uçkun Kiran et al.,2014).

En la Tabla 7 muestra algunos de los factores que pueden afectar a la hidrólisis del almidón para la producción de jarabes de glucosa.

Tabla 7. Factores que afecta la hidrólisis enzimática del almidón (Dona et al., 2010; Jacques et al., 2003; O'Brien y Wang, 2008; Rodriguez-Colinas et al., 2014; Tawil et al., 2012; Tester et al., 2004; Tomasik y Horton, 2012; Wu et al., 2006; Xia et al., 2014).

Factor	Característica
Origen botánico	Gránulos pequeños se degradan con mayor facilidad, ya que la enzima se absorbe más fácilmente debido a que la superficie de contacto es más grande haciendo agujeros o canales en la superficie del gránulo, siempre y cuando el gránulo ya esté gelatinizado, se ha visto que pre tratamientos con vapor durante 20 minutos incrementa la absorción de la enzima, otra propuesta es someterlo al autoclave a 121°C por 1 hora o mezclando con 10% de diatomea y agua se favorece la absorción de la enzima.
Tamaño del granulo de almidón	
Arquitectura del granulo	
Absorción de la enzima	
Proporción amilosa:amilopectina	Los almidones con altos contenidos en amilosa son menos susceptibles a la hidrólisis, debido a que las moléculas de amilosa están más próximas unas a otras formando puentes de hidrógeno inter e intramoleculares

	entre ella misma, afectando la absorción de la enzima y por lo tanto la conversión.
Complejo amilosa-lípido	Debido a que los almidones de cereales presentan este tipo de complejos, se evita la absorción de las enzimas en el gránulo, debido a la formación de enlaces entre las moléculas de amilosa y los lípidos, también los lípidos inhiben la hidrólisis ya que forman una membrana que impide el contacto con la enzima.
Patrón de difracción de rayos X	Los patrones B son más resistentes a la hidrólisis que los tipo A y la región amorfa comienza a degradarse más rápidamente que la zona cristalina
Temperatura de la hidrólisis	A 100°C la proporción de hidrólisis del almidón ceroso se ve favorecida que a temperatura ambiente
Cantidad de agua	Una pequeña cantidad es necesaria para iniciar la hidrólisis, las enzimas pueden conservar su actividad con 5.5% de contenido de agua; si hay incrementos en la humedad la estabilidad térmica disminuye
Sales inorgánicas	Iones de Mn^{2+} pueden inhibir la hidrólisis
Altas concentraciones de azúcares en el medio	La glucosa y la amiloglucosidasa inhiben la licuefacción y sacarificación.

2.6 Enzimas amilolíticas

La hidrólisis del almidón involucra una amplia variedad de enzimas que pertenecen a la familia de las glicosilhidrolasas (GH), en donde su función principal es la ruptura hidrolítica de los enlaces glucosídicos; están ampliamente distribuidas en la naturaleza y juegan un papel importante en el desarrollo de biocombustibles, ya que son capaces de hidrolizar al almidón en azúcares fermentables. Entre las GH que hidrolizan al almidón están la α -amilasa, β -amilasa, glucoamilasa y pulalanasa. Actúan de diferentes maneras sobre el sustrato, además de que cada una de las enzimas requiere de un pH y temperatura específicas para poder llevar a cabo su correcta función. Las GH son clasificadas por su similitud en la secuencia de amino ácidos en unas 90 familias (Cobucci-Ponzano et al., 2008; Tomasik y Horton, 2012; Vuong y Wilson, 2010).

Las enzimas amilolíticas pertenecen a la familia GH-13, GH-14 y GH-15 y obedecen un mecanismo de **retención** y de **inversión** del enlace glucosídico. El mecanismo de **retención** suele tener dos ácidos carboxílicos catalíticos en sus sitios activos y realiza un doble desplazamiento en el que un intermediario se forma y luego es hidrolizado. El mecanismo de **inversión** se da en un solo paso que consiste en un simple desplazamiento con la asistencia de un ácido o base en el sitio activo a partir de dos cadenas laterales de aminoácidos ácidos normalmente glutámico o aspártico, que se encuentran en la posición 6-11 (Cobucci-Ponzano et al., 2008; <http://www.cazy.org>).

En la Tabla 8 se observan las características de las familias GH-13, GH-14 y GH-15 y se indica el número de clasificación EC (clasificación de enzima de acuerdo a la academia de Bioquímica de la IUPACC), en donde la primera cifra indica la clase principal de la enzima, la segunda denota la subclase dentro de cada grupo, la tercera designa la subclase y la cuarta es el número de serie arbitrario asignado a su sub-subclase (Voet y Voet, 2011).

Tabla 8. Clasificación de las enzimas amilolíticas en familias (Datos obtenidos de Carbohydrate-Active Enzyme s.f <http://www.cazy.org>).

Características	Familia 13	Familia 14	Familia 15
Enzima	α -Amilasa Pulalanasa	β -Amilasa	Glucoamilasa
EC	3.2.1.1 3.2.1.41	3.2.1.2	3.2.1.3
Mecanismo	Retención	Inversión	Inversión
Núcleo catalítico/base	Asp	Glu	Glu
Donador de protones	Glu	Glu	Glu

2.6.1 α -amilasa.

Es una endoamilasa es capaz de hidrolizar y/o transglicosila los enlaces α -(1-4) y/o α -(1-6) de las cadenas internas del almidón produciendo un rápido descenso de la viscosidad y un cambio de color en la unión almidón-yodo, dando como producto de hidrólisis glucosa, maltosa, matodextrinas de bajo peso molecular, oligosacáridos de cadena corta y dextrinas limite o α -dextrinas limite (puntos de ramificación del almidón). Usualmente

pueden trabajar en un intervalo de pH de 6.7-7.0, pero pueden soportar medios alcalinos mejor que las soluciones ácidas, si se aumenta la temperatura su actividad decae con el tiempo, si se incrementa la concentración de enzima la hidrólisis disminuye dando bajas concentraciones de azúcares (glucosa y maltosa); comúnmente puede haber inhibición enzimática por producto cuando hay una alta concentración de glucosa. Esta enzima contiene iones de calcio en su sitio activo lo que le permite que sea estable a altas temperaturas (superiores a 90°C) (Bijttebier et al., 2008; Gupta et al., 2003; Robyt, 2008; Tomasik y Horton, 2012).

2.6.2 Amiloglucosidasa.

Exoenzima que hidroliza los enlaces α -(1-4) y α -(1-6) del primer enlace glucosídico del extremo no reductor de la maltosa liberando glucosa, su temperatura óptima se encuentra entre 30-60°C, y su pH óptimo entre 3.5-6.5, se usa para la conversión a glucosa de los productos de hidrólisis de la α -amilasa, una de las ventajas es la eliminación de los efectos inhibitorios de la maltosa sobre la actividad de la α -amilasa (Bijttebier et al., 2008; El-fallal et al., 2012; Tomasik y Horton, 2012; Warren et al., 2015).

2.6.3 Pulalanasa.

Existen 3 tipos de pulalanasa, la tipo I rompe el enlace α -(1-4) de la amilopectina, dextrinas y pulalano, la tipo II es menos específica que la tipo I, pero hidroliza el enlace α -(1-4) y α -(1-6) del almidón y dextrinas, el tercer tipo es la llamada enzima desramificadora que hidroliza solo los enlaces α -(1-6) de la amilopectina y dextrinas límite (Tomasik y Horton, 2012).

2.6.4 Mecanismo de acción de las enzimas amilolíticas.

Como se mencionó anteriormente las GH se clasifican en dos tipos dependiendo del cambio en la configuración anomérica durante la reacción (Figura 10): las que tienen un mecanismo de retención y las de inversión (Vuong y Wilson, 2010).

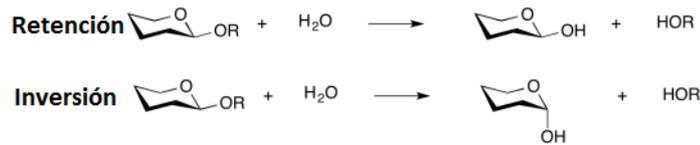


Figura 10. Mecanismos de retención e inversión de las GH (http://www.cazypedia.org/index.php/Glycoside_hydrolases)

Las GH que actúan con un mecanismo de retención de doble desplazamiento, involucra dos residuos catalíticos en el sitio activo: ácido glutámico y ácido aspártico. El primero actúa como acido/base en la catálisis y el segundo actúa como nucleófilo. El mecanismo se da en dos pasos: glicosilación (paso1) y desglicosilación (paso 2), cada paso involucra un estado de transición con un ion oxocarbenio (Figura 11):

1. El sustrato entra en el sitio activo de la enzima, el ácido glutámico en forma de ácido dona un protón al oxígeno del enlace glucosídico y el ácido aspártico hace un ataque nucleofílico en el carbono 1 de la glucosa.
2. Se forma un enlace covalente entre el intermediario enzima-glucosa. La molécula de glucosa protonada deja el sitio activo mientras que una molécula de agua actúa como nucleófila atacando el enlace covalente entre la glucosa y el ácido aspártico, el ácido glutámico actúa ahora como base para aceptar un H de la molécula de agua de la nueva molécula de glucosa que entra al sitio activo de la enzima (Cobucci-Ponzano et al., 2008; Van der Maarel et al., 2002; Vuong & Wilson, 2010; <http://www.cazypedia.org>).

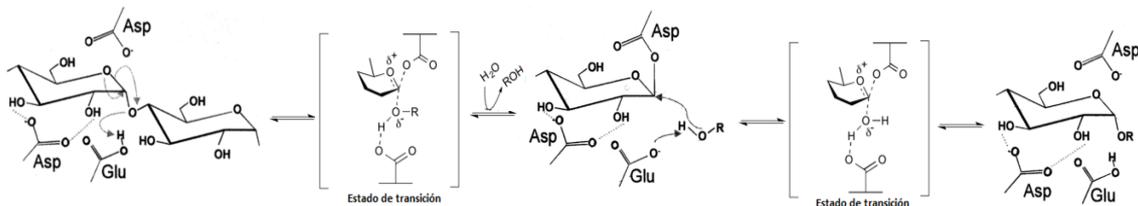


Figura 11. Mecanismo de retención de doble desplazamiento de la formación del enlace covalente (Van der Maarel et al., 2002; http://www.cazypedia.org/index.php/Glycoside_hydrolases)

En el mecanismo de inversión (Figura 12) se da en un solo paso de desplazamiento, el cual implica estados de transición similares a los observados en el mecanismo de retención; los residuos catalíticos de un ácido donan un protón al carbón anomérico mientras que el residuo catalítico de la base elimina un protón de una molécula de agua,

aumentando su nucleofilia facilitando su ataque al centro anomérico (Bojarová y Kren, 2009; Cobucci-Ponzano et al., 2008; Vuong y Wilson, 2010; <http://cazypedia.org>)

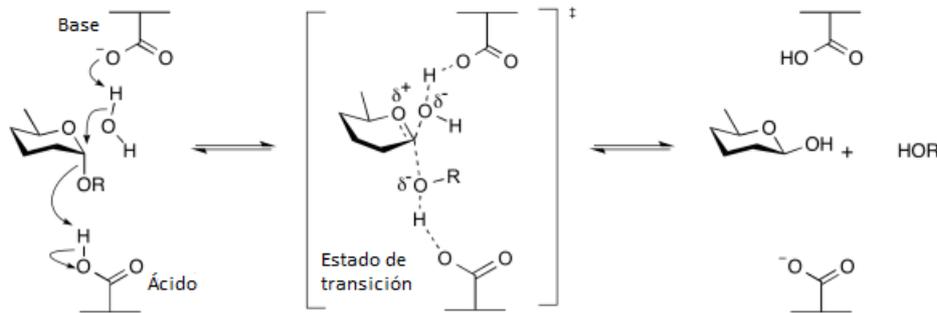


Figura 12. Mecanismo de inversión de un solo desplazamiento de las GH (http://www.cazypedia.org/index.php/Glycoside_hydrolases)

3. Justificación

La hidrólisis del almidón es ampliamente usada en la industria no solo alimentaria, sino también en la farmacéutica y la de papel. La producción de jarabes con alto contenido de fructosa, ampliamente utilizados como edulcorantes en diversas industrias, comienza con la hidrólisis del almidón para la producción de glucosa. Asimismo, la producción de glucosa a partir de almidones es de gran importancia en la producción de bioetanol.

El almidón de maíz es el principal sustrato para la elaboración de jarabes de glucosa mediante la hidrólisis enzimática, de la cual se puede tener un mejor control, que la hidrólisis química. El control del tiempo de hidrólisis a relativas bajas temperaturas y la poca producción de compuestos no deseados hace que se puedan obtener diferentes jarabes con diferentes propiedades fisicoquímicas. Por ejemplo, los almidones con alto contenido de amilosa generalmente tienen una mayor temperatura de gelatinización porque las cadenas de amilosa están más densamente empaquetadas que las moléculas de amilopectina ya que forman más puentes de hidrógeno.

El grano de amaranto contiene de forma natural del 70 al 95 % de amilopectina, lo cual debe facilitar la acción de las enzimas amilolíticas, de tal manera que se debe caracterizar la hidrólisis del almidón para la obtención de jarabes de glucosa. De esta manera, se podría convertir a este grano en una alternativa para la obtención de glucosa.

4. Hipótesis

El alto contenido de amilopectina en el grano de almidón de la semilla de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus* L.) facilitará la acción de enzimas amilolíticas para la obtención de glucosa.

5. Objetivos

5.1 General

- ★ Caracterizar la hidrólisis del almidón del grano de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus* L.) para la producción de jarabe de glucosa.

5.2 Particulares

- ★ Aislar y cuantificar el almidón del grano de amaranto por diferentes métodos de extracción.
- ★ Caracterizar la dextrinización y sacarificación del almidón de amaranto.
- ★ Obtener los parámetros cinéticos de la dextrinización y sacarificación del almidón de amaranto.

6. Materiales y métodos

6.1 Reactivos

- ★ Semillas de amaranto (*Amaranthus hipocondriacus* L)
- ★ NaOH (Meyer)
- ★ Fenol (JT Baker)
- ★ NaCl (JT Baker)
- ★ CaCl₂ (Reasol)
- ★ HCl (JT Baker)
- ★ H₂SO₄ (Reasol)
- ★ Ácido 3,5 Dinitrosalicílico (Sigma)
- ★ Na₂SO₃ (JT Baker)
- ★ Azul de coomasie (Sigma)
- ★ Ácido fosfórico (JT Baker)
- ★ Ácido perclórico (JT Baker)

- ★ Almidón de maíz (Meyer)
- ★ Dextrosa (JT Baker)
- ★ Kit para la determinación de glucosa (GOD-POD) (Mexlab)
- ★ α -amilasa de *Bacillus licheniformis* (Sigma)
- ★ Amiloglucosidasa de *Aspergillus niger* (Sigma)
- ★ Pulalanasa de *Bacillus subtilis* (Sigma)

6.2 Equipos

- ★ Espectrofotómetro Genesis 10 UV (Thermo Electron corporation)
- ★ Horno de secado (Riossa)
- ★ Centrifuga Rotina 420 R (Hetterh zentrifugen)
- ★ Baño de temperatura controlada BM100 (Yamato)

6.3 Plan general de trabajo

Para lograr obtener jarabes glucosados a partir de almidón de amaranto mediante hidrólisis enzimática, se usó el esquema general de trabajo presentado en la Figura 13, el cual se divide en tres etapas. La primera es la extracción del almidón de amaranto, la segunda es la dextrinización del almidón para la producción de dextrinas mediante la enzima α -amilasa y la tercera (sacarificación) consiste en la hidrólisis de las dextrinas a glucosa usando amiloglucosidasa y pulalanasa.



Figura 13. Esquema general de trabajo

6.4 Obtención de la harina de amaranto.

El grano de amaranto proveniente de la planta de *Amaranthus hypochondriacus* L. recolectada en la zona de Santiago Tulyehualco Delegación Xochimilco, Ciudad de México. El grano fue reducido de tamaño por medio de un molino eléctrico de la marca Krups GX410011, posteriormente tamizado con una malla de 420 micrones de apertura; la harina obtenida se utilizó para la extracción de almidón de amaranto según dos métodos propuestos por Villarreal et al. (2013), el método alcalino y el método alcalino con digestión con proteasa y además se utilizó el método de extracción con etanol propuesto por Gao et al. (2009).

6.5 Obtención de almidón de amaranto por método alcalino (MA).

La Figura 14 muestra el esquema general de la extracción de almidón; 50 g de harina de amaranto se remojó con una solución de NaOH (0.25 g de NaOH/100 mL de agua destilada), se calentó a 28°C y se agitó durante 9 ciclos de 30 minutos cada uno, después, la mezcla se centrifugó a 8000 rpm por 30 min usando una centrifuga y al sobrenadante se le determinó proteínas residuales mediante el método de Bradford.

El precipitado se resuspendió en 50 mL de agua destilada y se ajustó el pH a 7 con HCl (50 mL de HCl/100 mL de agua destilada); se centrifugó a 8000 rpm por 30 minutos, el precipitado se lavó, se filtró con 100 mL de agua destilada a través de una tela; la porción de fibra (pellet) fue eliminada. La suspensión obtenida (almidón) se centrifugó a 8000 rpm por 30 min, se eliminó el sobrenadante (agua) así como el mucilago del amaranto (capa superior oscura); el precipitado (almidón) se resuspendió en 50 mL de agua destilada, se repitió lo mismo hasta eliminar la capa negra. El almidón se secó a temperatura ambiente durante 48 h y se molió en un mortero.

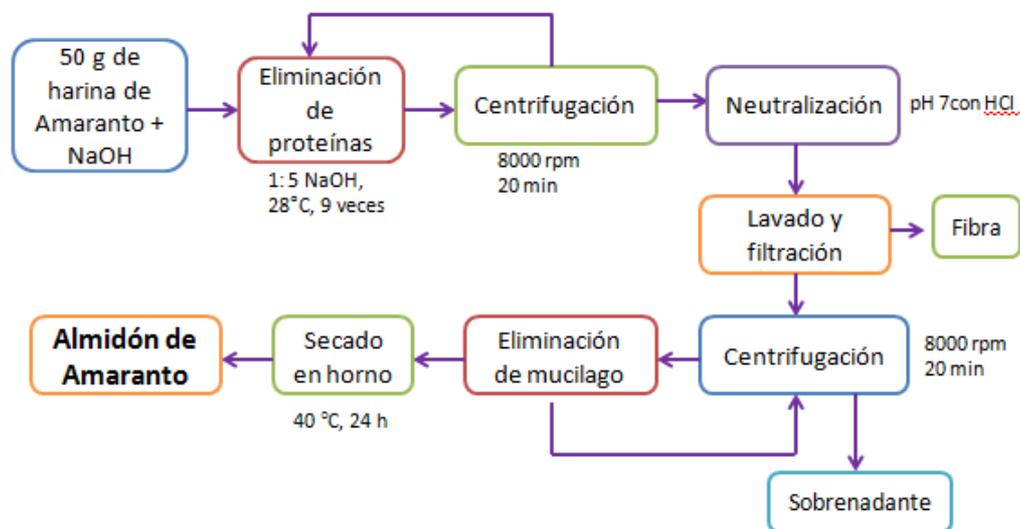


Figura 14. Esquema general de la obtención de almidón de amaranto por el MA.

6.6 Obtención de almidón por el método alcalino combinado con digestión con proteasa (MAP).

En la Figura 15 se muestra el esquema general de la extracción de almidón; 50 g de harina de amaranto se remojó con una solución de NaOH (0.05g/100 mL de agua destilada) con 0.1 g/100 g de azida de sodio como agente antimicrobiano y se mantuvo en agitación a temperatura ambiente durante 15 h. La suspensión fue neutralizada usando HCl (50 mL de HCl/100 mL de agua) y centrifugada a 8000 rpm por 20 min, el precipitado se lavó con 50 mL de agua destilada. Se añadió la proteasa que fue una alcalasa de *Bacillus licheniformis* (0.1 g/ 100 g de grano) a la suspensión y se incubó a 37°C a 60 rpm por 5 h. Las etapas posteriores se llevaron a cabo en las mismas condiciones que el MA.

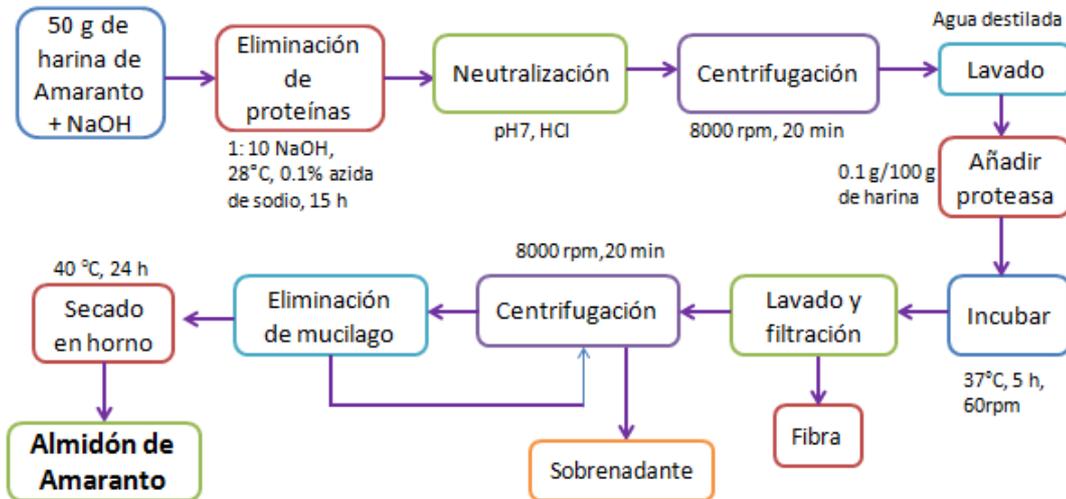


Figura 15. Esquema general de la obtención de almidón de amaranto por el método MAP.

6.7 Obtención de almidón con etanol.

Se siguió la metodología propuesta por Gao et. al. (2009), la cual se muestra en la Figura 16; se tomaron 25 g de harina de amaranto que se mezcló con etanol al 50%, la mezcla se agitó durante 30 minutos, pasado el tiempo de centrifugó a 8000 rpm por 10 minutos, el sobrenadante etanólico 1 se apartó y el precipitado (fibra) se mezcló nuevamente con etanol al 50% y se agitó por 30 minutos, se centrifugó y se apartó el sobrenadante etanólico 2, la fibra se mezcló con etanol al 50% por tercera ocasión y se agitó durante 10 min, se centrifugó y los residuos de fibra de lavaron con etanol al 95% por 30 minutos, se centrifugó y se apartó el sobrenadante etanólico 3. Estos sobrenadantes etanólicos se mezclaron y se centrifugaron para obtener un residuo de almidón, el sobrenadante etanólico se sometió a destilación para recuperar el etanol mientras que el residuo de almidón se lavó con agua destilada y se le adicionó SDS al 0.25 % (p/p en relación del peso original de la harina), se centrifugó y se raspó la capa negra de proteínas, de esta manera se obtuvo el almidón parcialmente purificado que fue lavado 3 veces con etanol al 95% para eliminar cualquier residuo de proteína presente, posteriormente se centrifugó y se obtuvo el almidón purificado que se dejó secar en estufa a 40°C por 12 h.

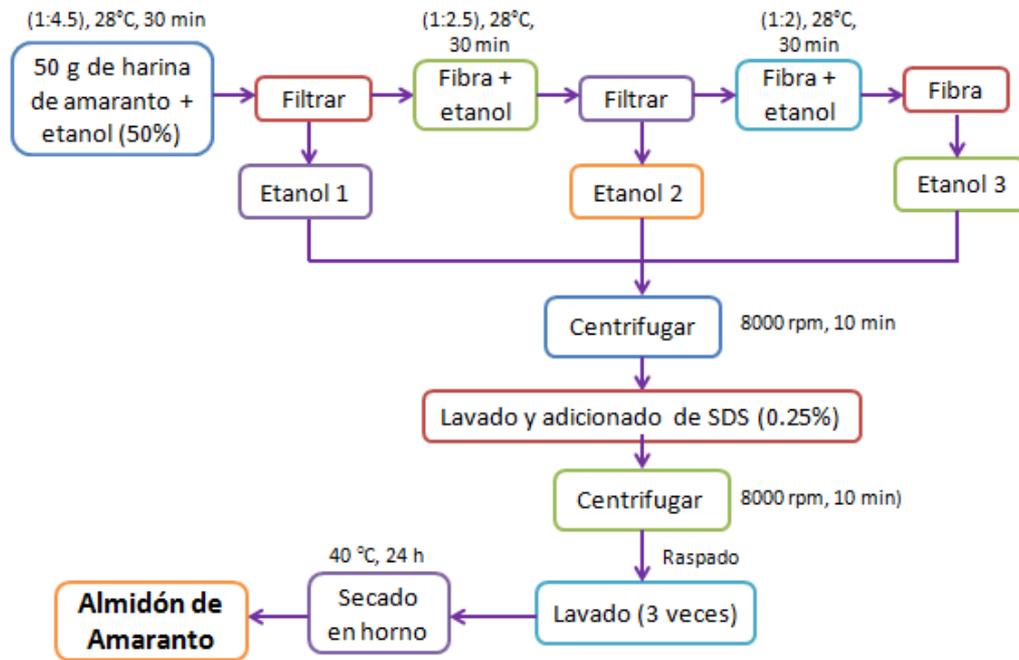


Figura 16. Esquema general de la obtención de almidón de amaranto con etanol.

Se midió el porcentaje de rendimiento del almidón extraído por los tres métodos mediante las ecuaciones 1 y 2.

$$\% \text{ Rendimiento} = \frac{\text{gramos de almidón extraído}}{\text{gramos de harina de amaranto}} \times 100 \quad \text{ecuación 1}$$

$$\% \text{ Recuperación} = \frac{\text{g de almidón extraído}}{\text{Almidón total de amaranto}} \times 100 \quad \text{ecuación 2}$$

6.8 Cuantificación de almidón.

Se utilizaron dos técnicas para la cuantificación del almidón: (1) Cuantificación de azúcares reductores por el método del ácido 3,5-Dinitrosalicílico (DNS) y (2) cuantificación de glucosa por el método enzimático GOD-POD.

6.8.1 Cuantificación de azúcares reductores y cálculo del almidón total.

Una vez obtenido el almidón de amaranto, se realizó la gelatinización y solubilización (hidrólisis ácida) del almidón siguiendo el método propuesto por Rose et al. (1991) con algunas modificaciones. Se pesaron 500 mg de almidón de amaranto a los que se

adicionaron 15 mL de ácido perclórico al 35 % la mezcla, se mantuvo en agitación constante durante 30 minutos, pasado el tiempo, se filtró a través de un papel Whatman No. 1 y se lavó el vaso con 10 mL de ácido perclórico. El filtrado (solución de almidón) se aforó a 100 mL con agua desionizada. Se realizó una dilución 1:10 (100 µL de solución de almidón y 900 µL de agua desionizada) para poder realizar la determinación de almidón total.

Para la cuantificación de almidón total se usó el método de DNS propuesto por Miller (1954), el cual se basa en la reducción del ácido 3,5-Dinitrosalicílico de color amarillo a 3-amino-5-nitrosalicílico que es de color rojo ladrillo en presencia de glucosa o cualquier otro azúcar reductor y cuyo máximo de absorción es a 540 nm (Figura 17). Se mezclaron 0.5 mL de muestra y 0.5 mL de DNS, se colocaron en ebullición por 5 minutos, se enfriaron a temperatura ambiente y se añadieron 5 mL de agua destilada, se dejaron reposar por 15 minutos y se midió la absorbancia a 540 nm. Se cuantificó el almidón total empleando a la ecuación 3.

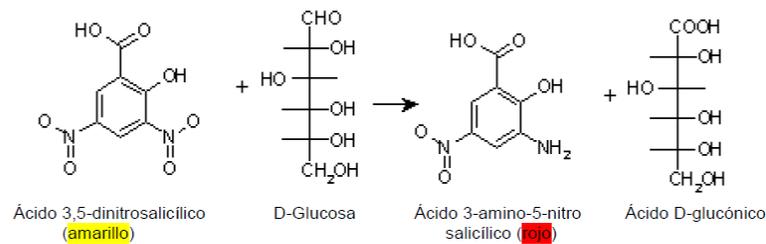


Figura 17. Mecanismos de acción de DNS.

$$Y = \frac{y_g * d_f * V * h_f}{d_w} \quad \text{ecuación 3}$$

Donde:

Y: mg de almidón/mg de muestra

y_g: mg de glucosa/ 100 mL (proveniente de la curva estándar)

d_f: Factor de dilución

V: Volumen original de almidón

d_w: Peso del almidón

h_f: Factor de hidrólisis del almidón (0.9)

6.8.2 Cuantificación de almidón por el método enzimático.

Se siguió el método de Holm et al. (1986) en el cual el almidón es hidrolizado a glucosa mediante enzimas amilolíticas; el método consistió en tomar 0.25 g de almidón y disolverlos en 50 mL de agua destilada, se agregaron 100 µL de α-amilasa y la mezcla de reacción se incubó a 90°C durante 1 hora con agitación. La mezcla se dejó enfriar y se filtró con papel Whatman No 1, se aforó a 100 mL, se tomó 1 mL del almidón hidrolizado y se adicionaron 50 µL de amiloglucosidasa (diluida en buffer de acetatos 0.1 M a pH 4.75), la mezcla fue incubada a 60°C por 30 minutos.

Terminado el tiempo de incubación, se mezclaron 1 mL de las dextrinas producidas, 2 mL de agua destilada y 2 mL de la solución de GOD-POD, se dejó en obscuridad durante 30 minutos y se midió el color a 505 nm.

En esta técnica (GOD-POD) la glucosa reacciona con el reactivo enzimático que contiene una mezcla de las enzimas glucosa Oxidasa (GOD) y peroxidasa (POD). La reacción se lleva a cabo en dos etapas, en la primera la glucosa es oxidada a ácido glucónico por acción de la enzima GOD obteniéndose como producto H₂O₂, en la segunda etapa hay una reacción mediada por la enzima POD la cual reacciona con el ácido p-Hidroxibenzoico y 4-Aminoantipirina generándose un compuesto de color rosa con un máximo de absorción a 505 nm (Figura 18).



Figura 18. Mecanismo de acción del método enzimático GOD-POD.

La pureza del almidón se cuantificó usando las fórmulas 4, 5 y 6 donde del factor de 2.4 incluye el factor de dilución (6666.65) y el peso de la muestra (0.25 g) multiplicados por el factor de conversión de porcentaje de glucosa a porcentaje de almidón (0.9).

$$\text{Factor} = \frac{100}{\text{Absorbencia del calibrador}} \quad \text{ecuación 4}$$

$$\text{Glucosa} \left(\frac{\text{mg}}{100\text{ml}} \right) = \text{Factor} * \text{Absorbencia a 505 mn} * 2.4 \quad \text{ecuación 5}$$

$$\%Almidón = Glucosa * 2.4 \quad \text{ecuación 6}$$

6.9 Caracterización de la dextrinización del almidón de amaranto.

En esta etapa se identificaron las variables de interés para determinar las mejores condiciones para la producción de dextrinas a partir de almidón de amaranto. Las variables que afectan el proceso de dextrinización del almidón son: concentración de α -amilasa de *Bacillus licheniformis*, pH, concentración de cloruro de calcio, temperatura, velocidad de agitación y tiempo de reacción. La evaluación de las variables se llevó a cabo de una manera escalonada, es decir, se obtuvieron las mejores condiciones de cada una de las variables de interés, dejando fijas las demás; una vez definida ésta, se tomó la siguiente y así sucesivamente hasta llegar a la última (Figura 19).

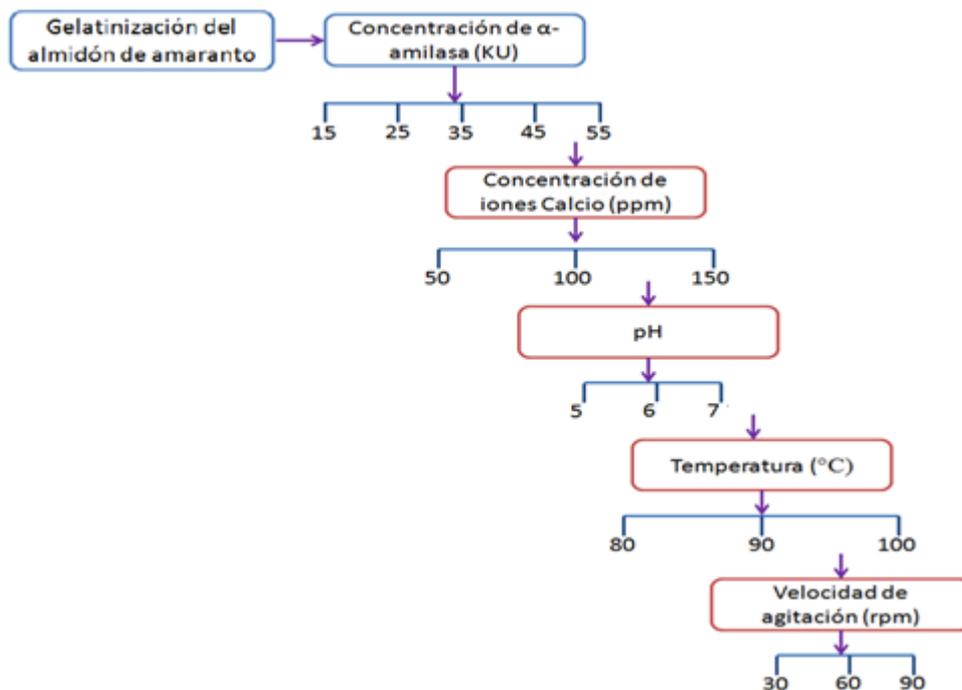


Figura 19. Esquema escalonado de experimentación usado para determinar las mejores condiciones de dextrinización del almidón de amaranto.

El grado de hidrólisis del almidón se expresa, generalmente en función del equivalente de dextrosa (ED) los cuales se determinaron por medio de la ecuación 6 (Johnson y Padmaja, 2013; Pardo et al., 2004; Ruiz et al., 2011).

$$ED = \frac{\text{Azúcares reductores}}{\text{Peso del almidón}} * 100 \quad \text{ecuación 6}$$

6.9.1 Selección de la concentración de α -amilasa.

Para evaluar el efecto de la concentración de enzima sobre el almidón, se probaron cinco concentraciones de α -amilasa (15, 25, 35, 45 y 55 KU), El almidón de amaranto fue dispersado en agua formando una solución de 100 g/L, el pH se ajustó a 6, se calentó a 70°C por 30 minutos y luego fue adicionada la enzima en las concentraciones respectivas. La enzima se dejó actuar por 30 minutos a 90°C y se detuvo la reacción con 1mL de ácido clorhídrico 1 N. El contenido de dextrinas se cuantificó por el método de DNS.

6.9.2 Selección de la concentración de Cloruro de Calcio.

Una vez conocida la concentración de α -amilasa más adecuada, se prosiguió con la selección de la cantidad necesaria del cofactor calcio (CaCl_2) para una mayor producción de dextrinas, para esto se probaron tres concentraciones de cloruro de calcio (50, 100 y 150ppm).

A la solución de almidón de amaranto se le añadieron las concentraciones de CaCl_2 propuestas, se ajustó el pH a 6, la mezcla de reacción se calentó a 70°C por 30 minutos y posteriormente se añadió la concentración de enzima seleccionada anteriormente, se dejó actuar por 30 minutos a una temperatura de 90°C y se detuvo la reacción con 1mL de ácido clorhídrico 1 N. El contenido de dextrinas se cuantificó por el método de DNS.

6.9.3 Selección del pH.

Con el fin de evaluar el efecto del pH sobre la dextrinización, se evaluaron tres diferentes valores de pH (5-7). A la solución de almidón de amaranto se añadió la concentración de CaCl_2 seleccionada en el inciso anterior, la mezcla se ajustó al pH correspondiente y se calentó a 70°C por 30 minutos posteriormente se añadió la concentración de enzima seleccionada, se dejó actuar por 30 minutos a 90°C y se detuvo la reacción con 1mL de ácido clorhídrico 1 N. El contenido de dextrinas se cuantificó por el método de DNS.

6.9.4 Selección de la temperatura.

Se probaron tres diferentes temperaturas (80, 90 y 100°C). A la solución de almidón de amaranto se añadió la concentración de CaCl_2 seleccionada, se ajustó al pH adecuado y se calentó a 70°C por 30 minutos, posteriormente se añadió la concentración de enzima seleccionada, se dejó actuar por otros 30 minutos a las diferentes temperaturas y se detuvo la reacción con 1mL de ácido clorhídrico 1 N. El contenido de dextrinas se cuantificó por el método de DNS.

6.9.5. Selección de la velocidad de agitación.

Se probaron tres diferentes velocidades de agitación (30, 60 y 90 rpm), debido a que esta variable ha sido muy poco estudiada. A la solución de almidón de amaranto se añadió la mejor concentración de CaCl_2 , se ajustó el pH adecuado y se calentó a 70°C por 30 minutos, después se ajustó la temperatura seleccionada, se añadió la concentración de enzima seleccionada y se dejó actuar por 30 minutos usando las diferentes velocidades de agitación, la reacción fue detenida adicionando 1mL de ácido clorhídrico 1 N. El contenido de dextrinas se cuantificó por el método de DNS.

6.9.6 Tiempo de reacción.

Una vez conocido las mejores condiciones para la dextrinización, entonces se estudió la variable del tiempo con el fin de poder evaluar la mayor producción de dextrinas, se propuso un tiempo de 1 hora de reacción. A la solución de almidón de amaranto se añadió la mejor concentración de CaCl_2 , se ajustó el pH adecuado y se calentó a 70°C por 30 minutos, se añadió α -amilasa y se dejó actuar durante 1 hora a una temperatura de 90°C tomando 1 mL de muestra cada 10 minutos, se detuvo la reacción con 1mL de ácido clorhídrico 1 N. El contenido de dextrinas se cuantificó por el método de DNS.

6.10 Caracterización de la sacarificación

Después de haber determinado las mejores condiciones para la producción de dextrinas, se procedió a evaluar las variables de la etapa de sacarificación. Las variables fueron relación amiloglucosidasa/pulalanasa, pH, temperatura y tiempo de reacción (Figura 20).

En esta etapa no se probó el efecto de los iones calcio ya que estas enzimas no son dependientes de calcio.

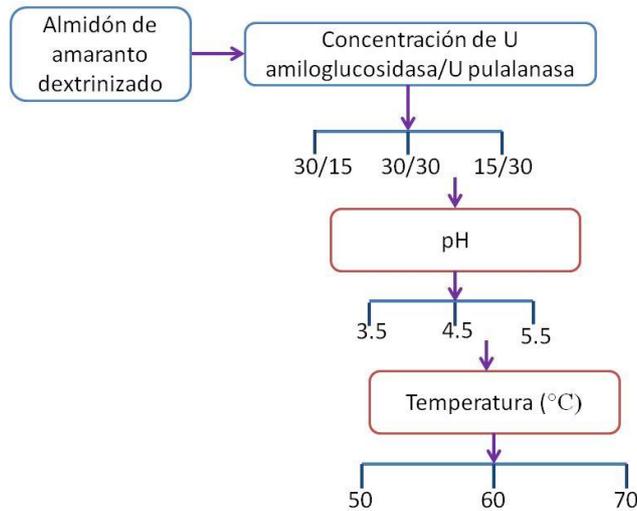


Figura 20. Esquema escalonado de experimentación usado para las determinar las mejores condiciones de la sacarificación del almidón de amaranto.

6.10.1 Relación amiloglucosidasa/pulalanasa.

Se utilizaron las dextrinas obtenidas de la etapa anterior para la producción de glucosa usando diferentes relaciones de amiloglucosidasa/pulalanasa. A la mezcla de dextrinas se le ajustó el pH a 4.5, se calentó a 60°C, se les adicionó las respectivas relaciones de enzimas y se dejaron reaccionar por 30 minutos. Se tomó una alícuota de 1 mL de muestra en la que se detuvo la reacción adicionando 1mL de ácido clorhídrico 1 N. el contenido de glucosa se cuantificó por el método de GOD-POD.

6.10.2 Selección del pH.

Con el fin de evaluar el efecto del pH sobre la producción de glucosa, se probaron diferentes valores de pH (3.5-5.5). Se ajustó la mezcla de dextrinas a los diferentes pH de muestra, la mezcla se calentó a 60°C y se añadió la relación de enzimas seleccionadas en el inciso anterior y se dejó actuar por 30 minutos a 60°C. La reacción se detuvo con 1mL de ácido clorhídrico 1 N. El contenido de glucosa se cuantificó por el método de GOD-POD.

6.10.3 Selección de la temperatura.

Se probaron tres diferentes temperaturas (50, 60 y 70°C), siendo la de 60°C la recomendada por la casa fabricante (Sigma-Aldrich), puesto que a temperaturas menores se corre el riesgo de contaminación microbiana, además, la actividad de la amiloglucosidasa decrece notablemente y a temperaturas mayores se ve afectada la estabilidad de la enzima. A las dextrinas de amaranto, se les ajustó el pH seleccionado y se calentaron a 60°C, después se añadió la relación de enzimas seleccionadas, se dejó actuar por 30 minutos a las diferentes temperaturas y se detuvo la reacción con 1 mL de ácido clorhídrico 1 N. El contenido de glucosa se cuantificó por el método de GOD-POD.

6.10.4 Tiempo de reacción.

Una vez conocidas las mejores condiciones para la sacarificación, entonces se estudió la variable del tiempo con el fin de poder evaluar la mayor producción de glucosa, se propuso un tiempo de 24 horas de reacción. A las dextrinas de amaranto obtenidas, se les ajustó el pH adecuado y se calentó a 60°C, se añadió la mejor relación de amiloglucosidasa/pulalanasa y se dejó actuar durante 24 horas a una temperatura de 60°C tomando 1 mL de muestra cada 30 minutos, se detuvo la reacción con 1 mL de ácido clorhídrico 1 N. El contenido de glucosa se cuantificó por el método de GOD-POD.

6.11 Cinética y estudio de la concentración de sustrato

Una vez determinadas las mejores condiciones para la dextrinización y sacarificación, se procedió a estudiar la cinética de reacción para cada una de las etapas, con el fin de transformar el almidón de amaranto en jarabes de glucosa.

Se evaluaron diferentes concentraciones de almidón (50, 100, 150, 200 y 250 g/L) y se construyeron las gráficas de avance de reacción (producto vs tiempo). Se calcularon los valores de velocidad inicial (V_0), es decir la pendiente de la curva. Una vez obtenido dichos valores de V_0 a diferentes concentraciones de almidón, se obtuvo la curva de sustrato vs V_0 (Figura 21.A). El criterio para elegir la concentración de sustrato fue la cinética de Michaelis-Menten, que se encuentra al alcanzar la saturación de la enzima (Figura 21.B).

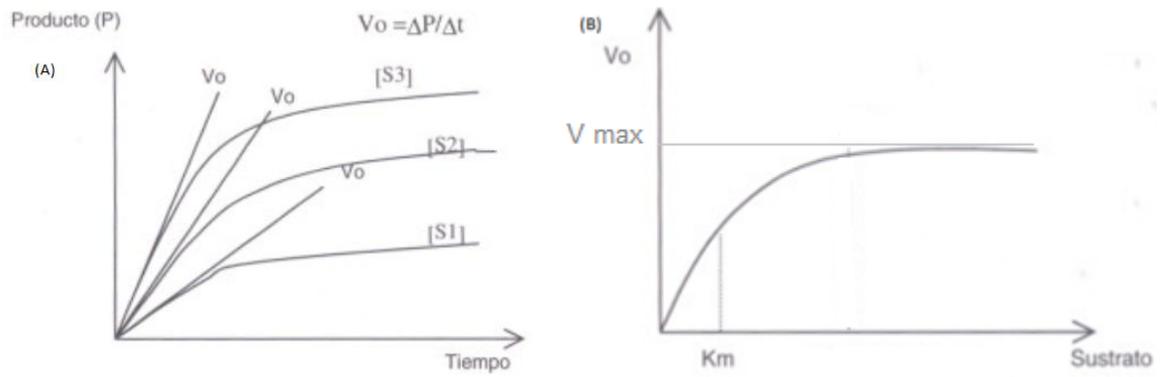


Figura 21. (A) Curva de avance de reacción. (B) Cinética de Michaelis-Menten.

6.12 Análisis estadístico.

Para conocer si existen diferencias significativas, todos los ensayos se realizaron por triplicado y se realizó un diseño factorial de 2^3 para la dextrinización y un factorial 3^3 para la sacarificación con una prueba complementaria de Tukey con un nivel de significancia (α) de 0.05 usando el software SPSS.

7. Resultados y Discusión.

7.1 Obtención de almidón de amaranto.

Para comparar los resultados obtenidos se utilizó como control al almidón de maíz, ya que es el que se utiliza comúnmente para la producción de jarabes de glucosa. La cantidad de almidón obtenido por los diferentes métodos se evaluó en términos de extracción y rendimiento (Tabla 9), el porcentaje de rendimiento de almidón se cuantificó con base en el peso inicial de harina de amaranto, mientras que la recuperación se expresó con base en el almidón total usando el contenido de glucosa.

Tabla 9. Extracción y rendimiento del almidón obtenido de harina de amaranto.

Almidón	Método de extracción	Rendimiento (%)	Recuperación (%)
Amaranto	Alcalino	43.83±0.13 ^c	96.69±2.95 ^a
	Alcalino-proteasa	24.83±0.5 ^b	81.70±1.02 ^b
	Etanol	9.75±0.2 ^a	90.81±1.69 ^c
Maíz	Alcalino	68.11±0.7 ^d	96.27±1.36 ^a

Letras diferentes en la misma columna significa que hay diferencias significativas ($p < 0.05$).

De los 3 métodos utilizados para la extracción de almidón de amaranto, el alcalino fue el que presentó un mayor porcentaje de extracción (43.83%), el análisis estadístico muestra que si existen diferencias significativas en cuanto al método utilizado, dicho esto, el método alcalino fue el que se usó para las extracciones posteriores de almidón de amaranto. Mistry et al. (1992) y Ji et al. (2004) lograron optimizar la extracción del almidón de maíz obteniendo un 68.11% de eficiencia de extracción.

El rendimiento obtenido por el método MA coincide con el reportado por Villarreal et al., (2013), mientras que para el método MAP los resultados obtenidos son muy bajos, 43.83% vs 45.29% y 24.83% vs 46.18% respectivamente. La cantidad de almidón obtenido por el método con etanol es bajo comparado con lo reportado por Gao (2009) (57-68% de extracción en harina de cebada); lo anterior puede ser atribuido a que la fracción de almidón aún se encuentra en los residuos de fibra del amaranto, debido a una

fuerte unión entre proteínas y β -glucanos presentes en la pared celular del grano de amaranto y el almidón, esta unión produce una alta viscosidad en una solución acuosa (por ejemplo en la solución con hidróxido de sodio) impidiendo así una extracción eficaz, los bajos rendimientos pueden ser ocasionados además debido a que durante la extracción el almidón aun esté en el material usado (Gao et al., 2009; Sharma y Tejinder, 2014; Villarreal et al., 2013).

El contenido de almidón generalmente se encuentra en el intervalo 92-96%; valores bajos indican que el proceso de extracción fue ineficiente (Aristizábal et al., 2007), es el caso del método con proteasa y el de etanol, ya que dichos valores se encuentran por debajo del 92%.

7.2 Dextrinización del almidón de amaranto.

Como ya se mencionó anteriormente, se utilizaron diferentes concentraciones de α -amilasa de *Bacillus licheniformis*, la cual hidroliza parcialmente el almidón de amaranto y lo transforma a dextrinas.

Se tomó como control al almidón de maíz, los resultados del efecto de la concentración de enzima se muestran en la Figura 22, el cual indica los equivalentes de dextrosa generados en la hidrólisis. Lo que se observa es que a medida que se aumenta la concentración de enzima también aumentan los equivalentes de dextrosa siguiendo una tendencia lineal; los ED producidos en ambos almidones van de 0.14-8.1 para almidón de amaranto y 0.25-8.5 para maíz; por lo tanto la concentración de α -amilasa afecta significativamente la hidrólisis del almidón además de disminuir el tiempo de conversión de almidón a dextrinas. Por consiguiente, la concentración de α -amilasa para la dextrinización de los almidones fue de 45 KU.

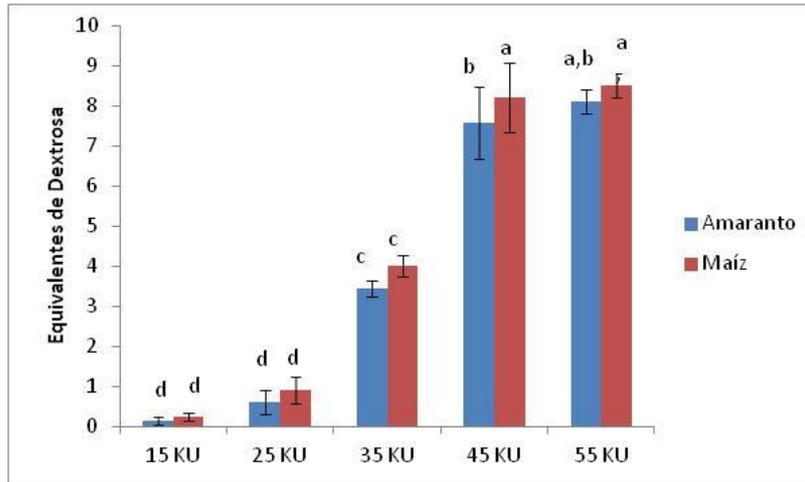


Figura 22. Equivalentes de dextrosa producidos de la hidrólisis del almidón de amaranto y maíz usando diferentes concentraciones de α -amilasa.

Una vez que la concentración de α -amilasa fue seleccionada (45 KU), entonces se prosiguió a evaluar el efecto de los iones calcio en la producción de ED; los resultados se muestran en la Figura 23. En la cual se observa que existe diferencia significativa entre las concentraciones de calcio utilizadas en la producción de ED para amaranto y maíz respectivamente.

Pardo et al. (2004) demuestra que la concentración óptima para la hidrólisis de almidón de papa es de 150 ppm, pero para este estudio se observa que los ED generados tienen una tendencia lineal cuando se aumenta la concentración de iones calcio, por lo tanto la concentración que se eligió fue de 150 ppm.

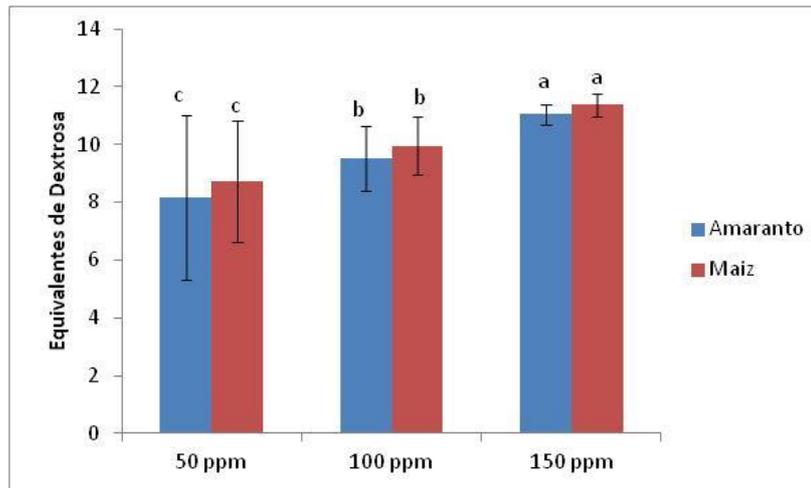


Figura 23. Efecto de la concentración de iones calcio (Ca^{2+}) sobre la dextrinización del almidón de amaranto y maíz.

Por otro lado, se sabe que los iones calcio son importantes en esta etapa, ya que la enzima es dependiente de este cofactor y mejora su actividad debido a que los iones calcio interactúan con los residuos de aminoácidos cargados negativamente, lo que resulta en la estabilización de la enzima, además este cofactor es conocido por tener un papel importante en la unión de la enzima con el sustrato (Pejin et al., 2015; Tomasik y Horton, 2012); la concentración de calcio que se seleccionó fue de 150 ppm, ya que con esta concentración se obtuvieron ED de 11 para ambos almidones.

Después de encontrar la concentración adecuada de iones calcio (150 ppm), se evaluó el efecto del pH, los resultados se muestran en la Figura 24 donde se observa que existen diferencias significativas cuando los valores de pH cambian, mostrando que la enzima es más productiva a pH de 6, ya que genera un ED de 13.87 y 14 para amaranto y maíz respectivamente.

El valor óptimo de pH varía dependiendo de la fuente de la enzima por ejemplo Tomasik y Horton (2012) mencionan que algunas α -amilasas pueden trabajar a pH de 4.5.

Ruiz et al.(2011) reportó que el pH óptimo de la α -amilasa para la hidrólisis del almidón de tapioca es de 5.0, para el caso de la hidrólisis del almidón de amaranto, el pH que se seleccionó fue de 6.

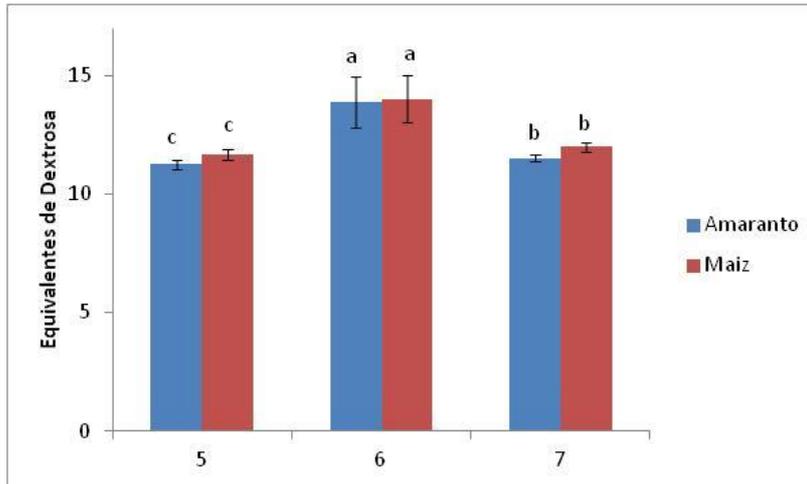


Figura 24. Efecto del pH sobre la dextrinización del almidón de amaranto y maíz.

Después de encontrar el pH óptimo de la α -amilasa (6), entonces se evaluó el efecto de la temperatura para la dextrinización del almidón de amaranto y maíz (Figura 25), se observa que la temperatura de 90°C en la que se producen la mayor cantidad de ED que es de 14 para la dextrinización de ambos almidones, siendo esta la temperatura seleccionada; además no hay diferencias significativas cuando la temperatura es de 80°C y 100°C. Por otra parte cuando la temperatura está por arriba y por debajo de los 90°C se producen menos ED, debido a una inactivación térmica de la enzima, como lo indica Ruiz et al. (2011). No obstante Cao et al. (1996) indica que cuando los ED son cercanos a 12, estos son los ideales para continuar con la sacarificación. .

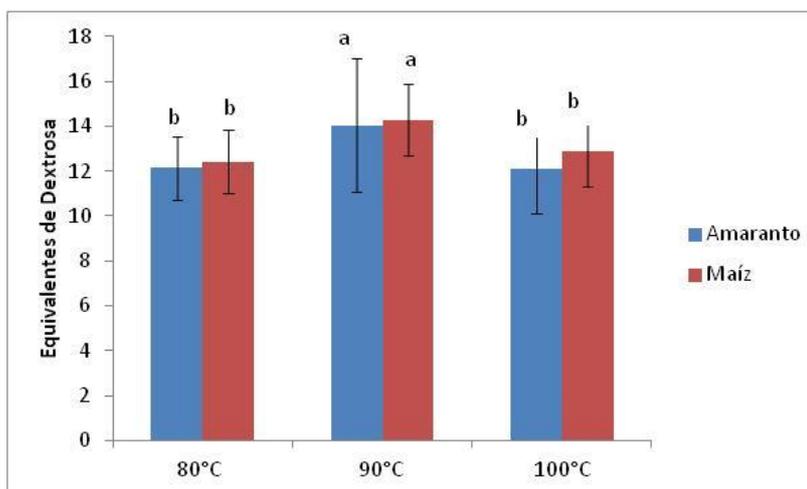


Figura 25. Efecto de la temperatura sobre la dextrinización del almidón de amaranto y maíz.

Una vez seleccionada la temperatura óptima (90°C) para la dextrinización, entonces se procedió a evaluar el efecto de la velocidad de agitación sobre la dextrinización, con el fin de evaluar si la velocidad de agitación afecta la absorción de la enzima en el gránulo de almidón, los resultados se muestran en la Figura 26, estos indican que sí existe diferencia significativa en la producción de ED. Para esta variable de estudio Pardo (2004) reporta que la velocidad de agitación óptima para la hidrólisis de almidón de papa es de 60 rpm, para este estudio en particular, la velocidad óptima obtenida fue de 60 rpm, lo cual es comparable con lo reportado por Pardo.

También se puede apreciar que velocidades inferiores a 60 rpm no permitieron un buen desempeño en la hidrólisis de los almidones, pues no facilitan la homogenización de la mezcla debido al efecto de la viscosidad presente, dificultando que el almidón se entre en contacto con la enzima, es decir, existen complicaciones para la formación del complejo enzima-sustrato. Velocidades superiores a 60 rpm disminuyen la productividad por efecto del inicio de una inactivación por agitación, ya que si se encuentra más homogéneo el sustrato, existe una mayor formación del complejo enzima-sustrato y por lo tanto aumenta la formación de producto, lo que produce una inactivación por producto (Pardo et al., 2004).

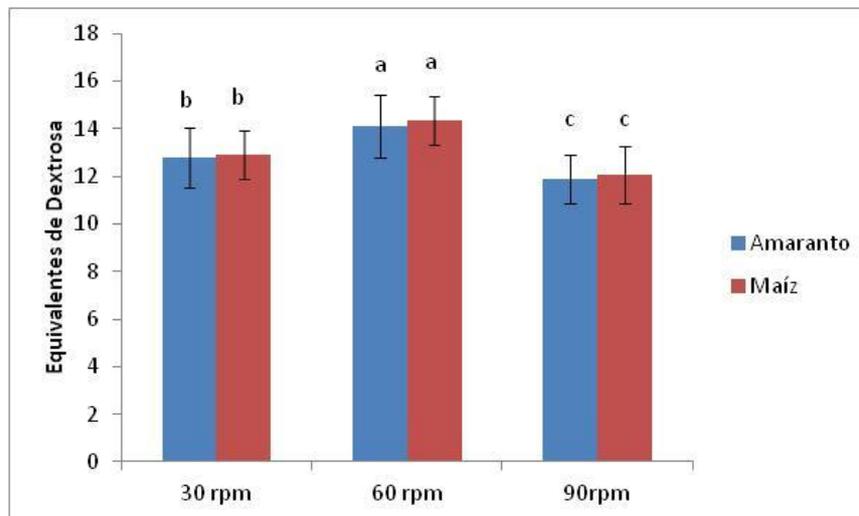


Figura 26. Efecto de la velocidad de agitación sobre de dextrinización de almidón de amaranto y maíz.

Se ha estudiado la conversión enzimática del almidón de diferentes fuentes botánicas usando una amplia gama de enzimas así como diferentes concentraciones o dosis enzimáticas bajo condiciones diversas de hidrólisis obteniendo jarabes glucosados de

diversos ED (Bettín y Quintero, 2010; Cao et al., 1996; Duvernay et al., 2013; Johnson y Padmaja, 2013; Konsula y Liakopoulou-Kyriakides, 2004; Kunamneni y Singh, 2005; Labeille et al., 1997; Mera y Cataño, 2005; Paolucci-Jeanjean et al., 2000; Rendón-Villalobos et al., 2011; Vidal et al., 2009; William y Pigman, 1944). Actualmente existen muy pocos reportes acerca de la hidrólisis enzimática del gránulo de amaranto; Guzmán-Maldonado et al. (1993) estudió la optimización de la dextrinización de harina de amaranto usando α -amilasa de *Bacillus licheniformis* obteniendo 28 ED después de 15 minutos de hidrólisis a 72°C, el cual es no es comparable a lo obtenido (14 ED), probablemente debido a que las condiciones de hidrólisis son diferentes. Por otro lado Gorinstein (1992) obtuvo 10 ED después de 30 minutos de hidrólisis a pH 6 a 100°C usando α -amilasa de *Bacillus licheniformis*, lo cual es similar a lo obtenido en este estudio. Yanez et al. (1986) encontró un 6.5% de hidrólisis de harina de amaranto después de 60 minutos, además de que los almidones cerosos son más rápidamente hidrolizados que los almidones normales (Gago et al., 2014).

La Figura 27 muestra el tiempo en el cual se obtuvieron más dextrinas a partir del almidón de amaranto que fue de una hora al igual que para el almidón de maíz; altos contenidos de azúcares reductores indican una alta proporción de azúcares de pequeño tamaño en la solución debido a la acción de la α -amilasa sobre los enlaces internos de la cadena de almidón; para el caso del almidón de amaranto, la cantidad de azúcares reductores que se muestran son maltosas y/o glucosas y el resto se consideran oligosacáridos como son maltodextrinas y dextrinas límite que no pueden ser cuantificadas con el método de DNS, debido a que el almidón de amaranto es del tipo ceroso y tiene un alto contenido de amilopectina la cual tiene muchas ramificaciones y por lo tanto hay una alta formación de dextrinas límite y su presencia impone cierto grado de resistencia hacia los enlaces α -1,4 vecinos (Hii et al., 2012).

En el presente estudio, no se observó un aumento en la producción de ED cuando se incrementa la concentración de almidón, sin embargo después de 20 minutos de hidrólisis la producción de ED se mantuvo constante obteniendo un máximo de 14 ED.

Ruiz et al. (2011) y Yankov et al. (1986) mencionan que a concentraciones mayores de 200 g/L de almidón existe inhibición enzimática debida a altas concentraciones de producto formado (maltosa) y por lo tanto la cantidad de azúcares reductores generados es menor.

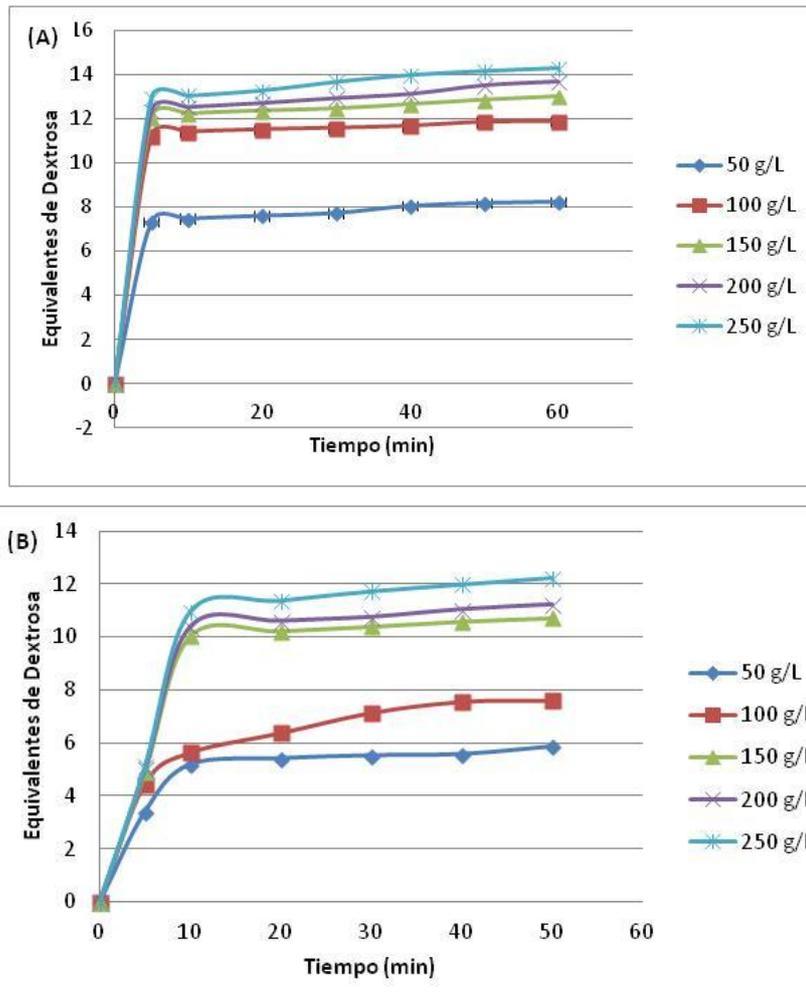


Figura 27. Curva de dextrinización usando diferentes concentraciones de almidón. (A) Amaranto, (B) Maíz.

Para concentraciones de almidón menores a 100 g/L Tawil et al., (2012) menciona que el complejo amilosa-lípido es más resistente al ataque enzimático, lo que ocasiona que la hidrólisis de la amilosa sea más difícil y lenta ya que esta unión puede restringir el hinchamiento de los gránulos durante la gelatinización del almidón y por lo tanto limita la entrada de la enzima al gránulo lo que conlleva bajas tasas de hidrólisis, además la estructura cristalina es más rápidamente degradada cuando se utilizan concentraciones mayores a 100 g/L. Una parte significativa de los lípidos se encuentra en la superficie del gránulo de almidón; los gránulos pequeños tienen un mayor contenido de lípidos que los gránulos grandes, mientras que la amilopectina no forma complejos con ningún compuesto orgánico, lo que facilita su degradación enzimática (Aggarwal et al., 2001; Dona et al., 2010; Dziugan et al., 2013; El-fallal et al., 2012; Fernandes et al., 2014; Foresti et al., 2014; Gago et al., 2014; Jacques et al., 2003; Pejin et al., 2015; Tawil et al.,

2012; Tester et al., 2004; Yongfeng et al., 2013). Por otro lado Foresti et al., (2014) proponen que la hidrólisis comienza primero en la región amorfa, seguida por la región cristalina.

Vidal et al. (2009) propone que durante la hidrólisis enzimática se forman canales o poros desde la superficie del gránulo hasta llegar al hilum, en estos canales se cree que proporcionan sitios para el ataque enzimático, dejando picaduras y formando túneles que van hasta el interior del granulo.

En cuanto a la baja liberación de glucosa usando una concentración de 50 g/L pudiera ser que la gelatinización del almidón sea incompleta, ya que los puentes de hidrógeno que unen a las zonas amorfas y cristalinas están intactos, haciendo que haya una ligera expansión del gránulo de almidón y la enzima no pueda entrar con facilidad (O'Brien y Wang, 2008; Tester et al., 2004).

La cinética de hidrólisis obtenida para cada almidón fue la correspondiente al modelo de Michaelis-Menten, en donde se graficó la concentración de almidón vs velocidad inicial. Para cada cinética se halló la velocidad inicial de reacción V_0 graficando luego vs la concentración inicial de sustrato (S_0) se obtuvo la cinética de reacción de Michaelis-Menten. Los parámetros cinéticos fueron calculados para la dextrinización usando el método de linearización de Lineweaver-Burk para ambos almidones (Figura 28).

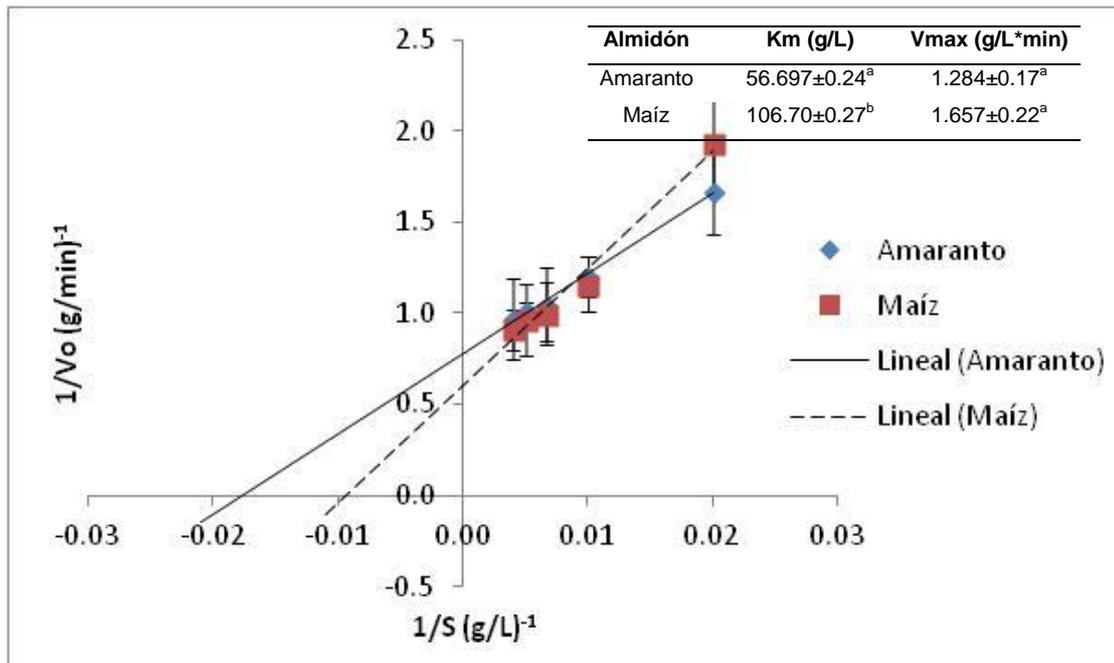


Figura 28. Gráfica de Lineawere-Burk o doble recíproco de almidón de Amaranto y Maíz.

Los valores de Vmax y Km son específicos para cada enzima y son afectadas por la temperatura, pH y concentración de sustrato. Vmax se define como la velocidad a la cual la enzima está saturada por el sustrato, mientras que Km describe la afinidad que tiene la enzima sobre el sustrato (Mokrejs et al., 2011). Se utilizó almidón de maíz como control para comparar los parámetros cinéticos de ambos almidones. La Vmax y Km la dextrinización del almidón de amaranto y maíz son presentados en la Tabla 10.

Tabla 10. Parámetros cinéticos de la dextrinización del almidón de amaranto

Almidón	Km (g/L)	Vmax (g/L*min)
Amaranto	56.697±0.24 ^a	1.284±0.17 ^a
Maíz	106.70±0.27 ^b	1.657±0.22 ^a

Letras diferentes en la misma columna significa que hay diferencias significativas (p<0.05)

Se observa que no hay diferencia significativa de la Vmax de la dextrinización de ambos almidones, mientras que para la Km, indica que la enzima tiene una mayor afinidad por el almidón de amaranto.

Las condiciones para la dextrinización del almidón de amaranto fueron 100 g/L de almidón de amaranto a pH 6, 150 ppm de CaCl₂, una concentración de α-amilasa de 45 KU con una temperatura de 90°C a una velocidad de agitación de 60 rpm durante una

hora de hidrólisis, obteniendo un máximo de ED de 14.29 con una V_{max} de 1.284 ± 0.17 y una K_m de 56.697 ± 0.24 .

Kim et al. (2014) indica que el tamaño del granulo de almidón al inicio de la hidrólisis afecta significativamente la velocidad de hidrolisis, encontrando que gránulos grandes (como es el caso del almidón de maíz) tienden a tener una velocidad mayor, mientras que los gránulos pequeños (amaranto) son más rápidamente hidrolizables. Lo que se puede observar en la Tabla 10.

Aunque existan reportes sobre hidrólisis enzimática del almidón de amaranto, estos no informan los parámetros cinéticos de dicha hidrólisis, por lo tanto se compararon los resultados obtenidos con el almidón de maíz.

Diversos autores han reportados los parámetros cinéticos de la hidrólisis del almidón de maíz, por ejemplo Kim et al. (2014) hidrolizó almidón de maíz usando α -amilasa porcina y obtuvo una K_m de 30.3 g/L y una V_{max} de 0.136 g/min, por otro lado Yankov et al. (1986) encontró una K_m de 59.2 g/L y una V_{max} de 1.55 g/L*min, lo cual es muy similar a lo encontrado para el almidón de amaranto; Komolprasert y Ofoli (1991) informaron una K_m de 17.34 g/L y una V_{max} de 1.133 g/L*min.

7.3 Sacarificación de las dextrinas del almidón de amaranto.

Una vez encontradas las condiciones óptimas para la dextrinización, las cuales fueron 45KU de α -amilasa/g almidón usando 150 ppm de cloruro de calcio con un pH de 6 a una temperatura de 90°C empleando 60 rpm de velocidad de agitación durante 1 hora de hidrólisis, entonces se procedió a encontrar las mejores condiciones para la sacarificación.

Para mejorar las condiciones de sacarificación, se utilizó un sistema escalonado, tal como en la dextrinización. Las variables a estudiar fueron relación amilogucosidasa/pulalanasa, pH, temperatura y tiempo de reacción, la concentración de iones calcio no fue estudiada, ya que estas enzimas no son dependientes de este cofactor. Los ensayos se realizaron a una temperatura constante de 60°C. El seguimiento de la reacción se llevó a cabo con la cuantificación de glucosa por el kit colorimétrico GOD-POD, como ya fue mencionado en la metodología.

Se probaron tres relaciones de enzimas diferentes, dejando como constante el pH, cantidad de almidón y temperatura. Estos resultados son presentados en la figura 29.

Para la sacarificación, el sustrato que se utilizó fueron las dextrinas producidas en la etapa anterior, dichas concentraciones fueron expresadas como azúcares reductores, por tanto, para el almidón de amaranto la concentración de azúcares reductores inicial fue de 2.029 g/L, mientras que para el almidón de maíz fue de 2.244 g/L.

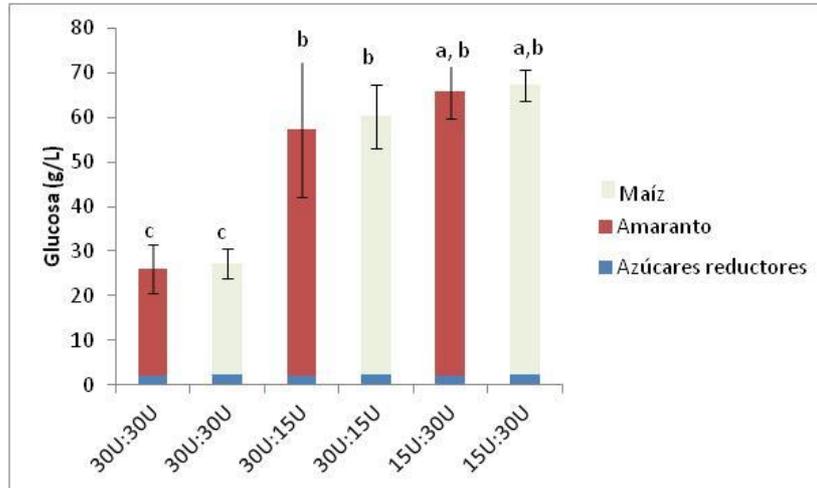


Figura 29. Efecto de la relación amiloglucosidasa/pululanasa sobre la producción de glucosa usando almidón de amaranto y de maíz.

Se observa que sí hay diferencia significativa usando diferentes relaciones de enzimas para ambos almidones, es decir, que usando la misma relación de enzimas no hay una producción de glucosa comparada cuando la concentración de amiloglucosidasa disminuye. Durante la sacarificación, la amilosa y amilopectina parcialmente hidrolizadas (o dextrinas) son depolimerizadas por la acción de la amiloglucosidasa que remueve glucosa de los extremos no reductores de la cadena de oligosacáridos. La tasa de hidrólisis por acción de la amiloglucosidasa depende de la longitud de la cadena, y que tan dispuestos los enlaces α -1,4 y α -1,6, además de que hidroliza muy lentamente los enlaces α -1,6 de la amilopectina (Hii et al., 2012).

La relación de enzimas de que se seleccionó fue 15U de amiloglucosidasa:30U pululanasa, ya que fue la relación que libero una mayor cantidad de glucosa 63 y 65 g/L para amaranto y maíz respectivamente, una de las ventajas de usar pululanasa y amiloglucosidasa juntas durante la sacarificación es que la primera es capaz de hidrolizar específicamente las ramificaciones de los residuos de amilopectina seguido de la hidrólisis de los enlaces α -1,4 por la amiloglucosidasa, dando como resultado niveles altos de glucosa. Por otra parte Hii et al. (2012) indica que se necesitaría una menor

actividad de amiloglucosidasa para la sacarificación de almidones cerosos, lo cual concuerda con los resultados obtenidos, aunque también se menciona que primeramente debe adicionarse la pululanasa al principio de la sacarificación y casi al final de las sacarificación se adiciona la amiloglucosidasa, ya que es cuando la formación de isomaltosa comienza a ser significativa. Rendón-Villalobos et al. (2011) recomiendan una baja dosis de amiloglucosidasa para obtener una mayor producción de glucosa.

Una vez estudiado el efecto de la concentración de enzima (15U amiloglucosidasa/30U pululanasa), se prosigue a evaluar el efecto del pH sobre la sacarificación (Figura 30), en donde se observa que el pH ideal para la producción de glucosa es 4.5 para ambos almidones, obteniendo 67 y 70 g/L de glucosa para amaranto y maíz, lo cual concuerda con los reportes existentes sobre la sacarificación de almidones, además la cantidad de glucosa liberada con el pH de 3.5 y 5.5 son muy bajos comparados con la obtenida a pH de 4.5.

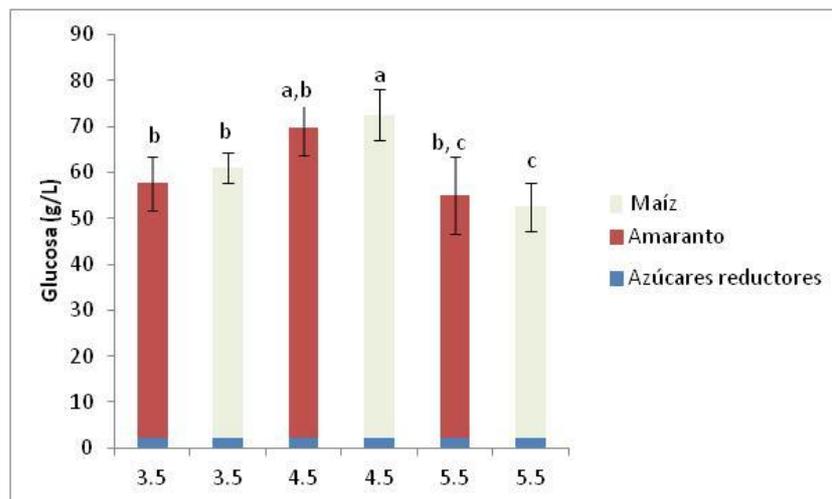


Figura 30. Efecto del pH sobre la producción de glucosa usando almidón de amaranto y maíz.

Después de conocer el pH óptimo para la sacarificación (4.5), entonces se evaluó el efecto de la temperatura sobre la sacarificación, los resultados se muestran en la Figura 31, en donde se observa que la temperatura afecta significativamente la conversión a glucosa siendo la temperatura de 60°C la que libera una mayor cantidad de glucosa 70 y 75 g/L para amaranto y maíz respectivamente, lo cual, dicha temperatura coincide con lo reportado en diversos estudios (Cao et al., 1996; Pardo et al., 2004; Ruiz et al., 2011).

A la temperatura de 50°C se observa que no hay una buena producción de glucosa, ya que la enzima no puede trabajar bien a esta temperatura, de manera similar ocurre con la temperatura de 70°C.

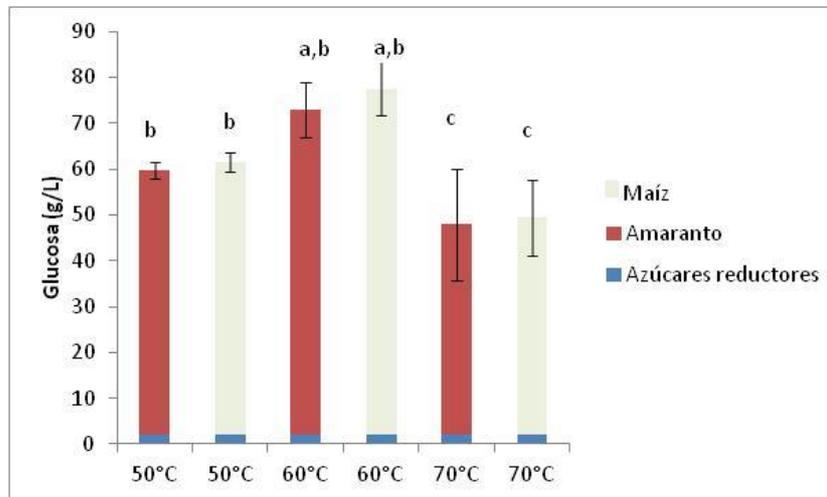


Figura 31. Efecto de la temperatura sobre la producción de glucosa usando almidón de amaranto y maíz.

Una vez que se conocieron las condiciones a las cuales se obtiene una mayor producción de glucosa para ambos almidones, las cuales fueron 15U amiloglicosidasa/30U de pulalanasa, pH de 4.5 a 60°C, entonces se evaluó un tiempo de reacción, el cual fue de 24 horas, usando diferentes concentraciones de dextrinas provenientes de la etapa anterior la cual se muestra en la Figura 32, la concentración inicial de dextrinas fueron de 5.37, 15.98, 30.01, 31.83 y 32.05 g/L para dextrinas de amaranto, mientras que para las dextrinas de maíz fueron 9.5, 16.32, 18.99, 19.24, 20.24 g/L.

Con las dextrinas de amaranto se obtiene un contenido máximo de glucosa de 92.23 g/L, mientras que para las de maíz se obtiene un máximo de glucosa de 86.34 g/L después de 24 horas de sacarificación. Además se puede apreciar que la concentración de glucosa después de 24 horas de sacarificación, comienza a disminuir esto puede deberse a que altas concentraciones de amiloglicosidasa, maltosa, isomaltosa y largos tiempos de sacarificación pueden ocasionar reacciones de reversión, es decir, la formación de nuevos enlaces α -1,4, haciendo que la producción de glucosa disminuya o también puede deberse a una inhibición no competitiva por un alto contenido de maltosa (Bettín y Quintero, 2010; Hii et al., 2012; Johnson y Padmaja, 2013).

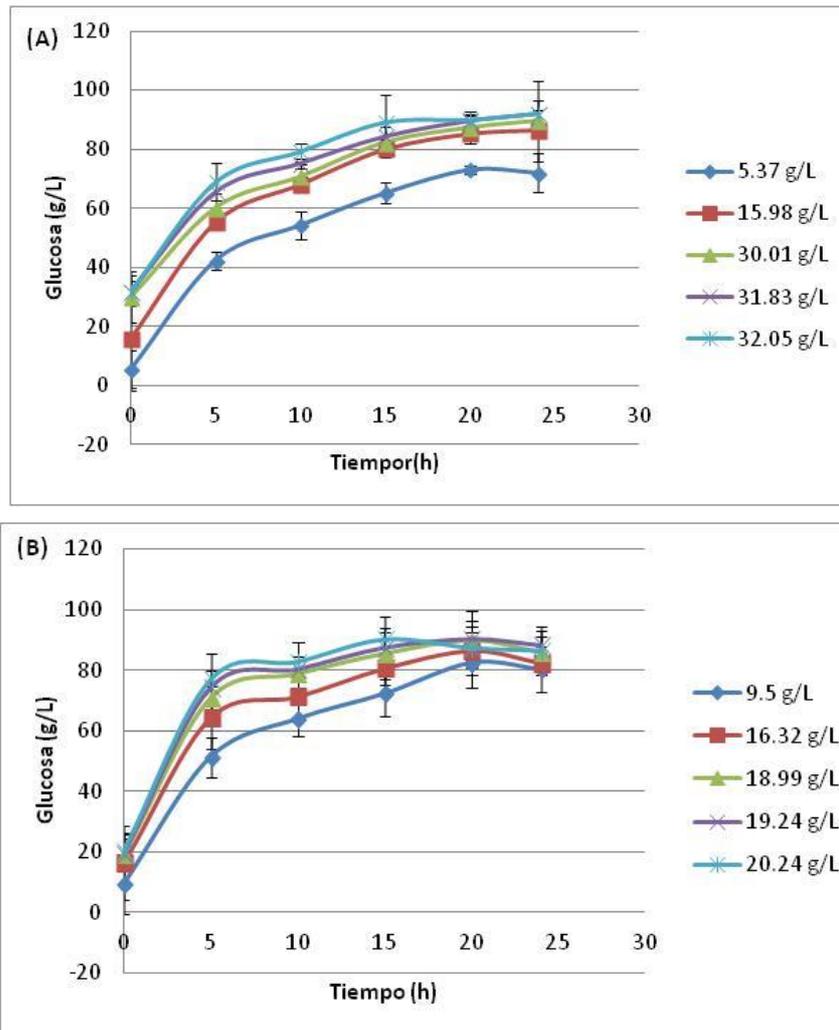


Figura 32. Curva de sacarificación para la producción de glucosa durante 24 horas. (A) Amarantho, (B) Maíz.

Por el contrario durante el enfriamiento (de 90°C a 60°C) es muy probable que las cadenas de almidón parcialmente hidrolizadas se re asocien unas con otras y de formen nuevos enlaces de amilopectina o se vuelvan a formar el complejo amilosa amilopectina formando un precipitado semicristalino que es altamente resistente a la hidrólisis produciendo una baja concentración de glucosa (Cao et al., 1996).

Guzmán-Maldonado et al. (1993) reportan que las condiciones óptimas de la sacarificación de almidón de amaranto son 100 U de amiloglucosidasa, 6U de pulalanasa por 24 horas, lo cual no coincide con los resultados obtenidos para la sacarificación en el presente estudio.

Johnson y Padmaja (2013) indican que a bajo contenido de glucosa o alto contenido de oligosacáridos se necesita una mayor dosis de amiloglucosidasa e incrementar el tiempo de sacarificación hasta por 72 horas para lograr una hidrólisis del 97-98%.

De la misma manera que para la dextrinización, una vez que se encontraron las mejores condiciones para la sacarificación entonces se determinaron los parámetros cinéticos de la sacarificación por medio de los gráficos del doble recíproco, los cuales se presentan en la Figura 33 y Tabla 11. En la cual se observa que es necesario 70.659 g/L de dextrinas para poder saturar a la enzima.

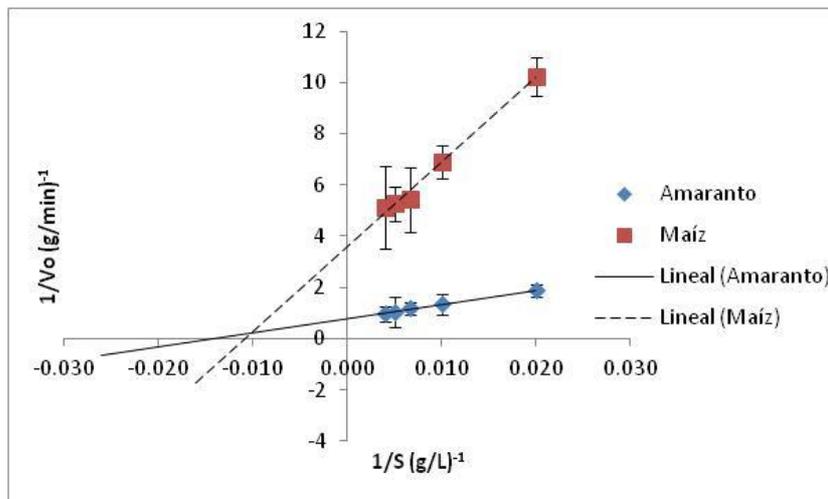


Figura 33. Gráfica de Lineawere-Burk o doble recíproco de almidón de Amaranto y Maíz.

Tabla 11. Parámetros cinéticos para la sacarificación de las dextrinas de amaranto y de maíz.

Almidón	Km (g/L)	Vmax (g/L*min)
Amaranto	70.659±0.75 ^a	1.283±1.03 ^a
Maíz	92.729±0.36 ^b	0.280±1.10 ^b

Letras diferentes en la misma columna significa que hay diferencias significativas (p<0.05)

Se observa que los parámetros cinéticos en ambos almidones son diferentes, a comparación de la dextrinización en donde la velocidad máxima era la misma; mientras que para la Km se observa que las enzimas muestran más afinidad por las dextrinas de amaranto, ya que estas son más rápidamente hidrolizables debido a que tienen más ramificaciones que las dextrinas de maíz. Por esta razón se puede decir que la estructura del granulo así como su morfología juegan un papel muy importante en la hidrólisis del almidón.

Wang et al. (2006) reportó los parámetros de la sacarificación obteniendo una K_m de 8.18 g/L y una V_{max} de 5.5 g/L*min. Dichos resultados no son comparables, ya que la K_m obtenida es mucho más grande que la reportada por Wang, mientras que para la velocidad obtenida con el almidón de amaranto es más lenta que la reportada.

Las condiciones para la sacarificación del almidón de amaranto son 15U de amiloglucosidasa/30 U de pulalanasa con pH de 4.5 a una temperatura de 60°C durante 24 horas de hidrólisis con una V_{max} de 1.283 g/L*min y una K_m de 70.65 g/L.

Por lo tanto el almidón de amaranto es una muy buena opción para la producción de jarabes de glucosa, y así poder usar este cereal no solamente como dulces tradicionales, si no para la elaborar jarabes que puedan ser utilizados en la industria alimentaria.

8. Conclusiones.

- ★ Se obtuvo glucosa a partir de la hidrólisis del almidón de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus* L) obteniendo un máximo de 92.23 g/L usando una concentración de almidón de 100 g/L.
- ★ El método alcalino para la extracción del almidón fue el más eficiente debido a que se logró obtener un rendimiento de $43.83 \pm 0.13\%$ y una recuperación del $96.69 \pm 2.95\%$.
- ★ Las condiciones experimentales para la dextrinización del almidón de amaranto fueron 100 g/L de almidón de amaranto, 45KU de α -amilasa con pH de 6, 150 ppm de CaCl_2 a 90°C durante una hora con una velocidad de agitación de 60 rpm. Se observó que el almidón de amaranto se hidroliza más fácilmente que el almidón de maíz por su mayor contenido de amilopectina. La K_m de la α -amilasa para el almidón de amaranto fue de 56.6 g/L el cual muestra una mayor afinidad por el sustrato que para el almidón de maíz, más rico en amilosa.
- ★ Las condiciones experimentales para la sacarificación fueron 15U amiloglucosidasa/30U de pulalanasa, pH 4.5 a 60°C durante 24 horas, con un contenido de glucosa de 98 g/L. La K_m de la sacarificación para el almidón de amaranto fue de 70.659 ± 0.75 con una velocidad máxima de 1.0283 ± 1.03 .

9. Recomendaciones

Para tener un mejor entendimiento de la conversión del almidón de amaranto a glucosa, es necesario seguir las siguientes recomendaciones:

- ★ Optimizar, por el método de superficie de respuesta, la hidrólisis del almidón en la cual se obtenga una adecuada concentración de glucosa para obtención de jarabes de glucosa.
- ★ Hacer una purificación del jarabe producido.
- ★ Realizar una microscopia electrónica de los gránulos de almidón para monitorear el cambio de estructura del gránulo a lo largo de la hidrólisis enzimática y comparar el mismo fenómeno con el de maíz.

10. Bibliografía.

- Aggarwal, N. K., Niga, P., Singh, D., & Yadav, B. S. (2001). Process optimization for the production of sugar for the bioethanol industry from tapioca, a non-conventional source of starch. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 17(8), 783–787. <https://doi.org/10.1023/A:1013500602881>
- Aristizábal, J., Sánchez, T., & Mejía Lorío, D. (2007). *Guía técnica para producción y análisis de almidón de yuca* (163rd ed.). Bolentín de servicios agrícolas de la FAO.
- Bajpai, P. (2013). *Advances in Bioethanol*. <https://doi.org/10.1007/978-81-322-1584-4>
- Bettín, L. A., & Quintero, D. J. (2010). Estudio de la producción de jarabes glucosados a partir de maltodextrinas empleando dos enzimas comerciales. *Revista de La Facultad de Química Farmacéutica*, 17(2), 165–172.
- Bijttebier, A., Goesaert, H., & Delcour, J. a. (2008). Amylase action pattern on starch polymers. *Biología*, 63(6), 989–999. <https://doi.org/10.2478/s11756-008-0169-x>
- Bojarová, P., & Kren, V. (2009). Glycosidases: a key to tailored carbohydrates. *Trends in Biotechnology*, 27(4), 199–209. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2008.12.003>
- Cao, N., Xu, Q., Ni, J., & Chen, L.-F. (1996). Enzymatic hydrolysis of corn starch after extraction of corn oil with ethanol. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 57–58(1), 39–47. <https://doi.org/10.1007/BF02941686>
- Cobucci-Ponzano, B., Conte, F., Rossi, M., & Moracci, M. (2008). The alpha-L-fucosidase from *Sulfolobus solfataricus*. *Extremophiles: Life under Extreme Conditions*, 12(1), 61–68. <https://doi.org/10.1007/s00792-007-0105-y>
- Dona, A. C., Pages, G., Gilbert, R. G., & Kuchel, P. W. (2010). Digestion of starch: In vivo and in vitro kinetic models used to characterise oligosaccharide or glucose release. *Carbohydrate Polymers*, 80(3), 599–617. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.01.002>
- Duvernay, W. H., Chinn, M. S., & Yenko, G. C. (2013). Hydrolysis and fermentation of sweetpotatoes for production of fermentable sugars and ethanol. *Industrial Crops and Products*, 42, 527–537. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.06.028>
- Dziugan, P., Balcerek, M., Pielech-Przybylska, K., & Patelski, P. (2013). Evaluation of the

fermentation of high gravity thick sugar beet juice worts for efficient bioethanol production. *Biotechnology for Biofuels*, 6(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-6-158>

El-fallal, A., Dohara, M. A., El-sayed, A., & Omar, N. (2012). Starch and Microbial α - Amylases : From Concepts to Biotechnological Applications. In *Carbohydrates-comprehensive studies on glycobiology and glycotecology* (pp. 459–489). <https://doi.org/10.5772/51571>

Fernandes, G., Braga, T. G., Fischer, J., Parrella, R. a. C., de Resende, M. M., & Cardoso, V. L. (2014). Evaluation of potential ethanol production and nutrients for four varieties of sweet sorghum during maturation. *Renewable Energy*, 71, 518–524. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2014.05.033>

Foresti, M. L., Williams, M. D. P., Martínez-García, R., & Vázquez, A. (2014). Analysis of a preferential action of α -amylase from *B. licheniformis* towards amorphous regions of waxy maize starch. *Carbohydrate Polymers*, 102(1), 80–87. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.11.013>

Gago, F., Horváthová, V., Ondáš, V., & Šturdík, E. (2014). Assessment of waxy and non-waxy corn and wheat cultivars as starch substrates for ethanol fermentation. *Chemical Papers*, 68(3), 300–307. <https://doi.org/10.2478/s11696-013-0454-1>

Gao, J., Vasanthan, T., & Hoover, R. (2009). Isolation and Characterization of High-Purity Starch Isolates from Regular, Waxy, and High-Amylose Hullless Barley Grains. *Cereal Chemistry*, 86(2), 157–163. <https://doi.org/10.1094/CCHEM-86-2-0157>

Gorinstein, S., & Lii, C.-Y. (1992). The Effects of Enzyme Hydrolysis on the Properties of Potato, Cassava and Amaranth Starches. *Starch - Stärke*, 44(12), 461–466. <https://doi.org/10.1002/star.19920441204>

Gupta, R., Gigras, P., Mohapatra, H., Goswami, V. K., & Chauhan, B. (2003). Microbial α -amylases: a biotechnological perspective. *Process Biochemistry*, 38(11), 1599–1616. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(03\)00053-0](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(03)00053-0)

Guzmán-Maldonado, H., Paredes-López, O., & Dominguez, J. (1993). Optimization of an enzymatic procedure for the hydrolytic depolymerization of Amaranth starch by response surface methodology. *LWT - Food Science and Technology*, 26(1), 28–33.

- Hii, S. L., Tan, J. S., Ling, T. C., & Ariff, A. Bin. (2012). Pullulanase: Role in Starch Hydrolysis and Potential Industrial Applications. *Enzyme Research*, 2012, 1–14. <https://doi.org/10.1155/2012/921362>
- Holm, J; Björck, A; Drews, N. (1986). A rapid method for the analysis of starch. *Starch/stärke*, 38(7), 224–226.
- Jacques, K., Lyons, T., Kensall, D. (2003). *THE ALCOHOL TEXTBOOK*.
- Ji, Y., Seetharaman, K., & White, P. J. (2004). Optimizing a Small-Scale Corn-Starch Extraction Method for Use in the Laboratory. *Cereal Chemistry*, 81(1), 55–58. <https://doi.org/10.1094/CCHEM.2004.81.1.55>
- Johnson, R., & Padmaja, G. (2013). Comparative Studies on the Production of Glucose and High Fructose Syrup from Tuber Starches. *International Research Journal of Biological Sciences*, 2(10), 68–75.
- Kim, M.-J. ., Jung, Y.-J. ., Lee, S. H. ., Lee, H. ., & Kim, J. C. . (2014). Kinetic analysis and enzyme concentration effect relevant to dependence of amylolysis of starch granules on specific surface area concentration. *Food Science and Biotechnology*, 23(2), 475–481. <https://doi.org/10.1007/s10068-014-0065-9>
- Komolprasert, V., & Ofoli, R. Y. (1991). Starch Hydrolysis Kinetics of Bacillus-Licheniformis Alpha-Amylase. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 51(2), 209–223.
- Konsula, Z., & Liakopoulou-Kyriakides, M. (2004). Hydrolysis of starches by the action of an α -amylase from Bacillus subtilis. *Process Biochemistry*, 39(11), 1745–1749. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2003.07.003>
- Kunamneni, A., & Singh, S. (2005). Response surface optimization of enzymatic hydrolysis of maize starch for higher glucose production. *Biochemical Engineering Journal*, 27(2), 179–190. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2005.08.027>
- Labeille, P., Baret, J. ., Beaux, Y., & Duchiron, F. (1997). Comparative study of wheat flour saccharification and ethanol production with two glucoamylase preparations. *Industrial Crops and Products*, 6(3–4), 291–295. [https://doi.org/10.1016/S0926-6690\(97\)00020-4](https://doi.org/10.1016/S0926-6690(97)00020-4)
- Mera, I., & Cataño, J. C. (2005). Obtención de Glucosa a partir de Almidón de Yuca

- Manihot sculenta. *Facultad de Ciencias Agropecuarias*, 2(1), 54–63.
- Mistry, A. H., Schmidt, S. J., Eckhoff, S. R., & Sutherland, J. M. (1992). Alkali extraction of starch from corn flour. *Starch - Stärke*, 44(8), 284–288.
- Mokrejs, P., Janacova, D., Kolomaznik, K., & Svoboda, P. (2011). Modeling Isolation of Amaranth Protein By Enzymatic Breakdown of Polysaccharides. *Rasayan Journal Chemical*, 4(1), 180–188.
- NMX-F-217-1975. DETERMINACIÓN DE DEXTROSA EQUIVALENTE EN GLUCOSA DE MAÍZ. (n.d.). In *Dirección General de Normas*.
- O'Brien, S., & Wang, Y. J. (2008). Susceptibility of annealed starches to hydrolysis by alpha-amylase and glucoamylase. *Carbohydrate Polymers*, 72(4), 597–607.
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2007.09.032>
- Paolucci-Jeanjean, D., Belleville, M. P., Zakhia, N., & Rios, G. M. (2000). Kinetics of cassava starch hydrolysis with Termamyl?? enzyme. *Biotechnology and Bioengineering*, 68(1), 71–77. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(20000405\)68:1<71::AID-BIT8>3.0.CO;2-5](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(20000405)68:1<71::AID-BIT8>3.0.CO;2-5)
- Pardo, M., Rivera, P., Castellanos, O., & González, G. (2004). Estudio cinético de la hidrólisis enzimática de almidón de papa. *Revista Ingeniería E Investigación*, (54), 66–83.
- Pejin, D. J., Savic, D. S., Pejin, J. D., Mojovic, L. V., & Djukic, A. P. (2015). Bioethanol production from triticale by simultaneous saccharification and fermentation with magnesium or calcium ions addition. *Fuel*, 142, 58–64.
- Ramachandran, V., Pujari, N., Matey, T., Kulkarni, S., & Rice, a. (2013). Enzymatic Hydrolysis for Glucose-A Review. *International Journal of Science, Engineering and Technology Research*, 2(10), 1937–1942.
- Rastogi, A., & Shukla, S. (2013). Amaranth: A New Millennium Crop of Nutraceutical Values. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 53(2), 109–125.
<https://doi.org/10.1080/10408398.2010.517876>
- Rendón-Villalobos, J. R., Solorza-Feria, J., & Aguilar-Sandoval, A. (2011). Optimisation of conditions for glucose syrup production from banana (*Musa paradisiaca* L.) pulp using response surface methodology. *International Journal of Food Science &*

Technology, 46(4), 739–745. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2010.02544.x>

- Robyt, J. F. (2008). Starch: Structure, properties, chemistry and enzymology. In *Complex Polysaccharides* (pp. 1437–1473).
- Rodriguez-Colinas, B., Fernandez-Arrojo, L., Ballesteros, A. O., & Plou, F. J. (2014). Galactooligosaccharides formation during enzymatic hydrolysis of lactose: Towards a prebiotic-enriched milk. *Food Chemistry*, 145, 388–94. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.08.060>
- Rose, R., Rose, C. L., Omi, S. K., Forry, K. R., Durall, D. M., & Bigg, W. L. (1991). Starch determination by perchloric acid vs enzymes: evaluating the accuracy and precision of six colorimetric methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39(1), 2–11. <https://doi.org/10.1021/jf00001a001>
- Ruiz, M., Sanchez, C., Torres, R., & Molina, D. (2011). Enzymatic Hydrolysis of Cassava Starch for Production of Bioethanol with a Colombian Wild Yeast Strain. *Sociedade Brasileira de Química*, 22(12), 2337–2343.
- Sharma, P., & Tejinder, S. (2014). Extraction of starch from hulled and hull-less barley with papain and aqueous sodium hydroxide. *Journal of Food Science and Technology*, 51(12), 3870–3877. <https://doi.org/10.1007/s13197-013-0924-z>
- Tawil, G., Viksø-Nielsen, A., Rolland-Sabaté, A., Colonna, P., & Buléon, A. (2012). Hydrolysis of concentrated raw starch: A new very efficient α -amylase from *Anoxybacillus flavothermus*. *Carbohydrate Polymers*, 87(1), 46–52. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.07.005>
- Tester, R. F., Karkalas, J., & Qi, X. (2004). Starch structure and digestibility Enzyme-Substrate relationship. *World Poul Sci J*, 60(June), 186–195. <https://doi.org/10.1079/WPS200312>
- Tomasik, P., & Horton, D. (2012). Enzymatic conversions of starch. *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, 68, 59–436.
- Uçkun Kiran, E., Trzcinski, A. P., Ng, W. J., & Liu, Y. (2014). Bioconversion of food waste to energy: A review. *Fuel*, 134, 389–399. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2014.05.074>
- van der Maarel, M. J. E. C., van der Veen, B., Uitdehaag, J. C. M., Leemhuis, H., & Dijkhuizen, L. (2002). Properties and applications of starch-converting enzymes of

- the alpha-amylase family. *Journal of Biotechnology*, 94(2), 137–155. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11796168>
- Vidal, B. C., Rausch, K. D., Tumbleson, M. E., & Singh, V. (2009). Kinetics of granular starch hydrolysis in corn dry-grind process. *Starch/Staerke*, 61(8), 448–456. <https://doi.org/10.1002/star.200800091>
- Villarreal, M. E., Ribotta, P. D., & Iturriaga, L. B. (2013). Comparing methods for extracting amaranthus starch and the properties of the isolated starches. *LWT - Food Science and Technology*, 51(2), 441–447. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.11.009>
- Voet, D., & Voet, J. (2011). *Biochemistry*.
- Vuong, T. V., & Wilson, D. B. (2010). Glycoside hydrolases: catalytic base/nucleophile diversity. *Biotechnology and Bioengineering*, 107(2), 195–205. <https://doi.org/10.1002/bit.22838>
- Wang, J. P., Zeng, A. W., Liu, Z., & Yuan, X. G. (2006). Kinetics of glucoamylase hydrolysis of corn starch. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 81(4), 727–729. <https://doi.org/10.1002/jctb.1435>
- Warren, F. J., Zhang, B., Waltzer, G., Gidley, M. J., & Dhital, S. (2015). The interplay of alpha-amylase and amyloglucosidase activities on the digestion of starch in in vitro enzymic systems. *Carbohydrate Polymers*, 117, 192–200. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.09.043>
- William, B., & Pigman, W. (1944). Extent of Hydrolysis of Starches By Amylases in the Presence and Absence of Yeasts 1. *National Bureau of Standards*, 33(April), 105–120.
- Wu, X., Zhao, R., Wang, D., Bean, S. R., Seib, P. A., Tuinstra, M. R., ... Brien, A. O. (2006). Effects of Amylose , Corn Protein , and Corn Fiber Contents on Production of Ethanol from Starch-Rich Media. *Cereal Chemistry*, 83(5), 569–575.
- Xia, X., Li, G., Liao, F., Zhang, F., Zheng, J., & Kan, J. (2014). Granular Structure and Physicochemical Properties of Starches from Amaranth Grain. *International Journal of Food Properties*, (May 2014), 140401085122008. <https://doi.org/10.1080/10942912.2013.860168>
- Yanez, G. A., Messinger, J. K., Walker, C. E., & Rupnow, J. H. (1986). Amaranthus

hypochondriacus: Starch Isolation and Partial Characterization. *Cereal Chem.*, 63(3), 273–276. Retrieved from <http://www.aaccnet.org/publications/cc/backissues/1986/Documents/CC1986a63.htm>

Yankov, D., Dobрева, E., Beschkov, V., & Emanuilova, E. (1986). Study of optimum conditions and kinetics of starch hydrolysis by means of thermostable α -amylase. *Enzyme and Microbial Technology*, 8(11), 665–667. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(86\)90062-1](https://doi.org/10.1016/0141-0229(86)90062-1)

Yongfeng, A., Jovin, H., & Jay-lin, J. (2013). Effects of lipids on enzymatic hydrolysis and physical properties of starch. *Carbohydrate Polymers*, 92(1), 120–7. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.08.092>

Apéndices.

Apéndice A

Curva estándar para la determinación de proteínas por el método de Bradford.

La tabla A muestra las concentraciones usadas de albumina de huevo para la elaboración de la curva estándar para la determinación de proteínas por el método de Bradford en el sobrenadante de la extracción de proteínas de la harina de amaranto, en la Figura A se observa la curva estándar de proteínas (mg/mL) versus absorbancia a 540 mn, de la cual se obtuvo la ecuación de la recta para la determinación de proteínas en mg/mL.

Tabla A. Curva estándar de albumina de huevo para la determinación de proteínas.

Albumina de huevo (mg/mL)	Absorbancia (540 mn)
0	0±0
0.1	0.27±0.047
0.2	0.34±0.046
0.3	0.42±0.04
0.4	0.50±0.033
0.5	0.57±0.037
0.6	0.67±0.014
0.7	0.77±0.013
0.8	0.86±0.032
0.9	0.90±0.036
1.0	0.96±0.039

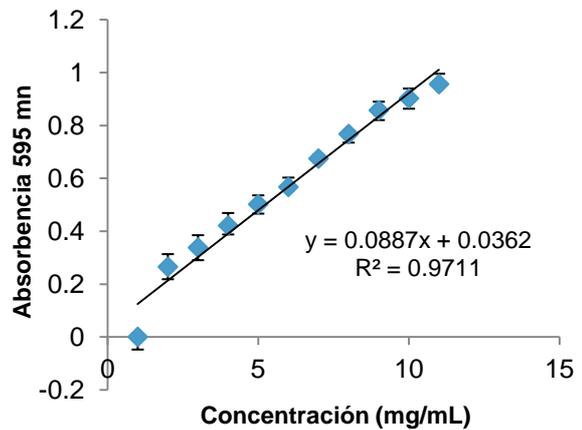


Figura A. Curva estándar de albumina de huevo para la determinación de proteínas.

Apéndice B

Curva estándar de DNS (ácido 3,5 dinitrosalicílico) para la cuantificación de azúcares reductores.

Para la determinación de azúcares reductores se utilizó el método de DNS propuesto por Miller en 1959; en la tabla B muestra las concentraciones de dextrosa utilizada para realizar la curva estándar, la Figura B muestra la concentración (mg/mL) versus absorbancia a 540 nm y la ecuación de la recta para la cuantificación de azúcares reductores.

Tabla B. Curva estándar de dextrosa para la determinación de azúcares reductores.

Dextrosa (mg/mL)	Absorbancia (540 nm)
0	0
0.2	0.12±0.013
0.4	0.31±0.012
0.6	0.45±0.020
0.8	0.62±0.033
1.0	0.73±0.022

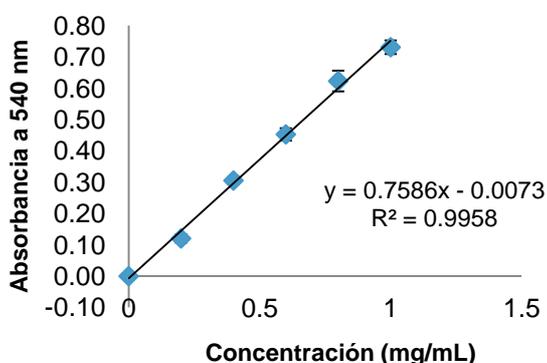


Figura B. Curva estándar de dextrosa para la determinación de azúcares reductores.

Apéndice C

Curva estándar para la determinación de carbohidratos totales por el método de fenol-sulfúrico.

Para la determinación de carbohidratos totales se uso el método de fenol sulfúrico, la tabla C muestra las concentraciones de dextrosa (mg/mL) para la curva estándar, así mismo la Figura B muestra la curva estándar y la ecuación de la recta versus la absorbencia a 480 mn para la cuantificación de carbohidratos totales

Tabla C. Curva estándar para la determinación de carbohidratos totales

Dextrosa (mg/mL)	Absorbencia (480 mn)
0	0.0±0.00
0.2	0.28±0.01
0.4	0.45±0.03
0.6	0.64±0.02
0.8	0.83±0.00
1.0	0.94±0.03

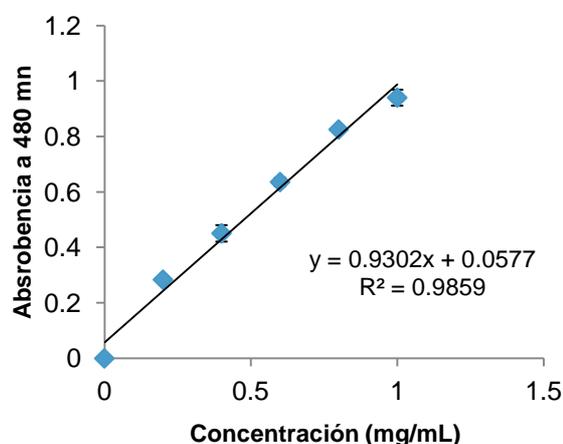


Figura B. curva estándar para la determinación de carbohidratos totales.