



**USO INTEGRAL DEL ALMIDÓN DE AMARANTO (*Amaranthus  
hypochondriacus* L.) EN LA PRODUCCIÓN DE CGTasa PARA LA SÍNTESIS  
DE CICLODEXTRINAS**

**T E S I S**  
**PARA OBTENER EL GRADO DE**  
**DOCTORA EN BIOTECNOLOGÍA**

PRESENTA:  
**MARIA BELEM ARCE VAZQUEZ**

DIRECTOR:  
Dr. JORGE SORIANO SANTOS  
ASESORES:  
Dr. EZEQUIEL DELGADO FORNUÉ  
Dra. RUTH PEDROZA ISLAS

“El Doctorado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluido en el Padrón Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACyT, con la referencia 001466”

Este trabajo contó con el apoyo del CONACyT a través de la beca  
330389

México, D. F., a 7 de octubre de 2016

El jurado designado por la  
División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa  
Aprobó la tesis:

**USO INTEGRAL DEL ALMIDÓN DE AMARANTO (*Amaranthus  
hypochondriacus* L.) EN LA PRODUCCIÓN DE CGTasa PARA LA SÍNTESIS  
DE CICLODEXTRINAS**

Que presenta:

M. en B. Maria Belem Arce Vazquez

Comité tutorial:

Director: Dr. Jorge Soriano Santos  
Asesor: Dr. Ezequiel Delgado Fornué  
Asesor: Dra. Ruth Pedroza Islas

Jurado:

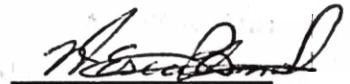
Presidente: Dr. Ezequiel Delgado Fornué  
Universidad de Guadalajara



Secretario: Dra. Ruth Pedroza Islas  
Universidad Iberoamericana



Vocal: Dr. Héctor B. Escalona Buendía  
Universidad Autónoma Metropolitana



Vocal: Dr. Ulises Durán Hinojosa  
Universidad Nacional Autónoma de México



A MIS ABUELOS

*“Yo no hablo del principio y del fin.  
Jamás hubo otro principio que el de ahora,  
ni más juventud o vejez que las de ahora,  
... Y nunca habrá otra perfección que la de ahora...” W.W.*

## AGRADECIMIENTOS

A mis padres que han sido un pilar en mi formación. Gracias Papá, por tu entereza y honestidad, por ser mi héroe y ejemplo a seguir. Mamá, gracias por tu amor incondicional, por tus palabras que siempre han sido de aliento, por tu apoyo durante mis fracasos, por tu entrega total a mi educación y formación. Doy gracias a Dios por el hogar que tenemos.

A mis hermanos que son mis mejores amigos. Gracias Araceli, por ser mi fuente inagotable de apoyo, porque siempre has sido paciente y has enfrentado junto a mí las adversidades brindándome una gran sonrisa. Gracias Sergio, por ser ese guerrero incansable e indomable, por darme siempre una mirada de cariño y un abrazo que desborda amor. Lesli, gracias por ser mi cómplice y la pieza perfecta que completa nuestro hogar, gracias por darme tu amor sincero.

A mis queridos amigos y amigas: Peter, Ara, Miri, Vicky, Tania, Ivette, Axel, Beto, Chris, Ángel, Lucio. Gracias por sus palabras y por sus acciones, por alentarme, por corregirme, por darme sus consejos, por escucharme, por entenderme, por permitirme disfrutar mis éxitos a su lado y por darme un abrazo en el momento más necesitado.

A todos los compañeros de laboratorio y de universidad así como a todos los que aportaron un granito a esta investigación (Juan Cabello, Perú, Azalea, Rox, Silvestre, Jacqueline, Jessy).

## AGRADECIMIENTOS ESPECIALES

Muy especialmente al Dr. Soriano, que ha sido mi guía, mi maestro en todos sentidos, lo admiro y respeto; gracias por abrirme las puertas de su laboratorio durante estos años y darme su apoyo incondicional, por sus comentarios, sus invaluable enseñanzas, sus consejos y su gran paciencia, por confiar en mí y en nuestro proyecto, por la dedicación en mi formación como científica, por enseñarme que lo más importante es hacer lo que nos gusta, pero sobre todo le agradezco su sincera amistad.

Al Dr. Ezequiel Delgado Fornué del Centro de Investigación en Biomateriales (CIO) del Departamento de Madera Celulosa y Papel (DMCyP), del Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías (CUCEI) de la Universidad de Guadalajara (U de G), por su invaluable aportación al proyecto, por enseñarme que la creatividad es una de las características de un Investigador, porque a pesar de la distancia me ha brindado su apoyo, sus consejos, observaciones, gracias por su afecto y amistad.

Al Dr. Gerardo Díaz Godínez de la Universidad Autónoma de Tlaxcala, le agradezco su asesoría en la parte de la caracterización de las fermentaciones, además por su tiempo y apoyo para realizar esta parte del proyecto, y por su valiosa amistad.

A la Dra. Ruth Pedroza Islas de la Universidad Iberoamericana, gracias por dedicar su tiempo y apoyo, para la realización de esta tesis, por su paciencia y entusiasmo en el proyecto, así como en el préstamo de sus instalaciones. Al Dr. José Correa Basurto del Instituto Politécnico Nacional, por su apoyo y asesoría, así como el préstamo de sus instalaciones y equipo para llevar a cabo la parte de modelamiento molecular.

Al Dr. Ulises Durán Hinojosa de la Universidad Nacional Autónoma de México, del Instituto de Ingeniería. Gracias por todo su apoyo y tiempo, consejo y oportunas observaciones, por enseñarme un pensamiento crítico y por todo lo que ha aportado en mi persona para formarme como un colega, gracias por su invaluable amistad.

## ÍNDICE GENERAL

	PAG.
RESUMEN	i
ABSTRACT	ii
PANORAMA GENERAL	1
I INTRODUCCIÓN. ....	3
Ciclodextrinas. ....	3
Ciclodextrin glucosiltransferasa. ....	13
Almidón. ....	19
Amaranto. ....	23
ANTECEDENTES. ....	27
III JUSTIFICACIÓN. ....	30
IV HIPÓTESIS. ....	32
V OBJETIVOS. ....	33
Objetivo general. ....	33
Objetivos particulares. ....	33
VI ESTRATEGIA GENERAL DE TRABAJO. ....	34
CAPÍTULO I	
1 ALMIDÓN DE AMARANTO. ....	36
1.1 Objetivo. ....	36
1.2 Materiales y Métodos. ....	36
1.3 Resultados y Discusión. ....	43
1.4 Conclusiones. ....	47
CAPÍTULO II	
2 CARACTERIZACIÓN DE LOS PARÁMETROS CINÉTICOS. ....	49
2.1 Objetivo. ....	49
2.2 Materiales y métodos. ....	49
2.3 Resultados. ....	52
2.4 Conclusiones. ....	58

### CAPÍTULO III

3	CARACTERIZACIÓN PARCIAL DE LA CGTasa.....	61
3.1	Objetivo. ....	61
3.2	Materiales y métodos. ....	61
3.3	Resultados. ....	63
3.4	Conclusiones.....	70

### CAPÍTULO IV

4	SINTESIS DE $\beta$ -CICLODEXTRINAS. ....	72
4.1	Objetivo. ....	72
4.2	Materiales y métodos. ....	72
4.3	Resultados. ....	75
4.4	Conclusiones.....	83

### CAPÍTULO V

5	POLIFENOLES NO EXTRAÍBLES DEL AMARANTO. ....	85
5.1	Objetivo. ....	85
5.2	Materiales y métodos. ....	85
5.3	Resultados. ....	90
5.4	Conclusiones.....	95

### CAPÍTULO VI

6	INCLUSIONES B-CICLODEXTRINA-POLIFENOL.....	97
6.1	Objetivo. ....	97
6.2	Materiales y métodos. ....	97
6.3	Resultados. ....	99
6.4	Conclusiones.....	111

VII	CONCLUSIONES GENERALES.....	112
VIII	Referencias. ....	113
IX	ANEXOS.....	135

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estructura 2D a) $\alpha$ -ciclodextrina b) $\beta$ -ciclodextrina y c) $\gamma$ -ciclodextrina.	3
<b>Figura 2.</b> Métodos de confirmación de la formación de complejos de inclusión de ciclodextrina-huésped.	6
<b>Figura 3.</b> Uso de las ciclodextrinas nativas y algunos derivados, en la Industria.	9
<b>Figura 4.</b> Ilustración de las características de cápsulas de polifenoles encapsulados, producidos por diversos procesos de encapsulación.	14
<b>Figura 5.</b> Asociación de la Cdaa y CGTasa, para el aprovechamiento de ciclodextrina como fuente de energía.	17
<b>Figura 6.</b> Estructura básica de la estructura del almidón a) amilosa; b) amilopectina, y sus respectivos ángulos de torsión.	20
<b>Figura 7.</b> Fotografías del cultivo de amaranto ( <i>Amaranthus hypochondriacus</i> L.) en la zona de Tulyehualco, México D.F., y de sus principales partes: a) grano b) tallo c) fluorescencia y d) hoja.	36
<b>Figura 8.</b> Reducción del ácido 3,5-dinitrosalicílico en presencia de un azúcar reductor a ácido 3-amino-5-nitrosalicílico.	38
<b>Figura 9.</b> Reacción típica de la amilosa en presencia del yodo formando un complejo colorido azul.	39
<b>Figura 10.</b> Método 1 para la extracción de AA con modificaciones de Hoover 2010	40
<b>Figura 11.</b> Método 2 para la extracción de AA con modificaciones de Villareal 2013.	41
<b>Figura 12.</b> Micrografías electrónicas de barrido x10 000 del gránulo de AA a) método de extracción 1 b) método de extracción 2.	44
<b>Figura 13</b> Formación de complejo de inclusión entre la beta ciclodextrina y la fenilalanina	52
<b>Figura 14.</b> Micrografías electrónicas de barrido: a) Irrupción de <i>B. megaterium</i> sobre láminas de AA, b) Cavidad del gránulo de AA después de la degradación y digestión.	53
<b>Figura 15.</b> Caracterización de fermentación por <i>B. megaterium</i> durante 96 horas. a) Crecimiento microbiano y consumo de sustrato y b) Producción de proteína y evaluación de pH.	56
<b>Figura 16.</b> Caracterización de fermentación por <i>Bacillus megaterium</i> a) Actividad de ciclación de $\beta$ -CD y b) Actividad específica de ciclación de $\beta$ -CD. E1: Enzima CGTasa obtenida en	

fermentación con AM, E2: Enzima CGTasa obtenida por fermentación con AA, AM: Almidón de maíz y AA: Almidón de amaranto.	59
<b>Figura 17.</b> Cromatografías de afinidad en a) Sephadex G-200 y b) Sephadex G-50, de una CGTasa procedente de <i>Bacillus megaterium</i> .	64
<b>Figura 18.</b> Perfil electroforético de CGTasa parcialmente purificada de <i>Bacillus megaterium</i> , por SDS-PAGE, línea 1, estándares de marcadores; línea 2, CGTasa parcialmente purificada	66
<b>Figura 19.</b> Efecto de las condiciones de a) pH y b) Temperatura, sobre la actividad de ciclación de la CGTasa	67
<b>Figura 20.</b> Gráfico de Lineweaver-Burk de la velocidad inicial vs recíproco de la concentración de almidón de amaranto por la CGTasa de <i>Bacillus megaterium</i> .	70
<b>Figura 21.</b> Metodología general para la síntesis de y purificación de la $\beta$ -CD.	73
<b>Figura 22.</b> Micrografías de la producción de la CGTasa para la producción de $\beta$ -ciclodextrina a) <i>Bacillus megaterium</i> 2.5x2.5x10 $\mu$ m, b) Muestra de la síntesis de la $\beta$ -ciclodextrina a partir de almidón de amaranto y c) Morfología típica de un cristal de $\beta$ -ciclodextrina.	75
<b>Figura 23.</b> Espectro de productos de la reacción por la CGTasa a partir de almidón de amaranto.	76
<b>Figura 24.</b> Espectro correspondiente a $\beta$ -Ciclodextrina	78
<b>Figura 25.</b> Efecto de la temperatura de gelatinización del almidón sobre la producción de $\beta$ -ciclodextrina.	79
<b>Figura 26.</b> Producción de $\beta$ -ciclodextrina por la CGTasa de <i>B. megaterium</i> , en presencia de solventes y con diferentes concentraciones de almidón a) Amaranto y b) Maíz.	82
<b>Figura 27.</b> Reacción de los compuestos polifenólicos con el reactivo de Folin-Ciocalteu.	86
<b>Figura 28.</b> Reacción de reducción del radical DPPH•	87
<b>Figura 29.</b> Formación del radical catiónico ABTS, y reacción en presencia de un antioxidante (Trolox), para su estabilización	88
<b>Figura 30.</b> Efecto de la temperatura y el tiempo en la optimización de PNE de amaranto.	90
<b>Figura 31.</b> Gráfica de contorno de la superficie de respuesta de la optimización de la extracción de PNE de amaranto.	91
<b>Figura 32.</b> Evaluación de la actividad antioxidante de PNE de amaranto.	92
<b>Figura 33.</b> Espectro de HPLC correspondiente a PNE de amaranto	93
<b>Figura 34.</b> Espectro HPLC–DAD–MS correspondiente a PNE de amaranto.	94

<b>Figura 35.</b> Modelos de inclusión de $\beta$ -CD-polifenoles a) Ácido cafeico, b) Ácido cinámico, c) Catequina, d) Ácido cumárico, e) Ácido elágeno, f) Epicatequina, g) Ácido ferúlico, h) Flavona, i) Ácido gálico, j) Isoflavona, k) Kaempferol, l) Ácido psinápico, m) Quercitina, n) Resveratrol y ñ) Vainillina	102
<b>Figura 36.</b> Patrón de absorbencia de estándares de polifenoles y su complejo con $\beta$ -CD.	105
<b>Figura 37.</b> Patrón de absorbencia de polifenoles no extraíbles de la planta de amaranto, con su respectivo complejo con $\beta$ -CD.	106
<b>Figura 38.</b> Evaluación de la actividad antioxidante del ácido gálico y sus complejos con $\beta$ -CD sobre a) DPPH• y b) ABTS•	108
<b>Figura 39.</b> Evaluación de la actividad antioxidante del ácido ferúlico y sus complejos con $\beta$ -CD sobre a) DPPH• y b) ABTS•	109
<b>Figura 40.</b> Evaluación de la actividad antioxidante de PNE de la planta de amaranto y sus complejos con $\beta$ -CD sobre a) DPPH• y b) ABTS•	110
<b>Figura 41.</b> Curva estándar de glucosa para la cuantificación de almidón total.	136
<b>Figura 42.</b> Curva estándar de amilosa.	137
<b>Figura 43.</b> Curva estándar para la cuantificación de $\beta$ -ciclodextrina.	138
<b>Figura 44.</b> Curva estándar de Ácido gálico para la cuantificación de polifenoles.	139

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Propiedades de la ciclodextrinas.	4
<b>Tabla 2.</b> Producción preferente de ciclodextrinas por varios microorganismos.	19
<b>Tabla 3.</b> Principales estados productores de amaranto en la República Mexicana.	24
<b>Tabla 4.</b> Rendimiento y recuperación de almidón de <i>Amaranthus hypochondriacus</i> L. por diferentes procedimientos	43
<b>Tabla 5.</b> Caracterización de almidones obtenidos de diversas fuentes.	46
<b>Tabla 6.</b> Formulación de medio y condiciones de operación empleados para la propagación y obtención de inóculo de una cepa de <i>B. megaterium</i> .	50
<b>Tabla 7.</b> Parámetros cinéticos de la fermentación de <i>Bacillus megaterium</i> para la producción de CGTasa.	58
<b>Tabla 8.</b> Composición de los geles de electroforesis SDS-PAGE.	62
<b>Tabla 9.</b> Composición del buffer de muestra para electroforesis SDS-PAGE.	62
<b>Tabla 10.</b> Purificación de CGTasa producida por <i>B. megaterium</i> .	65
<b>Tabla 11.</b> Características de diferentes CGTasas parcialmente purificadas.	68
<b>Tabla 12.</b> Propiedades de los compuestos detectados por HPLC-DAD-MS de PNE de amaranto.	94
<b>Tabla 13.</b> Evaluación de la energía libre de Gibbs de la formación de complejos de inclusión $\beta$ -CD/polifenol.	103
<b>Tabla 14</b> Curva estándar de glucosa para cuantificación de almidón total	136
<b>Tabla 15</b> Curva estándar de amilosa	137
<b>Tabla 16</b> Curva estándar de $\beta$ -ciclodextrina	138
<b>Tabla 17</b> Curva estándar de ácido gálico para cuantificación de polifenoles totales	139

## RESUMEN

Durante la degradación del almidón, que es catalizada por la enzima bacteriana del género *Bacillus*, ciclodextrina glucosiltransferasa (CGTasa), se obtienen compuestos denominados ciclodextrinas (CDs) que son ampliamente utilizados en la industria alimentaria por su capacidad para formar complejos de inclusión. Esta investigación propone el uso integral de la planta de amaranto a partir del grano, mediante la extracción y aplicación del almidón de amaranto (AA) como una fuente alternativa para la obtención de CGTasa y CDs, así como también para la obtención de polifenoles no extraíbles (PNE) a partir de la fibra del rastrojo de amaranto, en los cuales se evaluó la formación de complejos de inclusión  $\beta$ -CD/polifenol.

Al realizar la caracterización una fermentación sumergida por *Bacillus megaterium* probando AA como fuente de carbono, se obtuvieron los siguientes parámetros cinéticos:  $\mu=0.094\pm 2\times 10^{-3}$  ( $\text{h}^{-1}$ ),  $Y_{X/S}=11.47$  ( $\text{gXg}^{-1}\text{S}$ ),  $Y_{E/X}=9775$  ( $\text{Ug}^{-1}\text{X}$ )  $Y_{E/S}=44602$  ( $\text{Ug}^{-1}\text{S}$ ).

La máxima actividad de ciclación específica ( $106.62\pm 8.33$   $\text{Umg}^{-1}$ ) se observó a las 36 h. La CGTasa obtenida después de dos etapas de purificación presentó un rendimiento de 10.25% (p/v) y un aumento en la actividad específica hasta  $3946$   $\text{Umg}^{-1}$ , con respecto al extracto crudo, presentó un peso molecular aparente de 66KDa mediante electroforesis SDS-PAGE, un pH óptimo de 8 y una temperatura óptima de  $50$  °C, así como una  $K_m$  de  $7.6$   $\text{mgmL}^{-1}$  y una  $V_{\text{máx}}$  de  $1.53$   $\text{mg mL}^{-1}\text{h}^{-1}$  al utilizar AA como sustrato, observándose una afinidad 50% más alta en comparación con el almidón de maíz.

Al utilizar la CGTasa parcialmente purificada en la síntesis de CDs, se obtuvo una producción de  $\alpha$ -CD,  $\beta$ -CD y  $\gamma$ -CD, las cuales se identificaron por espectrofotometría de masa con una  $m/z$  de 983.6412, 1157.35 y 1301.5763 respectivamente. La  $\beta$ -CD fue la que estuvo en mayor proporción y al ser purificada mediante un proceso de

cristalización presentó un rendimiento del 15.2%. La productividad de  $\beta$ -CD se aumentó hasta un 50% al realizar una pre-gelatinización a 50°C con el 3% (p/v) de AA en presencia de etanol (0.01% v/v).

Mediante una hidrólisis ácida realizada en un reactor tipo Parr a 120°C durante 150 minutos con 5% de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se obtuvieron PNE (93.11  $\pm$  5.18 mg eq AG/g) de la fibra de la planta de amaranto, los cuales al evaluar su actividad antioxidante, presentaron un IC<sub>50</sub> sobre el DPPH• de 0.89  $\pm$  0.05 mg eq AG/g y un IC<sub>50</sub> sobre el ABTS• de 0.54  $\pm$  0.017 mg eq AG/g. Los PNE fueron identificados por ESI-MS como ácido 4-hidroxibenzoico, ácido ferúlico, ácido gálico, rutinoside y el kaempferol; m/z = 132.99, 193.02, 172.99, 327.21 y 297.14 respectivamente.

Los PNE se incluyeron en la  $\beta$ -CD de AA mediante una mezcla física. El complejo de inclusión  $\beta$ -CD-PNE fue identificado por el efecto hipocrómico presentado en los patrones de absorbencia. Al evaluar la actividad antioxidante del complejo de inclusión  $\beta$ -CD-PNE se observó que se mantiene durante 7 semanas.

Esta investigación concluye que el almidón de amaranto tiene un gran potencial para ser utilizado en los procesos de producción de CGTasa y de  $\beta$ -CD, permitiendo sustituir a los almidones convencionales de maíz utilizados para este fin, así mismo, el amaranto es una planta que puede ser aprovechada para la obtención de antioxidantes naturales, los cuales a su vez pueden formar inclusiones con la  $\beta$ -CD para mantener su actividad antioxidante.

## ABSTRACT

During the degradation of starch, which is catalyzed by the bacterial enzyme, the gender *Bacillus* cyclodextrin glucosyltransferase (CGTase), are obtained cyclodextrins compounds called (CDs) that are widely used in the food industry for its ability to form inclusion complexes. These research proposes the integrated use of the amaranth plant, from the grain by extraction and application of amaranth starch (AS) as an alternative for obtaining CGTase and CDs source, as well as for obtaining the nonremovable polyphenols (NP) from fiber stubble amaranth, in which the formation of inclusion complexes  $\beta$ -CD / polyphenol was evaluated.

Performing the characterization of a submerged fermentation by testing AS *Bacillus megaterium* as carbon source, the following kinetic parameters were obtained:  $\mu=0.094 \pm 2 \times 10^{-3}$  ( $\text{h}^{-1}$ ),  $\text{YX/S} = 11.47$  ( $\text{GxG}^{-1}\text{S}$ ),  $\text{YE/X} = 9775$  ( $\text{Ug}^{-1}\text{X}$ ) y  $\text{E/S} = 44602$  ( $\text{Ug}^{-1}\text{S}$ ). The maximum specific activity cyclization ( $106.62 \pm 8.33$   $\text{Umg}^{-1}$ ) was observed at 36 h. CGTase obtained after two purification steps showed a yield of 10.25% (w/v) and an increase in the specific activity to  $3946$   $\text{Umg}^{-1}$ , with respect to the row extract, showed an apparent molecular weight of 66kDa by electrophoresis SDS-PAGE, an optimum pH of 8 and a temperature optimum of  $50$   $^{\circ}\text{C}$ , and a  $K_m$  of  $7.6$   $\text{mgml}^{-1}$  and a  $V_{\text{max}}$  of  $1.53$   $\text{mg mL}^{-1} \text{h}^{-1}$  using AS as substrate, showing a higher affinity 50% in compared to corn starch.

By using the partially purified CGTase in the synthesis of CDs, a production of  $\alpha$ -CD,  $\beta$ -CD and  $\gamma$ -CD, which were identified by mass spectrometry with a  $m/z$  983.6412, 1157.35 and 1301.5763 respectively was obtained. The  $\beta$ -CD was the one that was greater extent and to be purified by a crystallization process provided 15.2% yield. Productivity  $\beta$ -CD was increased to 50% to make a pregelatinization at  $50$   $^{\circ}\text{C}$  with 3% (w/v) in the presence of AS ethanol (0.01% v/v).

By acid hydrolysis carried out in a Parr type reactor at 120 °C for 150 minutes with 5% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, were obtained a NP of the plant fiber amaranth (93.11 ± 5.18 mg eq AG/g), to evaluate their antioxidant activity, showed an IC<sub>50</sub> of the DPPH • ± 0.05 mg 0.89 eq AG/g and an IC<sub>50</sub> on ABTS •±0.017 mg 0.54 eq AG/g. The NP were identified by ESI-MS as 4-hydroxybenzoic acid, ferulic acid, gallic acid, kaempferol rutinoid and; m/z = 132.99, 193.02, 172.99, 327.21 and 297.14 respectively.

The NP included in the β-CD physical mixture through AS. The complex of β-CD-NP inclusion was identified by the hypochromic effect patterns presented in absorbency. Assessing antioxidant activity of inclusion complex β-CD-NP was observed that remains for 7 weeks.

This research concluded that starch amaranth has great potential for use in production processes CGTase and β-CD, allowing replace conventional corn starches used for this purpose, furthermore the amaranth plant it can be exploited for obtaining natural antioxidants, which can form inclusions with β-CD to maintain its antioxidant activity.

**GENERALIDADES**

## PANORAMA GENERAL

El estudio de la nanotecnología ha supuesto un modo sistemático de estudio y manipulación de la materia y sus propiedades a una escala nanométrica con una regularidad y una precisión desconocida hasta ahora. Una visión general superficial de las aplicaciones actuales y previstas de la nanotecnología apunta a tecnologías aplicadas en la industria farmacéutica, cosmetológica y alimentaria. En este último rubro se conocen productos comercializados como un modo para mejorar la nutrición y como coadyuvante para la salud, la belleza y el bienestar (Molins, Martins, & Delgado, 2011).

Estos subsectores, por ejemplo, los alimentos dietéticos, los suplementos, los nutraceuticos, los cosmocéuticos y los nutricosméticos se perfilan como el primer objetivo de las aplicaciones de la nanotecnología. Una de las diversas aplicaciones de la nanotecnología en alimentos, consiste en la utilización de aditivos alimentarios de nanotamaño o nanoencapsulados. Esta aplicación está prevista para explotar un segmento mucho más amplio del sector de los alimentos y comprende: colores, conservantes, aromatizantes y complementos. En algunos sectores alimentarios ya se dispone de varios productos de consumo que contienen aditivos de nanotamaño, entre estos figuran: minerales, antimicrobianos, vitaminas, antioxidantes, entre otros, prácticamente, a todos estos productos, se les atribuye una mejor absorción y biodisponibilidad en el organismo.

Específicamente, los estudios sobre antioxidantes han presentado un interés general a nivel internacional, ya que se ha demostrado que el consumo de antioxidantes puede mejorar la salud y prevenir la incidencia de enfermedades crónico-degenerativas, coronarias y cáncer, diabetes, entre otras (J Soriano-Santos & Escalona-Buendía, 2013), además de tener efectos vasodilatadores, antitrombóticos.

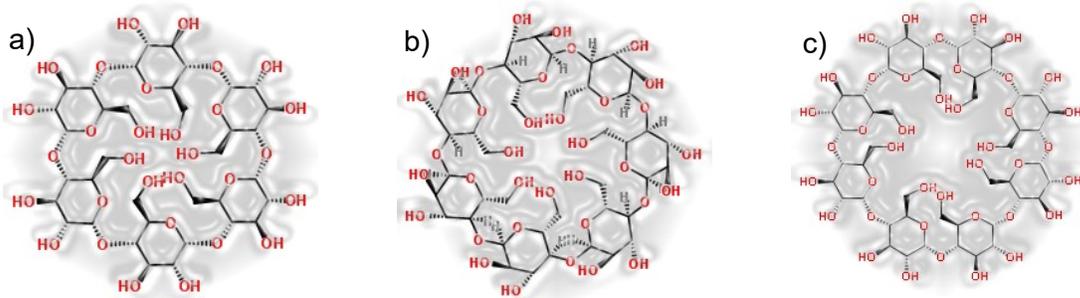
Las principales fuentes de obtención de compuestos antioxidantes, se prefieren de fuentes naturales y no sintéticas, esto debido a sus efectos secundarios.

En México, la diversidad de alimentos de origen vegetal que pueden ser utilizadas para la extracción de antioxidantes es muy amplia. En los últimos años se han realizado estudios para evaluar la capacidad antioxidante y la composición química de diversos alimentos del país y así conocer sus propiedades funcionales. Se han observado altos contenidos de polifenoles en ciertos alimentos tradicionales como maíz, cacao, especias, amaranto entre otros, los cuales forman parte de la dieta del mexicano. Este conocimiento es importante, ya que pueden aprovecharse sus beneficios para la salud y su potencial para crear ingredientes en la producción de alimentos funcionales.

## 1 INTRODUCCIÓN.

### 1.1 Ciclodextrinas.

Las ciclodextrinas (CDs) son compuestos únicos que se descubrieron por primera vez entre 1911-1981, teniendo aplicaciones hasta principios de 1970 (Crini, 2014). Las CDs se obtienen durante la degradación enzimática del almidón, son oligosacáridos cíclicos formados por 6 (Jorge Soriano-Santos, Reyes-Bautista, Guerrero-Legarreta, Ponce-Alquicira, Escalona-Buendía, Almanza-Pérez, Díaz-Godínez, & Roman-Ramos), 7 ( $\beta$ ) u 8 ( $\gamma$ ) unidades de  $\alpha$ -D-[1,4] glucosa (Figura 1).



**Figura 1.** Estructura 2D a)  $\alpha$ -ciclodextrina b)  $\beta$ -ciclodextrina y c)  $\gamma$ -ciclodextrina.

Las ciclodextrinas presentan una estructura molecular toroidal, rígida y con una cavidad interior de volumen específico (Tabla 1). Contienen grupos hidroxilo primarios en posición 6, que están localizados en el lado más estrecho del toroide y los grupos hidroxilo secundarios, se ubican en el lado más ancho del mismo (Martínez & Gómez, 2007), (Contreras, Ramírez, Andrade, Toriz, & Delgado, 2011).

Las ciclodextrinas son estables en disoluciones neutras y básicas, pero se degradan lentamente en pH ácido, y en estado sólido se descomponen en cadenas lineales de glucosa por encima de 200°C (Contreras et al., 2011).

Debido a que presentan grupos hidroxilo libres situados en el exterior de la superficie de los anillos, las ciclodextrinas son hidrófilas y por lo tanto solubles en agua, siendo mayor para la

$\gamma$ -ciclodextrina y la  $\alpha$ -ciclodextrina, asimismo las ciclodextrinas son igualmente solubles en disolventes fuertemente polares, como el dimetilsulfóxido y la dimetilformamida.

Por otro lado en las posiciones 3 y 5 de los carbonos de las unidades de glucosa, se encuentran hidrógenos apolares, que resulta un ambiente hidrófobo hacia el interior de la cavidad toroidal, característica que se ha explotado para la formación de complejos de inclusión con una extensa variedad de moléculas huésped hidrófobas (Contreras et al., 2011).

**Tabla 1.** Propiedades de la ciclodextrinas.

	<b>A-Ciclodextrina</b>	<b><math>\beta</math>-Ciclodextrina</b>	<b><math>\gamma</math>-Ciclodextrina</b>
Número de unidades de glucopiranosas	6	7	8
Fórmula empírica (estado anhidro)	C <sub>36</sub> H <sub>60</sub> O <sub>30</sub>	C <sub>42</sub> H <sub>70</sub> O <sub>35</sub>	C <sub>48</sub> H <sub>80</sub> O <sub>40</sub>
Peso molecular (g/mol)	972.85	1134.99	1297.14
Diámetro exterior (Å)	14.6	15.4	17.5
Diámetro interior (Å)	4.7-5.3	6.0-6.5	7.5-8.3
Altura del toroide (Å)	7.9	7.9	7.9
Volumen aproximado de la cavidad (Å <sup>3</sup> )	174	262	427
Solubilidad en agua a 25 °C (%P/V)	14.5	1.85	23.2
Punto de fusión °C	255-260	255-262	240-245

Fuente: Veen et al., 2000 (B. Van der Veen, Uitdehaag, Dijkstra, & Dijkhuizen, 2000) y Contreras et al., 2011 (Contreras et al., 2011).

### 1.1.1 Inclusión ciclodextrina-huésped.

La forma y el tamaño (Tabla 1) determinan la formación de complejos con moléculas hidrófobas completamente o parcialmente con sus grupos funcionales. La fuerza que impulsa la formación de complejos de inclusión, está relacionada con el efecto entrópico del desplazamiento de las moléculas de agua desde el interior de la cavidad hidrofóbica, sabiendo que moléculas de agua causan una tensión en el interior de la ciclodextrina y que se libera después de la formación del complejo produciendo un estado menor de energía (B. Van der Veen et al., 2000).

---

Las ciclodextrinas pueden formar inclusiones con moléculas orgánicas como huéspedes en estado sólido, líquido e incluso gaseoso debido a lo anterior, las moléculas huéspedes insolubles en agua pueden llegar a ser completamente solubles, sin que presenten alguna modificación química en la estructura de dicha molécula, ya que no se origina ningún enlace covalente durante la interacción entre la ciclodextrina y la molécula insoluble en agua (Martínez & Gómez, 2007),(Contreras et al., 2011).

La característica más importante de las ciclodextrinas, es su capacidad de formar complejos de inclusión estables con una amplia variedad de compuestos de distinto peso molecular, tanto de naturaleza no polar (hidrocarburos) como de naturaleza polar (ácidos carboxílicos y aminas) y con grandes posibilidades de generar fenómenos de reconocimiento de macromoléculas en sistemas biológicos (Martínez & Gómez, 2007) (Contreras et al., 2011).

Se han empleado varias técnicas para formar complejos de inclusión con CDs, tales como:

- I. **Métodos en estado sólido (Co-molienda).** Es una mezcla física de alta energía, donde el huésped y la CD pueden someterse a: a una mezcla en molinos (Mura, Cirri, Faucci, Ginès-Dorado, & Bettinetti, 2002), a tecnologías donde se combina la presión y temperatura para llegar a tener un fluido supercrítico (Al-Marzouqi, Jobe, Corti, Cirri, & Mura, 2007) o a irradiación de microondas (Wen, Tan, Jing, & Liu, 2004).
- II. **Métodos en estado semi-sólido (Amasado).** Es una mezcla física donde el huésped y la CD se mezclan en presencia de: un disolvente volátil (Patel, Suhagia, Shah, Rathod, & Parmar, 2007) o una pequeña cantidad de agua (Higashi, Tozuka, Moribe, & Yamamoto, 2010).
- III. **Métodos en solución.** Se forma una solución con el huésped y la ciclodextrina en presencia de disolvente, posteriormente se elimina este disolvente por: coevaporación/coprecipitación (Maestrelli et al., 2009), secado por pulverización (Higashi et al., 2010) o coliofilización (Seo, Min, & Choi, 2010).

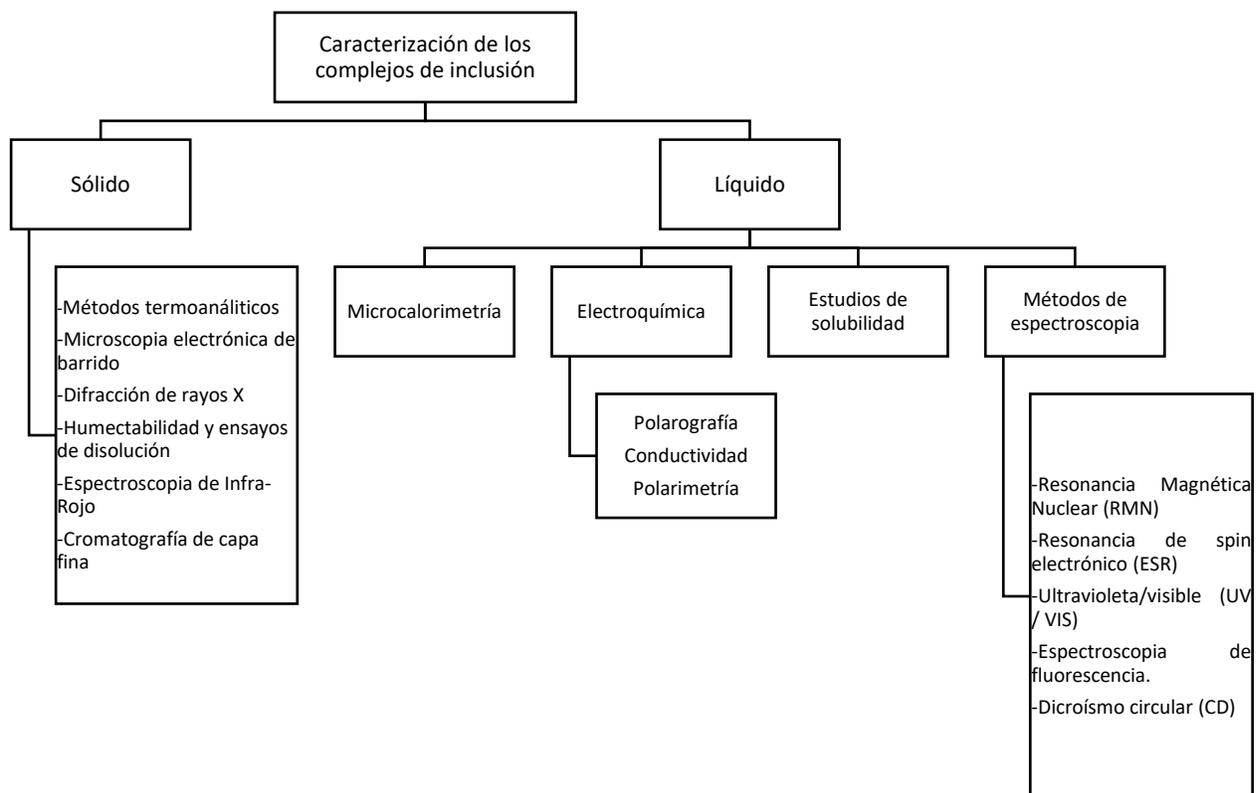
Existen diferentes técnicas (Figura 2) para la confirmación de los complejos de inclusión, que se dividen en los formados en sólido y los formados en solución.

Los métodos que utilizan la espectroscopia se basan en que la complejación provoca un cambio en el espectro de absorción de las moléculas huésped. Durante los cambios espectrales, el cromóforo del huésped se transfiere del medio acuoso a la región hidrofóbica de la ciclodextrina (Singh, Bharti, Madan, & Hiremath, 2010).

Las ventajas más importantes que tienen las moléculas huésped al formar complejos de inclusión con ciclodextrinas son (Del Valle, 2004):

I. La protección de las moléculas huésped contra:

- a) Reacciones de descomposición inducida por la luz o el calor.
- b) Oxidación o hidrólisis.
- c) Reacciones químicas con otros compuestos orgánicos.
- d) Pérdida por evaporación.



**Figura 2.** Métodos de confirmación de la formación de complejos de inclusión de ciclodextrina-huésped.

II. La solubilización de las moléculas huésped en el agua:

- a) Aumento de la solubilidad.
- b) Aumento de la velocidad de solubilización.
- c) Evita el uso de disolventes orgánicos.
- d) Cambio de viscosidad.

III. Eliminación de:

- a) Olores o sabores indeseados.
- b) Higroscopicidad.

IV. Mejora de la manipulación:

- a) De sustancias líquidas o aceitosas como polvos.
- b) Aumento en la estabilidad de la emulsión.

### 1.1.2 Regulación de las ciclodextrinas.

La situación reglamentaria de las ciclodextrinas, en alimentos difiere entre países; en EUA, las  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -CDs se encuentran en la lista GRAS ( publicada por la Food and Drug Administration (FDA) de los aditivos alimentarios que son generalmente reconocidos como seguros) y puede ser comercializado como seguro, en Japón, las  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -CDs se reconocen como productos naturales y su comercialización en el sector de la alimentación se limita solamente por consideraciones de pureza, mientras que en Australia y Nueva Zelanda  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -CDs se clasifican como nuevos alimentos desde el 2003 (Cravotto, Binello, Baranelli, Carraro, & Trotta, 2006).

El Comité Mixto FAO/OMS de expertos en aditivos alimentarios (JECFA), no ha establecido hasta el momento para  $\alpha$ - y  $\gamma$ -CDs ninguna ingesta diaria aceptable, debido a sus perfiles toxicológicos.

Por otra parte, en julio de 2005, la Agencia de Protección Ambiental (EPA) mencionó la necesidad de establecer un nivel máximo permitido de residuos de todos los tipos de ciclodextrinas que sean usadas en diversos productos alimenticios (EE.UU. Federal Register,

---

2005) (Astray, Gonzalez-Barreiro, Mejuto, Rial-Otero, & Simal-Gándara, 2009). Sin embargo, debido a que la  $\beta$ -ciclodextrina no presenta perfiles toxicológicos, ha sido establecido un nivel máximo de 5 mg/kg-día para su uso en alimentos.

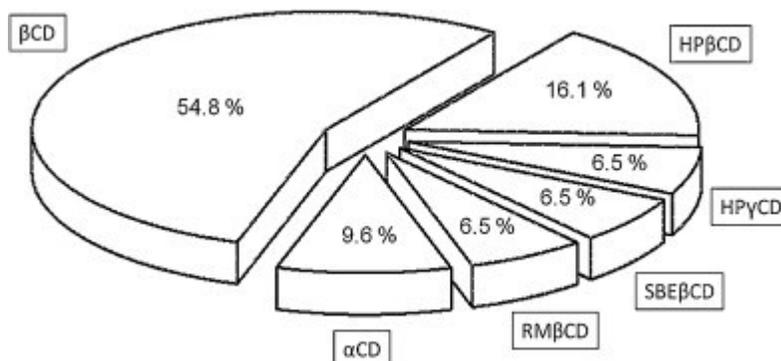
### 1.1.3 Producción de ciclodextrinas.

Las ciclodextrinas se obtienen a partir de la degradación enzimática de la ciclodextrin glucosiltransferasa (CGTasa) sobre el almidón o derivados del mismo. El almidón de maíz, es el que más se emplea en la síntesis de CDs, sin embargo debido a la gran demanda de CDs que se ha presentado en los últimos años, diversos autores se han dado a la tarea de buscar nuevas fuentes de almidón. Se han propuesto otros almidones como los de: tapioca, de sagú, arroz, papa, cassava, entre otros.

Se debe tener en cuenta que en la síntesis de CDs se obtiene una mezcla de ciclodextrinas nativas de  $\alpha$ -,  $\beta$ - y  $\gamma$ -, obteniendo  $\beta$ -CD en mayor proporción.

La forma  $\beta$  de CD se perfila para ser más adecuada para su uso industrial, ya que los complejos de inclusión se pueden preparar fácilmente y son muy estables debido a la baja solubilidad de la  $\beta$ -CD en agua, además, el rendimiento de  $\beta$ -CD a partir de almidón es generalmente más alta que la de las otras CD (Cheirsilp, Kitcha, & Maneerat, 2010b), dicho rendimiento depende de las condiciones de reacción, concentración de sustrato, cantidad de enzima y fuente de CGTasa. Para determinar las condiciones óptimas para la producción de  $\beta$ -CD por CGTasa, es esencial entender la cinética de la reacción.

Un análisis comparativo, en la actualidad contiene muestras de que la  $\beta$ -CD es la más comúnmente empleada en la Industria (Fig. 3). Este hecho se debe a que los costos de producción, son más bajos por su fácil síntesis (más de 10.000 toneladas producidas anualmente con un precio promedio mayor de aproximadamente 5 dólares por kg) (Kurkov & Loftsson, 2013), en comparación con algunos derivados de las CDs, tales como 2-hidroxipropil (HP $\beta$ CD y HP $\gamma$ CD) y sulfobutiléter (SBE $\beta$ CD), sin embargo cabe mencionar que estos derivados poseen perfiles toxicológicos, más altos en comparación con la  $\alpha$  y  $\gamma$  ciclodextrinas.



**Figura 3.** Uso de las ciclodextrinas nativas y algunos derivados, en la Industria.

**Fuente:** Kurkov & Loftsson, 2013.

En la industria es importante aislar la  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  CDs obtenidas de las mezclas de reacción, durante el aislamiento se requieren técnicas selectivas y de altos costos. Es una práctica común al aislar las ciclodextrinas, el uso de solventes orgánicos no polares los cuales son altamente tóxicos, y su eliminación se debe asegurar por completo en el producto final, con el objeto de aplicarlos en fármacos, cosméticos, alimentos, entre otros (Armbruster, 1988). Un método alternativo es la selectividad de la CGTasa a través de ingeniería de proteínas (Penninga et al., 1995), la cual genera un solo tipo de ciclodextrina como productos de reacción. Otros estudios (Blackwood & Bucke, 2000; Y. D. Lee & Kim, 1992) proponen la adición de solventes polares de bajo peso molecular en pequeñas cantidades (hasta 10% v/v) para aumentar los rendimientos de CDs y que se pueden eliminar fácilmente.

#### 1.1.4 Aplicaciones de las ciclodextrinas.

En los últimos años, se han incrementado los trabajos de investigación, patentes y conferencias sobre el estudio de las ciclodextrinas, esto debido a su amplio campo de aplicación.

Las ciclodextrinas se emplean en el tratamiento de aguas residuales, industria del papel, productos cosméticos, industria farmacéutica y de alimentos, entre otras, esto debido a que se pueden encapsular compuestos lábiles, tóxicos, explosivos, emulsionar aceites,

enmascarar olores y sabores, aumentar la solubilidad de medicamentos y convertir en polvo compuestos sólidos y aceitosos (Contreras et al., 2011).

También destaca el empleo de ciclodextrinas en la purificación de aguas, en esta área existen importantes proyectos internacionales que están en desarrollo de sistemas que permiten eliminar sustancias contaminantes (tales como metales pesados) a través de CDs funcionalizadas.

En la industria del papel, las ciclodextrinas pueden ser aplicadas en el tratamiento de la pulpa para atrapar tintas hidrofóbicas y para combatir el problema de reversión de blancura en el papel. También en papeles para embalajes de alimentos y en papel de cigarrillos donde logra encapsular saborizantes que se liberan mientras se fuma y en los materiales absorbentes como en filtro, boquillas de cigarro en donde actúan encapsulando vapores de solventes (Contreras et al., 2011)

En productos fibrosos que atrapan o liberan olores, por ejemplo pañales, pañuelos desechables, toallas de papel, entre otros.

En la Industria cosmética, se emplean en productos destinados al aseo personal, basado en la eliminación de olores formados en la degradación microbiana del sudor, incorporándose con este fin a desodorantes de barra (Martínez y Gómez 2007, Delgado *et al.*, 2011).

En algunos productos comerciales como Epicutin-TT © (Chem. Laboratorium Dr. Kurt Richter GmbH) y Pিকেlex © (Regena Ney Cosmética) que utilizan la formación de un complejo con un antimicrobiano para evitar la oxidación que tiene como consecuencia la irritación en la piel.

En agentes para aclarar la piel como la hidroquinona y el ácido Kójico, en el primer caso se emplea para hacer una formulación acuosa estable y en el segundo para evitar la evaporación. El efecto de larga duración de liberación lenta de los perfumes, como son los de acción prolongada como Vivace © (Shiseido Co.), en todos los casos se destaca que las ciclodextrinas no alteran la funcionalidad de las moléculas huésped (Astray et al., 2009).

En la industria farmacéutica, se sabe que un número importante de principios activos tienen poca solubilidad en agua, por lo que su absorción es más lenta y poco eficaz y son sensibles a la oxidación. La mayoría de estas moléculas pueden incluirse dentro de las ciclodextrinas y así mejorar sus limitaciones. En ocasiones se deben combinar múltiples sustancias activas en una formulación farmacéutica, para conseguir efectos sinérgicos, sin embargo algunos de estos compuestos son incompatibles en el medio y en estos casos el complejo de inclusión puede estabilizar la formulación (Martínez y Gómez 2007, Delgado *et al.*, 2011).

Sin duda la mayor producción de ciclodextrinas, en específico la  $\beta$ -ciclodextrina, es destinada a la industria de los alimentos, destacando su aplicación durante el procesamiento y como aditivo alimentario con una variedad de objetivos:

- a) Para proteger los componentes alimentarios lipófilos que son sensibles al oxígeno y la degradación de iluminación o inducida por calor;
- b) Para solubilizar colorantes de alimentos y vitaminas;
- c) Para estabilizar fragancias, sabores, vitaminas y aceites esenciales contra cambios no deseados;
- d) Para suprimir olores o sabores desagradables; y
- e) Para lograr una liberación controlada de ciertos constituyentes de los alimentos.

En alimentos, el sabor juega un papel importante en la satisfacción del consumidor y directamente su consumo. Durante el procesamiento y almacenamiento, los materiales de embalaje y los mismos ingredientes en los alimentos a menudo causan modificaciones en su sabor general, esto por la reducción de la intensidad de aroma o la generación de componentes con sabor, para evitar estos acontecimientos es beneficioso encapsular ingredientes volátiles antes de su uso en alimentos y bebidas.

Una variedad de prácticas de encapsulación comerciales están actualmente aplicándose; la adición de  $\beta$ -CD como agentes estabilizantes o espesantes puede retener algunos compuestos de aroma en matrices de alimentos durante los procesos térmicos (cocción, pasteurización).

Hay un gran potencial para el uso de sabor encapsulado en el proceso de extrusión de alta temperatura de corto tiempo de alimentos (por sus siglas en inglés, HTST) (Astray et al., 2009).

La formación de complejos de inclusión con CD puede proteger algunos componentes de los alimentos lipofílicos que son sensibles al oxígeno y a la degradación por calor o inducida por la luz. En la producción de jugos el daño mecánico sufrido por los tejidos vegetales y frutas a menudo conduce a reacciones catalizadas por enzimas de pardeamiento rápidos. Por lo tanto, la polifenol-oxidasa convierte los polifenoles incoloros a compuestos de color, con el fin de evitar este efecto, por lo cual las frutas y los zumos de verduras pueden ser tratados con CDs para eliminar la polifenol-oxidasa a partir de zumos por complejación (Del Valle, 2004). Por lo tanto, esto demuestra que los compuestos fenólicos en inclusión con CDs evita la oxidación enzimática (López-Nicolás & García-Carmona, 2007).

Algunos sabores pueden hacer complejos con  $\beta$ -CD; tales como aceite de anís, de albahaca, de hoja de laurel, de zanahoria, de limón, de naranja, de menta, con benzaldehído, vainilla, entre otros (Astray et al., 2009). El uso de complejos CDs de inclusión durante el procesamiento permite utilizar pequeñas cantidades de sabores para mantener una alta estabilidad cuando se calientan durante el procesamiento industrial de los alimentos.

#### **1.1.4.1 Inclusiones ciclodextrina-polifenoles.**

Los problemas que se presentan los polifenoles extraídos de fuentes naturales pueden ser resueltos mediante la aplicación de la tecnología de microencapsulación (Figura 4), que proporciona la técnica requerida para mantener los polifenoles funcionales y eficaces. La aplicación de compuestos bioactivos microencapsulados como ingredientes funcionales en diversas aplicaciones de alimentos y bebidas exhibe un potencial significativo, ya que podría permitir el enriquecimiento de diversos productos alimenticios con antioxidantes naturales (Diplock et al., 1999).

Datos de la literatura sobre la encapsulación de antioxidantes polifenólicos son limitadas. Hasta el momento la encapsulación, se ha realizado de compuestos polifenólicos de la yerba mate (*Ilex paraguariensis*) (Deladino, Anbinder, Navarro, & Martino, 2008), hierba de San Juan (*Hypericum perforatum*) (Deladino et al., 2008), nopal (*Opuntia ficus indica*) (Saéñz, Tapia,

Chávez, & Robert, 2009). Para ello se han utilizado gomas arábigas o secado por pulverización como la técnica de encapsulación. Sin embargo estos no son los únicos sistemas posibles para la encapsulación, diversos estudios han utilizado a la  $\beta$ -ciclodextrina como medio para formar inclusiones con extractos de hoja de olivo (Mourtzinou, Salta, Yannakopoulou, Chiou, & Karathanos, 2007) o para inclusiones de catequina y taninos condensados (Belščak-Cvitanović et al., 2011; Taylor, Taylor, Belton, & Minnaar, 2009).

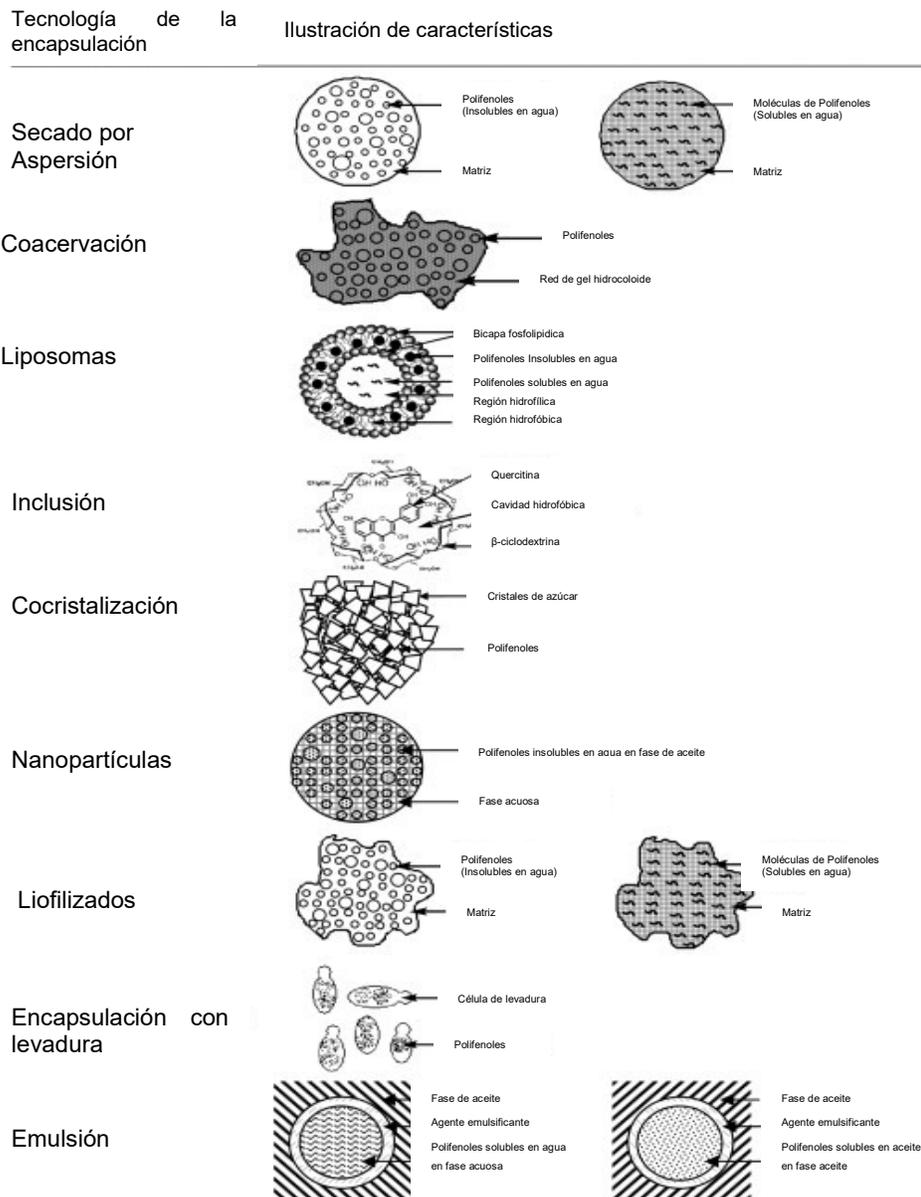
Al realizar inclusiones de polifenoles con la  $\beta$ -ciclodextrina, se podrá conservar la actividad biológica de estos compuestos, ya que deben ser capaces de alcanzar el sitio de acción sin perder la integridad y poder cruzar la membrana lipófila (Munin & Edwards-Lévy, 2010). La aplicación de los polifenoles, en su mayoría, ha sido restringida debido a que su solubilidad en agua es limitada; además, éstos pueden ser modificados fácilmente por factores ambientales tales como la temperatura y pH. Por lo tanto, a fin de preservar integra su bioactividad, se pueden proteger en una inclusión polifenol- $\beta$ -ciclodextrina.

Las ciclodextrinas pueden proteger la bioactividad de los polifenoles debido a su capacidad para formar inclusiones, modificando las características de los polifenoles, mejorando su solubilidad, estabilizarlos frente a agentes oxidantes (como el oxígeno, luz visible o ultravioleta), altas temperaturas, disminuyendo su volatilidad y/o liberando los compuestos de manera controlada.

## **1.2 Ciclodextrin glucosiltransferasa.**

Los procesos industriales que involucran la transformación de sustratos mediante el tratamiento químico han migrado durante las últimas décadas hacia el uso de enzimas que aceleran un proceso con un menor impacto negativo en el ambiente; éstas enzimas se han aplicado en diferentes procesos industriales, como la obtención o tratamiento de alimentos, bebidas, textiles, curtiembres, desechos biodegradables, remediación ambiental, etcétera. De las enzimas producidas a nivel industrial, el 90% son producidas por microorganismos. Especies de *Bacillus* siguen estando a la cabeza de bacterias dominantes en fermentaciones microbianas. Algunas especies de *Bacillus* son en la lista GRAS de la Administración de Alimentos y Medicamentos (generalmente considerado como seguro). La capacidad de las cepas de *Bacillus* seleccionadas para producir y secretar grandes cantidades (20-25 g / L) de

enzimas extracelulares los ha colocado entre los más importantes productores de enzimas industriales (Schallmey, Singh, & Ward, 2004). Dentro de estas enzimas que produce la especie *Bacillus* se encuentran algunas glucosiltransferasas, tales como la ciclodextrin glucosiltransferasa.



**Figura 4.** Ilustración de las características de cápsulas de polifenoles encapsulados, producidos por diversos procesos de encapsulación.

Fuente: (Fang & Bhandari, 2010).

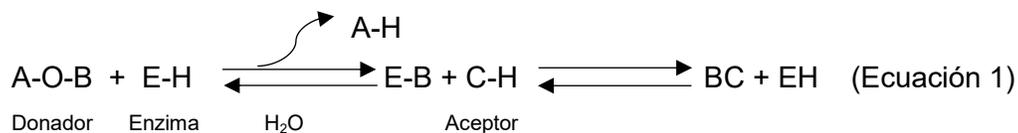
### 1.2.1 Clasificación.

Las glucosiltransferasas pueden ser definidas como enzimas que transfieren un residuo glucosilo desde un donador a un sustrato aceptor.

La alta especificidad hacia los donadores y aceptores de las glucosiltransferasas es la base fundamental para la síntesis específica de las cadenas de azúcar producidas en la célula. Dentro de las glucosiltransferasas (EC 2.4.) existen tres tipos diferentes, que se diferencian por el residuo de azúcar que transfieren:

- I. Hexosiltransferasas (2.4.1.).
- II. Pentosiltransferasas (2.4.2.).
- III. Otras enzimas que transfieran restos distintos a hexosas y pentosas (2.4.99.).

Las reacciones generales de transferencia, se generan cuando transfiere un grupo glucósido, desde un donador (A-O-B) hacia un aceptor (C-H), durante la reacción se forma un complejo covalente intermediario enzima-sustrato (E-B), dicha reacción se describe en la Ecuación 1.

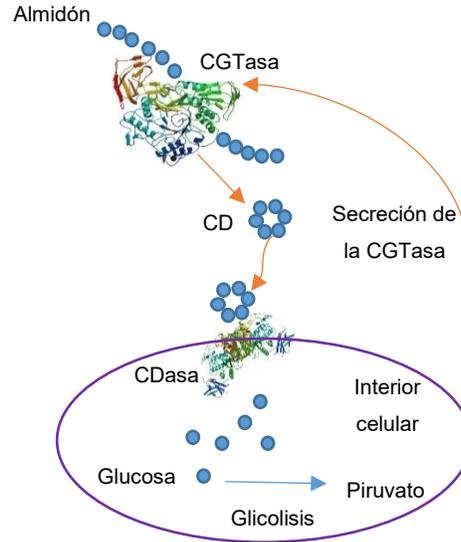


La ciclodextrin glucosiltransferasa (CGTasa, EC 2.4.1.19) pertenece al grupo de las hexosiltransferasas, originalmente se les conocía como *amilasa macerans*, debido a que las primeras ciclodextrinas sintetizadas se obtuvieron de cultivos de *Bacillus macerans*, y hoy en día se conocen como ciclodextrina glucosiltransferasa y cicloamilosa gluconotransferasa (Contreras et al., 2011). La CGTasa es una enzima extracelular inducible, producida solamente por células microbianas tales como; *Klebsiella*, *Paenibacillus*, *Brevibacterium*, *Thermococcus*, *Thermoanaerobacterium* y *Anaerobranca* (Pishtiyski, Popova, & Zhekova, 2008) y más comúnmente citado en la literatura son los géneros *Bacillus* (Menocci et al., 2008).

Estos microorganismos, secretan a las CGTasas al medio extracelular principalmente para degradar el almidón, facilitando el suministro de carbohidratos al interior celular generando la formación de ciclodextrinas.

Las ciclodextrinas sintetizadas en el exterior celular pueden desempeñar tres funciones diferentes:

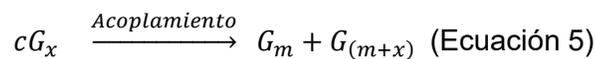
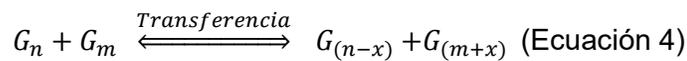
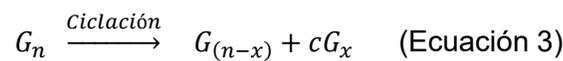
- I. El organismo dispondrá de una reserva externa de glucosa que difícilmente podrá ser accesible para otras células debido a que no sean capaces de metabolizar estos oligosacáridos cíclicos. Cuando el microorganismo requiera energía, podrá metabolizar las ciclodextrinas. Durante el proceso para metabolizar las ciclodextrinas, se sabe que interviene la enzima ciclomaltodextrinasa (Cdas; EC 3.2.1.54), la cual se encuentra asociada a la membrana celular (localizada en la cara citosólica), la cual a partir de la CD produce unidades de glucosa, maltosa y maltotriosa (Feederle, Pajatsch, Kremmer, & Böck, 1996) y con ello satisface las necesidades energéticas del microorganismo. El metabolismo posterior de la glucosa tiene lugar en el interior celular mediante las rutas glucolíticas, dando como producto final piruvato (Figura 5).
- II. Las ciclodextrinas son sintetizadas en el exterior para proteger a la célula contra sustancias tóxicas que se encuentren en el medio, debido a que las CDs pueden atrapar en su interior estos compuestos tóxicos y con ello resguardar la seguridad del microorganismo.
- III. En algunas ocasiones las CDs pueden atrapar compuestos que necesitan los microorganismos para poder desarrollarse, por ejemplo el hexadecano.



**Figura 5.** Asociación de la Cdaa y CGTasa, para el aprovechamiento de ciclodextrina como fuente de energía.

### 1.2.2 Mecanismos de reacciones catalíticas.

Las CGTasa sintetizan las ciclodextrinas a partir de la degradación del almidón. La cinética de reacción propuesta por Van der Veen (B. A. Van der Veen, van Alebeek, Uitdehaag, Dijkstra, & Dijkhuizen, 2000) se puede representar con las siguientes ecuaciones.



Dónde  $G_n$ ,  $G_m$  y  $G_x$  son oligosacáridos con  $n$ ,  $m$  y  $x$  unidades de glucosa, respectivamente.  $cG_x$  toma valores de  $x=6$  para  $\alpha$ -CD, de  $x=7$  para  $\beta$ -CD y de  $x=8$  para  $\gamma$ -CD.

Las reacciones de hidrólisis que se observan en la Ecuación 2, se llevan a cabo muy débilmente por lo que algunos autores concuerdan en despreiciarla; por otro lado, la reacción de ciclación, se considera una reacción específica en donde se forman los anillos cerrados de CDs a partir de  $\alpha$ -(1→4) glucanas, mediante la transferencia intermolecular de un extremo

---

reductor (donador) del azúcar, a un extremo no reductor de la misma cadena (aceptor) (Ecuación 3). El acoplamiento se da mediante la reacción inversa de la ciclación, donde se abren los anillos y se transfieren como cosustratos unidades de glucosa, maltosa o sacarosa para formar varios oligosacáridos (Ecuación 5) (J. C. M. Uitdehaag, van der Veen, Dijkhuizen, & Dijkstra, 2002; B. Van der Veen et al., 2000; B. A. Van der Veen et al., 2000).

Por último la reacción de transferencia se lleva a cabo de acuerdo a la Ecuación 4; donde se da una redistribución de oligosacáridos lineales, en ésta se puede catalizar la transferencia de unidades glucosilo de un donante (como el almidón) a un aceptor adecuado. Las reacciones de transferencia son generalmente mucho más rápidas que las otras reacciones, lo que conduce apresuradamente a un estado de cuasi-equilibrio con respecto a la concentración de dextrinas lineales que se ciclan por la enzima. La transferencia también permite la producción de cadenas más grandes (que experimentan ciclación) de pequeñas cadenas tales como maltotriosa (J. C. M. Uitdehaag et al., 2002; B. Van der Veen et al., 2000; B. A. Van der Veen et al., 2000). Por esta razón es posible la producción de CDs de maltotriosa, sin embargo la producción de CD a partir de glucosa no ha sido reportada en la literatura.

### **1.2.3 Producción específica de ciclodextrinas.**

Todas las enzimas CGTasas aisladas producen los tres tipos de CD en diferentes relaciones. Los principales productos de la degradación del almidón son la  $\alpha$ -,  $\beta$ - y  $\gamma$ - CDs, formando predominantemente un cierto tipo de CD que en la mayoría de los casos es la  $\beta$ -CD. Se sabe que la conversión de almidón a ciclodextrinas, así como su relación  $\alpha$ : $\beta$ : $\gamma$  ciclodextrinas, depende principalmente de la fuente microbiana de la enzima (Tabla 2), además de sus condiciones de reacción empleadas como concentración inicial y tipo de almidón, pH, temperatura y tiempo. Dependiendo de los complejos enzima-sustratos llevados a cabo, se pueden obtener rendimientos de CDs desde un 20 a un 40% (Contreras et al., 2011).

Así mismo, el proceso de producción de CD depende de manera significativa de la CGTasa que se utiliza y del tipo de almidón. La caracterización y la aplicación de CGTasas nuevas y poco estudiadas, así como el uso de fuentes de almidón alternativas, podrían proporcionar nuevas perspectivas para la producción de CDs.

**Tabla 2.** Producción preferente de ciclodextrinas por varios microorganismos.

Microorganismo	Relación $\alpha$ : $\beta$ : $\gamma$
<i>Bacillus alcalofilicos</i>	$\beta$ -CD
<i>Bacillus alcalofilicus</i>	1:11:15
<i>Bacillus megaterium</i>	1:2.4:1
<i>Bacillus macerans</i>	2.7:1:1
<i>Bacillus circulans</i>	1:10.5:0
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Hasta 95% $\alpha$ -CD
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1:1.86:0.56
<i>Bacillus lentus</i>	1:67:1.6

Fuente: Contreras (2011) (Contreras et al., 2011).

### 1.3 Almidón.

El almidón es un biopolímero que ha sido parte fundamental de la dieta del hombre como principal fuente de carbohidratos desde la prehistoria y por ello, en la actualidad se destina como materia prima en diversos sectores de la industria alimentaria.

Después de la celulosa, es el polisacárido más abundante en la naturaleza e importante desde el punto de vista comercial; se encuentra en los cereales, tubérculos y en algunas frutas como polisacárido de reserva energética, su concentración varía según la fuente vegetativa.

El almidón es un polímero altamente funcional que puede ser modificado química o enzimáticamente, para obtener propiedades adecuadas para cubrir necesidades específica en la industria, tal es el caso del almidón soluble (Paredes-López, 1990).

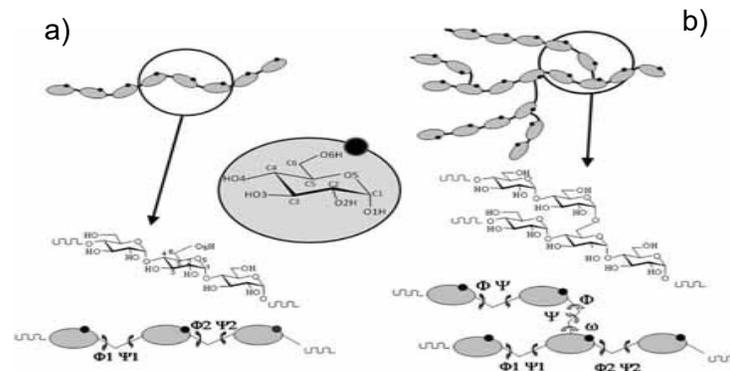
#### 1.3.1 Composición química del almidón.

El almidón está compuesto por una mezcla de dos polisacáridos similares, la amilosa y la amilopectina, ambas estructuras de manera organizada forman el gránulo de almidón. Los gránulos de almidón tendrán diferentes dimensiones y características según la fuente vegetativa de donde se extrae.

La amilosa es producto de la condensación de D-glucopiranososa por medio de enlaces glucosídicos  $\alpha$ -(1,4), que establecen largas cadenas lineales de 200 a 2500 unidades y pesos moleculares de hasta de un millón; es decir, la amilosa es una  $\alpha$ -D-(1,4)-glucana, cuya unidad repetitiva es la  $\alpha$ -maltosa.

Tiene la facilidad de adquirir una conformación tridimensional helicoidal, (Figura 6 a) en la que cada vuelta de la hélice consta de seis moléculas de glucosa.

La amilopectina se diferencia de la amilosa en que contiene ramificaciones, estas ramas están unidas a una cadena lineal central (semejante a la amilosa) por enlaces  $\alpha$ -D-(1,6), localizadas cada 15-25 unidades lineales de glucosa (Figura 6 b). Su peso molecular es alto, ya que algunas fracciones llegan a alcanzar hasta 200 millones de daltones, es importante señalar que también se han reportado pesos de entre 300,000 y 500,000 (Badui Dergal, 2006).



**Figura 6.** Estructura básica de la estructura del almidón a) amilosa; b) amilopectina, y sus respectivos ángulos de torsión.

Fuente: Pérez (2010) (Pérez & Bertoft, 2010).

### 1.3.2 Propiedades de la amilosa y la amilopectina.

La amilosa y amilopectina tienen diferentes propiedades, la primera tiene una alta tendencia a retrogradar y producir geles duros y películas fuertes, mientras que la amilopectina, dispersada en agua, es más estable y produce geles suaves y películas débiles. Los entrecruzamientos entre amilosa y amilopectina, junto con la presencia de fosfolípidos y lípidos, tienen efectos significativos en las propiedades de gelación y retrogradación (Pérez & Bertoft, 2010).

De acuerdo al contenido de amilosa/amilopectina, el almidón se clasifica en dos tipos: a) tipo glutinoso, opaco o ceroso; el cual está formado principalmente por amilopectina, con menos del 1% de amilosa, donde los gránulos se tiñen de ámbar a púrpura en presencia de yodo; y b) tipo no ceroso, translúcido o normal; donde el contenido de amilosa es mayor a un 5%, los gránulos dan una coloración azul cuando se tiñen con yodo (Paredes-López, 1990).

### **1.3.3 Principales fuentes de obtención de almidón**

En 2012, la producción mundial de almidón fue de 75 millones de toneladas (Waterschoot, Gomand, Fierens, & Delcour, 2015), siendo las principales fuentes de obtención el maíz, la papa, la yuca y el trigo, mientras que las de menor proporción es el arroz.

La selección de la fuente de almidón debe ser cuidadosa según el destino industrial, ya que la estructura, composición, hinchazón y gelatinización están directamente relacionados con las características de los productos finales. Las diferencias que se encuentran entre los almidones radica en gran parte en las concentraciones existentes de amilosa y amilopectina, su estructura, organización granular, presencia de lípidos, proteínas y minerales, además del tamaño del gránulo de almidón (Waterschoot et al., 2015).

### **1.3.4 Aplicaciones del almidón en la industria.**

La principal aplicación del almidón en la industria alimentaria es su uso como agente espesante, aglutinante, desintegrante, estabilizador, modificador de textura y gelificante.

Los almidones nativos tienen algunos inconvenientes que limitan su uso en la industria de alimentos, tales como la resistencia de baja cizalladura, baja termorresistencia, y la inmediata descomposición térmica (Rodrigues & Emeje, 2012). Por lo tanto, para fines industriales, se ha abusado del empleo de almidones modificados que se utilizan para suplir los almidones nativos. Sin embargo, recientemente las preferencias de los consumidores se orientan a ingredientes alimentarios naturales, lo que ha propiciado una nueva tendencia a buscar almidones naturales.

---

El almidón también es ampliamente utilizado en industrias tan diversas como de textiles, cosméticos, plásticos, adhesivos, papel y productos farmacéuticos (Otegbayo, Oguniyan, & Akinwumi, 2014). Cabe señalar, que recientemente se ha observado el uso de almidón en la nanotecnología el cual juega un papel importante y que ha dado avances significativos entre éstos la síntesis de CDs.

### **1.3.5 Almidones utilizados en la síntesis de las ciclodextrinas.**

Cada vez son más los estudios que se realizan para ofrecer nuevas alternativas vegetativas como fuente de almidón para la producción de CDs, y como se ha mencionado anteriormente los principales son los almidones de maíz (Ahmed & El-Refai, 2010; Atanasova et al., 2008; Costa, Canto, Ferrarotti, & de Jiménez Bonino, 2009; Cheirsilp, Kitcha, & Maneerat, 2010a; Freitas, Monti, & Contiero, 2004; Gastón, Szerman, Costa, Krymkiewicz, & Ferrarotti, 2009; Jaitak et al., 2009; Martins & Hatti-Kaul, 2002), de yuca, de papa y de cassava (Alves-Prado et al., 2008; K. Blanco et al., 2012; K. C. Blanco, de Moraes, et al., 2014; Goh, Mahadi, Hassan, Rahman, & Illias, 2007).

La síntesis de las CDs nativas, involucra dos operaciones generales, que en la práctica se llevan por separado.

- I. La síntesis de las enzimas involucradas (CGTasa).
- II. La síntesis y separación de ciclodextrinas.

De éstas, se pueden derivar consecutivos procesos, esto sí se desea modificar las estructuras de las ciclodextrinas para mejorar sus propiedades o en su defecto realizar complejos de inclusión con diversas moléculas para fines específicos.

En las operaciones generales se utiliza el almidón como principal materia prima, en la actualidad se han estudiado diversas fuentes de almidón en la industria de las fermentaciones para la producción de CGTasas (Biber, Antranikian, & Heinzle, 2002), así como en la síntesis de ciclodextrinas (K. C. Blanco, Moraes, et al., 2014), con el propósito de ofrecer alternativas que satisfagan a este sector que está creciendo potencialmente.

## **1.4 Amaranto.**

### **1.4.1 Propiedades del amaranto.**

El amaranto (huautli, en náhuatl) considerado como uno de los principales cultivos de las dinastías azteca e inca; su presencia en Tehuacán, México, se remonta a 4000 a.C., a través de la historia las hojas de amaranto las cuales fueron consumidas como vegetales y sus semillas como cereal (Morales, Vázquez, & Bressani, 2009; Paredes Lopez, Lara, & Pérez, 2006).

El amaranto, es una planta de hojas anchas, brillantemente coloreadas, su forma es parecida a la del sorgo, pertenece a la clase dicotiledóneas del orden *caryophyllales* y de la familia *Amaranthaceae* (Bunzel, Ralph, & Steinhart, 2005; Morales et al., 2009), comprende más de 60 géneros y aproximadamente 800 especies de plantas herbáceas anuales o perennes.

La planta tiene una panícula (panoja) parecida al sorgo con una longitud promedio de 50 a 90 cm mientras que la panoja está formada por muchas espigas que contienen numerosas flores pequeñas (inflorescencias) en las cuales están contenidas el grano.(Arellano Vázquez & Galicia Franco, 2007; Morales et al., 2009).

### **1.4.2 Producción del amaranto.**

Existen tres especies del género *Amaranthus* que producen grandes inflorescencias: *A. hypochondriacus* y *A. cruentus*, que son cultivadas principalmente en México y Guatemala, respectivamente, y *A. caudatus*, que es cultivada especialmente en Perú.(Morales et al., 2009; Paredes Lopez et al., 2006). En la República Mexicana, las zonas de producción y cultivo de amaranto son las mismas de la época precolombina, en la Tabla 3 se muestra la producción por zonas.

**Tabla 3.** Principales estados productores de amaranto en la República Mexicana.

Estado	Sup. Sembrada (Ha)	Sup. Cosechada (Ha)	Producción (Ton)	Rendimiento (Ton/ha)
Distrito Federal	137.0	137.0	151.4	1.1
Jalisco	21.0	21.0	18.9	0.9
México	191.0	191.0	439.8	2.3
Morelos	329.0	329.0	325.0	0.9
Oaxaca	7.0	7.0	6.9	0.9
Puebla	2,816.0	2,101.0	3,355.6	1.6
Tlaxcala	191.0	191.0	195.6	1.0

Fuente: Anuario Estadístico de Producción Agrícola 2009. SAGARPA (SAGARPA, 2014).

Nota: La producción de los demás estados se muestra en Anexo I.

### 1.4.3 Clasificación e importancia industrial del amaranto.

El amaranto es una planta considerada como pseudocereal, puesto que produce granos tipo cereal, su crecimiento es rápido en climas calientes y templados, donde el suministro de agua es limitado; por otro lado es tolerante a condiciones áridas y suelos pobres, condiciones que son altamente adversas para el cultivo de cereales.

Una de las características que hacen atractivo el uso de la semilla de amaranto en diversos sectores industriales se debe a que es un producto de origen vegetal muy completo el cual es fuente importante de proteínas (13-18%), minerales y vitaminas naturales como A, B, C, B1, B2, B3; también contiene ácido fólico, niacina, calcio, hierro fósforo (Paredes Lopez et al., 2006; Jorge Soriano-Santos & Avendaño, 2013).

Es uno de los alimentos con alto contenido de aminoácidos esenciales como la lisina, también contienen sustancias con funciones biológicas en las dietas tales como: inhibidores de proteasas, péptidos antimicrobianos, lectinas y antioxidantes (Paredes Lopez et al., 2006; Jorge Soriano-Santos & Avendaño, 2013).

Investigaciones recientes han reportado que los extractos acuosos de hojas de *Amaranthus gangeticus* poseen actividad anticancerígena en células de hígado, mama y colon (Sani, Rahmat, Ismail, Rosli, & Endrini, 2004).

Los granos de amaranto contienen del 6 al 10% de aceite, el cual se encuentra principalmente en el germen, éste es predominantemente un aceite insaturado (76%) alto en ácido linoleico (Mendonça, Saldiva, Cruz, & Arêas, 2009), que es esencial para la nutrición humana.

#### **1.4.4 Limitaciones y bondades del amaranto.**

Aunque diversas investigaciones reconocen que el grano posee características nutrimentales únicas, como son: alta calidad proteica, fibra dietética 9-16%, lípidos 3.1-11.5% y alto contenido de almidón 52-70% (Guerrero, Mata, & Castignoli, 2009; Kečkešová, Palenčárová, Gálová, Gažo, & Hricová, 2013; Van der Maarel, van der Veen, Uitdehaag, Leemhuis, & Dijkhuizen, 2002).

Hasta el momento no se ha explotado de manera importante. Sin embargo se pueden extraer sus nutrientes de manera aislada para obtener materias primas con propiedades tecnofuncionales específicas (Jorge Soriano-Santos & Avendaño, 2013). Tal es el caso de las proteínas de donde se han aislado péptidos con actividad antihipertensiva, antioxidante, así como los hidrolizados de glutelina de Amaranto que controlan la glucemia postprandial, (Jorge Soriano-Santos & Escalona-Buendía, 2013; Jorge Soriano-Santos, Reyes-Bautista, Guerrero-Legarreta, Ponce-Alquicira, Escalona-Buendía, Almanza-Pérez, Díaz-Godínez, & Román-Ramos, 2014).

Se sabe que anualmente en México, se generan 271,100 ton de residuos agrícolas después de cosechado el grano que generalmente se desechan sin darles un uso adecuado lo que representa un foco de contaminación, para ello es posible resolver este problema obteniendo fibra dietética insoluble a partir de estos residuos, que a su vez es una fuente de compuestos polifenólicos, los cuales se liberan de la lignina a través de una hidrólisis ácida, los compuestos polifenólicos resultantes de la hidrólisis ácida, presentan buena actividad antioxidante que al añadirse al mismo residuo lignocelulósico podría generar una fibra dietética antioxidante (Arce Vazquez, 2011).

Sin embargo, a pesar de todos los beneficios que presenta el grano y sus residuos agrícolas, en México no se aprovechan de manera intensiva, ya que los productores sólo se limitan a destinar el producto principal (el grano) a la elaboración de dulces artesanales, harinas para atole y en combinación con harina de trigo para tener un porcentaje mínimo en formulaciones para productos de panificación (Jorge Soriano-Santos & Avendaño, 2013).

Debido a esto, la producción registrada actualmente a nivel nacional se ha visto disminuida con respecto a años anteriores (SAGARPA, 2014). Se debe estudiar con mayor esfuerzo, los nutrimentos independientes que pueden ser aprovechados en diversas áreas potenciales de la industria, con lo cual se incentivaría su cultivo y se preservaría.

---

## 2 ANTECEDENTES.

La mayoría de las enzimas ciclodextrin glucosiltransferasas, se producen a partir de aproximadamente 25 microorganismos, sin embargo, solo alrededor del 2% de los microorganismos se han utilizado a nivel industrial como fuente de enzimas. Dentro de estos microorganismos, diversos autores han reportado al género *Bacillus* como el más usado para la producción de CGTasas (Atanasova et al., 2008; Jaitak et al., 2009; Leemhuis, Kelly, & Dijkhuizen, 2010; Rimphanitchayakit, Tonozuka, & Sakano, 2005; B. Zhekova, Dobrev, Stanchev, & Pishtiyski, 2009; B. Y. Zhekova, Pishtiyski, & Stanchev, 2008).

Por otra parte, se ha informado que las fuentes de almidón que se utilizan en la síntesis de CGTasa y de ciclodextrinas a nivel industrial, preferentemente son el maíz y la papa, los cuales previamente han sufrido una modificación química para aumentar su solubilidad, o de otra manera, se han pre-gelatinizado.

A nivel laboratorio, es una práctica común, que se emplee únicamente almidón de maíz soluble o pregelatinizado, como sustrato para las fermentaciones en la producción de CGTasa (Mahat et al., 2004; Menocci et al., 2008), para la síntesis de CGTasa es indispensable caracterizar los parámetros cinéticos de las fermentaciones, tales como el rendimiento de la CGTasa por unidad de sustrato ( $Y_{E/S} = E_{m\acute{a}x} / S$ ), productividad de la CGTasa ( $E_{m\acute{a}x} / t$ ) así como la tasa de consumo específico ( $q_C = (\mu) / (Y_{E/S})$ ).

Diversos autores han dirigido sus estudios a la caracterización de la CGTasa (Atanasova, Kitayska, Bojadjieva, Yankov, & Tonkova, 2011; K. C. Blanco, de Moraes, et al., 2014; Freitas et al., 2004; Gastón et al., 2009), debido a que es importante especificar las condiciones óptimas de trabajo de la enzima (Ahmed & El-Refai, 2010), además de la afinidad por el sustrato (Rakmai & Cheirsilp) que se va a emplear (Leemhuis et al., 2010).

Se deben identificar los productos de la reacción, con la finalidad de saber la relación de las tres ciclodextrinas formadas:  $\alpha$ -CD,  $\beta$ -CD ó  $\gamma$ -CD [13], ya que con la modificación de los parámetros cinéticos se puede modificar la relación dependiendo del tipo de aplicación a la que se destine.

Hasta el momento no se han realizado investigaciones acerca del uso de almidones nativos, como el almidón de amaranto, y de otras fuentes de almidón, en la síntesis de CGTasa.

Los reportes se centran en la utilización de nuevas fuentes de almidón para la síntesis de ciclodextrinas, tales como, mandioca, camote, maíz ceroso (Alves-Prado et al., 2008; K. Blanco et al., 2012; K. C. Blanco, de Moraes, et al., 2014; Goh et al., 2007) y arroz. Estos nuevos almidones presentan altos contenidos de amilopectina y bajo contenido de amilosa, característica que explica que se obtengan mejores rendimientos de enzima y una mayor actividad de ciclación que favorece la formación de ciclodextrinas, al compararse con los ensayos empleando almidón de maíz soluble y con alto contenido de amilosa [42-45].

Urban (2012) reportó por primera vez un estudio sobre el aprovechamiento del almidón de amaranto (*Amaranthus cruentus*) en la síntesis de ciclodextrinas, obteniendo hasta 8.76% de rendimiento de  $\beta$ -CD (Urban et al., 2012), en dicho estudio se utilizó una CGTasa obtenida a partir de una fermentación, la cual se realizó en un medio con almidón soluble y no con almidón de amaranto.

Un análisis comparativo, en la actualidad, sobre la producción de las ciclodextrinas ha demostrado que la  $\beta$ -CD es la que presenta mayor demanda en la industria. Esto es debido a que los costos de producción son más bajos por su fácil producción, registrándose más de 10,000 toneladas producidas anualmente con un precio promedio mayor de aproximadamente 5 dólares por Kg (Kurkov & Loftsson, 2013).

De las muchas aplicaciones que tienen las ciclodextrinas, la  $\beta$ -ciclodextrina, por el tamaño de su cavidad, destaca el área de alimentos, ya que puede formar complejos de inclusión con diversos compuestos empleados en los alimentos procesados, tales como, compuestos lábiles, aceites, olores y sabores indeseables; al formar los complejos, se proporciona las siguientes ventajas sobre los compuestos huésped: no tienen sabor, color, aumentan su solubilidad, convierte en polvo compuestos sólidos y aceitosos (Contreras et al., 2011) y, presenta estabilidad frente a la luz y el oxígeno.

La aplicación de la  $\beta$ -ciclodextrina en la formación de complejos de inclusión evitaría la pérdida de actividad antioxidante y biológica de los polifenoles naturales, ya que son altamente susceptibles a la oxidación durante los procesamientos que se llevan a cabo en la industria alimentaria, como tratamientos térmicos y durante el almacenamiento (Patras, Brunton, Tiwari, & Butler, 2011). Por estas razones se han buscado sistemas de encapsulamiento de los polifenoles naturales contra diversos factores que afectan su estabilidad (Munin & Edwards-Lévy, 2010), siendo los más prometedores los complejos de inclusión formados con la  $\beta$ -CD [77, 84].

La obtención de polifenoles naturales se ha basado, principalmente, en extracciones con solventes afines a la polaridad de los polifenoles de interés, sin embargo son escasos los estudios de la obtención de polifenoles no extraíbles (PNE), que tienen la ventaja de presentar mejores actividades antioxidantes, Arce, et al. (2011) optimizaron la obtención de PNE a partir de la fibra insoluble de la planta de amaranto mediante una hidrólisis ácida, los PNE obtenidos fueron 100 veces más que los polifenoles acuosos.

---

### 3 JUSTIFICACIÓN.

El alto contenido de amilopectina en el almidón de amaranto lo coloca como una alternativa viable para la obtención de CGTasas.

El almidón proveniente del amaranto puede ser usado por el género *Bacillus* como sustrato, ya que hay evidencias de que este género es uno de los más empleados para la producción de estas enzimas.

En medios con almidón de maíz soluble, el género *Bacillus* presenta una alta velocidad de crecimiento y produce rendimientos altos de enzima, sin embargo, sólo hay un reporte en la literatura que describe la obtención de CGTasa por fermentación sumergida, utilizando almidón de amaranto y a *Paenibacillus macerans* CCM 2012. No obstante, en este trabajo no se reportaron los parámetros cinéticos de la fermentación por lo cual se hace indispensable dicha caracterización, con el propósito de establecer la productividad de la enzima producida, bajo las condiciones de experimentación.

En la literatura sólo existen trabajos que han reportado la caracterización fisicoquímica de la CGTasa proveniente de *B. megaterium*, los cuales reportan los parámetros cinéticos de la enzima ( $K_m$  y  $V_{max}$ ), empleando almidón de maíz soluble como sustrato. Hasta el momento, no se ha reportado en la literatura los parámetros cinéticos de la CGTasa producida por fermentación del almidón de amaranto.

Por lo que es importante la búsqueda de nuevas alternativas para la producción de ciclodextrinas, que es el producto de mayor demanda obtenido de la reacción de la CGTasa, por lo que actualmente la producción mundial de ciclodextrinas es de 25 millones de Ton/año (Kurkov & Loftsson, 2013), siendo la principal la  $\beta$ -CD.

Por lo tanto, estudiar al almidón de amaranto como una nueva fuente de sustrato podría ser una opción viable para tener una mayor eficiencia en la síntesis de ciclodextrinas de importancia biotecnológica (Alves-Prado et al., 2008; K. Blanco et al., 2012; K. C. Blanco, de Moraes, et al., 2014; Goh et al., 2007), además, se requiere tener procesos sustentables que no sólo aprovechen el almidón, sino también la biomasa del amaranto como una fuente

lignocelulósica, para la obtención de polifenoles mediante procesos biotecnológicos, como una hidrólisis ácida.

Una vez obtenidos los polifenoles del amaranto, se pueden formar complejos de inclusión con  $\beta$ -CD, que ayudará a la conservación de la actividad antioxidante de los polifenoles, éste permitiría darle un uso integral a la planta de amaranto consiguiendo las siguientes ventajas: (a) se obtendrían productos con un alto valor agregado, tales como CGTasa, CDs y PNE; (b) se proporcionaría estabilidad a los polifenoles preservando su actividad antioxidante y (c) de una manera indirecta, se incentivaría el cultivo de amaranto.

---

#### **4 HIPÓTESIS.**

El almidón de amaranto puede utilizarse de una manera integral, para la producción de la ciclodextrin glucosiltransferasa y posteriormente, su alto contenido en amilopectina puede proporcionar los residuos no reductores necesarios para la producción de ciclodextrinas.

---

## 5 OBJETIVOS.

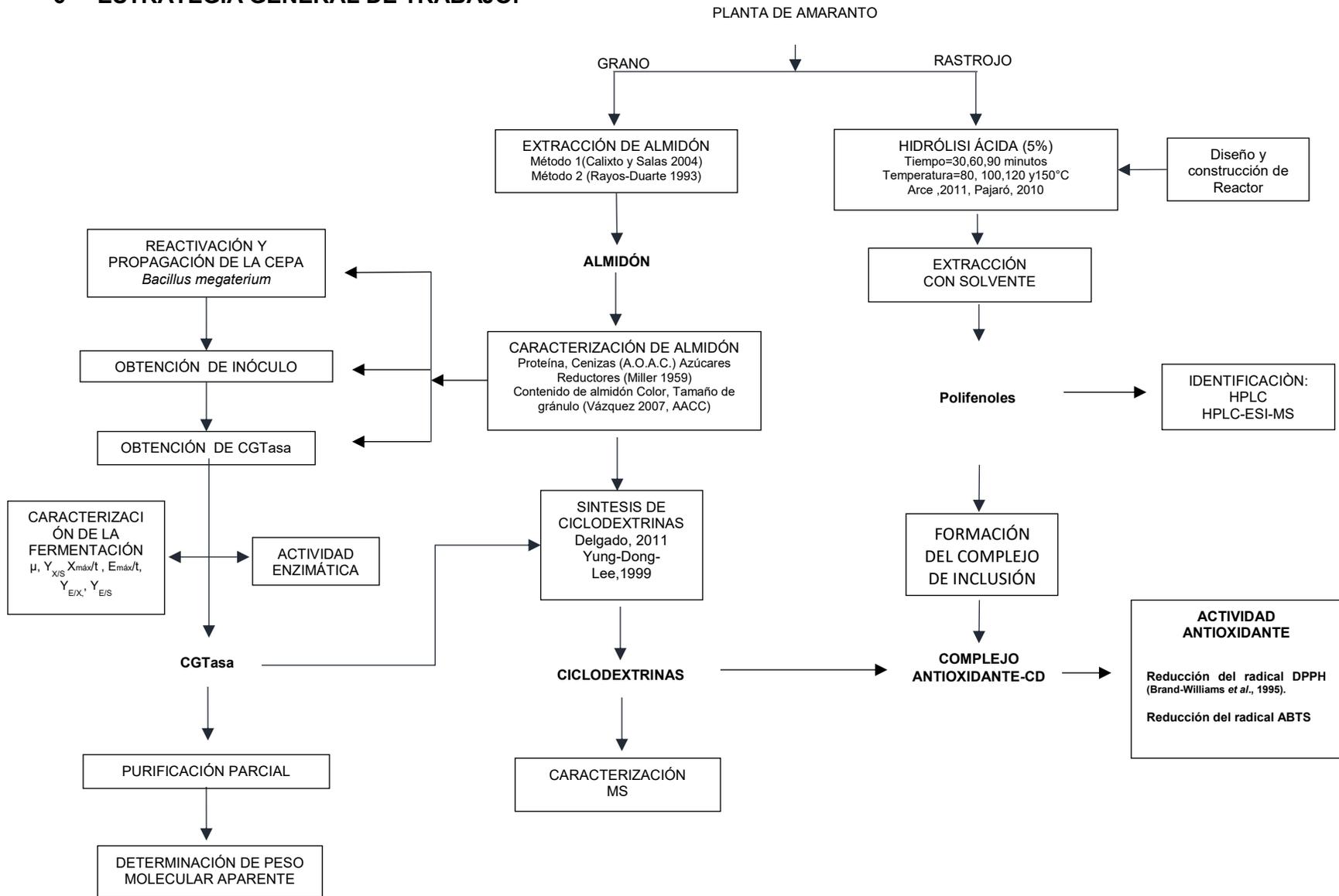
### 5.1 Objetivo general.

Evaluar el uso del almidón del grano de amaranto para la obtención de ciclodextrin glucosiltransferasa y para la síntesis de  $\beta$ -ciclodextrinas.

### 5.2 Objetivos particulares.

1. Evaluar los parámetros cinéticos de una fermentación líquida sumergida para la obtención de la ciclodextrin glucosiltransferasa, utilizando almidón del grano de amaranto.
2. Caracterizar parcialmente la ciclodextrin glucosiltransferasa obtenida en la fermentación líquida sumergida con *Bacillus megaterium*.
3. Sintetizar y caracterizar las  $\beta$ -ciclodextrinas utilizando almidón de amaranto y la CGTasa producida por fermentación líquida sumergida.
4. Obtener los polifenoles no extraíbles de la fibra de la planta del amaranto para la formación de complejos de inclusión  $\beta$ -ciclodextrina-polifenol.
5. Caracterizar la formación de un complejo de inclusión  $\beta$ -ciclodextrina-polifenol en un sistema modelo.

6 ESTRATEGIA GENERAL DE TRABAJO.



**CAPÍTULO I**  
CARACTERIZACIÓN DEL ALMIDÓN DE AMARANTO

## 1 ALMIDÓN DE AMARANTO.

### 1.1 Objetivo.

Extraer y caracterizar el almidón obtenido a partir del grano de amaranto.

### 1.2 Materiales y Métodos.

#### 1.2.1 Materiales.

En el presente trabajo se utilizó grano y rastrojo de *Amaranthus hypochondriacus* L. (Figura 7), donada por productores Revancha de INIFAP-Campus Montecillo.



**Figura 7.** Fotografías del cultivo de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus* L.) en la zona de Tulyehualco, México D.F., y de sus principales partes: a) grano b) tallo c) fluorescencia y d) hoja.

#### 1.2.2 Extracción de almidón de amaranto.

El almidón de amaranto (AA) se obtuvo por dos métodos de extracción, propuestos por Hoover (2010) (Hoover, Hughes, Chung, & Liu, 2010) y Villareal (2013) (Myriam E Villarreal, Pablo D Ribotta, & Laura B Iturriaga, 2013) (método 1 y método 2), con modificaciones de las metodologías originales descritas en las figuras 10 y 11 respectivamente.

En el método 1, se pesaron 250 g de grano de amaranto y se suspendieron en 1000 mL de una solución de  $\text{NaHSO}_3$  al 5% dejándolo reposar durante 24 h. Una vez transcurrido este tiempo, se molió durante 5 minutos con adición de 50 mL  $\text{NaHSO}_3$  al 5%, la mezcla se hizo pasar por un tamiz del número 80 (repetiendo la operación cuatro veces). La mezcla recuperada

se centrifugó a 3900 g, por 20 minutos a 10°C. El sobrenadante fue desechado y la capa mucilaginosa fue retirada mediante un raspado. La parte inferior se resuspendió en agua destilada y se ajustó el pH hasta la neutralidad. Posteriormente se centrifugó bajo las condiciones anteriormente descritas. El precipitado se dejó secar a 60°C durante 2 días en una estufa. Antes de almacenarlo a 4°C se pasó por un tamiz de malla 100. En el método 2, se tomaron 25 g de harina de amaranto y se remojaron en una solución 0.25 % de NaOH en una relación 1:8 y se agitó durante 2h. Posteriormente, se centrifugó en un equipo 420R Hettich a 3900 g, durante 15 min a 10°C. El precipitado obtenido después de 4 repeticiones se resuspendió en agua destilada y se neutralizó con HCL 4M. Se pasó por una malla para separar residuos de fibra. El almidón obtenido se centrifugó a 3900 g bajo las anteriores condiciones. Se realizó un raspado de la superficie al precipitado, posteriormente se secó en estufa a 60°C durante 12 h.

Tanto el rendimiento y la recuperación de los almidones obtenidos por el método 1 y el método 2, se estimaron de acuerdo con las ecuaciones (ISO-6647) y (ISO-6647) respectivamente.

$$\% \text{ rendimiento} = \frac{\text{almidón extraído (g)}}{\text{peso inicial de harina de amaranto (g)}} \times 100 \text{ (Ecuación 6)}$$

$$\% \text{ recuperación} = \frac{\text{almidón extraído (g)}}{\text{Almidón total en la muestra (g)}} \times 100 \text{ (Ecuación 7)}$$

### 1.2.3 Caracterización del almidón de amaranto.

Al almidón de amaranto obtenido, se le determinaron los siguientes parámetros:

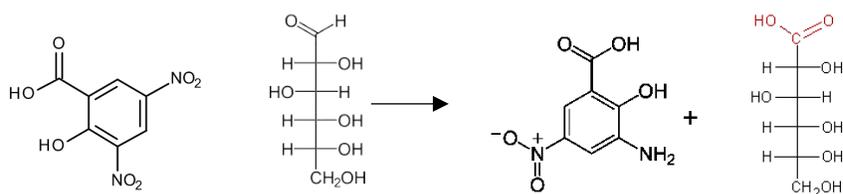
### 1.2.4 Contenido de proteína y cenizas

Para la cuantificación de proteínas y cenizas, se llevaron a cabo las metodologías oficiales de la A.O.A.C. (2000) (AOAC, 1990), siendo éstas:

- Determinación de cenizas por incineración (método No. 14006).
- Determinación de proteína cruda por Kjeldahl (método No. 2.049).

### 1.2.5 Azúcares reductores.

La presencia de azúcares reductores de las muestras se cuantificó por el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) según Miller (1959) con algunas modificaciones. El compuesto DNS (color amarillo) se reduce en presencia de azúcares con un extremo reductor al ácido 3-amino-5-nitrosalicílico (color rojo ladrillo) cuya presencia puede detectarse en una zona de absorbencia de 540-570 nm (Figura 8).



**Figura 8.** Reducción del ácido 3,5-dinitrosalicílico en presencia de un azúcar reductor a ácido 3-amino-5-nitrosalicílico.

Se mezcló 0.5 mL del reactivo del DNS con 0.5 mL de la muestra, se agitó en vortex Genie 2, se llevó a ebullición durante 5 minutos en baño maría, se enfrió a temperatura ambiente, se adicionó 5 mL de agua destilada y se agitó, se dejó reposar durante 15 min y se midió la absorbencia a 540 nm.

El contenido de azúcares reductores en las muestras, se calculó mediante la curva patrón que se muestra en el anexo II, y se expresando la concentración en mg de glucosa.

### 1.2.6 Contenido de almidón total.

El método descrito por Holm (1986), es un ensayo especialmente para la cuantificación de cereales, mientras que para la cuantificación de almidón total de amaranto se hicieron modificaciones al método.

El método se basa en la dispersión del almidón en medio acuoso, seguido de una hidrólisis enzimática parcial (para obtención de dextrinas) con  $\alpha$ -amilasa termoestable, completando la hidrólisis con amiloglucosidasa (obteniendo glucosa), la glucosa obtenida es cuantificada por colorimetría mediante la siguiente reacción:



Se gelatiniza 0.25 g de almidón con 100  $\mu\text{L}$  Termamyl ( $\alpha$ -amilasa (EC 3.2.1.1) Tipo XII-A de *Bacillus licheniformis*, producto Sigma®) durante 15 min en 50 mL de agua destilada incubando a 95  $^\circ\text{C}$ , se dejó enfriar y se filtró a través de un papel Whatman No. 1, se adicionó 100 mL de agua destilada, se tomó 0,75 mL de la dilución anterior y se adicionó 0,2 mL de solución tampón acetato 2 M pH 4,8 y 50 $\mu\text{L}$  de amiloglucosidasa (Solución de amiloglucosidasa de *Aspergillus niger*, producto Sigma®), posteriormente se incubó a 60  $^\circ\text{C}$  durante 2 h, una vez que se enfrió la mezcla se adicionó 2 mL de agua destilada y 2 mL del reactivo de glucosa-LS (No. 8001503, grupo MexLab), se dejó reposar por 30 min, se midió la absorbancia a 550 nm y se empleó estándar de glucosa 100 mg/mL.

El contenido de glucosa fue calculado con las siguientes ecuaciones:

$$\text{factor} = \frac{100}{\text{Abs (505 nm)}}$$

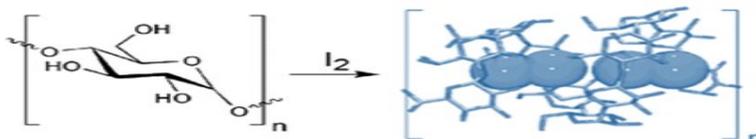
$$\text{Glucosa} \left( \frac{\text{mg}}{100\text{mL}} \right) = \text{factor} \times \text{Absorbancia de la muestra a 505 nm}$$

$$\% \text{ Almidón} = \text{glucosa} \times 2.4$$

El factor de 2.4 incluye el factor de dilución (6666.65) x el peso de la muestra (0.25 g) x el factor de conversión de porcentaje de glucosa a porcentaje de almidón (0.9).

### 1.2.7 Contenido de amilosa-amilopectina.

El contenido de amilosa y amilopectina, se realizó de acuerdo a la ISO-6647 (1987) (ISO-6647, 1987), que se fundamenta en que después de dispersar, gelatinizar y reaccionar con yodo los gránulos de almidón, se forma un complejo colorido azul intenso yodo-amilosa (Figura 9).



**Figura 9.** Reacción típica de la amilosa en presencia del yodo formando un complejo colorido azul.

Fuente: Pluth (2007) (Pluth & Raymond, 2007)

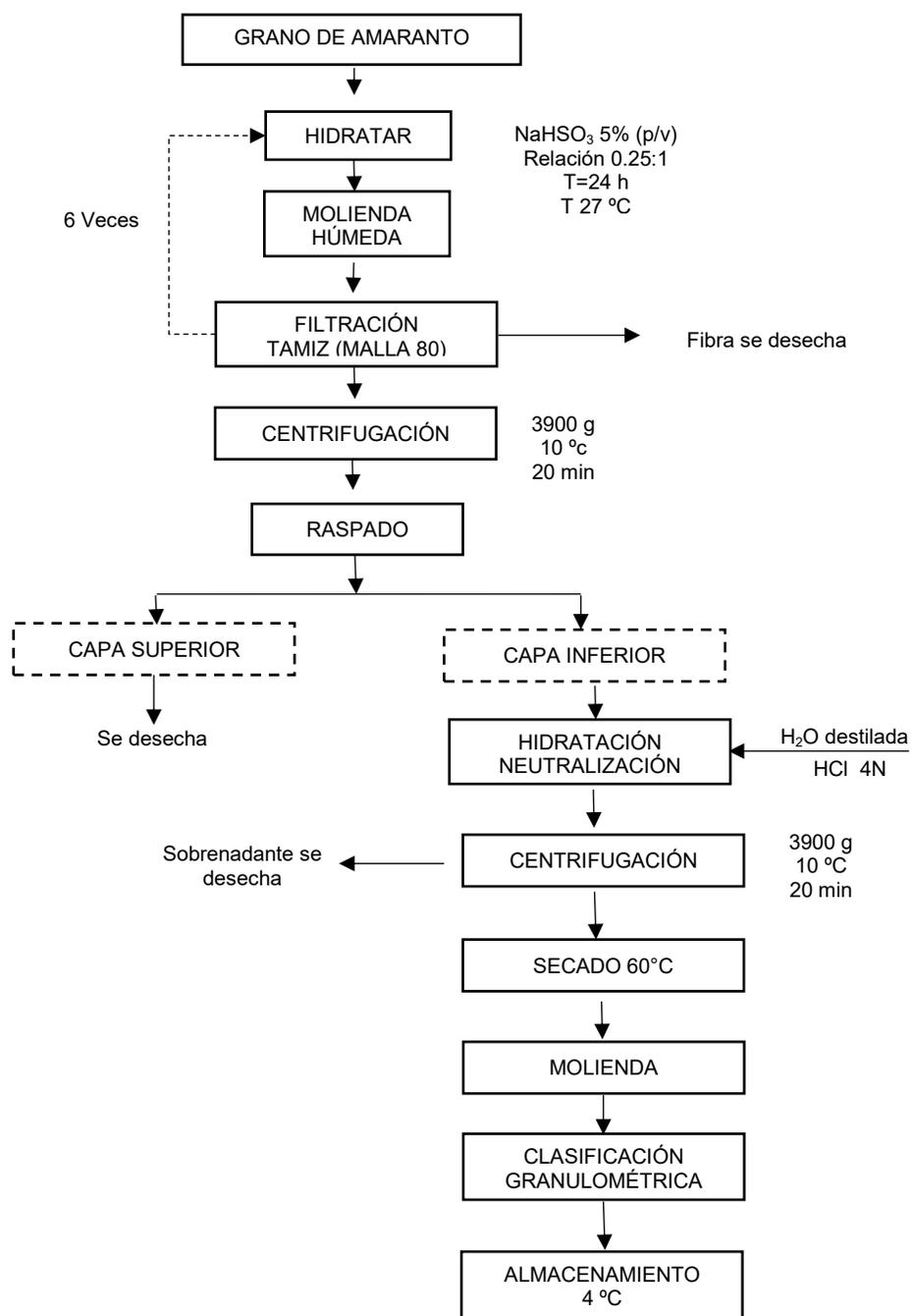


Figura 10. Método 1 para la extracción de AA con modificaciones de Hoover 2010 (Hoover et al., 2010).

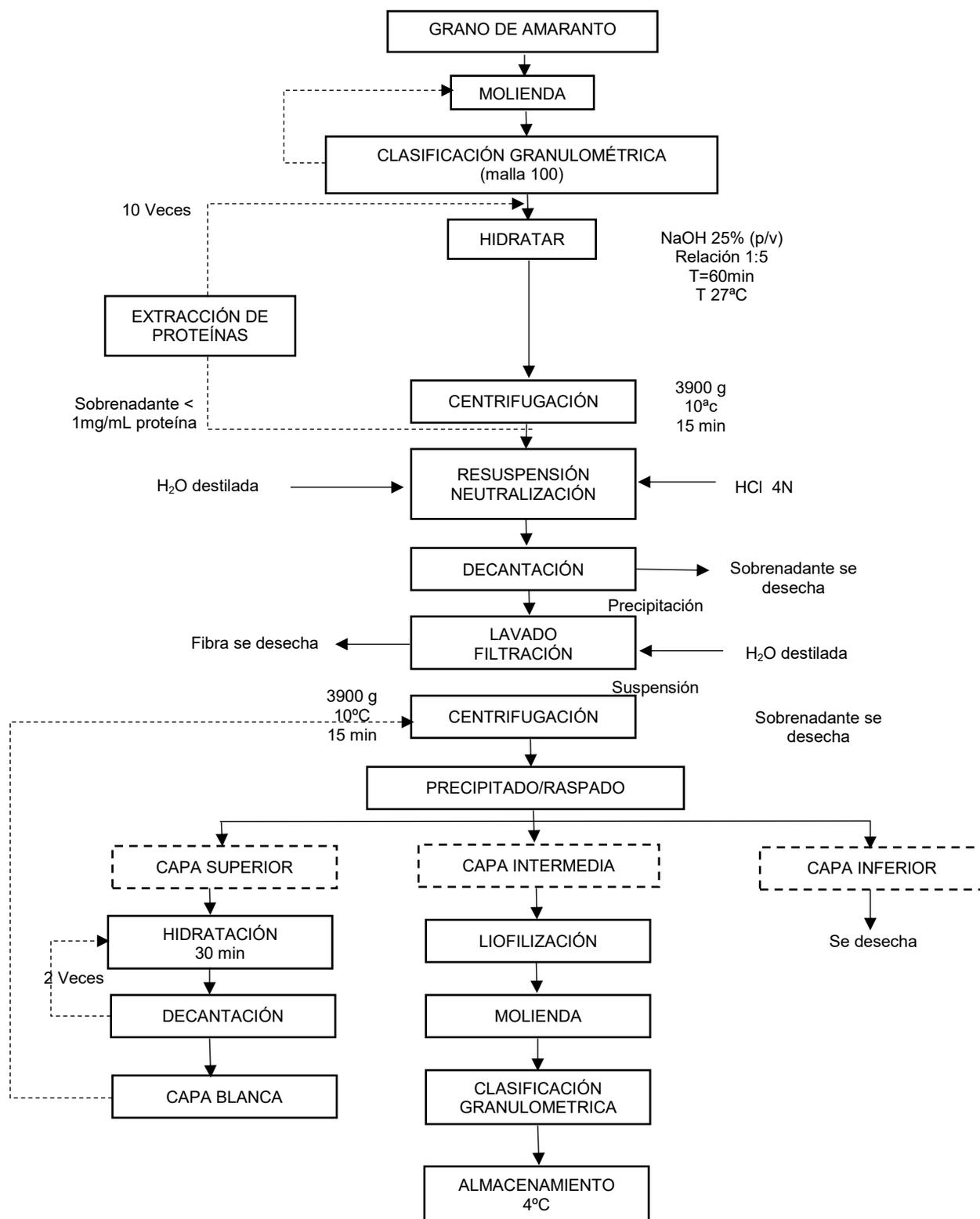


Figura 11. Método 2 para la extracción de AA con modificaciones de Villareal 2013 (Myriam E Villarreal et al., 2013).

Preparación de la muestra: en un matraz aforado de 100 mL, se colocó 2 g de almidón y se le adicionó 1 mL de etanol al 95 % y 9 mL de NaOH 1N, se tapó y dejó reposar a temperatura ambiente durante 24 h. transcurrido el tiempo se aforó con agua destilada.

La muestra para la curva patrón, se trató de la misma manera colocando 100 mg de amilosa y 100 mg de amilopectina. Posteriormente se colocó una alícuota en un segundo matraz aforado y se adicionó 50 mL de agua destilada, 1 mL de ácido acético 1N y 2 mL de solución de yodo al 2 % (p/v), se mezcló y se completó el volumen a 100 mL, se dejó reposar durante 20 min al resguardo de la luz y finalmente se midió su absorbancia a 620 nm.

La curva se preparó con las siguientes concentraciones en relación amilosa:amilopectina: NaOH 0.09N; 0:18:2; 2:16:2; 4:14:2; 5:13:2; 6:12:2; teniendo una concentración de 0%, 10%, 20%, 25% y 30% de amilosa (anexo III). El contenido de amilopectina se calculó por diferencia.

### **1.2.8 Evaluación de color.**

El color del almidón, se determinó de acuerdo con Beta (2001) (Beta, Corke, Rooney, & Taylor, 2001), usando un colorímetro Hunter Lab Color Flex EZ (Hunter Lab, Reston Virginia, EUA) con iluminante D65, 10° y apertura 1.25", se calibró el equipo acorde al fabricante y se tomó la lectura de muestra por triplicado, rotándola 90° entre cada lectura, finalmente se determinaron los siguientes parámetros L, a y b., equipado con software universal de la versión 3.1.

### **1.2.9 Tamaño de gránulo.**

Para determinar el tamaño de gránulo, se realizó según Lindeboom (2004) (Lindeboom, Chang, & Tyler, 2004), que se sabe implica un análisis de imágenes.

Lindeboom menciona que es requisito para este estudio que los gránulos de almidón no sufran daño durante el aislamiento además las muestras deben ser homogéneas. La microscopía electrónica de barrido (SEM), se utiliza con frecuencia debido a la corta longitud de onda del haz de electrones, que hace que sea posible determinar el tamaño de gránulo más precisa

que es el caso con el microscopio óptico. Proporciona una las características de la superficie de gránulos y su morfología más detallada.

Se tomó un gramo de muestra de almidón y se secó en estufa a 65 °C durante 36 h, posteriormente se mantuvo en un desecador. La muestra se colocó distribuida homogéneamente en una película adhesiva de carbón sobre una base, fue recubierta con una micro capa de Au, para su posterior análisis en un microscopio electrónico de barrido JEOL modelo JSM-5900LV; el tamaño de gránulo fue determinado como el promedio del tamaño de 21 gránulos en 3 regiones diferentes.

### 1.3 Resultados y Discusión.

En los dos métodos utilizados para la extracción de almidón (*Amaranthus hypochondriacus* L.), se observa que hay diferencias en el tiempo de extracción.

Para el método 1 se requieren 36 h mientras que para el método 2 solo 16 h, aproximadamente.

En la Tabla 4 se muestra los rendimientos y recuperaciones logradas en ambos procedimientos, los cuales están dentro del rango reportado por Paredes y Uriyapongson (50-70 g/100g, 30-63 g/100g y 45-46 g/100g respectivamente) para este grano (Paredes Lopez et al., 2006; Uriyapongson & Rayas-Duarte, 1994; Myriam E. Villarreal, Pablo D. Ribotta, & Laura B. Iturriaga, 2013). Malinsky et al. (2003); Myers y Fox (1994).

Estos resultados podrían deberse al hecho de que el grano se muele antes del tratamiento alcalino favoreciendo la liberación de proteínas en una etapa de remojo más corta.

**Tabla 4.** Rendimiento y recuperación de almidón de *Amaranthus hypochondriacus* L. por diferentes procedimientos

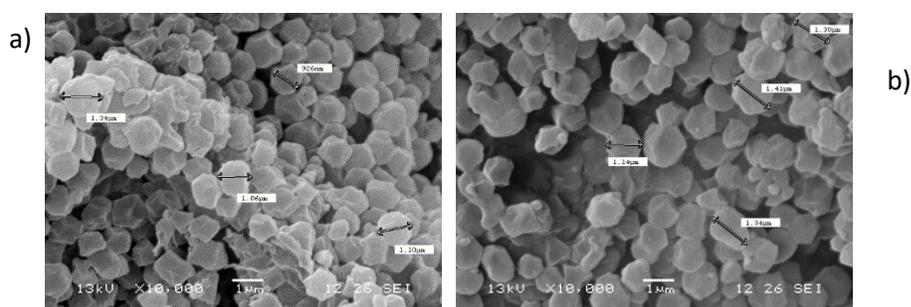
Método	% Rendimiento (g/100g)	% Recuperación (g/100g)
1	40.25±0.25 <sup>b</sup>	48.43±0.30 <sup>b</sup>
2	57.47±0.28 <sup>a</sup>	58.70±0.18 <sup>a</sup>

Letras diferentes indican diferencia significativa ( $p < 0.05$ ).

Al comparar las características que presentan algunas fuentes alternativas de almidón con las presentadas por el AA (Tabla 5), se observó que el contenido de humedad, proteínas, cenizas y almidón total está dentro del rango reportado para los almidones de maíz, plátano, cassava achira, mijo y amaranto (*Amaranthus cruentus*). Sin embargo, el contenido de proteína encontrado en el almidón extraído con el método 1 es aproximadamente 4 veces más alto que el encontrado en el método 2. Es importante definir un contenido de proteína similar al que se encuentra en el almidón de maíz que es el de referencia, para que no sea un factor de variabilidad en los procesos de fermentación, así mismo para los demás parámetros.

Este AA presentó mayor pureza que la reportada por Myers y Fox (1994) y Zhao y Whistler (1994), con respecto al contenido de proteínas, cenizas, almidón total y color. Esto probablemente puede suceder porque de las fracciones más grandes y más pesadas se separan, teniendo especial cuidado en las etapas de lavado y filtración, las centrifugaciones repetidas y etapas de desguace que en conjunto rebajan los contenidos de proteína almidón, ceniza y de fibras muy finas. Uriyapongson y Rayas Duarte (1994) informaron contenidos proteína similar a los de este trabajo en el almidón extraído por el método 2.

En cuanto al color, se observa que tanto la luminosidad ( $L^*$ ) y las coordenadas de cromaticidad ( $a^*$ ,  $b^*$ ) del almidón extraído por el método 1, son bastante cercanos a los del almidón de maíz como referencia (Tabla 5). Estos valores están asociados a la calidad final del producto, con una pureza aceptable. A su vez, las coordenadas de cromaticidad del almidón extraído por el método 1, mostraron una buena luminosidad a pesar de que se alejan de la referencia hacia el amarillo verdoso que podría estar asociado a su mayor contenido de ceniza.



**Figura 12.** Micrografías electrónicas de barrido x10 000 del gránulo de AA a) método de extracción 1 b) método de extracción 2.

Las micrografías electrónicas de barrido de los almidones extraídos por el método 1 y 2, se muestran en la Fig. 15. Los gránulos observados tuvieron una forma poligonal, con diámetros que varían de 0.926 a 1.41 micras. En la muestra 1 (Figura 12 a), no se observan cuerpos proteicos o espacios vacíos, esto sugiere que el método 1 es adecuado para mantener la estructura de los gránulos de almidón. Sin embargo, en la muestra 2 (Figura 12 b) se observa en la superficie sistemas apretadas y se ven estructuras dañadas que posiblemente se deba a un daño físico por la molienda en húmedo a la que se sometió. Tanto el tamaño y forma gránulos observados fueron concordantes con los reportados por la investigaciones anteriores en lo reportado en almidón de amaranto por (Choi, Kim, & Shin, 2004; Myriam E Villarreal et al., 2013). La presencia de agregados multigranulares podría ser debido a la manera en que los almidones se agregan de forma nativa.

Se confirmó que el tamaño de gránulo es extremadamente pequeño a las otras fuentes comparadas, como el maíz (12.9  $\mu\text{m}$ ) la cassava (15  $\mu\text{m}$ ), la achira (45-50  $\mu\text{m}$ ) y el mijo (5-10  $\mu\text{m}$ ) y es similar a lo reportado para *A. cruentus* (1.05  $\mu\text{m}$ ).

Los gránulos más pequeños, tiene la cualidad de tener mayor retención de agua y mayor poder de hinchamiento, y con altos contenidos de amilopectina se sabe que está relacionada con la disminución de la temperatura de gelatinización (Kong, Bao, & Corke, 2009). En los procesos de fermentación, el tamaño pequeño del gránulo de almidón, representa una ventaja, ya que se tiene mayor superficie de contacto para las enzimas y en consecuencia se encontrará más disponible. En general se sabe que la variación en los constituyentes (proteínas, cenizas etc.), influyen en las propiedades funcionales del almidón, y estas propiedades se deben tomar en cuenta para los propósitos específicos de procesamientos (Baker & Rayas-Duarte, 1998).

En cuanto al contenido de amilopectina es similar a lo reportado para el almidón de amaranto, pero hay una diferencia de hasta el 35% con respecto al almidón de Achira que es el que presenta un el menor contenido de amilopectina. Esta cantidad de amilopectina, contenida en el almidón de amaranto, lo clasifica como un almidón del tipo ceroso. Según lo reportado por Wilhem (2002) (Wilhelm, Aberle, Burchard, & Landers, 2002) el gránulo de almidón contiene promedio 1,700 moléculas de amilopectina.

**Tabla 5.** Caracterización de almidones obtenidos de diversas fuentes.

Análisis / Fuente	Maíz	Plátano	Cassava	Achira	Mijo	Amaranto <i>Amaranthus cruentus</i>	Amaranto <i>Amaranthus hypochondriacus</i> L.	Amaranto <i>Amaranthus hypochondriacus</i> L.
Humedad (%)	5.0	9.27	12.10	2.40	12.70	12.60	12.52±1.709	8.07±0.480
Proteína (%)*	0.00	0.97	0.09	0.60	0.55-0.77	0.1, 0.30	0.21±0.005	0.058±0.003
Cenizas (%)	0.001	0.03	0.90	5.30	0.1-0.12	1.2 – 0.50	3.28±0.025	0.100±0.002
Almidón total	99	94.8	92.90	98.78	70.3	87.20	83.1±0.205	97.43±1.540
Amilosa (%)	25.0	35.0	24.60	39.00	17-26	5.40	4.8±0.030	3.99±0.012
Amilopectina (%)**	75.0	65.0	75.40	61.00	74-83	94.60	95.20	96.01
Color								
L	96.25	90.9	87.46	Nd	78.58	96.64	91.43±0.46	96.21±0.28
a	0.57	0.6	1.52	Nd	0.53	0.16	0.68±0.014	0.067±0.003
b	3.05	3.9	12.52	Nd	12.53	1.95	8.53±0.37	1.26±0.06
Tamaño de gránulo (µg)	12.9	31.7	15.0	45-50	5-10	1.05	1.17±0.14 (Fig. 12a)	1.29±0.11 (Fig. 12b)
Referencia	Presente trabajo	(Pelissari, Andrade-Mahecha, Sobral, & Menegalli, 2012)	(Israkarn, Na Nakornpanom, & Hongsprabhas, 2014; Sriroth et al., 1999)	(Andrade-Mahecha, Tapia-Blácido, & Menegalli, 2012)	(Balasubramanian, Sharma, Kaur, & Bhardwaj, 2014; Choi et al., 2004)	(Kong, Corke, & Bertoft, 2009; Myriam E Villarreal et al., 2013)	Presente trabajo <b>Método 1</b>	Presente trabajo <b>Método 2</b>

\*Se utilizó un factor de 6.25, \*\*Calculado por diferencia.

#### **1.4 Conclusiones.**

Los resultados muestran que la molienda de los granos contribuye en gran medida a obtener mayores rendimientos y porcentaje de recuperación y de pureza, en comparación con los métodos de extracción convencionales. Se logró aislar el almidón de amaranto con un grado de pureza de 97% con un alto contenido de amilopectina (96%), para ser usado en las fermentaciones por *B. megaterium* para la síntesis de la CGTasa.

**CAPÍTULO II**  
CARACTERIZACIÓN DE LOS PARÁMETROS CINÉTICOS DE  
FERMENTACIÓN

---

## **2 CARACTERIZACIÓN DE LOS PARÁMETROS CINÉTICOS DE FERMENTACIÓN.**

### **2.1 Objetivo.**

Evaluar los parámetros cinéticos de una fermentación líquida sumergida para la obtención de la ciclodextrin glucosiltransferasa utilizando almidón del grano de amaranto.

### **2.2 Materiales y métodos.**

#### **2.2.1 Materiales.**

La cepa de *B. megaterium* fue proporcionada por el cepario de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, identificada con el código ATCC-10778. El almidón de amaranto se obtuvo previamente como se describió en la sección anterior. La  $\beta$ -ciclodextrina fue donada por la empresa Wacker Mexicana, S.A. de C.V. Todos los reactivos empleados fueron grado analítico.

#### **2.2.2 Propagación y obtención del inóculo.**

La propagación se realizó en caja Petrí y la preparación de inóculo en matraces Erlenmeyer de 500 mL, ambos ensayos bajo condiciones aerobias. Mediante estos ensayos se probaron dos fuentes de almidón (almidón de amaranto y almidón de maíz), utilizando las formulaciones y condiciones de operación referidas en la Tabla 6. Ambos medios fueron esterilizados a 121°C durante 20 minutos, previo a su utilización.

#### **2.2.3 Producción de la enzima cruda.**

La biosíntesis de CGTasa se llevó a cabo en un fermentador de 1000 mL diseñado y construido en el laboratorio de trabajo de la Universidad Autónoma Metropolitana UAM Unidad Iztapalapa (Anexo VI).

Se utilizó el medio de cultivo reportado por Usharani (2014) (Usharani, Prasad, Sundar, Dhananjaya, & Mallesha, 2014b) con 250 mL de medio que contenía (g/L): almidón 12.0,

extracto de levadura 2.5, peptona de carne 2.5, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2.0, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.0, MgSO<sub>4</sub> 0.2, licor de maíz 0.5 % (v/v).

**Tabla 6.** Formulación de medio y condiciones de operación empleados para la propagación y obtención de inóculo de una cepa de *B. megaterium*.

Etapa	Formulación (g/L)		Condiciones de operación
Propagación	*Almidón	10.0	pH final de 7.5 T = 37°C t = 24 h
	Peptona	12.0	
	Agar	20.0	
Obtención de Inóculo	*Almidón	12.0	Volumen útil 50 mL pH final de 7.5 T = 37°C t = 24 h 200 rpm
	Peptona	5.0	
	Dextrosa	10.0	

\*Se utilizó almidón de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus* L.) y almidón de maíz.

El pH se ajustó a 7.5, se utilizó un volumen de 2% de inóculo preparado y se incubó a 37 °C con agitación de 200 rpm durante 96 h tomando 3mL de muestra cada 12 h (Determinación de los parámetros cinéticos). La biomasa se separó por centrifugación a 3500 g, durante 15 minutos a 4 °C, el sobrenadante libre de células fue usado como fuente de la enzima cruda y se le midieron el pH, contenido de proteína (Kruger, 2009), azúcares totales (Miller, 1959) y la biomasa por peso seco.

#### 2.2.4 Determinación de los parámetros cinéticos de fermentación.

En la literatura modelos no segregados y no estructurados, como la ecuación logística, modelos de crecimiento lineal y exponencial son ampliamente utilizados para describir la relación entre biomasa, su tasa de crecimiento y actividad enzimática (Mitchell, Stuart, & Tanner, 1999; Singhania, Sukumaran, Patel, Larroche, & Pandey, 2010; Smits, 1998). Para determinar los parámetros de crecimiento de *Bacillus megaterium* se considera la evolución de la biomasa  $X=X(t)$  por la ecuación logística.

$$\frac{dx}{dt} = \mu \left( 1 - \frac{X}{X_{m\acute{a}x}} \right) X$$

El modelo fue utilizado para estimar la velocidad específica de crecimiento ( $\mu_{esp}$ ) así como los parámetros cinéticos de la fermentación debido a que no se consideran explícitamente limitaciones por sustrato o problemas difusionales.

Al resolver la ecuación logística se tiene:

$$X_{cal} = \frac{K}{\left(1 + \frac{(K - X_0)}{X_0}\right) \times e^{-\mu t}}$$

Esta ecuación fue parametrizada con los datos experimentales a través del método de Newton ("Solver", Exel Microsoft) (Diaz-Godinez, Soriano-Santos, Augur, & Viniegra-Gonzalez, 2001).

Dónde:

$\mu$  es la tasa específica de crecimiento máxima ( $h^{-1}$ ).

$X_0$  es la concentración inicial de biomasa (mg/L).

$K$  es la constante de afinidad (mg/L)

$t$  es el tiempo (h).

Los parámetros cinéticos calculados fueron: el rendimiento de la CGTasa por unidad de sustrato ( $Y_{E/S} = E_{m\acute{a}x} / S$ ), productividad de la CGTasa ( $E_{m\acute{a}x}/t$ ), tasa de consumo específico ( $qC = (\mu)(Y_{E/S})$ ).

### 2.2.5 Actividad de ciclación de la CGTasa.

La ciclación es una actividad exclusiva de la CGTasa, ésta fue determinada usando el método de fenolftaleína con ligeras modificaciones a los métodos propuestos por Costa (2015), Gatón (2009) y Mahat (2009) (; Gastón et al., 2009; Mahat et al., 2004).

El método se fundamenta en la formación de un cromóforo (color rosa) de la fenolftaleína en medio básico que tiene su máxima absorbancia a 550 nm, el cual al estar en presencia de  $\beta$ -

CD es capaz de formar un complejo de inclusión, que dará como resultado una decoloración proporcional a la concentración de la  $\beta$ -CD (Figura 13).

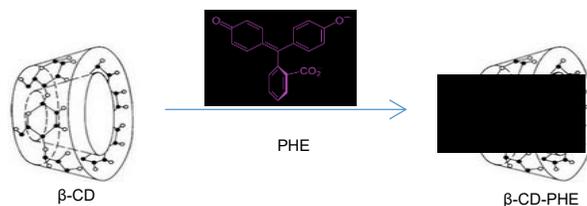


Figura 13 Formación de complejo de inclusión entre la beta ciclodextrina y la fenilalanina

La cinética de reacción se llevó a cabo con la CGTasa previamente liofilizada en 0.5 mL de una solución al 1% (w/v) de AA en 50mM de tampón Tris-HCl, pH 8,0 y se incubó a 40 °C. El muestreo de la cinética se realizó a los 10, 20 y 30 min, deteniendo la reacción mediante un choque térmico. La cantidad de CDs se determinó por la disminución de la absorción a 550 nm, después de la adición de 1,2 mL de fenolftaleína 3 mM preparado en 500 mM de carbonato de tampón de sodio, pH 10,0 a 0,5. mL de producto de reacción, utilizando una curva de calibración en un rango de 80 a 800  $\mu$ mol de  $\beta$ -CD comercial (anexo IV). Una unidad enzimática de CGTasa (U) se definió como la cantidad de enzima que produce 1  $\mu$ mol de  $\beta$ -CD por minuto, bajo las condiciones de ensayo. La actividad específica se expresó U por miligramo de proteína.

### 2.3 Resultados.

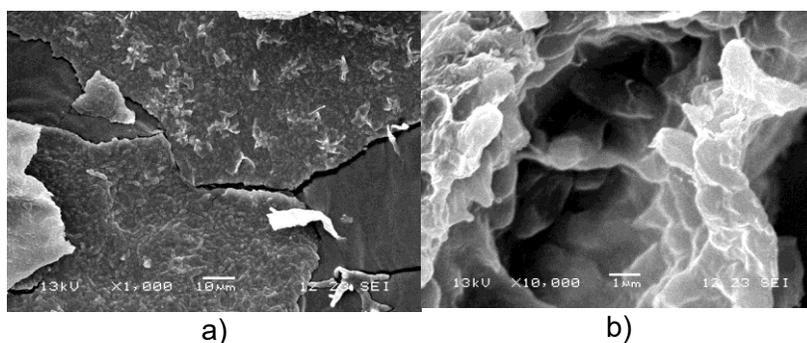
Los procesos de fermentación para la producción de CGTasa, que emplean como sustrato almidones nativos, tienen la desventaja de tener rendimientos bajos, debido a la falta de disponibilidad de sustrato por su baja solubilidad (Acosta, Villada, Torres, & Ramírez, 2006), además de que se dificulta su caracterización. Las características físicas del almidón de amaranto nativo, se pueden aprovechar eficientemente en los cultivos de fermentación para la síntesis de CGTasa.

### 2.3.1 Propagación y obtención de inóculo de *Bacillus megaterium*.

En los cultivos en cajas Petri, empleando almidón de amaranto como fuente de carbono para la propagación de una cepa de *Bacillus megaterium*, se observó que la densidad óptica, a una  $\lambda=600\text{nm}$ , se duplicó ( $0.964 \pm 0.0150$ ) en comparación con el cultivo de referencia ( $0.5540 \pm 0.032$ ) que emplea almidón de maíz, bajo las mismas condiciones de incubación.

En los cultivos de inóculo también se vieron desfavorecidos cuando se usó almidón de maíz ( $1\text{mL}=4.7 \times 10^2$  UFC), en comparación con el almidón de amaranto ( $1\text{mL}=8 \times 10^4$  UFC). Estos resultados se apoyan en la figura 18 a, donde se observa una micrografía de *B. megaterium* consumiendo al almidón de amaranto, obtenida a partir de una alícuota del inóculo. Cuando el gránulo de almidón es degradado y consumido, se observan cavidades donde se encontraba el gránulo de almidón de amaranto (Fig. 18 b).

Es importante destacar que para *B. megaterium*, el proceso de adaptación es fundamental, ya que se prefiere que se adapte al nuevo sustrato y se genere una alta concentración de biomasa, para reducir tiempos en las fermentaciones. La adaptación depende principalmente de tener los nutrientes suficientes y disponibles, para el caso de la fuente de carbono, depende básicamente de su estructura y la facilidad con la que lo pueda consumir (Cho, Hwang, Kim, Song, & Yun, 2002)



**Figura 14.** Micrografías electrónicas de barrido: a) Irrupción de *B. megaterium* sobre láminas de AA, b) Cavidad del gránulo de AA después de la degradación y digestión.

Hasta el momento no se ha reportado estudios sobre el uso de almidón de amaranto como sustrato en el proceso de propagación y obtención de inóculo, por lo que sería una nueva

---

propuesta para comprobar su eficiencia como sustrato para otros microorganismos en dichas etapas. Sin embargo, algunos autores han observado que un factor importante que favorece la producción y actividad de la CGTasa es la biodisponibilidad del almidón (Y.-D. Lee & Kim, 1991; Martínez & Gómez, 2007).

### **2.3.2 Obtención de los parámetros cinéticos de la fermentación por *B. megaterium* para la producción de CGTasa.**

#### **2.3.2.1 Crecimiento de biomasa.**

Después de 72 h de fermentación, el contenido de AS y CS eran prácticamente insignificante ( $p < 0,05$ ). El tiempo de producción de CGTasa está relacionada con el crecimiento de *Bacillus megaterium* el cual se puede apreciar en la figura 15 a, presentó un crecimiento de tipo exponencial independientemente del sustrato empleado. Por otro lado las velocidades específicas de crecimiento ( $\mu$ ) presentaron diferencias estadísticas importantes, siendo mayor cuando se emplea AA ( $\mu = 0.094 \pm 0.001 \text{ h}^{-1}$ ) con respecto a AM (Tabla 7). Respecto al consumo de almidón se observa un agotamiento a partir de las 60 horas de fermentación, con lo que se determina que el AA se consume de manera similar al AM por *B. megaterium*.

#### **2.3.2.2 Producción de enzima.**

Los valores de pH fueron muy similares entre las dos fermentaciones. El pH inicial fue de 7.5 en ambos casos y con el tiempo se incrementó hasta 8.5 dentro de las primeras 24 h. Se observó que el pH se mantuvo estable hasta 48 h de fermentación y finalmente alcanzó un pH de 9.0 al final (Figura 15 b).

#### **2.3.2.3 Actividad de ciclación.**

La enzima sintetizada durante la fermentación utilizó AA y AM como fuente de carbono, la cual se expresó a principios de la fase exponencial. La actividad específica máxima de la CGTasa fue obtenida después de 36 h de incubación, la cual está relacionada directamente con el crecimiento espontáneo de la biomasa celular. A partir de las 36 h, la actividad de la CGTasa disminuyó gradualmente a lo largo de la fermentación. La forma de la curva de las proteínas

---

extracelulares fue idéntica a la de actividad específica CGTasa. La actividad obtenida durante la fermentación en la fase exponencial, cuando se utilizó AA fue aproximadamente 25% mayor que la observada cuando se utilizó CS (Figura 16 b). La actividad máxima específica de CGTasa obtenido con AA como fuente de carbono fue mayor ( $105.72 \pm 8,33$  U / mg de proteína) que el reportado con CS ( $81.75 \pm 3,2$  U / mg de proteína).

#### **2.3.2.4 Evaluación de la actividad de ciclación en AA y AM.**

A partir de las dos fermentaciones se obtuvo la CGTasa E1 a partir del medio con AM y la CGTasa E2 a partir del medio con AA. Tanto la E1 como la E2 presentaron actividad de ciclación, sin embargo esta actividad cambia de acuerdo al sustrato en que se evaluó (Figura 16 a), donde la máxima actividad de ciclación de CGTasa se observó al emplear AA como sustrato de E1 y E2.

La E2 alcanza la máxima actividad de ciclación a las 48h de incubación ( $64635 \pm 452$  U/L;  $338.6 \pm 12.4 \mu\text{mol } \beta\text{-CD/mL}$ ) presentando un 40% más actividad que la E1, la cual la alcanza a las 60h ( $39061 \pm 236$  U/L;  $203.15 \pm 10.9 \mu\text{mol } \beta\text{-CD/mL}$ ).

La menor actividad de ciclación se presentó al emplear AM teniendo un máximo de actividad para la E1 y E2 a las 72h y 36h ( $18849 \pm 134$  U/L;  $98.74 \pm 4.7 \mu\text{mol } \beta\text{-CD/mL}$ ;  $14278 \pm 101$  U/L;  $74.79 \pm 5.2 \mu\text{mol } \beta\text{-CD/mL}$ ) respectivamente.

La actividad específica máxima se presenta en el mismo tiempo (48h) (Figura 16 b), empleando AA como sustrato en ambos casos.

Estos resultados muestran que tanto la E1 como la E2 tienen mayor actividad sobre el sustrato AA, esto se puede atribuir principalmente a que este gránulo de almidón contiene mayor grupos no reductores debido al alto contenido de amilopectina, por lo que la enzima tiene mayor facilidad para reconocer el sitio en donde empezará a ciclar las unidades de almidón para la formación de CD's.

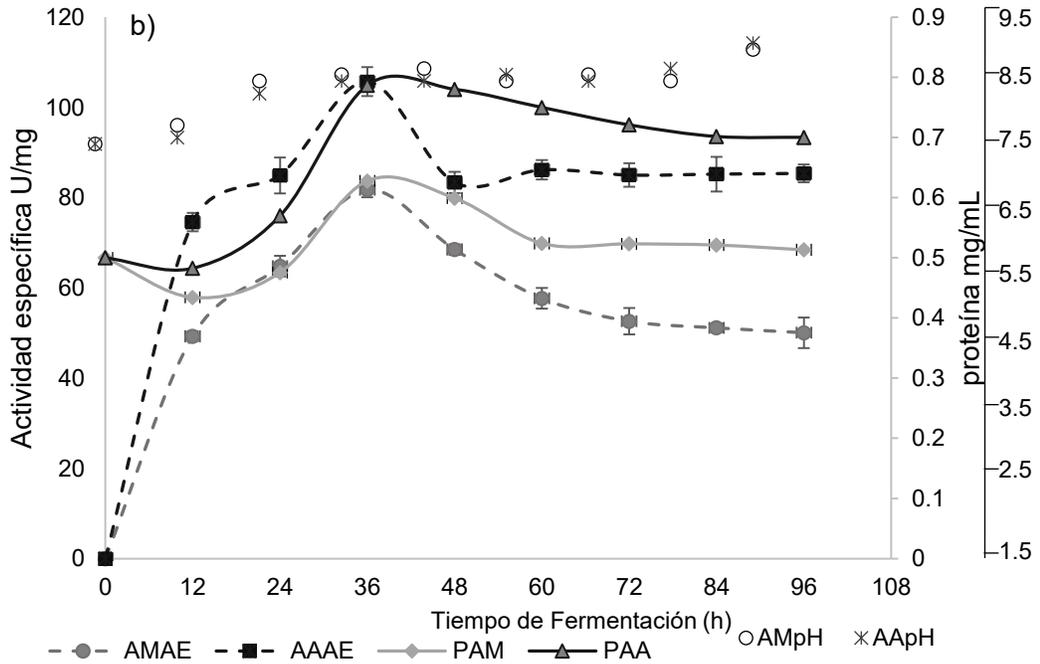
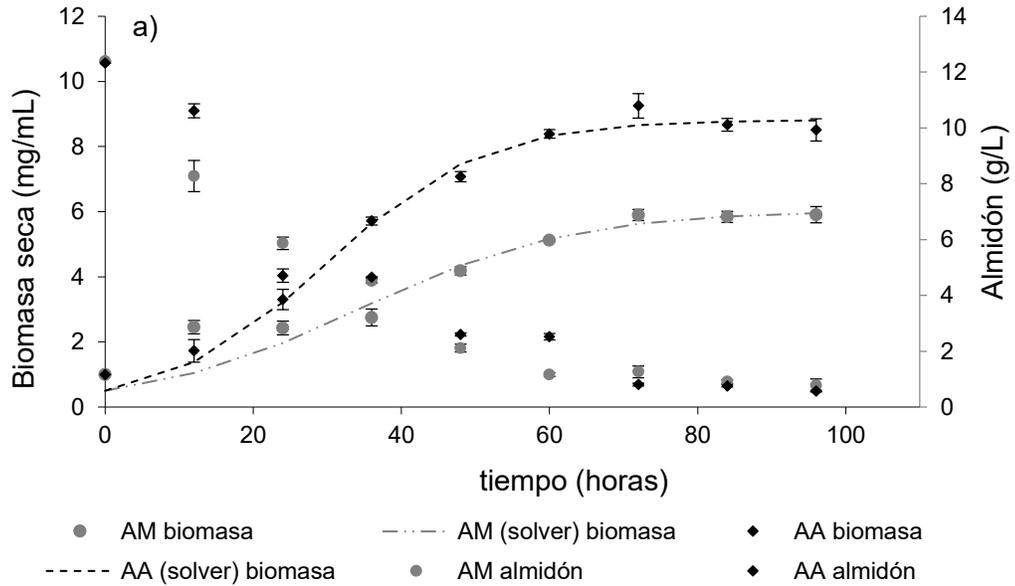


Figura 15. Caracterización de fermentación por *Bacillus megaterium* durante 96 horas. a) Crecimiento microbiano y consumo de sustrato y b) Producción de proteína y evaluación de pH.

---

Cuando se empleó almidón de amaranto, se observó una mayor biodisponibilidad para *B. megaterium*, ya que se presentó una velocidad específica ( $0.094 \pm 2.3 \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$ ) 20% mayor y un tiempo de duplicación 7.4 h, 25% menor y una productividad de biomasa generada ( $0.128 \pm 3.4 \times 10^{-2}$ ) la cual es 37% mayor con respecto al de referencia.

Los rendimientos de biomasa por unidad de almidón ( $11.47 \text{ gX g}^{-1}\text{S}$ ), de CGTasa por unidad de biomasa así como de CGTasa por unidad de almidón fueron significativamente mejores cuando se usó en la fermentación AA que AM (Tabla 7).

Un parámetro importante evaluado fue la productividad de la CGTasa, obteniendo como resultado un 80% más de productividad en la fermentación con AA sobre la fermentación con AM, lo cual indica que el AA es un sustrato que estimula en mayor medida la producción de CGTasa, esto puede atribuirse a que la temperatura de licuefacción es menor en este almidón comparado con la que se da en el de maíz (Martínez & Gómez, 2007).

Por otro lado se reconoce que las CGTasa se producirá con mayor esfuerzo cuando se tenga en el medio la necesidad de ciclar al sustrato, y dado que la presencia de gránulos de almidón es mayor en AA que en AM sobre todo por su tamaño, se genera el ambiente propicio para activar la producción de CGTasa.

### **2.3.2.5 Evaluación de los rendimientos.**

La tabla 7 muestra que los rendimientos de biomas-sustrato; enzima biomasa fue mayor cuando e utilizo AA ( $YX / S = 11,47 \text{ g X / GS}$ ,  $YE / X = 5985 \text{ U / GX}$ , respectivamente) que los reportados cuando se utilizó el AM bajo las mismas condiciones de fermentación. La actividad CGTasa fue dos veces mayor ( $YE / S = 3290 \text{ U / g S}$ ) que el obtenido por g de AM ( $YE / S = 1509 \text{ U / g S}$ ). Esto demuestra que el AA es una buena fuente de carbono alternativa para obtener un mayor rendimiento de CGTasa.

**Tabla 7.** Parámetros cinéticos de la fermentación de *Bacillus megaterium* para la producción de CGTasa.

Sustrato de Fermentación	$\mu$ ( $h^{-1}$ )	$t_d$ (h)	$P_x$ ( $gBL^{-1}h^{-1}$ )	$Y_{X/S}$ ( $gBg^{-1}S$ )	$P_E$ ( $UL^{-1}h^{-1}$ )	$Y_{E/X}$ ( $U g^{-1}B$ )	$Y_{E/S}$ ( $U g^{-1}S$ )
AA <sub>SF</sub>	$0.094 \pm 2.3 \times 10^{-3}^a$	7.4	$0.128 \pm 3.4 \times 10^{-2a}$	11.47 <sup>a</sup>	1346 <sup>a</sup>	5985 <sup>a</sup>	3290 <sup>a</sup>
AM <sub>SF</sub>	$0.075 \pm 4.4 \times 10^{-3}^b$	9.9	$0.081 \pm 8.8 \times 10^{-3b}$	4.66 <sup>b</sup>	261 <sup>b</sup>	4883 <sup>b</sup>	1509 <sup>b</sup>

$\mu$ = velocidad específica de crecimiento

$t_d$ = tiempo de duplicación

$P_x$ =Productividad de biomasa

$Y_{X/S}$ =Rendimiento de biomasa por unidad de almidón

$P_E$  = Productividad de actividad de ciclación de CGTasa

$Y_{E/X}$ =Rendimiento de CGTasa por unidad de biomasa

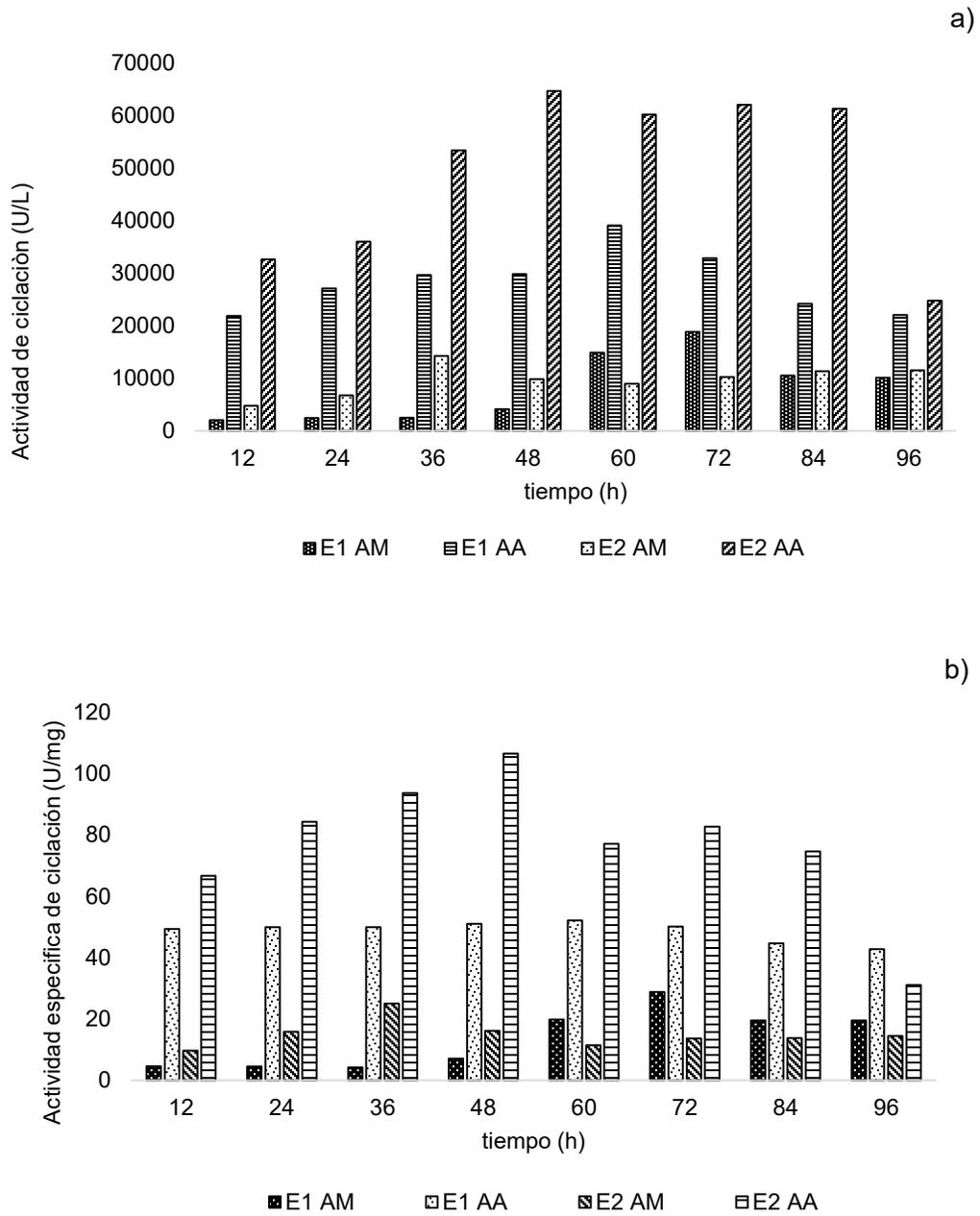
$Y_{E/S}$ =Rendimiento de CGTasa por unidad de almidón

Nota: El tiempo de fermentación fue tomado a  $E_{máx}$

Letras diferentes indican diferencia significativa ( $p < 0.05$ ).

## 2.4 Conclusiones.

Debido a las propiedades físicas, de tamaño y contenido de amilopectina del almidón de amaranto se observó que en primer lugar incrementa al doble la velocidad de crecimiento en la etapa de propagación con respecto a la velocidad que se obtiene al utilizar almidón de maíz. Esto se confirma en la fermentación, donde se observó que el tiempo de duplicación disminuyó en un 25% y la productividad de enzima con respecto al sustrato aumenta en aproximadamente el doble. Con estos resultados se puede confirmar que la ciclodextrin glucosil transferasa, a nivel catalítico, incrementa su actividad en los grupos no reductores que contiene la amilopectina (B. A. Van der Veen et al., 2000), que para el caso de el almidón de amaranto que contiene 21% más amilopectina que el almidón de maíz. Con esta diferencia se tiene el doble del efecto en su actividad, que se ve reflejada directamente sobre el incremento sobre la biomasa de *B. megaterium* en una fermentación líquida sumergida.



**Figura 16.** Caracterización de fermentación por *Bacillus megaterium* a) Actividad de ciclación de  $\beta$ -CD y b) Actividad específica de ciclación de  $\beta$ -CD. E1: Enzima CGTasa obtenida en fermentación con AM, E2: Enzima CGTasa obtenida por fermentación con AA, AM: Almidón de maíz y AA: Almidón de amaranto.

**CAPÍTULO III**  
CARACTERIZACIÓN PARCIAL DE CGT<sub>asa</sub>

---

### **3 CARACTERIZACIÓN PARCIAL DE LA CICLODEXTRIN GLUCOSIL TRANSFERASA.**

#### **3.1 Objetivo.**

Caracterizar parcialmente la ciclodextrin glucosiltransferasa obtenida en la fermentación líquida sumergida con *Bacillus megaterium*.

#### **3.2 Materiales y métodos.**

##### **3.2.1 Purificación parcial de la CGTasa.**

El aislamiento de la CGTasa se realizó adaptando los métodos propuestos por Moriwaki (2009) y Wei-hong (2009) (Moriwaki, Ferreira, Rodella, & Matioli, 2009; Wei-hong, Yin, & Li, 2009). A partir de una fermentación descrita en el apartado 7.4.2, por un tiempo de 40h, la biomasa fue separada por centrifugación a 3,500 g a 20 °C durante 15 min. El precipitado fue desechado y el sobrenadante, donde se encuentra la enzima cruda, se recolectó. Se realizó una precipitación fraccionada de la CGTasa presente en el sobrenadante, utilizando diferentes concentraciones de sulfato de amonio (50, 75 y 80%), la enzima se recolectó por centrifugación a 10,000 rpm, a 4 °C durante 20 minutos en cada una de las etapas de saturación.

La enzima precipitada se resuspendió con 10 mL de buffer Tris-HCl 5 mM, pH 8 y se pasó por una membrana de diálisis con tamaño de corte de 6-8000 (Spectra/Por®Dialysis) durante 16 h, se cambió el medio cada 2 h. La CGTasa dializada se sometió a cromatografía en una serie de columnas de Sephadex G-200 y G-50, empelando el mismo buffer Tris-HCl. Finalmente para su conservación se liofilizó y se almacenó a -4°C.

##### **3.2.2 Caracterización parcial de la CGTasa parcialmente purificada.**

###### **3.2.2.1 Determinación del peso molecular aparente.**

El peso molecular aparente de CGTasa se estimó por electroforesis SDS-PAGE de acuerdo al método de Laemmli (1970) (Laemmli, 1970), la composición de los geles se describe en la tabla 8.

La muestra se resuspendió previamente en buffer de fosfatos pH 6 y posteriormente se diluyó 1:1 en búfer de muestra (Tabla 9) y se inyectó 10  $\mu$ L de muestras en el gel. La corrida se llevó a cabo con una corriente constante de 120 V, durante 45 minutos. El perfil electroforético de las muestras fue comparado con un estándar de pesos moleculares altos (Bio Rad) 60-250 Kda. Aprotinina 6.5 Kda, lisosima 14.4 Kda, inhibidor de tripsina 21.5 Kda, anhidrasa carbónica 31 Kda, ovoalbúmina 45 Kda, albumina sérica 66.2 Kda, fosforilasa b 97.4 Kda,  $\beta$ -galactosidasa 116.25 Kda y miosina 200 Kda.Da.

**Tabla 8.** Composición de los geles de electroforesis SDS-PAGE.

Reactivo	Gel concentrador (4%)	Gel de separación (12%)
Agua desionizada	4.1 mL	3.35 mL
0.5 Mtris-HCl, pH 6.8	2.5 mL	-
1.5 Mtris-HCl, pH 8.8	-	2.5 mL
SDS 10%	100 $\mu$ L	100 $\mu$ L
Acilamida-Bis (30%T 2.67%C)*	3.3 mL	4 mL
Persulfato de amonio 10% (p/v)**	100 $\mu$ L	50 $\mu$ L
TEMED	40 $\mu$ L	50 $\mu$ L

\*\*Se debe desgasificar durante 20 min \*Preparación el mismo día.

**Tabla 9.** Composición del buffer de muestra para electroforesis SDS-PAGE.

Reactivo	Volumen (mL)
Agua deionizada	4
0.5M Tris-HCl, pH 6.8	1
Glicerol	0.8
SDS 10%	1.6
2- $\beta$ -mercaptoetanol	0.4
Azul de bromofenol 0.05% (p/v)	0.2

### 3.2.2.2 pH y Temperatura óptima.

Tanto el pH y la temperatura óptima se obtuvieron por el método propuesto por (Mora et al., 2012) con ligeras modificaciones. El pH óptimo fue determinado utilizando un rango de pH de 3.0, 5.0, 7.0, 8.0, 9.0 y 10.0 (buffers de citatos 0.2M, acetatos 0.1M, fosfatos 0.1M, tris-HCl 0.05M, borato-cloruro 0.1M). Se midió la actividad de la enzima purificada de CGTasa a 40 °C. Para la determinación de la temperatura óptima, la enzima purificada fue analizada en un rango de temperaturas de 35 a 70 °C en buffer de Tris-HCl. pH 8, en ambos ensayos se probó AA, AM y almidón de papa (AP) como sustrato. En todos los experimentos, se consideró como 100% la máxima actividad de la CGTasa encontrada en los primeros ensayos.

### 3.2.2.3 Determinación de los parámetros cinéticos de la CGTasa.

Para la medición de los parámetros cinéticos se realizó la metodología propuesta por Blanco (2012) (K. Blanco et al., 2012), se tomó 0.5 ml de la enzima parcialmente purificada y se adicionó a 5 ml de solución de almidón (10, 20, 30, 40, 50, 75 Y 100 mg/mL) en tampón Tris-HCl 50mM, pH 8,0 a 50 °C durante 30 min en la misma solución tampón. Las constantes Km y Vmax fueron determinadas a partir del gráfico de Lineweaver-Burk obtenido del modelo de Michaelis-Menten:

$$\frac{1}{V} = \frac{1}{V_{m\acute{a}x}} + \frac{K_m}{V_{m\acute{a}x}} \left(\frac{1}{S}\right)$$

Dónde:

V es la velocidad de producción inicial (mgmL<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup>).

V<sub>máx</sub> es la velocidad máxima.

K<sub>m</sub> es la constante de Michaelis-Menten (mgmL<sup>-1</sup>).

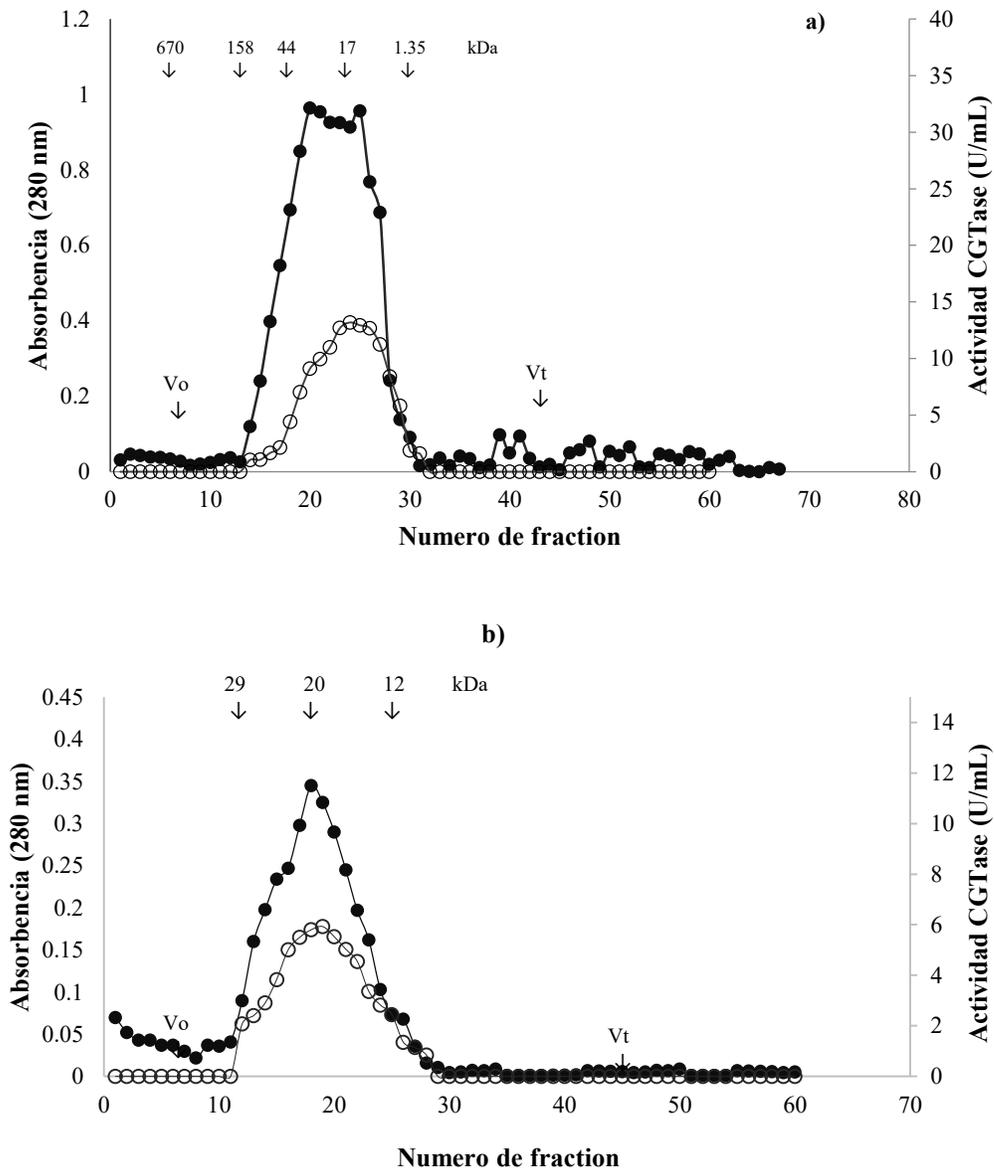
s es la concentración de sustrato (mgmL<sup>-1</sup>).

## 3.3 Resultados

### 3.3.1 Purificación parcial de la CGTasa.

De una fermentación sumergida por *B. megaterium* durante 48h, empleando AA, se obtuvo la enzima cruda de CGTasa, la cual se purificó mediante tres etapas consecutivas, que incluyen: precipitación con sulfato de amonio seguido de una diálisis, se realizó una cromatografía de filtración en gel (columna Sephadex G-200) seguido de otra cromatografía de filtración en gel (columna Sephadex G-50). La fracción precipitada con sulfato de amonio, mostró una actividad enzimática total de 29.7±1.5 U mL<sup>-1</sup>, que representa el 2.33% del rendimiento, con un contenido de proteína total de 0.13±0.010 mg mL<sup>-1</sup> (Tabla 10). Seis fracciones (20-25) eluidas de la columna de Sephadex G-200 (Fig. 17 a), poseían las actividades recuperadas más altas, se agruparon dando como resultado una actividad de CGTasa total de 13.18± 0.94 U mL<sup>-1</sup> y la actividad específica de 659 U mg<sup>-1</sup> (tabla 10), la enzima que se recolectó, se eluyó en la columna de Sephadex G-50 (recogido de la fracción 12 a 28) dio como resultado una purificación de 40.32 veces con un rendimiento de 10.25% (Fig. 17 b).

El proceso global de purificación dio como resultado un aumento en la actividad específica de un promedio de 97.88 U por cada mg de proteína en el sobrenadante (enzima cruda) a 3946 U por cada mg de proteína de las fracciones recolectadas en la cromatografía en columna de Sephadex G-50. Se observó que después de 3 meses de almacenada a  $-4^{\circ}\text{C}$ , la CGTasa purificada mantenía su actividad enzimática y específica.



**Figura 17.** Cromatografías de afinidad en a) Sephadex G-200 y b) Sephadex G-50, de una CGTasa procedente de *Bacillus megaterium*.

**Tabla 10.** Purificación de CGTasa producida por *B. megaterium*.

Etapa de purificación	Actividad enzimática (U mL <sup>-1</sup> )	Proteína (mg mL <sup>-1</sup> )	Actividad específica (Umg <sup>-1</sup> )	Rendimiento (%)	Purificación
Sobrenadante	57.75±3.3	0.59±0.010	97.88	100	1.00
Precipitación (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 85% /Dializado	29.7±1.5	0.13±0.010	228.46	51.43	2.33
Columna Sephadex G-200	13.18±0.94	0.02±0.008	659.00	22.82	6.73
Columna Sephadex G-50	5.92±0.41	0.0015±0.0001	3946.00	10.25	40.32

Los resultados fueron comparables a los reportados por Kitahata (1974)(Kitahata, Tsuyama, & Okada, 1974), donde obtuvo hasta un 50% de rendimiento de una CGTasa obtenida de *Bacillus sp.* (5 etapas de purificación), con aproximadamente la mitad de actividad específica encontrada en la CGTasa del presente estudio, sin embargo en una purificación de 3 etapas Suntainana (1997)(Suntainalert, Petmaneechote, Damnian, & Hutadilok-Towatana, 1997) obtuvo hasta un 58% de rendimiento con 25 (U/mg) de actividad en la misma cepa, mientras que Ibrahim (2011)(Ibrahim, El-Tayeb, Elbadawi, & Al-Salamah, 2011) estudiando la purificación en 3 etapas de una CGTasa obtenida de *B. agaradhaerens*, encontró un rendimiento de 26% con una actividad específica diez veces comparada con la CGTasa de *B. megaterium*.

### 3.3.2 Caracterización parcial de la CGTasa.

#### 3.3.2.1 Determinación del peso molecular aparente.

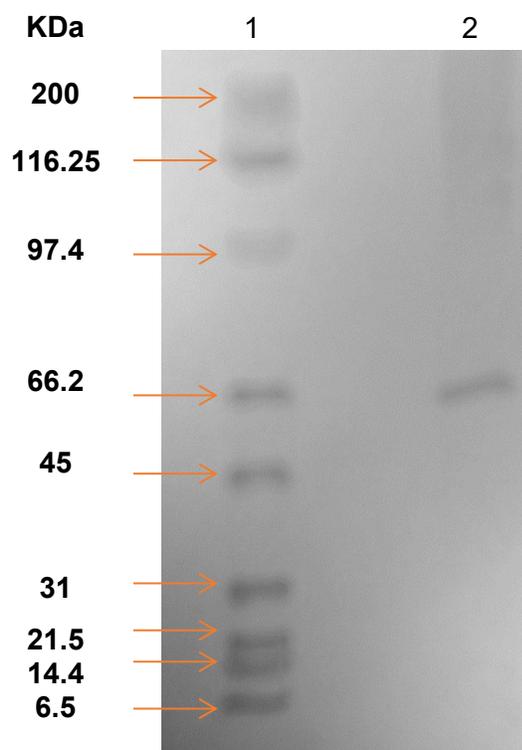
La enzima parcialmente purificada dio una sola banda de proteína por SDS-PAGE, se estimó un peso molecular aparente de 66 Kda (Figura 18), este valor es muy cercano a lo establecido de 68.2 Kda por Pishtyski (2008)(Pishtiyski et al., 2008) a partir de *B. megaterium*, sin embargo otros autores han reportado diversos pesos moleculares según el tipo de microorganismo que la produce, 69, 75, y 76Kda por *Bacillus sp.* (Ibrahim et al., 2011; Liggett & Koffler, 1948; Suntainalert et al., 1997), respectivamente), 110Kda por *B. agaradhaerens* (Martins & Hatti-

Kaul, 2002) y 114 Kda por *Paenibacillus macerans* (Urban et al., 2012) además de los reportado en la tabla 4. En algunos estudios informan que la CGTasa puede llegar a tener 2 subunidades, sin embargo la CGTasa purificada bajo las condiciones de estudio sólo presenta una única banda sin subunidades.

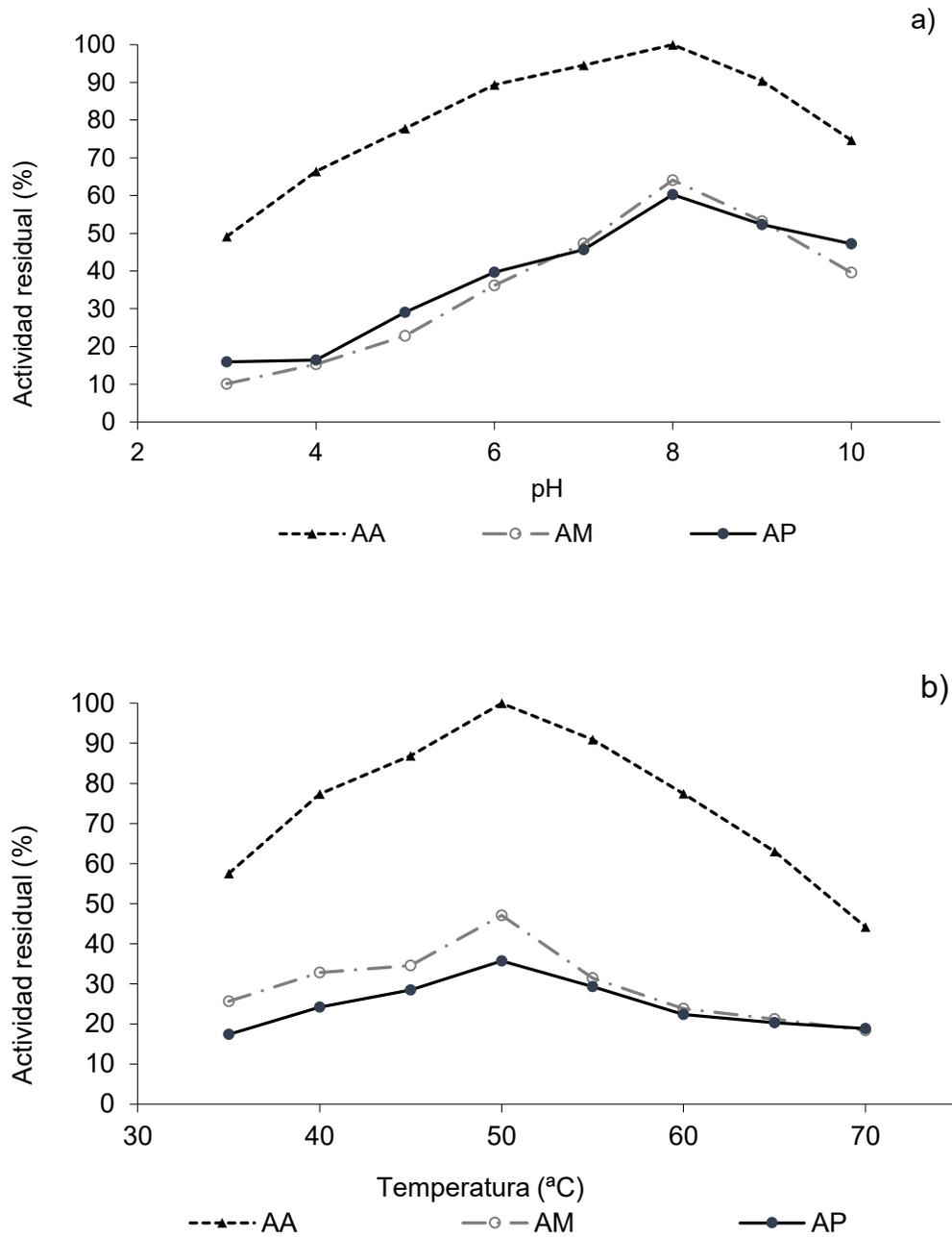
### 3.3.2.2 Propiedades de la CGTasa.

La actividad de la CGTasa parcialmente purificada se midió en diferentes condiciones de pH, temperatura y de sustrato. Es importante señalar que en todos los trabajos previos se utilizó específicamente almidón soluble para estos ensayos, por lo que es indispensable probar que la CGTasa obtenida deberá ser capaz producir CDs en presencia de los sustratos propuestos.

El pH óptimo se obtuvo en 8, después de probar un pH rango entre 3 y 10 (Fig. 19 a) independientemente del sustrato empleado, los resultados están dentro del rango (7.2, y 950 °C reportado para las CGTasas de fuentes de *B. megaterium* y otras fuentes (Tabla 10).



**Figura 18.** Perfil electroforético de CGTasa parcialmente purificada de *Bacillus megaterium*, por SDS-PAGE, línea 1, estándares de marcadores; línea 2, CGTasa parcialmente purificada



**Figura 19.** Efecto de las condiciones de a) pH y b) Temperatura, sobre la actividad de ciclación de la CGTasa

**Tabla 11.** Características de diferentes CGTasas parcialmente purificadas.

Microorganismo productor	Masa molecular (Da)	pH optimo	Temperatura Óptima (°C)	<i>Km</i> (mgmL <sup>-1</sup> )	<i>Vmax</i> (mgmL <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	Referencia
<i>Bacillus firmus</i>	78 000	7	60	1.21	ND	(Singh et al., 2010)
<i>Bacillus Alcalophilic</i>	ND	8	55	ND	ND	(Freitas et al., 2004)
Bacillus megaterium	73400	7.2-9	27 y 60	3.4	0.07	(Pishtiyiski et al., 2008), (Sivakumar & Shakilabanu, 2013)
<i>Bacillus sp c26</i>	ND	ND	ND	22.3	1.59	(Cheirsilp et al., 2010a)
<i>Bacillus pseudocaliphilus</i> 20RP	70000	6 y 9	60	ND	ND	(Atanasova et al., 2011)
<i>Bacillus lehensis</i>	83000	8	55	8.62	0.862	(K. Blanco et al., 2012)
<i>Bacillus licheniformes</i>	85200	9	45	1.77	ND	(Bonilha, Menocci, Goulart, Polizeli, & Monti, 2006; Usharani, Prasad, Sundar, Dhananjaya, & Mallesha, 2014a)
<i>Alcalophilic Bacilli</i>	74100	7	60	ND	ND	(Elbaz, Sobhi, & ElMekawy, 2015)
<i>Bacillus megaterium</i>	66000	8	50	7.6	1.53	Presente trabajo

ND= No se reporta ningún dato.

Se observó que la CGTasa disminuye su actividad considerablemente a pH menor de 6. Cuando se emplean AM y AP como sustrato en el punto óptimo se observó una disminución de la actividad relativa en un 40% con respecto a cuándo se emplea AA. Se recomienda mantener los ensayos en un rango de 7-9, para mantener su actividad total.

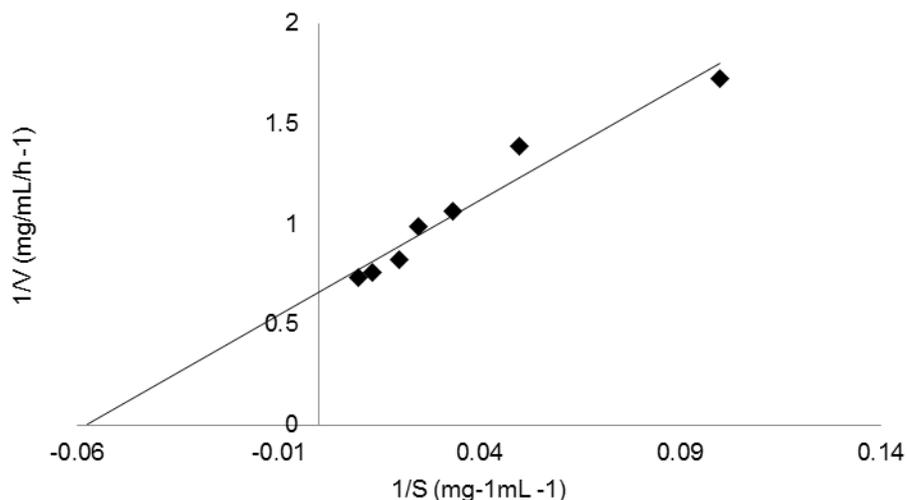
Por otro lado, se examinó un rango de temperatura de 35-70 °C en presencia de diferentes sustratos. La temperatura óptima observada fue de 50 °C y la actividad de la enzima disminuido hasta un 60% por debajo y hasta un 50% por arriba cuando se emplea AA, mientras que cuando se empleó AM y AP su temperatura óptima fue la misma, solo que a la actividad residual disminuyo hasta un 40% y 37% (respectivamente) (Fig. 19 b). Esta temperatura observada es muy similar al rango de temperaturas óptimas reportadas para las CGTasa en la tabla 11.

En la figura 20 se puede observar la  $K_m$  y  $V_{max}$  aparente. Es importante reconocer que son escasos los trabajos que reportan estos valores los cuales son importantes para confirmar la afinidad de la enzima sobre un determinado sustrato en específico.

La incubación de la enzima con diversas concentraciones de AA mostró que los valores de  $K_m$  y  $V_{max}$  obtuvieron fueron 0.152 mM y 13.4  $\mu\text{M}/\text{min}$ , respectivamente además de una  $K_{cat}$  de  $0.36 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ , reportadas a partir del modelo de Michaelis-Menten.

La CGTasa producida por *B. megaterium* tuvo una afinidad 50% más alta para el sustrato de AA que lo reportado por el mismo microorganismo usando como sustrato almidón soluble (Pishtiyski et al., 2008), mientras que es muy semejante a la CGTasa producida por *B. lehenesis* (K. Blanco et al., 2012).

La  $V_{max}$  representa que aproximadamente todas las moléculas de CGTasa están en forma del complejo enzima-sustrato y es poca la cantidad de enzima libre, este valor está dentro de los valores reportados para diversos CGTasas en la tabla 11.



**Figura 20.** Gráfico de Lineweaver-Burk de la velocidad inicial vs recíproco de la concentración de almidón de amaranto por la CGTasa de *Bacillus megaterium*.

### 3.4 Conclusiones.

La enzima ciclodextrina glucosil transferasa producida por *Bacillus megaterium*, que fue parcialmente purificada en 3 etapas, fue capaz de aumentar su actividad específica de 98 Umg<sup>-1</sup> a 3946 Umg<sup>-1</sup>, teniendo un peso aproximado de 66 Kda. Esta enzima mantiene un pH óptimo de 8 y una temperatura óptima de 50°C, sin embargo es aceptable su actividad cuando trabaja en otros intervalos de pH y temperaturas, lo que la hace ideal para su empleo en procesos con diferentes condiciones de tratamientos.

Cuando se evaluó su Km y su Vmáx sobre el almidón de amaranto, se obtuvo valores que indican su afinidad en un 50% más que en comparación con almidón de maíz; la caracterización de la enzima es una herramienta útil para la obtención de conocimiento sobre las propiedades y posibles aplicaciones de la glucosil transferasa ciclodextrina parcialmente purificada producida por *Bacillus megaterium* en una fermentación líquida sumergida y su afinidad por el almidón de amaranto.

**CAPÍTULO IV**  
**SÍNTESIS DE  $\beta$ -CICLODEXTRINA**

## **4 SINTESIS DE B-CICLODEXTRINAS.**

### **4.1 Objetivo.**

Sintetizar y caracterizar las  $\beta$ -ciclodextrinas utilizando almidón de amaranto y la CGTasa producida por fermentación líquida sumergida.

### **4.2 Materiales y métodos.**

#### **4.2.1 Síntesis de las ciclodextrinas.**

La síntesis de la ciclodextrina se llevó a cabo según lo propuesto por Biwer (202) (Biwer et al., 2002); de manera general, se pesó 0.5 g de almidón de amaranto y se dispersó en 500 mL de buffer de fosfatos 0.1M, pH 7, se calentó hasta alcanzar una temperatura de 65 °C y se mantuvo por 10 min, posteriormente se enfrió hasta alcanzar una temperatura de 50 °C, se adicionó a la mezcla de reacción la enzima CGTasa parcialmente purificada (2 mg/mL) y se incubó en un equipo LAB-LINE con agitación durante 24 h a una temperatura de 50 °C.

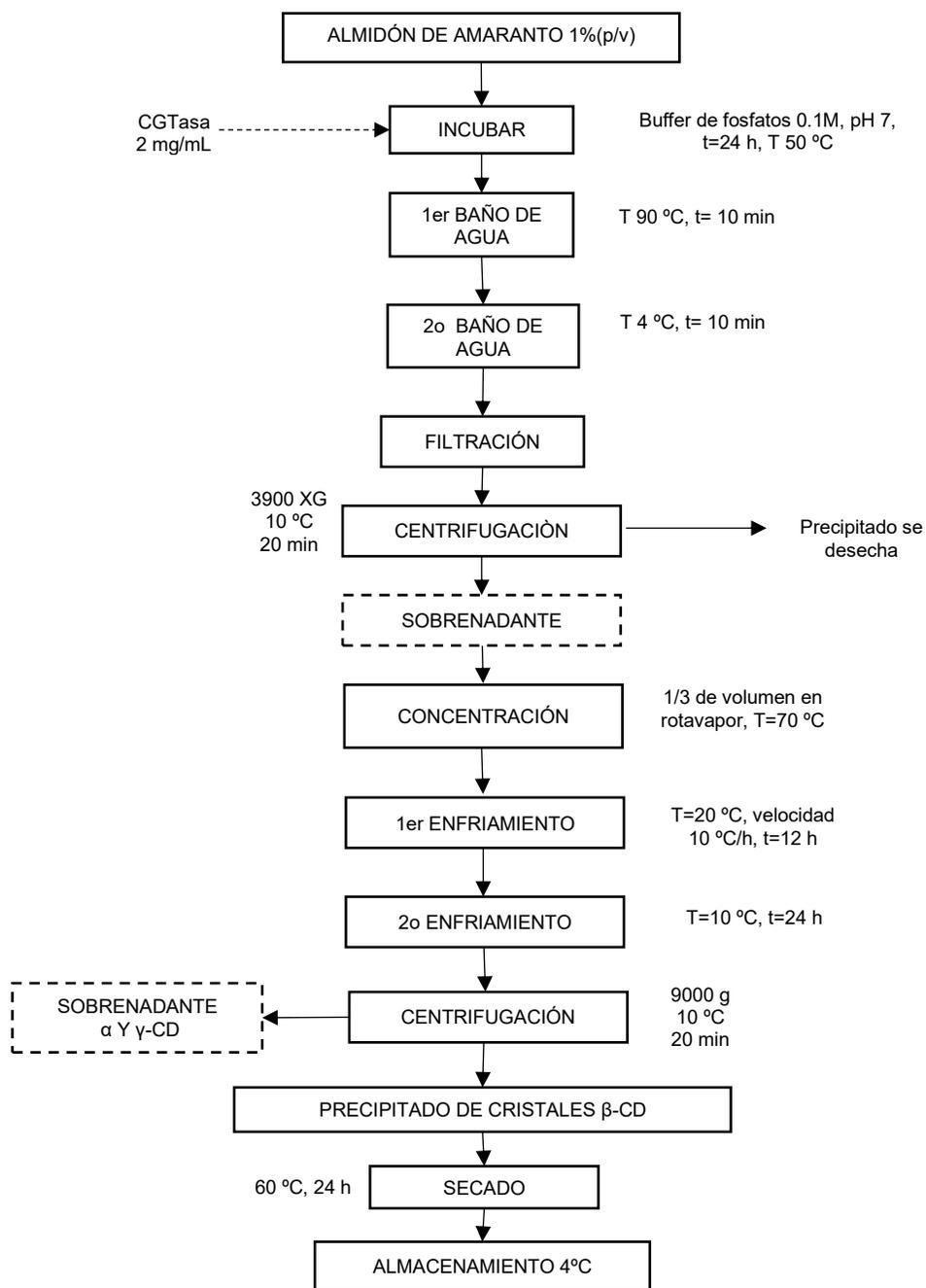
La reacción se detuvo mediante un choque térmico, sometiendo primero a un baño de agua caliente (90 °C) e inmediatamente después a un baño frío (4 °C) durante 10 minutos cada uno (Figura 21); para la caracterización de la producción de ciclodextrinas por microscopia, se recolecto muestra de reacción de 5 mL en el apartado 7.4.2, posteriormente se liofilizó y se almacenó a 4 °C para su análisis a través de microscopia electrónica de barrido según lo indicado en el apartado 1.3.6.

#### **4.2.2 Aislamiento de la $\beta$ -ciclodextrina.**

Debido a que en la etapa de síntesis se obtiene una mezcla de  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ -CDs, es necesario aislar el componente de mayor interés y debido a que la enzima sintetizada proviene del *Bacillus megaterium*, se sabe que se produce en mayor proporción  $\beta$ -CD.

Para aislar la  $\beta$ -CD, se tomó la mezcla de reacción obtenida de la etapa 7.5 y se calentó a 40 °C, se adicionó carbón activado (relación 1:5 p/v) y se agitó en una parrilla magnética durante

2 h, transcurrido el tiempo se filtró en un papel Whatman No.1 y se centrifugó a 3000 g durante 10 min.



**Figura 21.** Metodología general para la síntesis de y purificación de la β-CD.

Posteriormente se concentró hasta un tercio del volumen inicial en un Yamato RE200 a una temperatura de 70 °C, se sometió a un enfriamiento en dos etapas, la primera etapa hasta

llegar a una temperatura de 20 °C durante 12 h y en la segunda etapa se enfrió hasta 10 °C sin agitar durante 24h, una vez transcurrido el tiempo se centrifugó a 9000 g durante 20 min a 10 °C.

El precipitado contiene los cristales de  $\beta$ -CD mientras que en el sobrenadante se obtiene la mezcla mayormente de  $\alpha$  y  $\gamma$ -CDs, los cristales se secan en estufa a 60 °C por 24 h y posteriormente se almacenan a 4 °C (Figura 21).

#### **4.2.3 Optimización de la producción de $\beta$ -cilodextrina.**

La síntesis selectiva de  $\beta$ -CD se determinó mediante el método propuesto por Blackwood (2000) (Blackwood & Bucke, 2000). En una primera etapa se probaron diferentes temperaturas (50, 60, 70 y 80 °C) de pre-tratamiento a los almidones de amaranto y de maíz al 1%, en un medio de buffer Tris-HCl, pH 8,0, durante 30 minutos, después se dejó enfriar. Se adicionó La CGTasa parcialmente purificada 1% (v/v) y se incubo a 40 °C durante 24h. La reacción se detuvo mediante un choque térmico; la cantidad de  $\beta$ -ciclodextrina, se determinó por su capacidad para formar un complejo de inclusión incoloro con el indicador fenolftaleína (Mäkelä, Korpela, & Laakso, 1987), utilizando una curva de calibración en un rango de 2 a 10 mg/mL de  $\beta$ -CD comercial.

En un segundo ensayo se realizó la optimización variando la concentración de sustrato (1, 3 y 5% p/v) y la presencia de solventes (acetona, etanol y tolueno 0.01 % v/v) en la reacción de síntesis de  $\beta$ -CD. Realizando los pasos anteriores para la cuantificación de  $\beta$ -CD.

Los datos obtenidos de esos experimentos se ajustan a las expresiones polinómicas mediante el uso del paquete estadístico STATGRAPHICS Centurion XVI, versión 16.1.15.

#### **4.2.4 Identificación de ciclodextrinas por espectrofotometría de masas.**

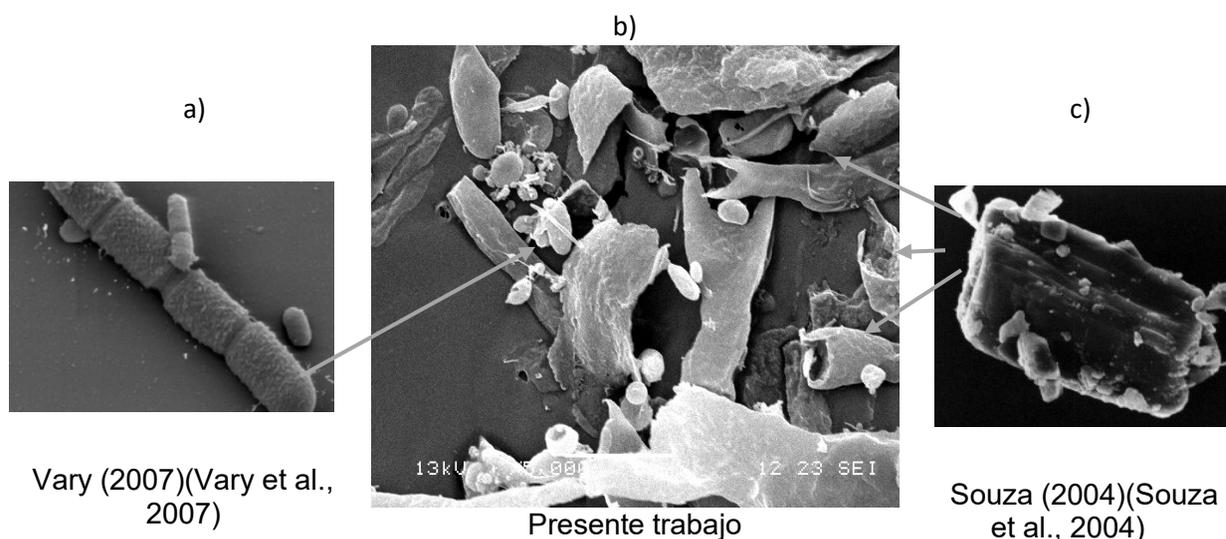
Todas las soluciones de  $\beta$ -CD para la espectrometría de masas de análisis se prepararon a una concentración 50 mM, los espectros de masas se obtuvieron por infusión directa a una velocidad de 3  $\mu$ L/min en un micrOTOF (Bruker Daltonik, Alemania) que cuenta con un sistema de ionización a presión atmosférica por electrospray (Calzetta Resio, Tolaba, & Suárez) y un

analizador de tiempo de vuelo (TOF). Las condiciones de adquisición en el espectrómetro: polaridad de iones positivos, voltaje del capilar 4500 V, temperatura de desolvatación 180°C, flujo de gas (N<sub>2</sub>) a 4 L/min, presión del nebulizador 0.3 Bar y un rango de detección de masas de 50-3000 m/z.

### 4.3 Resultados.

#### 4.3.1 Síntesis de ciclodextrinas.

La reacción catalítica de la ciclodextrin glucosil transferasa de *Bacillus megaterium*, produce como principal producto la  $\beta$ -CD. Este producto se puede observar en la figura 22, donde se compara con los cristales típicos de  $\beta$ -CD reportados por Souza (2004) (Souza et al., 2004), en la micrografía tomada a partir de una muestra en la etapa de síntesis de la Figura 22 b, se muestra claramente la formación de  $\beta$ -ciclodextrinas por la CGTasa de *Bacillus megaterium* (Figura 22 a) empleando almidón de amaranto como sustrato.

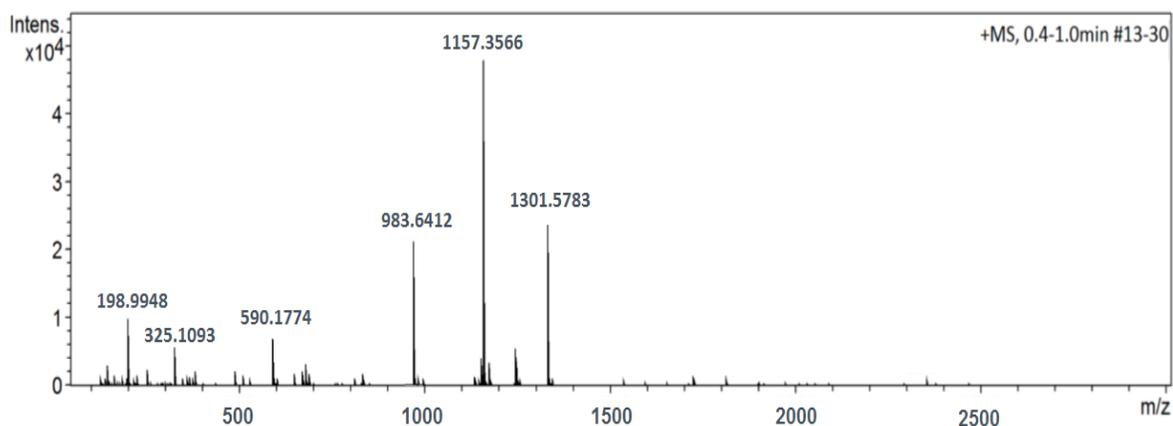


**Figura 22.** Micrografías de la producción de la CGTasa para la producción de  $\beta$ -ciclodextrina a) *Bacillus megaterium* 2.5x2.5x10  $\mu$ m, b) Muestra de la síntesis de la  $\beta$ -ciclodextrina a partir de almidón de amaranto y c) Morfología típica de un cristal de  $\beta$ -ciclodextrina.

Para tener la certeza de los productos de reacción en la síntesis de ciclodextrinas, se realizó una identificación por espectrometría de masas, en un equipo micrOTOF., de la muestra analizada, se obtuvo un espectro de masas (Figura 23), en donde se observa una mezcla de

compuestos, dentro de las que se distinguen la glucosa, la maltosa, la  $\alpha$ -ciclodextrina, la  $\beta$ -ciclodextrina y la  $\gamma$ -ciclodextrina. Los cuales fueron identificados por los patrones de fragmentación MS característicos y masas aproximadas en un programa de Análisis de datos Bruker Compass 4.1.

En este análisis se determinó a la glucosa con un valor máximo de  $m/z$  de 198.9948, para la maltosa un valor de  $m/z$  de 325.1093, mientras que para la  $\alpha$ -ciclodextrina se obtuvo un valor de  $m/z$  de 983.6412 con aproximadamente un 40% menor de área con respecto a la  $\beta$ -ciclodextrina, quien es la que se encuentra en mayor concentración. La  $\beta$ -ciclodextrina se encuentra en mayor proporción en la mezcla de reacción, identificada con un valor de  $m/z$  de 1157.3566, mientras que la  $\gamma$ -ciclodextrina se identificó con un valor de  $m/z$  de 1301.5783, con un área semejante a la de la  $\alpha$ -ciclodextrina.



**Figura 23.** Espectro de productos de la reacción por la CGTasa a partir de almidón de amaranto.

Estos resultados confirman que la CGTasa producida por *Bacillus megaterium*, cataliza preferentemente la  $\beta$ -ciclación de acuerdo a lo reportado por Pishtiyski (2008) (Pishtiyski et al., 2008), para la CGTasa producida por el mismo microorganismo. Un comportamiento semejante lo muestra la investigación de Bender (1977) (Bender, 1977) donde encontró que la CGTasa producida por *Klebsiella pneumoniae* fue capaz de producir el 29.3% de  $\beta$ -CD y el 10.7% de  $\alpha$ -CD a partir de amilopectina.

De estos resultados se infiere que el sitio activo de CGTasa es especialmente adecuado para la unión en un sitio de 7 residuos de distancia del sitio de escisión (Strokopytov et al., 1996; J. C. Uitdehaag et al., 1999). La especificidad del producto puede ser influenciado por el aminoácido en el sitio y la estructura activa del sustrato.

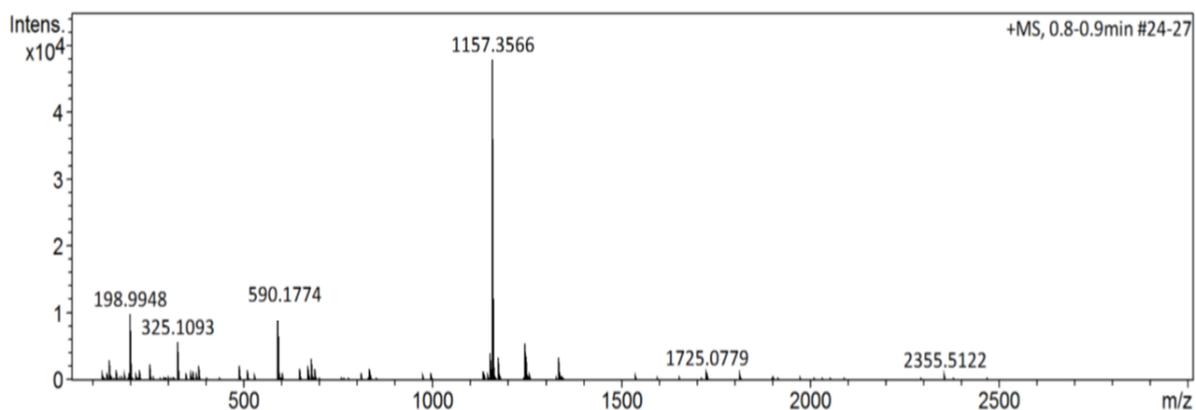
#### **4.3.2 Aislamiento de la $\beta$ -ciclodextrina.**

Al realizar el aislamiento utilizando el proceso de cristalización de  $\beta$ -ciclodextrina, se obtuvo un rendimiento de 15.2% de cristales con alta pureza (el rendimiento fue calculado con respecto al sustrato inicial), los cuales fueron identificados mediante espectrofotometría de masas. Este rendimiento observado en el presente trabajo es muy cercano a lo reportado por Szejtli (2013) (Szejtli, 2013), que menciona rendimientos de 18 a 24% en procesos de cristalización de la  $\beta$ -CD a partir de almidón de maíz. Si es empleado como sustrato amilopectina pura, se observan rendimientos del 16.96 mg/mL de  $\beta$ -CD, según Pishtiyski (2006).

El bajo rendimiento puede deberse principalmente a que aún debe optimizarse el proceso de síntesis, donde se consideren factores como la concentración de sustrato con respecto a la enzima, presencia de solventes entre otros (Pishtiyski & Zhekova, 2006).

En la figura 24 se muestra que los cristales aislados principalmente corresponden a  $\beta$ -ciclodextrinas, aunque se encuentran trazas de glucosa y de otros compuestos no identificados. Por lo que este método se perfila como una opción adecuada para el aislamiento de  $\beta$ -ciclodextrinas.

Debido a su baja solubilidad, la  $\beta$ -ciclodextrina, puede ser fácilmente purificada por pasos de cristalización. Este método es muy utilizado a gran escala a nivel industrial, sobre todo en Japón (Biber et al., 2002). Por otro lado el aislamiento para la  $\alpha$  y la  $\gamma$ -ciclodextrinas puede realizarse mediante cromatografía, que se vuelve más complejo y aumenta el costo.



**Figura 24.** Espectro correspondiente a  $\beta$ -Ciclodextrina

### 4.3.3 Optimización del proceso de producción de $\beta$ -ciclodextrina.

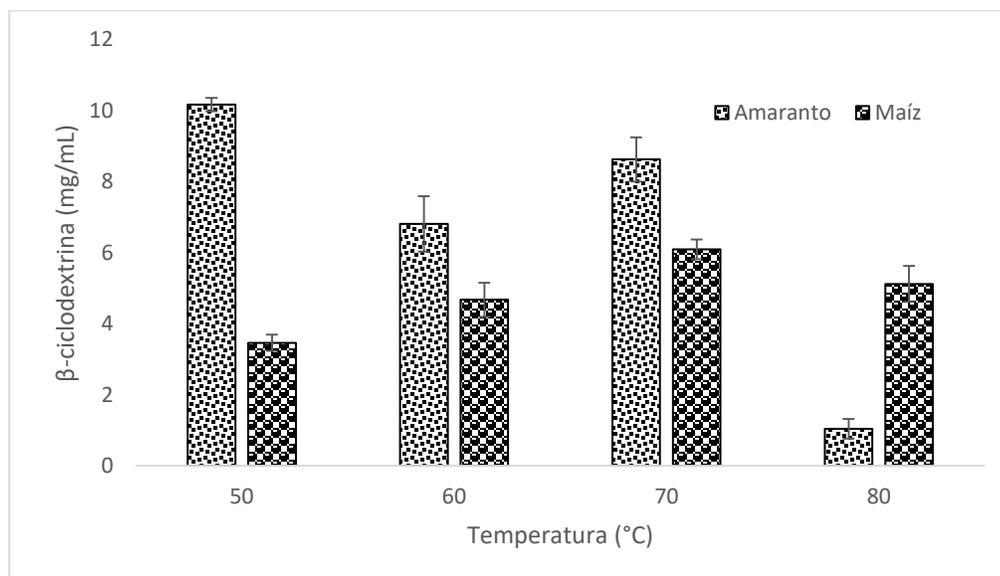
#### 4.3.3.1 Temperatura de gelatinización de almidón.

En estudios previos por Kim (1995) (Kim, Kim, & Lee, 1995) remarcan la importancia que tiene la temperatura de gelatinización sobre el rendimiento de  $\beta$ -CD producida por CGTasa. En el presente trabajo el primer paso hacia la optimización fue tomar en cuenta un rango de temperaturas de gelatinización, desde 50 hasta 80 °C, que es un rango que abarca las temperaturas de gelatinización para el almidón de amaranto y el almidón de maíz. Cabe mencionar que los almidones fueron tratados a estas temperaturas previo el desarrollo de la reacción de ciclación por la CGTasa.

Se pudo observar que para el caso del almidón de amaranto hay una diferencia significativa sobre las temperaturas probadas, teniendo una máxima producción de  $\beta$ -CD a una T de gelatinización de 50 °C (Figura 25), mientras que a una temperatura de 80 °C se observó la formación de un gel rígido, lo que impidió el acceso de la enzima, y en consecuencia se ve disminuida la producción de  $\beta$ -CD en aproximadamente un 90%. En la temperatura de 60 °C, que es la temperatura de gelatinización reportada para almidón de amaranto (60-68 °C)(Paredes-López, 1990), se observa una disminución en la productividad, esto debido posiblemente que el almidón de amaranto tratado a 50 °C, está muy cerca de la temperatura de gelatinización, donde se encuentran enlaces de tipo puente de hidrogeno de la molécula de almidón con moléculas de agua que resulta en la inflamación continua del gránulo. El

gránulo hinchado de almidón podría facilitar la digestibilidad de la enzima, y a los 60 °C esto puede ser debido a que en ese momento el gránulo se encuentra en un estado de transición que impide su fácil acceso para la enzima. En el caso del almidón de maíz es notable que conforme se aumenta la temperatura su producción de  $\beta$ -CD aumentó, esto es debido principalmente a que se reconoce que a 80 °C presenta forma su gel característico (Pérez & Bertoft, 2010). Bajo las condiciones de estudio el almidón de maíz presento su máxima producción a los 70°C, sin embargo si se compara con el almidón de amaranto se observa que hay una disminución en la producción de  $\beta$ -CD del 30%.

Los resultados del almidón de amaranto son mayores a lo encontrado para el almidón de tapioca reportado por Chelrsllp (2010) (Cheirsilp et al., 2010a), que muestra una mejor producción de  $\beta$ -CD (6 mg/mL) a una temperatura de gelatinización de 55 °C y una menor producción a 60°C (1 mg/mL). Para el almidón de maíz se tienen reportes de la producción de CD, por una CGTasa de *Bacillus macerans* (Kim et al., 1995), de un máximo a los 70°C. En el caso del almidón de cassava se obtuvo hasta 9 mg/mL de  $\beta$ -CD cuando se registró una temperatura de 70°C, reportado por Szerman (2007) (Szerman et al., 2007). Se fijaron las condiciones de pre-gelatinización para el almidón de amaranto a una temperatura de 50°C, y para el almidón de maíz a una temperatura de 70°C, para los posteriores estudios.



**Figura 25.** Efecto de la temperatura de gelatinización del almidón sobre la producción de  $\beta$ -ciclodextrina.

#### 4.3.3.2 Efecto de la concentración de sustrato y presencia de solventes orgánicos.

Otros factores a considerar en la optimización de la producción de  $\beta$ -CD son: la concentración de sustrato (Gawande & Patkar, 2001; Matioli, Zanin, & De Moraes, 2002; Moriwaki et al., 2007) , ya que se reconoce que la producción de ciclodextrinas está ligada de manera importante, al tipo de sustrato y su concentración, así como la presencia de solventes (B. T. Tesfai, D. Wu, S. Chen, J. Chen, & J. Wu, 2013). La optimización lleva el propósito de aumentar el rendimiento de la producción de  $\beta$ -CD. Por lo que se probó las concentraciones de 1, 3 y 5 % (p/v) y el uso de solventes tales como la acetona, etanol y tolueno, que se sabe son capaces de formar complejos de inclusión con la  $\beta$ -ciclodextrina (Martínez & Gómez, 2007).

Los resultados obtenidos de la optimización de la producción de  $\beta$ -CD, se muestran en la figura 26. En primera instancia, se distingue que permanece como sustrato preferente, el almidón de amaranto sobre el almidón de maíz, para la CGTasa producida por *Bacillus megaterium*. Esto es debido a la diferencia en el su contenido de amilosa y amilopectina que hay en los almidones. El almidón de amaranto presenta un contenido mayor de amilopectina que el almidón de maíz. En la actividad catalítica de la CGTasa, se reconoce un primer paso que implica una protonación del oxígeno glucosídico por un catalizador ácido general (Glu257 en CGTasa), creando un estado de transición oxo-carbonio, que se estabiliza posteriormente en un segundo paso, con un intermedio unido covalentemente a la nucleófilo (Asp229 en CGTasa). Este intermedio es atacado por el C4-OH en el extremo no reductor de otro oligosacárido (B. Van der Veen et al., 2000). Debido a que la amilosa contiene un solo grupo reductor y un solo grupo no reductor, se formarían con mayor dificultad las ciclodextrinas mientras que con la amilopectina que en su estructura contiene abundantes grupos no reductores y solo un grupo reductor (Kong, Bertoft, Bao, & Corke, 2008; Kong, Corke, et al., 2009), se obtienen mayores rendimientos de ciclodextrinas.

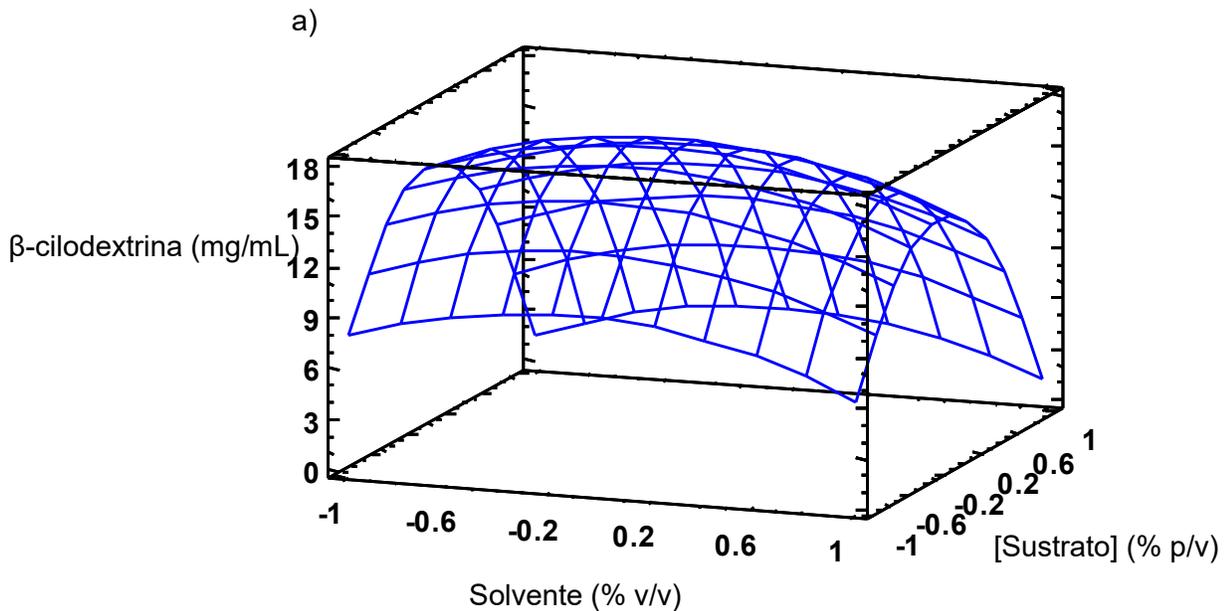
Por otro lado, se puede observar que las condiciones de optimización se obtuvieron empleando una concentración de almidón del 3 % (p/v) y en presencia de etanol como solvente, independientemente del tipo de almidón. El ajuste del modelo varía de 97 a 91% respectivamente. Se observa que la relación de las dos variables estudiadas es alta, y que ambas afectan de manera significativa la producción de  $\beta$ -CD. En estudios similares para la optimización, Szerman (2007) encontró que de entre un rango de 5-15% de almidón de

cassava, el óptimo fue la menor concentración. Pishtiyski (2006) (Pishtiyski & Zhekova, 2006) observo un aumento de hasta un 6% cuando disminuyo la concentración de almidón de un 5% a un 2.5%.

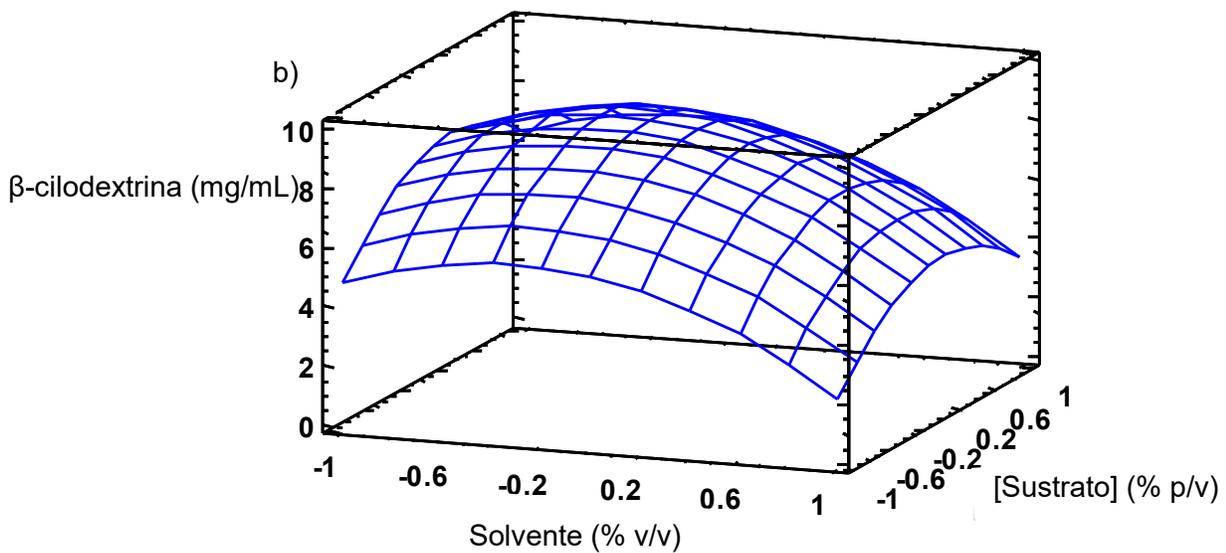
En el caso de la presencia de los solventes, estos se emplean a nivel industrial para inducir al tipo de ciclodextrina deseado (Biwer et al., 2002). En el presente trabajo se emplearon solventes que tienen afinidad por formación de complejos con la  $\beta$ -CD (Contreras et al., 2011). Se observó que la presencia de etanol fue quien favoreció la producción de  $\beta$ -CD, con respecto a la acetona o el tolueno. Este comportamiento fue similar a lo reportado por Tesfai (2013) (B. Tesfai, D. Wu, S. Chen, J. Chen, & J. Wu, 2013) donde el etanol fue el que le dio la más alta conversión de almidón a ciclodextrinas.

El etanol tiene la ventaja de poder ser eliminado fácilmente del producto de reacción, hasta un 100% según lo reportado por Tesfai (2013) (B. Tesfai et al., 2013), sin embargo en el caso de que pudieran quedar trazas, no afecta en su aplicación en formulaciones alimentarias, ya que está permitido su uso en este sector. Por otro lado el uso de acetona y tolueno, limitaría su aplicación a otras industrias que no se vean afectada por la presencia de estos solventes, por ejemplo la cosmetológica.

El efecto de los disolventes orgánicos se sabe que minimiza algunos factores como la inhibición por producto, la reacción de transglicosilación y /o reacción de hidrólisis que limitan el incremento en la producción de CD por CGTasas (B. Tesfai et al., 2013). Sin embargo el uso de solventes en la producción de ciclodextrinas puede elevar los costos, en comparación con aquellos procesos que no los utilizan, pero lo cual, el productor deberá hacer un análisis sobre la conveniencia de su uso.



$$\text{Beta ciclodextrina} = 17.4418 - 0.489223 * \text{Solvente} - 2.74638 * \text{sustrato} - 2.90357 * \text{Solvente}^2 + 0.351449 * \text{Solvente} * \text{sustrato} - 10.257 * \text{sustrato}^2, R^2 = 97.7402, R^2 \text{ ajustada} = 96.9076$$



$$\text{Beta ciclodextrina} = 8.40536 - 1.41119 * \text{Solvente} + 0.778428 * \text{sustrato} - 2.17466 * \text{Solvente}^2 - 0.0738573 * \text{Solvente} * \text{sustrato} - 2.04394 * \text{sustrato}^2 \quad R^2 = 91.5826, R^2 \text{ ajustada} = 88.4815$$

**Solvente (% v/v): -1=acetona, 0=etanol y 1=tolueno**  
**Concentración de sustrato (%p/v): -1=1%, 0=3% y 1=5%**

**Figura 26.** Producción de  $\beta$ -cilodextrina por la CGTasa de *B. megaterium*, en presencia de solventes y con diferentes concentraciones de almidón a) Amaranto y b) Maíz.

#### 4.4 Conclusiones.

El almidón es un sustrato que da mayores rendimientos en la síntesis de ciclodextrinas por la CGTasa. El almidón de amaranto se compone de 3.99% de amilosa y de 96.01% de amilopectina, mientras que el almidón de maíz tiene 75% de contenido de amilopectina; ambas fracciones pueden servir como materia prima para la formación de CD, pero la amilopectina da mayores rendimientos que la amilosa, es por esto que se presentó un aumento del doble en la producción de  $\beta$ -CD usando almidón de amaranto, en comparación con el almidón de maíz.

Es importante señalar que el trabajar con amilopectina pura es más costoso a nivel industrial, esto debido a los procesos de purificación, es por ello que se prefieren almidones con altos contenidos de amilopectina, tal es el caso del almidón de amaranto, que se perfila como materia prima en la producción de ciclodextrinas.

Otra ventaja que presenta el almidón de amaranto es la baja temperatura de licuefacción (50 °C) sobre los otros almidones, así mismo en una concentración baja (3%) en presencia de etanol se puede aumentar hasta en un 50% la producción de  $\beta$ -ciclodextrina, que pueden ser usadas ampliamente en la industria de los alimentos.

**CAPÍTULO V**  
POLIFENÓLES NO EXTRAIBLES DE AMARANTO

## **5 POLIFENOLES NO EXTRAÍBLES DEL AMARANTO.**

### **5.1 Objetivo.**

Obtener los polifenoles no extraíbles de la fibra de la planta del amaranto para la formación de complejos de inclusión  $\beta$ -ciclodextrina-polifenol.

### **5.2 Materiales y métodos.**

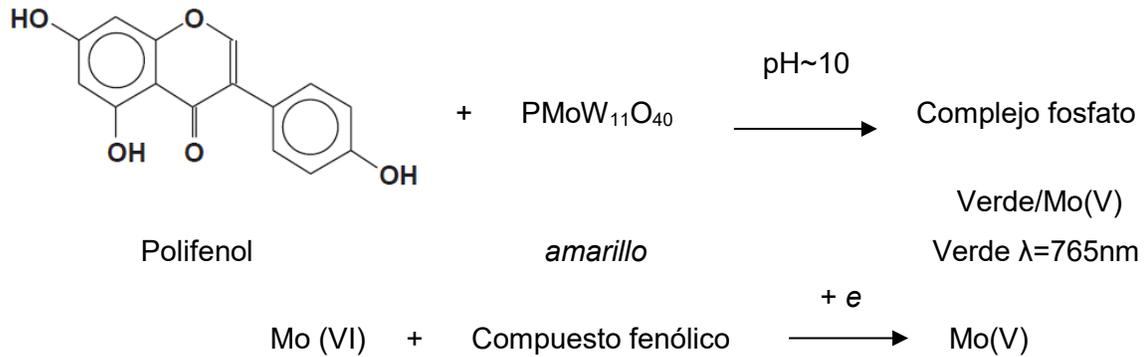
#### **5.2.1 Optimización de obtención de polifenoles no extraíbles (PNE).**

Para la obtención de polifenoles no extraíbles (PNE) se realizó una hidrólisis ácida, de acuerdo al método propuesto por Conde, (2009) y Arce (2012) (Conde, Gullón, Moure, Domínguez, & Parajó, 2009). Se realizó una optimización de los factores de tiempo y temperatura sobre la obtención de PNE. Una muestra de rastrojo se colocó en un reactor tipo Parr (anexo VII, diseñado y construido en el laboratorio pp1 de la UAM-I) y se mezcló con ácido sulfúrico 5% (v/v) en una relación 1:16 (p/v), durante 30, 60, 90, 120 y 150 min, variando la temperatura ( $T=90, 100, 110, 120$  y  $130$  °C). Los hidrolizados resultantes se neutralizaron (pH 7) con solución saturada carbonato de sodio. Se centrifugaron a 5000 g durante 10 min. Finalmente se realizó una extracción con acetato de etilo (1:20 v/v). El solvente fue recuperado con un rotavapor Yamato RE200. A los hidrolizados se les cuantifico el contenido de polifenoles totales y su actividad antioxidante. Los datos obtenidos de esos experimentos se ajustaron a expresiones polinómicas mediante el uso del paquete estadístico STATGRAPHICS Centurion XVI, versión 16.1.15.

#### **5.2.2 Cuantificación de polifenoles.**

Los compuestos fenólicos fueron cuantificados de acuerdo a Singleton (1999) (Singleton, Orthofer, & Lamuela-Raventós, 1999), por el método de Folin Ciocalteau y se expresaron como polifenoles totales (PT). Los compuestos fenólicos reaccionan con el reactivo bajo condiciones alcalinas, por lo que la disociación de protones fenólicos da lugar a un anión fenolato que es capaz de reducir al reactivo de Folin-Ciocalteau. Se forma un complejo verde entre el fenolato

y el reactivo independientemente de la estructura del compuesto fenólico, como se observa en la Figura 27 (Huang, Ou, & Prior, 2005).



**Figura 27.** Reacción de los compuestos polifenólicos con el reactivo de Folin-Ciocalteu.

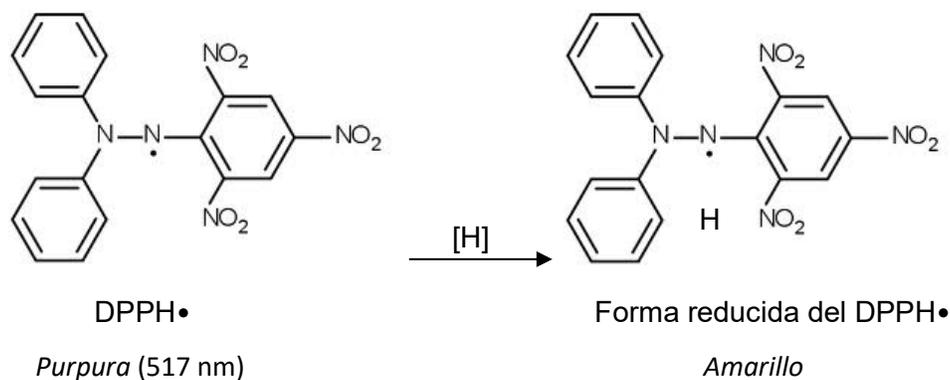
El reactivo de Folin-Ciocalteu es una mezcla de molibdato de sodio (25 g), tungstato de sodio (100 g), ácido clorhídrico concentrado (100 mL), ácido fosfórico al 85% (50 mL) y agua destilada (700 mL). Esta mezcla se debe hervir por 10 h. Después se agrega sulfato de sodio (150 g) dando como resultado una solución de color amarillo intenso. La reacción de este reactivo con reductores le confiere color verde. Se mezcló 500  $\mu\text{L}$  de muestra con 4.5 mL de agua destilada, se agregó 200  $\mu\text{L}$  de reactivo de Folin-Ciocalteu y 500  $\mu\text{L}$  de solución saturada de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , se agito para mezclar perfectamente en un vortex, por último se agregó 4.3 mL de agua destilada. Se dejó reposar 1 h. al resguardo de la luz, se leyó la absorbencia a 765 nm. El contenido total de polifenoles fue calculado en equivalentes de ácido gálico (eq. AG).

### 5.2.3 Evaluación de la actividad antioxidante.

#### 5.2.3.1 Capacidad de reducción del radical 2,2-difenol-1-picrilhidrazil (DPPH•).

La capacidad de reducción del DPPH• por las muestras fue evaluada según Brand-Williams (1995) (Brand-Williams, Cuvelier, & Berset, 1995). El DPPH• en su forma radical presenta compuesto colorido púrpura alcanzando una absorción máxima a 517 nm en

espectrofotómetro de UV-Vis. En su forma reducida posterior a la presencia de antioxidantes con los radicales, el DPPH• se torna color amarillo. La reacción de reducción del radical DPPH• se observa en la Figura 28. La decoloración de este compuesto en presencia de los compuestos antioxidantes, se monitorea para determinar la concentración de antioxidantes en la muestra de estudio (Brand-Williams et al., 1995).



**Figura 28.** Reacción de reducción del radical DPPH•

Se mezcló 300  $\mu\text{L}$  de solución de DPPH• en metanol (0.5 mM) con 500  $\mu\text{L}$  de la muestra. Se adicionan 3.0 mL de metanol. La cinética de decoloración se monitorea a 517 nm por un tiempo exacto de 45 minutos. El porcentaje de inhibición del radical se calculó con la siguiente ecuación.

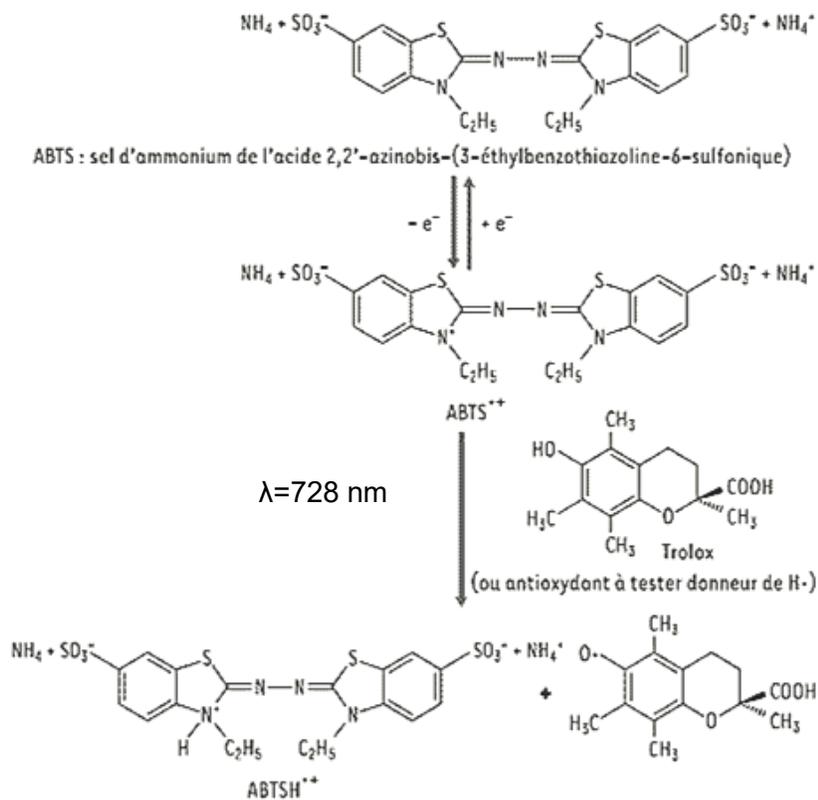
$$\% \text{ inhibición} = \left[ \frac{A_{\text{blanco}} - A_{\text{muestra}}}{A_{\text{blanco}}} \right] \times 100$$

$A_{\text{blanco}}$  = Absorbencia del control negativo en el momento de la preparación de la solución

$A_{\text{muestra}}$  = Absorbencia de la muestra después de 45 min

### 5.2.3.2 Método de decoloración del radical catiónico ABTS•.

La capacidad de reducción del radical catiónico ABTS por las muestras se evaluó según Re-Re (1999) (Re et al., 1999). El ABTS<sup>+</sup> es generado por su oxidación a causa de la exposición con persulfato de potasio (K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>) obteniéndose el radical catiónico ABTS<sup>±</sup> o el dicatión ABTS<sup>2+</sup> (Figura 29), se caracterizan por poseer un color verde-azul intenso. Este radical presenta una estabilidad química elevada, su máxima absorción UV-visible es a 728 nm.



**Figura 29.** Formación del radical catiónico ABTS, y reacción en presencia de un antioxidante (Trolox), para su estabilización

Fuente: [http://web.tn.refer.org/hedhili/potentiel\\_antioxydant.html](http://web.tn.refer.org/hedhili/potentiel_antioxydant.html).

Se mezcló una solución 7 mM de ABTS con una solución 2.45 mM de persulfato de potasio en agua, se mantuvo a temperatura ambiente durante 16 horas hasta obtener una solución azul oscuro intenso. Se diluyó en agua teniendo un volumen total de 3 mL, hasta alcanzar una

absorbencia de 0.7 leído a 734 nm. Esta solución se mezcló con 10 µL de la muestra. La absorbencia se monitoreo cada minuto, por un tiempo total de 6 min a 30 °C. La capacidad de reducción de radicales se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Inhibición (\%)} = \frac{1 - A_{\text{final.}}}{A_{\text{inicial.}}} \times 100$$

$A_{\text{final}}$  = Absorbencia medida a los 6 minutos

$A_{\text{inicial}}$  = Absorbencia inicial de la mezcla

### 5.2.3.3 Análisis HPLC.

El análisis de compuestos presentes en los PNE, en un primer paso se realizó mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) según lo propuesto por Sarkar (2014) (Sarkar, Khodre, Patel, & Mandaniya, 2014), los compuestos se determinaron en un equipo Waters aliace 2695 con una columna C18 (C18; 25 cm × 4,6 mm), utilizando una mezcla de disolventes de acetonitrilo-agua - ácido fosfórico (85: 15: 0.1, v / v / v). El volumen de inyección de muestra fue de 20 µl, la velocidad de flujo fue de 0.5 mL/min. El tiempo de corrida fue de 25 min. Los polifenoles se identificaron según el tiempo de retención y el espectro de absorción, por comparación de estos resultados con los tiempos de retención de estándares.

### 5.2.3.4 Análisis UHPLC–ESI–MS.

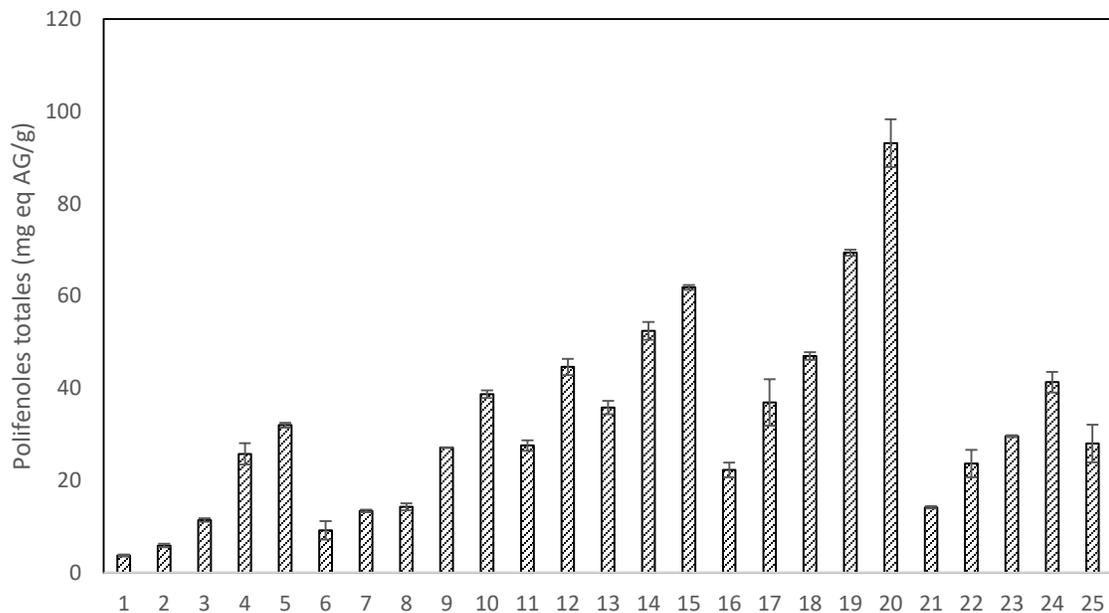
La separación de la muestra se realizó mediante cromatografía líquida de alta eficiencia en un UHPLC (Agilent) equipado con un desgasificador de vacío, una bomba cuaternaria y un automuestreador automático. El cromatógrafo está acoplado a un espectrómetro micrOTOF (Bruker Daltonik) que cuenta con un sistema de ionización a presión atmosférica por electrospray (Calzetta Resio et al.) y un analizador de tiempo de vuelo (TOF). Las muestras se inyectaron en una columna Zobrax SB-C18 (2.5 x 100 mm, 3.5 µM) operada a 40 grados C. La separación se logró utilizando un gradiente de elución de 0.1% de ácido fórmico en agua (A) y 100% acetonitrilo (B) a un flujo de 300 µL/min. Luego de la separación, el perfil de elución ingresó continuamente en el espectrómetro para la detección de los compuestos presentes. Los espectros de masas fueron adquiridos en modo de polaridad negativo y con un rango de detección de 50 - 3000 m/z. Las condiciones ESI-MS fueron las siguientes: tensión del capilar

en el electro spray 3000V, presión del gas de nebulizador (N<sub>2</sub>) 3 bar, temperatura de secado 200 grados C y gas de secado 12 L / min.

### 5.3 Resultados.

#### 5.3.1 Cuantificación de PNE del rastrojo de amaranto.

El rompimiento de las estructuras base de la pared celular de las células vegetales de la planta de amaranto, fue catalizada por ácido sulfúrico al 5% (v/v). El diseño para la optimización fue de 25 corridas, con las siguientes combinaciones de Temperatura (°C) / tiempo (min): 1=90/30, 2=90/60, 3=90/90, 4=90/120, 5=90/150, 6=100/30, 7=100/60, 8=100/90, 9=100/120, 10=100/150, 11=110/30, 12=110/60, 13=110/90, 14=110/120, 15=110/150, 16=120/30, 17=120/60, 18=120/90, 19=120/120, 20=120/150, 21=130/30, 22=130/60, 23=130/90, 24=130/120, 25=130/150. Se puede observar existe un comportamiento proporcional al aumentar la temperatura y el tiempo, en la hidrólisis ácida (Figura 30).



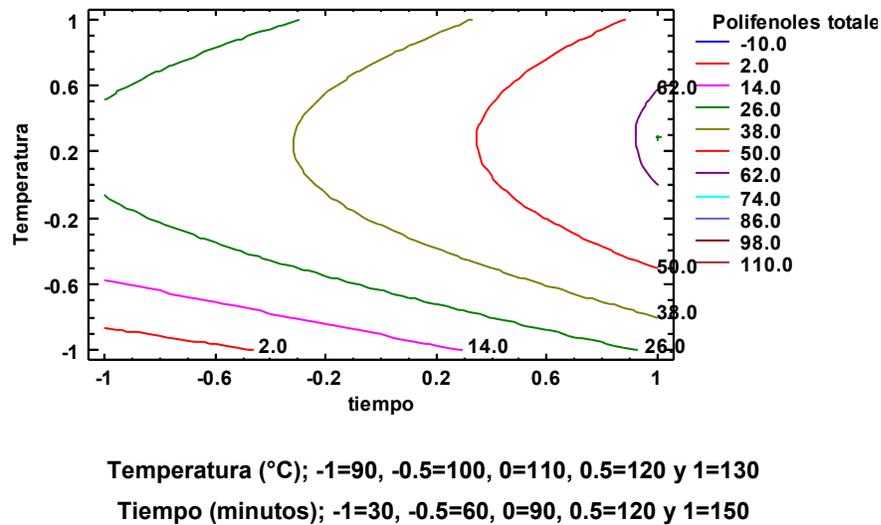
**Figura 30.** Efecto de la temperatura y el tiempo en la optimización de PNE de amaranto.

Se obtuvo un máximo de polifenoles de  $93.11 \pm 5.18$  mg eq AG/g, empleando una temperatura de  $120^{\circ}\text{C}$  en el reactor y manteniéndolo por 150 minutos. Esta concentración de PNE es mayor a lo reportado por Arce (2012), para una muestra de rastrojo de amaranto sometida a hidrólisis ácida en autoclave. Esto se puede deber a que en el reactor se tiene el control exacto de temperatura y tiempo de la reacción, mientras que en autoclave puede ser inexacto el registro de los parámetros.

Mediante el programa estadístico STATGRAPHICS, se pudo realizar la optimización que se muestra en la figura 31. Se puede observar que teóricamente el óptimo se encuentra en las a una temperatura de  $116^{\circ}\text{C}$  manteniéndolo con un tiempo de 130 minutos. El modelo ajustado a los datos experimentales fue el siguiente:

$$\text{Polifenoles totales} = 42.0637 + 17.6341 \cdot \text{tiempo} + 11.1926 \cdot \text{Temperatura} + 2.31886 \cdot \text{tiempo}^2 + 1.4055 \cdot \text{tiempo} \cdot \text{Temperatura} - 21.8775 \cdot \text{Temperatura}^2$$

Este modelo presenta una  $R^2=72.05\%$  y una  $R^2$  ajustada =  $70.825\%$ .

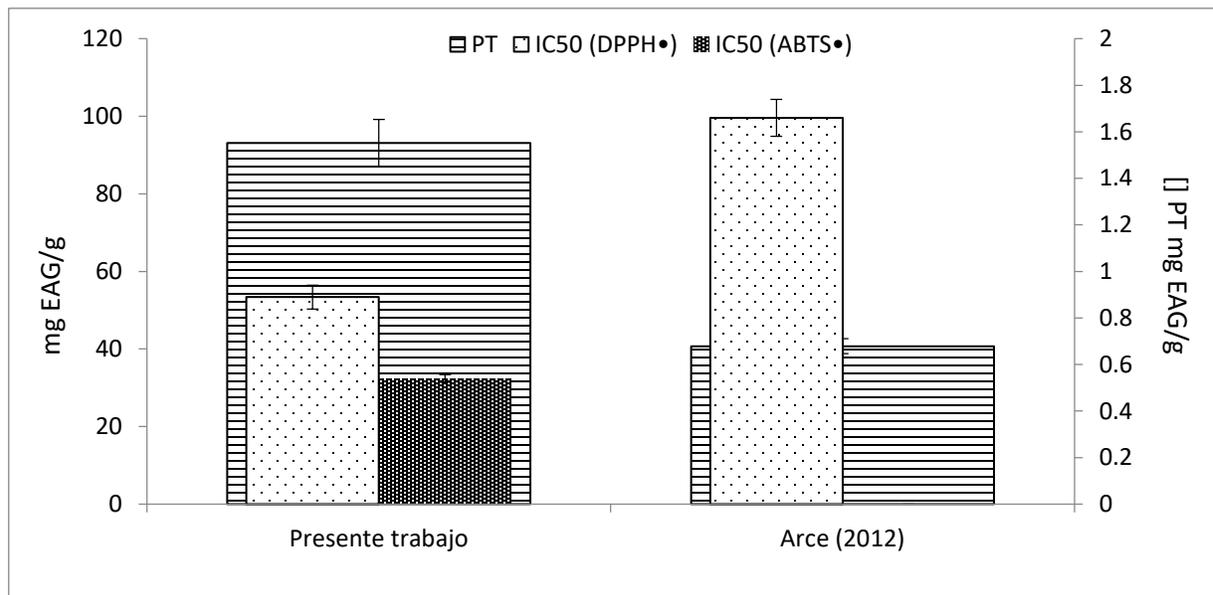


**Figura 31.** Gráfica de contorno de la superficie de respuesta de la optimización de la extracción de PNE de amaranto.

Este modelo puede servir como base para futuras investigaciones acerca de la obtención de polifenoles no extraíbles de materiales lignocelulósicos.

### 5.3.2 Evaluación de la actividad antioxidante de PNE

Se determinó la actividad antioxidante en las condiciones óptimas, y se obtuvo un  $IC_{50}$  sobre el DPPH• de  $0.89 \pm 0.05$  mg eq AG/g y un  $IC_{50}$  sobre el ABTS• de  $0.54 \pm 0.017$  mg eq AG/g (Figura 32). Estos resultados muestran que los hidrolizados que contienen PNE de la planta de amaranto, extraídos bajo las condiciones de estudio presentan actividad antioxidante importante, y que es mejor que de los PNE extraídos en autoclave.



**Figura 32.** Evaluación de la actividad antioxidante de PNE de amaranto.

Ensayos de actividad antioxidante de extractos de PE, mediante uso de solventes, de la planta de amaranto, coinciden en que la planta de amaranto contiene compuestos polifenólicos con actividad antioxidante (Kraujalis, Venskutonis, Kraujalienė, & Pukalskas, 2013). Hasta el momento no hay trabajos relacionados con la extracción de PNE de la planta de amaranto.

Los compuestos fenólicos que se encuentran en los PNE, son una opción recomendable para incluir en la dieta humana ya que presentan una actividad antioxidante importante, son extraídos de una fuente natural. Además se ha reconocido en los polifenoles de fuentes naturales, una amplia variedad de funciones biológicas que se relacionan principalmente a la modulación de la carcinogénesis (Dai & Mumper, 2010) y de otras enfermedades crónico degenerativas.

### 5.3.3 Identificación de polifenoles en PNE.

De los PNE de la planta de amaranto, obtenidos anteriormente, se reconoce que tiene hasta un 93.11 mg eq AG/g de polifenoles totales, esta aseveración engloba a cualquier compuesto que tenga un grupo fenol. Sin embargo se hace importante reconocer cuales son estos polifenoles que se encuentran mezclados y que dan un efecto sinérgico de la actividad antioxidante.

Como primera opción se realizó un análisis por HPLC de dichos compuestos. Este análisis mostro un cronograma (Figura 33) con diversos picos, dentro de los que destacan dos. El primero tiene un tiempo de retención de 5.3 minutos correspondiente al tiempo de retención del estándar de ácido gálico, y el segundo, que es el que tiene el área más grande, presenta un tiempo de retención de 7.8 minutos, correspondiente al tiempo en el que salió el estándar de ácido ferúlico. Los demás picos no se pudieron asociar a los demás estándares evaluados, ya que sus tiempos de retención diferían. Con este análisis se puede sospechar de que en la muestra de PNE, se encuentra presente el ácido gálico y el ácido ferúlico.

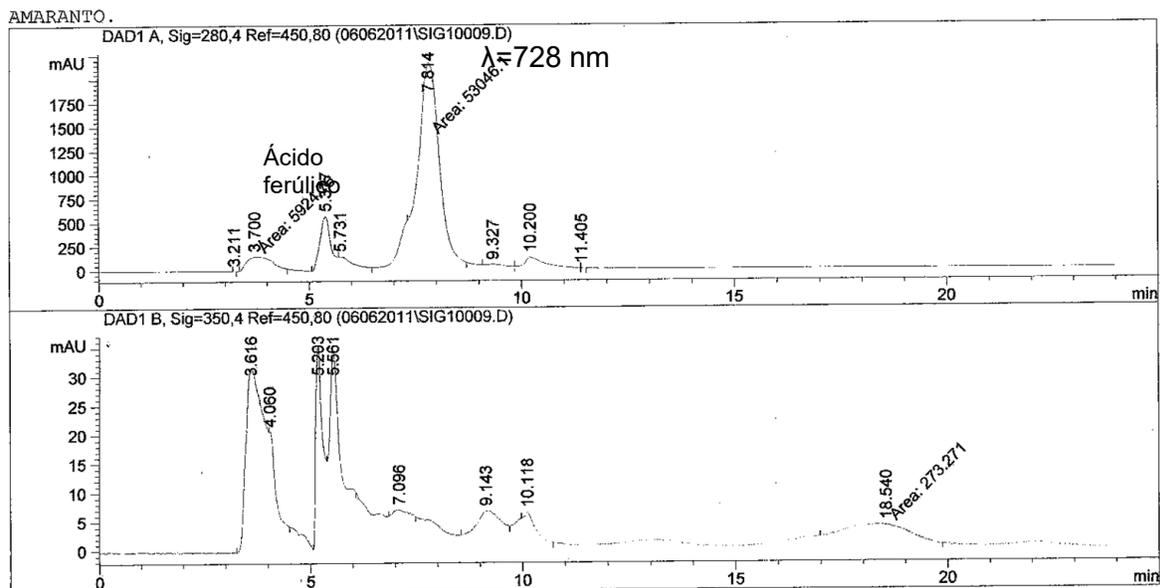
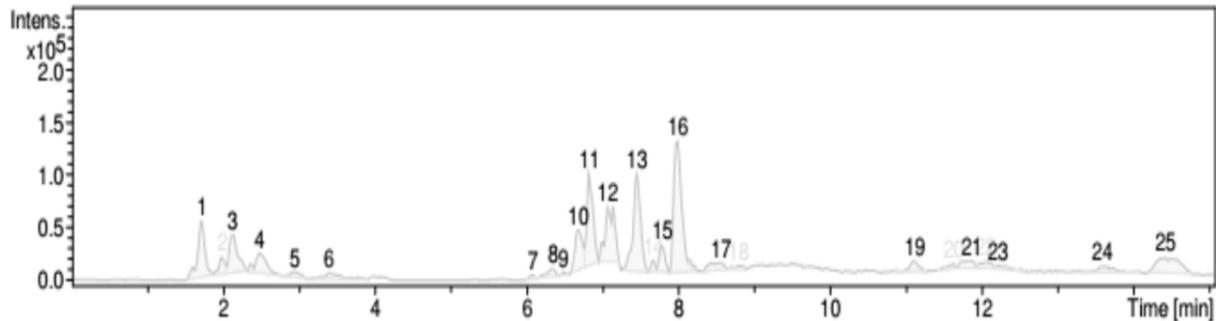


Figura 33. Espectro de HPLC correspondiente a PNE de amaranto

Para tener mayor certidumbre sobre los compuestos polifenólicos que contienen la muestra de PNE del amaranto, se realizó un segundo ensayo en un cromatógrafo microOTOF, donde se detectaron las masas de los picos más representativos en la Figura 34.



**Figura 34.** Espectro HPLC–DAD–MS correspondiente a PNE de amaranto.

El ácido 4-hidroxibenzoico, ácido ferúlico, ácido gálico, rutinoside y el kaempferol, fueron identificados en los PNE de la planta de amaranto, midiendo su masa y tiempo de retención (Tabla 12). Se puede observar que mediante esta técnica se pudo hacer una mejor separación de los compuestos fenólicos que por HPLC. El compuesto que está en mayor concentración es el ácido gálico, seguido del 4-hidroxibenzoico. Es importante mencionar que debido a que los PNE fueron sometidos a una hidrólisis, estos ya no presentan el grupo glicosilo característico. Además por efecto de la hidrólisis se puede suponer que se descompuso el compuesto nicotiflorin en rutinoside y kaempferol.

**Tabla 12.** Propiedades de los compuestos detectados por HPLC-DAD-MS de PNE de amaranto.

No pico	TR (min)	Área	m/z	Compuesto
3	2.1	277566	132.99	4-hidroxibenzoico
9	6.5	11309	193.02	Ácido ferúlico
12	7.1	463758	172.990	Ácido gálico
15	7.8	124693	327.21	Rutinoside
24	13.6	89634	297.14	Kaempferol

A pesar de que se ha reportado que la Rutina (24.5 g/Kg de hoja seca) es un compuesto común de encontrar en los extractos polifenólicos de amaranto (Kraujalis et al., 2013), este polifenol

es considerado como PE, por lo que no es de esperar que se encuentre en los PNE. Además también se han informado que en brotes de amaranto, se encuentran el ácido gálico, p-cumárico y ácido siríngico (Paško, Sajewicz, Gorinstein, & Zachwieja, 2008). Es reconocido que el contenido de polifenoles en las diferentes variedades dependen de diversos factores como el genotipo, el clima las condiciones de suelo etc. (Steffensen et al., 2011).

### **5.4 Conclusiones.**

La máxima extracción de polifenoles no extraíbles de la planta de amaranto, se obtiene cuando se da un tratamiento térmico a los 120 °C manteniéndolo durante 150 minutos, bajo condiciones controladas, esta mezcla de polifenoles extraídos de la lignina de la pared celular de las células vegetales del rastrojo de amaranto presentan una acción sinérgica sobre la actividad antioxidante presentada. Los polifenoles que se encuentran en la mezcla son el ácido gálico, ácido 4-hidroxibenzoico, el ácido ferúlico y el Kaempferol. Estos polifenoles pueden servir como materia prima en la industria alimentaria, ya que los consumidores prefieren a los antioxidantes naturales sobre los sintéticos.

**CAPÍTULO VI**  
**INCLUSIONES  $\beta$ -CICLODEXTRINA-POLIFENOL**

## 6 INCLUSIONES B-CICLODEXTRINA-POLIFENOL.

### 6.1 Objetivo.

Caracterizar la formación de un complejo de inclusión  $\beta$ -ciclodextrina-polifenol en un sistema modelo.

### 6.2 Materiales y métodos.

#### 6.2.1 Modelado molecular de complejos de inclusión.

El modelado de los complejos de inclusión se realizó de acuerdo a la metodología seguida por Bermúdez-Lugo (2012) (Bermúdez-Lugo, 2012 ). Se utilizó el programa AutoDock 4.2 en plataforma Linux, con computadora personal a 1.5 GHz con 512 Mb de memoria RAM. El procedimiento consistió en crear archivos de programa AutoDockTool 1.5.6, el cual incluía un archivo con la estructura en tercera dimensión los siguientes compuestos polifenólicos: ácido cafeico, ácido cinámico, catequina, ácido p-cumárico, ácido elágico, epicatequina, ácido ferúlico, flavona, ácido gálico, isoflavona, kaempferol, ácido sinapínico, quercitina, resveratrol, y vainillina.

La geometría molecular de la  $\beta$ -CD se obtuvo de Protein Data Bank (PDB ID: 1GVI), las estructuras tridimensional de los polifenoles fueron creadas en formato \*mol2; el archivo \*mol2 fue modificado, eliminando los átomos de hidrógeno excepto los que tienen la capacidad de formar puentes hidrógeno, y se le adicionan cargas Gasteiger, se guardó en formato \*pdbqt. La  $\beta$ -CD fue tomada de la literatura en formato \*pdbqt.

Para las inclusiones se determinó los enlaces rotables y se guardaron en formato \*pdbqt, a continuación se corrió el programa AutoGrid para generar los mapas de afinidad, estos archivos se guardaron en formato \*gpf por el mismo programa. Por último se realizó el docking con AutoDoc4. La energía en los estudios de acoplamiento se calculó como una función de los cinco términos siguientes:

$$\begin{aligned} \Delta G = & \Delta G_{vfw} \sum_{i,j} \left( \frac{A_{i,j}}{r_{ij}^{12}} - \frac{B_{i,j}}{r_{ij}^6} \right) + \Delta G_{hbond} \sum_{ij} E(t) \left( \frac{C_{i,j}}{r_{ij}^{12}} - \frac{D_{ij}}{r_{ij}^{10}} \right) \\ & + \Delta G_{hbond} \sum_{ij} \frac{q_i q_j}{\epsilon (r_{ij}) r_{ij}} + \Delta G_{tor} N_{tor} \\ & + \Delta G_{sol} \sum_{ii} (S_i V_j + S_j V_i) e^{\left( \frac{-r_{ij}^2}{2\sigma^2} \right)} \end{aligned}$$

Dónde los cinco términos el lado derecho de G, son coeficientes determinados empíricamente utilizando regresión lineal mediante el análisis de un conjunto de complejos de  $\beta$ -CD-polifenol con constantes de unión establecidos en el programa.

### 6.2.2 Formación de complejos de inclusión.

La formación de los complejos de inclusión se realizaron utilizando ácido gálico (AG) y ácido ferúlico (AF) de Sigma-Aldrich®, con pureza de 99%, como estándares. Se utilizó como antioxidantes naturales a los hidrolizados de la planta de amaranto, obtenidos previamente en el apartado 7.6. Las concentraciones que se empleadas fueron de acuerdo a lo reportado Julian (2007) y Lu (2009) (Jullian, Moyano, Yañez, & Olea-Azar, 2007; Lu et al., 2009), para los estándares fue de 0.03mM, para los hidrolizados de 0.01g (base seca) y para la  $\beta$ -CD de 10mM. Se realizaron los complejos de inclusión en seco de acuerdo a Wang (2011) (Wang, Cao, Sun, & Wang, 2011), adicionando el huésped con la  $\beta$ -CD, se agitó vigorosamente durante 30 min. Transcurrido el tiempo se hidrataron con 100 mL a una temperatura de 27 °C. Para maximizar la degradación fotoquímica y la oxidación por el O<sub>2</sub>, se mantuvieron en agitación constante y sin resguardo de la luz durante un periodo de 7 semanas. Se tomó muestra cada 7 días. Se determinó el contenido de polifenoles totales, y en cada punto de muestreo se determinó la actividad antioxidante, por los métodos mencionados en el apartado 7.8.1 y 7.8.2. Como muestra control, se sometió a los hidrolizados y estándares, por separado, al mismo procedimiento.

Se registró espectros de absorción UV-visible para el AG, AF y  $\beta$ -CD, para evaluar la formación del complejo de inclusión, se observó mediante el uso de un espectrofotómetro UV-visible (Thermo, modelo Genesys 10-S, USA). Cada muestra fue escaneada, respectivamente, en el rango de 236 a 500 nm, usando una celda de 1 cm, para obtener los espectros de absorción UV-visible.

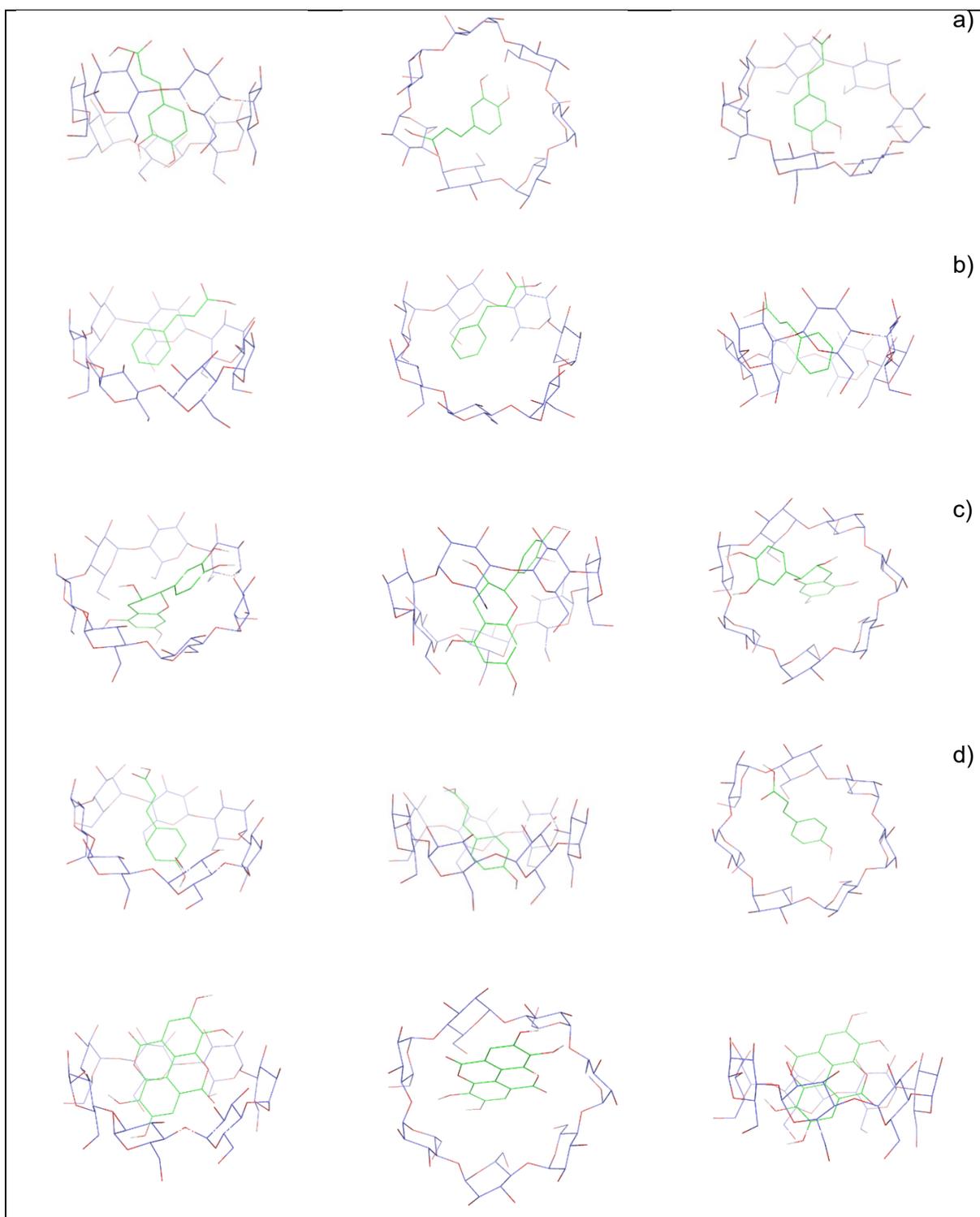
### **6.3 Resultados.**

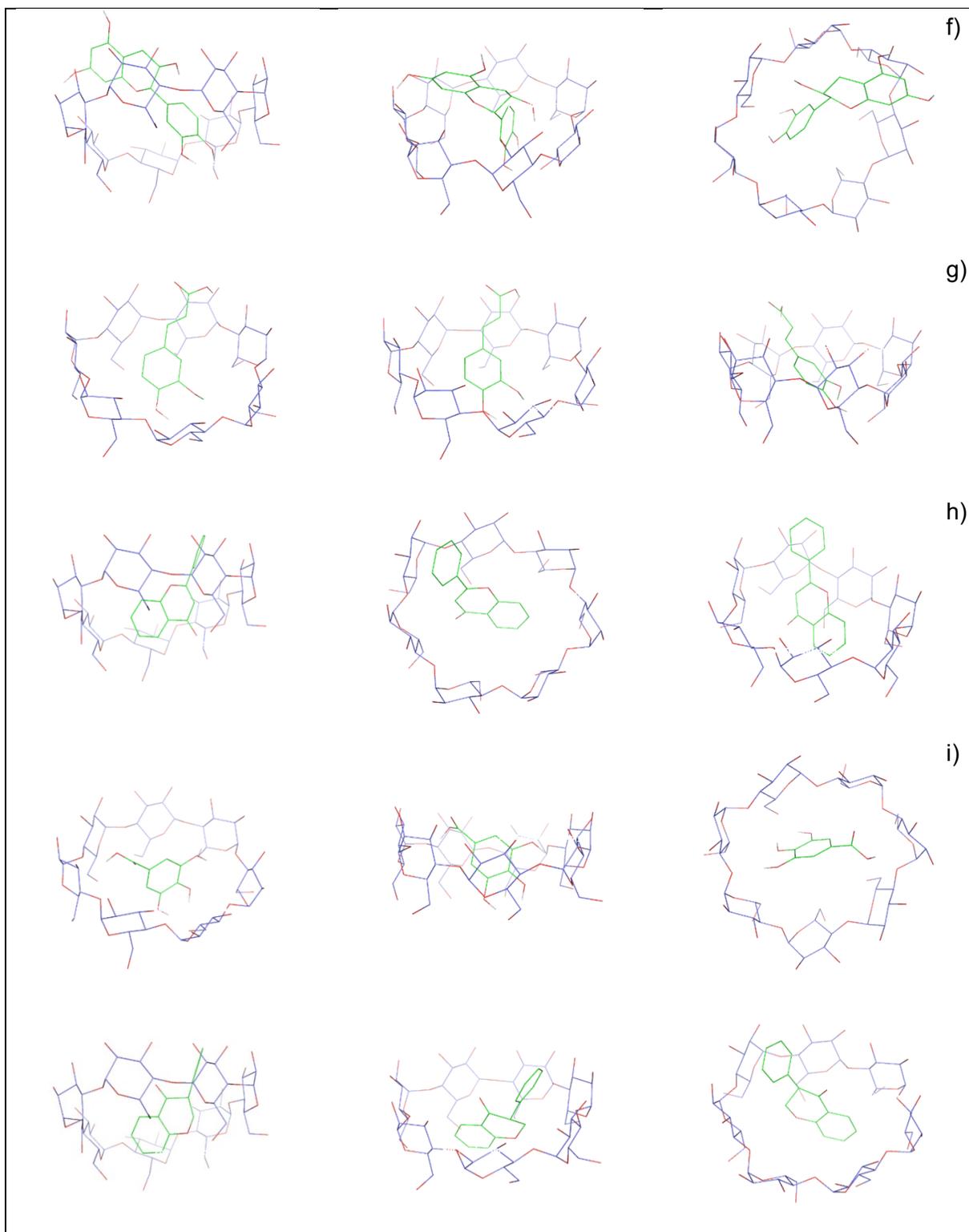
El modelamiento molecular de inclusiones  $\beta$ -ciclodextrina con diferentes polifenoles se muestran de manera esquemática, desde 3 ángulos diferentes, en la figura 35.

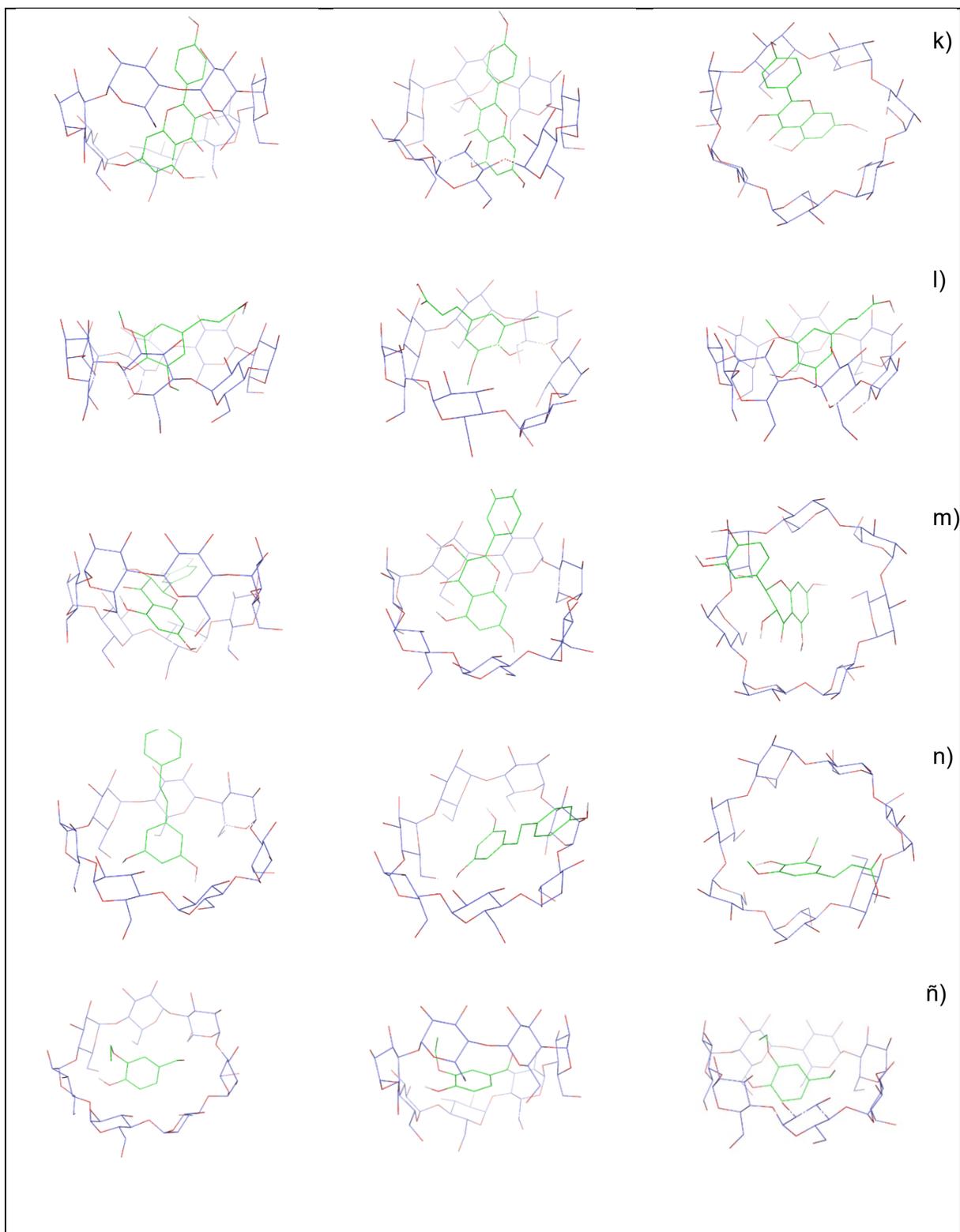
Cada uno de los complejos de inclusión formados presentaron distintos niveles de energía, entre más negativo sea el valor de la energía de unión el complejo tiende a ser más estable.

Estudios de simulación preliminares, se prefieren para hacer predicciones de los posibles resultados obtenidos con éstos se puede evitar la pérdida de tiempo en la realización de experimentos que no sean posibles.

En la tabla 13, se muestra que de los polifenoles estudiados, los que presentan una menor energía de unión son: el kaempferol, epicatequina, ácido elágico, flavona y la quercitina. Sin embargo el ácido gálico y el ácido ferúlico presentan energías que favorecen la unión con la  $\beta$ -CD. Resultados similares se observaron en un estudio de inclusión  $\beta$ -CD/ácido cafeico reportado por Górnas (Górnas, Neunert, Baczyński, & Polewski, 2009). Dados estos resultados se puede pasar a la fase experimental.







**Figura 35.** Modelos de inclusión de  $\beta$ -CD-polifenoles a) Ácido cafeico, b) Ácido cinámico, c) Catequina, d) Ácido cumárico, e) Ácido elágico, f) Epicatequina, g) Ácido ferulico, h) Flavona, i) Ácido gálico, j) Isoflavona, k) Kaempferol, l) Ácido psinápico, m) Quercitina, n) Resveratrol y ñ) Vainillina

### 6.3.1 Formación de complejos $\beta$ -CD/polifenoles.

La espectroscopia UV-visible es una herramienta importante para estudiar la formación de complejos de antioxidantes con  $\beta$ -CD. La  $\beta$ -CD no presenta absorción UV. Los estándares de ácido gálico (AG) y ácido ferúlico (AF) utilizados para a formación de los complejos de inclusión in vitro, fueron seleccionados por ser de los más utilizados en la industria de los alimentos por su alta actividad antioxidante (Dorta, González, Lobo, Sánchez-Moreno, & de Ancos, 2014).

Se ha observado que el AG induce la muerte celular de células de cáncer por apoptosis, la inhibición de la expresión génica del efecto proinflamatorio por la artritis reumatoide (Yoon et al., 2013), como neuroprotector frente al estrés oxidativo (Mansouri et al., 2013) entre otros.

**Tabla 13.** Evaluación de la energía libre de Gibbs de la formación de complejos de inclusión  $\beta$ -CD/polifenol.

Inclusión $\beta$ -CD/Huésped	Valores de energía libre (Kcal/mol)			
	Energía de Unión	Energía intermolecular	Energía interna	Energía Torsional
Ácido cafeico	-4,73	-6,22	-0,44	1,49
Ácido cinámico	-4,01	-4,91	-0,05	0,89
Catequina	-6,8	-8,59	-0,26	1,79
Ácido p-cumárico	-4,35	-5,54	-0,03	1,19
Ácido elágico	-6,58	-7,77	-0,69	1,19
Epicatequina	-6,7	-8,49	-0,26	1,79
Ácido ferúlico	-4,49	-5,98	-0,43	1,49
Flavona	-6,18	-6,48	-0,25	0,3
Ácido gálico	-4,22	-5,71	-0,41	1,49
Isoflavona	-5,9	-6,2	-0,31	0,3
Kaempferol	-6,89	-8,08	-0,44	1,19
Ácido sinapínico	-4,38	-6,17	-0,6	1,79
Quercitina	-6,32	-8,11	-0,94	1,79
Resveratrol	-5,73	-7,22	-0,22	1,49
Vainillina	-3,95	-5,15	-0,37	1,19

Así mismo, el AF, se perfila como candidato para la inhibición de la Listeria presente en alimentos de preparación instantánea (Takahashi, Kashimura, Koiso, Kuda, & Kimura, 2013),

---

ha demostrado inhibir la expresión y/o actividad de las enzimas citotóxicas, incluyendo óxido nítrico sintasa inducible, caspasas y la ciclooxigenasa-2, por lo que se ha propuesto como un tratamiento potencial para muchos trastornos incluyendo la enfermedad de Alzheimer, cáncer, enfermedades cardiovasculares, diabetes mellitus y enfermedad de la piel (Mancuso & Santangelo, 2014).

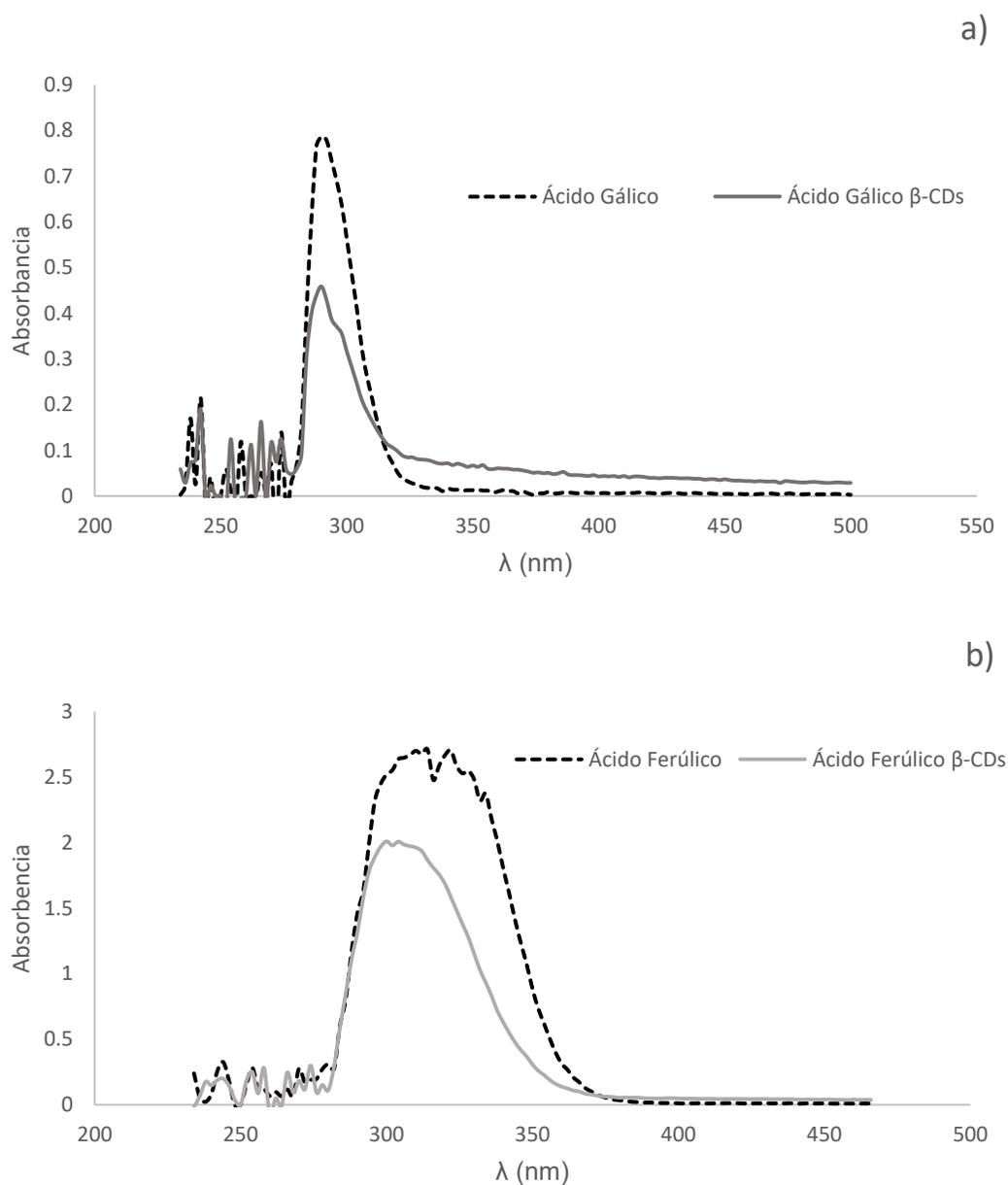
Los espectros de absorción obtenidos de los estándares de AG y AF y sus respectivos complejos con la  $\beta$ -CD se presentan en la Figura 36.

La formación de complejos de inclusión se puede identificar mediante el estudio de su absorción a lo largo de un intervalo de longitudes de onda, donde se muestra el cambio de intensidad en los puntos máximos de la molécula huésped, cuando se forma el complejo de inclusión. En la formación de los complejos de inclusión, tanto en el caso del AG y AF, se muestra que existe la formación de complejos de inclusión con la  $\beta$ -CD. Se observó que para el complejo AG- $\beta$ -CD se obtuvo una disminución del 41% en la absorbancia del punto máximo a una  $\lambda=290\pm 2$  (de 0.779 a 0.459), con el efecto hipocrómico esperado el cual se muestra en la Figura 30 a. En la figura 30b, se muestra el AF y su complejo con la  $\beta$ -CD.

En la gráfica se muestra la reducción de hasta un 26% en la absorbancia registrada en el punto máximo, sin embargo en este caso se observó además desplazamiento de 14 unidades en la longitud de onda, de 314 nm a 300 nm.

Los espectros de absorción de los complejos de inclusión de los estándares de AG y AF con  $\beta$ -CD fueron similares a lo reportado por Wang (2011) (Wang et al., 2011) donde realizan la formación de inclusión de AF con HP- $\beta$ -CD. Zhao et al. (2010) (Zhao, Wang, Yang, & Tao, 2010) reportó un cambio en la longitud de onda de 2 nm para el ácido clorogénico después de la inclusión con  $\beta$ -CD.

Por otro lado, Górnas et al. (2009) (Górnas et al., 2009) reportó que se observó un desplazamiento batocrómico de los picos de absorción de ácidos clorogénico y cafeico, en presencia de  $\beta$ -CD. Estos resultados sugieren la posibilidad de una interacción entre el AG y FA con la  $\beta$ -CD como resultado de una interacción parcial de los electrones cromóforos en la cavidad de la  $\beta$ -CD, lo que indica que tanto el AG y el AF son capaces de formar complejos de

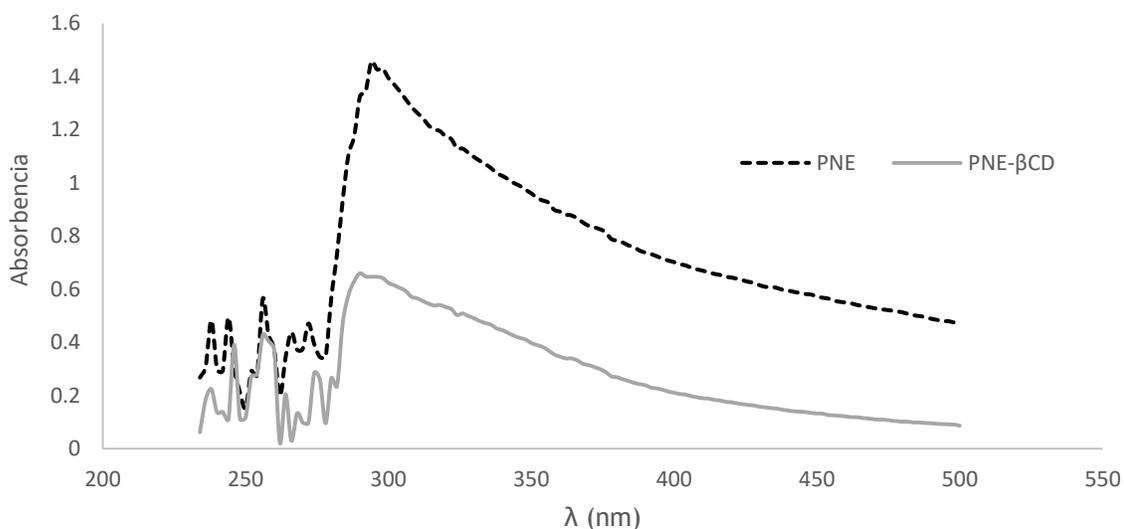


**Figura 36.** Patrón de absorbencia de estándares de polifenoles y su complejo con  $\beta$ -CD.

inclusión con  $\beta$ -CD. Además, los espectros disponen de un pico máximo alrededor de 300 nm, que no se ve afectado por la  $\beta$ -CD. De acuerdo a lo encontrado en la caracterización de los polifenoles no extraíbles de la planta de amaranto, tienen la característica de ser polifenoles naturales que presentan la desventaja de ser mucho más susceptibles a perder su actividad

antioxidante en comparación con los polifenoles sintéticos. Entonces surge la necesidad de recurrir a la formación de complejos de inclusión para que conserven por más tiempo su actividad antioxidante.

Los espectros de absorción obtenidos de los hidrolizados PNE de la planta de amaranto y sus respectivos complejos con la  $\beta$ -CD se presentan en la Figura 37. Como en el caso de los estándares, la formación de complejos de inclusión se puede identificar mediante el estudio de su absorción a lo largo de un intervalo de longitudes de onda. Se observó que para el complejo PNE/ $\beta$ -CD se obtuvo una disminución del 54.6%, recorriéndose la absorbancia del punto máximo de una  $\lambda=296$  a  $\lambda=294$  (de 1.427 a 0.648), con el efecto hipocrómico esperado, que se muestra en la Figura 36 a, en este sentido, se están incluyendo los polifenoles de la fase acuosa de los hidrolizados como el ácido gálico.



**Figura 37.** Patrón de absorción de polifenoles no extraíbles de la planta de amaranto, con su respectivo complejo con  $\beta$ -CD.

En lo que respecta a la inclusión de polifenoles no extraíbles obtenidos de fuentes naturales con, no existen trabajos. Sin embargo son limitados los estudios que han incluido polifenoles extraíbles con la  $\beta$ -CD, tal es el caso de extracto café (rico en ácido cafeico y clorogénico) en  $\beta$ -CD (Górnas et al., 2009). Sin embargo no basta con decir que se ha realizado la inclusión, se debe evaluar su actividad antioxidante.

### 6.3.2 Evaluación de la actividad antioxidante de los complejos $\beta$ -CD/polifenol.

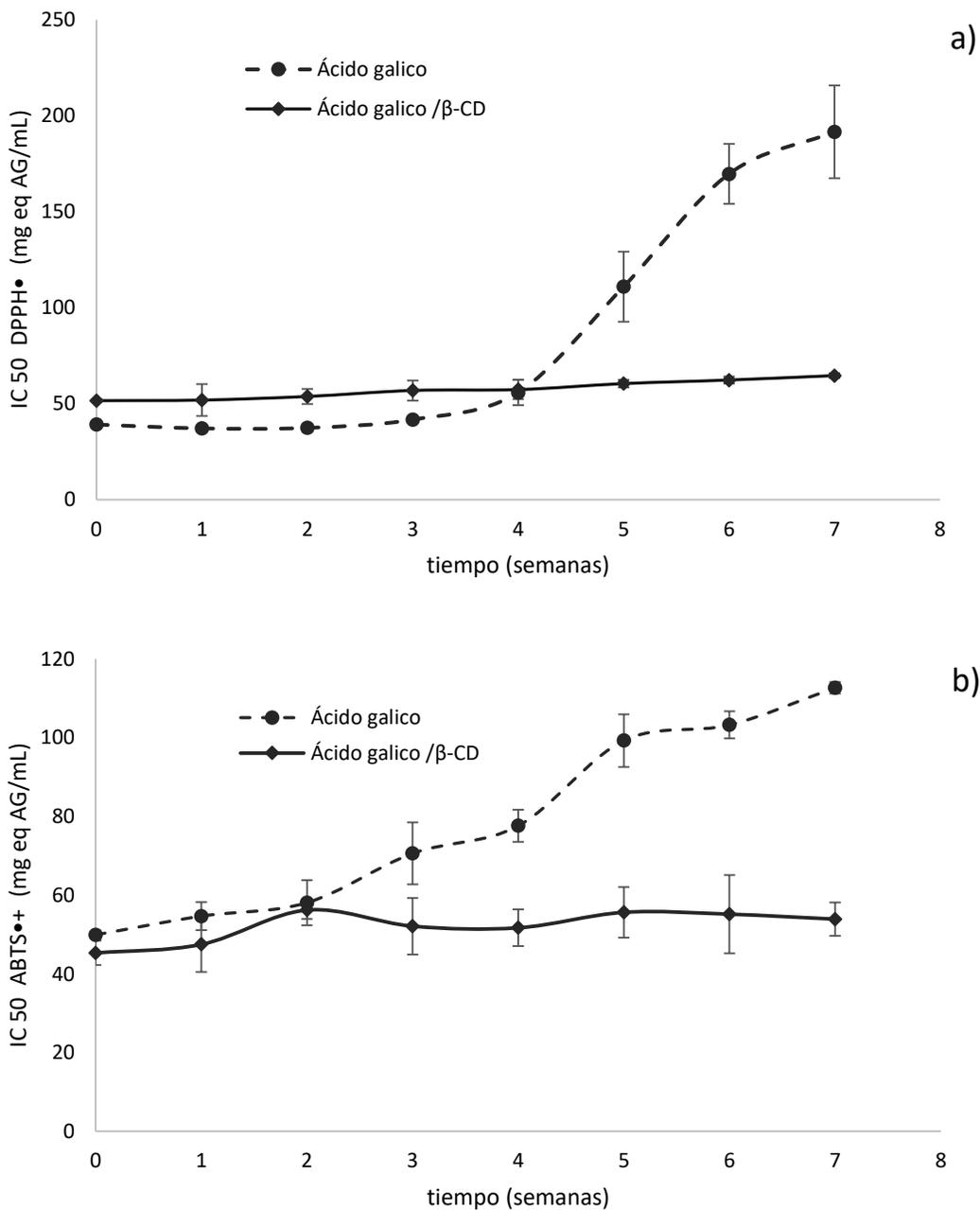
La inclusión molecular con el uso de ciclodextrina, forma complejos estables. Se ha observado que cuando se realizan inclusiones con polifenoles se incrementa su solubilidad de estos. Además, sus actividades antioxidantes aumentaron (Mangolim et al., 2014) en algunos casos o se mantienen por más tiempo. Los resultados en el presente estudio demuestran, que el ácido gálico sin un agente complejante, pierde su actividad sobre el DPPH• a la cuarta semana, mientras que si está en un complejo de inclusión con la  $\beta$ -CD, su actividad se mantiene de manera constante, durante el periodo de evaluación (Figura 38 a). Sin embargo la actividad de ácido gálico sobre el ABTS•, la pierde a partir de las dos semanas, siendo el complejo más estable (Figura 38 b).

Ahora, para el caso del ácido ferúlico, cuando se evalúa su actividad antioxidante para la reducción del radical DPPH•, este es totalmente inestable desde la primer semana, y va perdiendo su actividad gradualmente (Figura 39 a). Lo que no ocurre si esta acomplejada. Por otro lado, si se evalúa su actividad sobre el ABTS•, se observa que el ácido ferúlico no pierde significativamente su actividad en las primeras 3 semanas, sin embargo a partir de la cuarta su perdida es significativa (Figura 39 b). Igual en los casos anteriores se demuestra que cuando forma la inclusión con la  $\beta$ -CD, esta actividad dura por todo el tiempo de estudio.

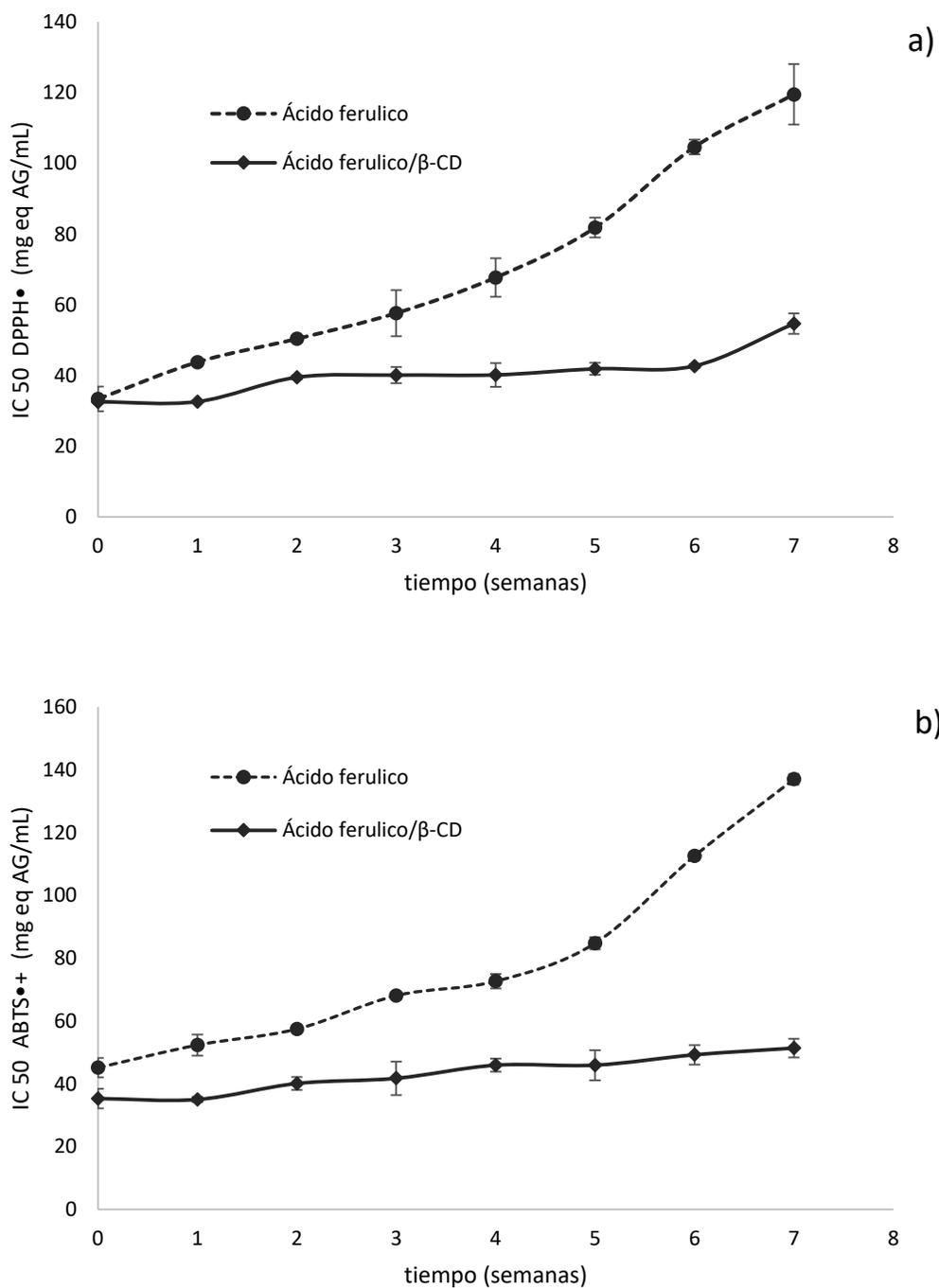
Estos resultados demuestran que la  $\beta$ -CD es una molécula que sirve como resguardo del ácido gálico y ácido ferúlico, y que protege de agentes oxidantes como la luz, las radiaciones UV, el oxígeno del ambiente entre otros. Es posible que la actividad biológica de los polifenoles se pueda conservar a través de los procesos metabólicos que sufren al ser ingeridos en la dieta.

En la evaluación de la actividad antioxidante de PNE del amaranto, se observa que se asemeja al comportamiento del ácido gálico, probablemente a que es el polifenol el cual tiene en mayor concentración. Sin embargo al tener otros polifenoles éstos hacen que tenga ligeras variaciones. Ya que la perdida de la actividad es mucho menor que en el estándar de ácido gálico. (Figura 40 a y b).

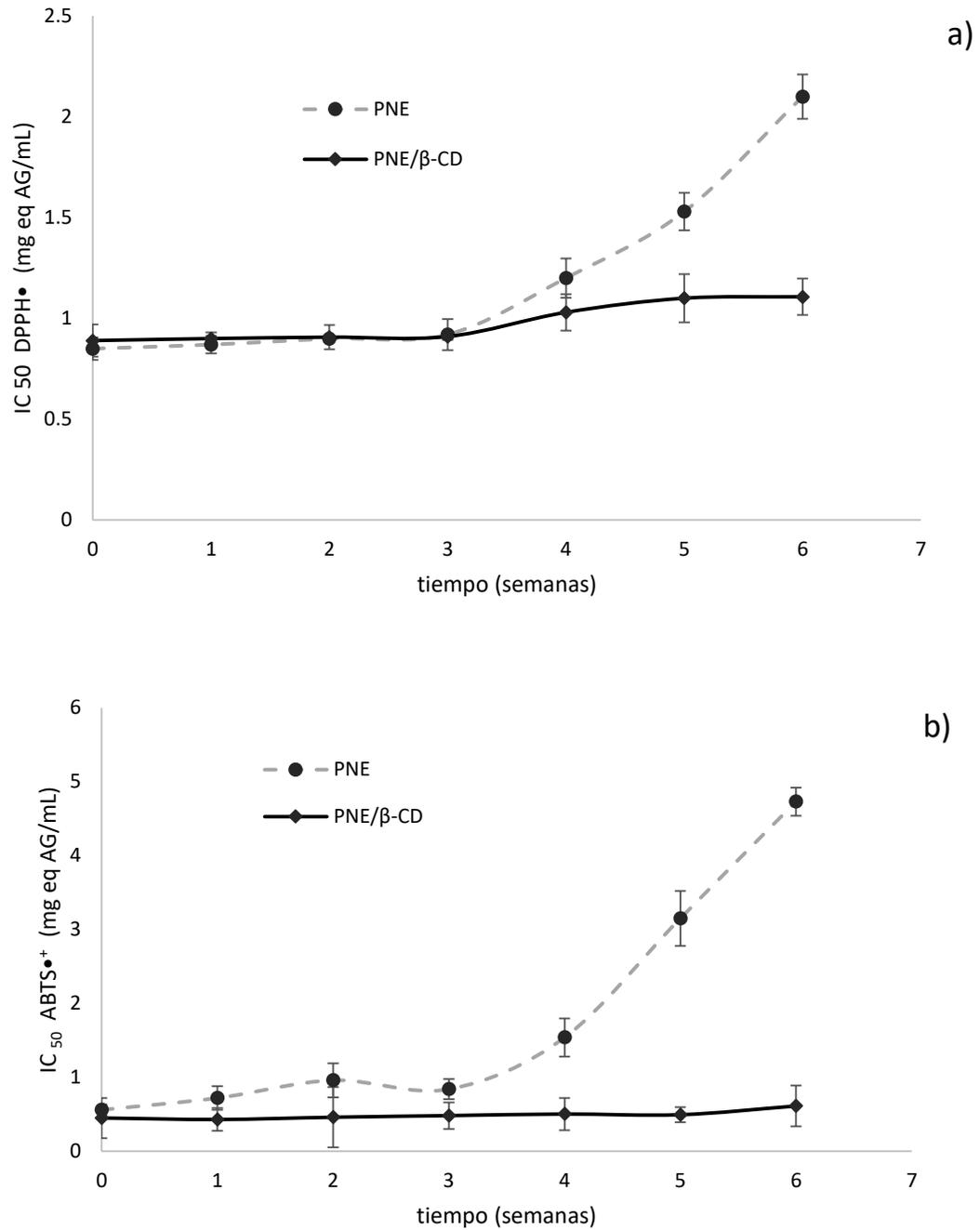
En el caso de los PNE, se encuentran estables durante las 7 semanas de estudio, ya que no se presentó una pérdida en la actividad antioxidante, evaluada en los sistemas de óxido reducción.



**Figura 38.** Evaluación de la actividad antioxidante del ácido gálico y sus complejos con  $\beta$ -CD sobre a) DPPH• y b) ABTS•.



**Figura 39.** Evaluación de la actividad antioxidante del ácido féulico y sus complejos con  $\beta$ -CD sobre a) DPPH• y b) ABTS•.



**Figura 40.** Evaluación de la actividad antioxidante de PNE de la planta de amaranto y sus complejos con  $\beta$ -CD sobre a) DPPH• y b) ABTS•.

#### **6.4 Conclusiones.**

La eficacia en la encapsulación de CDs, se ve afectada por los materiales del núcleo, esto es cuanto mayor sea la hidrofobicidad la molécula es más pequeña por lo tanto mayor es la afinidad para los CDs. Por otro lado, los diferentes materiales de la pared afectan a la capacidad de encapsulación para el mismo material del núcleo.

Mientras que el ácido gálico, el ácido ferúlico y los PNE de la planta de amaranto, resultaron ser moléculas huésped afines a la  $\beta$ -CD, la estabilidad de la actividad antioxidante debida a la protección que encuentra la molécula huésped dentro de la cavidad hidrofóbica, hace que se mantengan los enlaces de tipo puente hidrogeno.

Por lo tanto, los PNE al estar incluidos en la  $\beta$ -CD no pierden su actividad antioxidante.

## 7 CONCLUSIONES GENERALES.

En el estudio de la cinética de la fermentación, se reconoce al almidón de amaranto como un sustrato con mayor digestibilidad por las CGTasas de *Bacillum megaterium* que el almidón de maíz, al presentar mejores rendimientos tanto de crecimiento bacteriano, como de producción de enzima, a través de un proceso de fermentación sumergida.

La CGTasa parcialmente purificada presentó una actividad específica de  $3946 \text{ Umg}^{-1}$ , con un peso molecular aparente aproximadamente de 66KDa.

La enzima purificada con un óptimo pH de 8 y una temperatura de  $50 \text{ }^\circ\text{C}$ , así mismo tiene una alta afinidad por el almidón de amaranto como se muestra en sus valores de  $K_m$  y  $K_{cat}$ .

Por lo tanto el almidón de amaranto es un buen candidato para ser utilizado como sustrato en la síntesis de CGTasa y de  $\beta$ -ciclodextrinas.

Las  $\beta$ -ciclodextrinas son capaces de formar complejos de inclusión con polifenoles no extraíbles de la planta de amaranto, quienes mantienen su actividad antioxidante hasta por 7 semanas.

---

## 8 REFERENCIAS.

- Acosta, H. A., Villada, H. S., Torres, G. A., & Ramírez, J. G. (2006). Morfología Superficial de Almidones Termoplásticos Agrario de Yuca y Nativo de Papa por Microscopía Óptica y de Fuerza Atómica. *Información tecnológica*, 17, 63-70.
- Ahmed, E., & El-Refai, H. A. (2010). Cyclodextrin glucosyltransferase production by *Bacillus megaterium* NCR: evaluation and optimization of culture conditions using factorial design. *Indian journal of microbiology*, 50(3), 303-308.
- Al-Marzouqi, A., Jobe, B., Corti, G., Cirri, M., & Mura, P. (2007). Physicochemical characterization of drug-cyclodextrin complexes prepared by supercritical carbon dioxide and by conventional techniques. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 57(1-4), 223-231.
- Alves-Prado, H., Carneiro, A., Pavezzi, F., Gomes, E., Boscolo, M., Franco, C., & Da Silva, R. (2008). Production of cyclodextrins by CGTase from *Bacillus clausii* using different starches as substrates *Biotechnology for Fuels and Chemicals* (pp. 123-133): Springer.
- Andrade-Mahecha, M. M., Tapia-Blácido, D. R., & Menegalli, F. C. (2012). Physical–chemical, thermal, and functional properties of achira (*Canna indica* L.) flour and starch from different geographical origin. *Starch-Stärke*, 64(5), 348-358.
- AOAC, W. H. (1990). Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists. *Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA, USA*.
- Arce Vazquez, M. B. (2011). *Obtención de compuestos biofuncionales a partir del material lignocelulósico de *Amaranthus hypochondriacus* L.* Retrieved from México:

- 
- Arellano Vázquez, J. L., & Galicia Franco, J. A. (2007). Rendimiento y características de planta y panoja de amaranto en respuesta a nitrógeno y cantidad de semilla. *Agricultura técnica en México*, 33, 251-258.
- Armbruster, F. C. (1988). *Use of Cyclohexane in the Production of Pure alpha-and beta-Cyclodextrins*. Paper presented at the Proceedings of the Fourth International Symposium on Cyclodextrins.
- Astray, G., Gonzalez-Barreiro, C., Mejuto, J. C., Rial-Otero, R., & Simal-Gándara, J. (2009). A review on the use of cyclodextrins in foods. *Food Hydrocolloids*, 23(7), 1631-1640. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2009.01.001>
- Atanasova, N., Kitayska, T., Bojadjieva, I., Yankov, D., & Tonkova, A. (2011). A novel cyclodextrin glucanotransferase from alkaliphilic *Bacillus pseudocaliphilus* 20RF: Purification and properties. *Process Biochemistry*, 46(1), 116-122. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2010.07.027>
- Atanasova, N., Petrova, P., Ivanova, V., Yankov, D., Vassileva, A., & Tonkova, A. (2008). Isolation of novel alkaliphilic *Bacillus* strains for cyclodextrin glucanotransferase production. *Applied biochemistry and biotechnology*, 149(2), 155-167.
- Badui Dergal, S. (2006). Química de los alimentos.
- Baker, L., & Rayas-Duarte, P. (1998). Retrogradation of amaranth starch at different storage temperatures and the effects of salt and sugars 1. *Cereal chemistry*, 75(3), 308-314.
- Balasubramanian, S., Sharma, R., Kaur, J., & Bhardwaj, N. (2014). Characterization of modified pearl millet (*Pennisetum typhoides*) starch. *Journal of Food Science and Technology*, 51(2), 294-300.

- 
- Belščak-Cvitanović, A., Stojanović, R., Manojlović, V., Komes, D., Cindrić, I. J., Nedović, V., & Bugarski, B. (2011). Encapsulation of polyphenolic antioxidants from medicinal plant extracts in alginate–chitosan system enhanced with ascorbic acid by electrostatic extrusion. *Food research international*, 44(4), 1094-1101. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2011.03.030>
- Bender, H. (1977). Cyclodextrin glucanotransferase from *Klebsiella pneumoniae*. 2. Significance of the enzyme for the metabolism of cyclodextrins by *Klebsiella pneumoniae* M 5 al (author's transl). *Archives of microbiology*, 113(1-2), 49.
- Beta, T., Corke, H., Rooney, L. W., & Taylor, J. R. N. (2001). Starch properties as affected by sorghum grain chemistry. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81(2), 245-251. doi:10.1002/1097-0010(20010115)81:2<245::aid-jsfa805>3.0.co;2-s
- Biwer, A., Antranikian, G., & Heinzle, E. (2002). Enzymatic production of cyclodextrins. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59(6), 609-617. doi:10.1007/s00253-002-1057-x
- Blackwood, A. D., & Bucke, C. (2000). Addition of polar organic solvents can improve the product selectivity of cyclodextrin glycosyltransferase: Solvent effects on cgtase. *Enzyme and Microbial Technology*, 27(9), 704-708.
- Blanco, K., Lima, C. B., Monti, R., Martins, J., Jr., Bernardi, N., & Contiero, J. (2012). *Bacillus lehensis*—an alkali-tolerant bacterium isolated from cassava starch wastewater: optimization of parameters for cyclodextrin glycosyltransferase production. *Annals of Microbiology*, 62(1), 329-337. doi:10.1007/s13213-011-0266-x
- Blanco, K. C., de Moraes, F. F., Bernardi, N. S., VETTORI, M. H. P. B., Monti, R., & Contiero, J. (2014). Cyclodextrin Production by *Bacillus lehensis* Isolated

- 
- from Cassava Starch: Characterisation of a Novel Enzyme. *J. Food Sci*, 32, 48-53.
- Blanco, K. C., Moraes, F. F. d., Bernardi, N. S., Vettori, B., Palmuti, M. H., Monti, R., & Contiero, J. (2014). Cyclodextrin Production by *Bacillus lehensis* Isolated from Cassava Starch: Characterisation of a Novel Enzyme. *Czech Journal of Food Sciences*, 48-53.
- Bonilha, P. R. M., Menocci, V., Goulart, A. J., Polizeli, M. d. L. T. d., & Monti, R. (2006). Cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus licheniformis*: optimization of production and its properties. *Brazilian Journal of Microbiology*, 37(3), 317-323.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, 28(1), 25-30. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)
- Bunzel, M., Ralph, J., & Steinhart, H. (2005). Association of non-starch polysaccharides and ferulic acid in grain amaranth (*Amaranthus caudatus* L.) dietary fiber. *Molecular Nutrition & Food Research*, 49(6), 551-559. doi:10.1002/mnfr.200500030
- Calzetta Resio, A. N., Tolaba, M. P., & Suárez, C. (2009). Correlations between wet-milling characteristics of amaranth grain. *Journal of Food Engineering*, 92(3), 275-279.
- Conde, E., Gullón, P., Moure, A., Domínguez, H., & Parajó, J. C. (2009). Fractionation of industrial solids containing barley husks in aqueous media. *Food and Bioproducts Processing*, 87(3), 208-214. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.fbp.2009.03.007>

- 
- Contreras, H., Ramírez, C., Andrade, Á., Toriz, G., & Delgado, E. (2011). *Ciclodextrinas, Fenómenos de inclusión y modificación de fibras de celulosa* (E. Universitaria Ed.).
- Costa, H., Canto, S. d., Ferrarotti, S., & de Jiménez Bonino, M. B. (2009). Structure–function relationship in cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans* DF 9R. *Carbohydrate Research*, 344(1), 74-79. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.carres.2008.09.023>
- Cravotto, G., Binello, A., Baranelli, E., Carraro, P., & Trotta, F. (2006). Cyclodextrins as food additives and in food processing. *Current Nutrition & Food Science*, 2(4), 343-350.
- Crini, G. g. (2014). Review: A History of Cyclodextrins. *Chemical reviews*, 114(21), 10940-10975.
- Cheirsilp, B., Kitcha, S., & Maneerat, S. (2010a). Kinetic characteristics of  $\alpha$ -cyclodextrin production by cyclodextrin glycosyltransferase from newly isolated *Bacillus* sp. C26. *Electronic Journal of Biotechnology*, 13(4), 4-5.
- Cheirsilp, B., Kitcha, S., & Maneerat, S. (2010b). Kinetic characteristics of  $\beta$ -cyclodextrin production by cyclodextrin glycosyltransferase from newly isolated *Bacillus* sp. C26. *Electronic Journal of Biotechnology*, 13(4), 4-5.
- Cho, Y. J., Hwang, H. J., Kim, S. W., Song, C. H., & Yun, J. W. (2002). Effect of carbon source and aeration rate on broth rheology and fungal morphology during red pigment production by *Paecilomyces sinclairii* in a batch bioreactor. *J Biotechnol*, 95(1), 13-23. doi:S016816560100445X [pii]
- Choi, H., Kim, W., & Shin, M. (2004). Properties of Korean amaranth starch compared to waxy millet and waxy sorghum starches. *Starch-Stärke*, 56(10), 469-477.

- 
- Dai, J., & Mumper, R. J. (2010). Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*, *15*(10), 7313-7352.
- Del Valle, E. M. M. (2004). Cyclodextrins and their uses: a review. *Process Biochemistry*, *39*(9), 1033-1046. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0032-9592\(03\)00258-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0032-9592(03)00258-9)
- Deladino, L., Anbinder, P. S., Navarro, A. S., & Martino, M. N. (2008). Encapsulation of natural antioxidants extracted from *Ilex paraguariensis*. *Carbohydrate Polymers*, *71*(1), 126-134.
- Diaz-Godinez, G., Soriano-Santos, J., Augur, C., & Viniegra-Gonzalez, G. (2001). Exopectinases produced by *Aspergillus niger* in solid-state and submerged fermentation: a comparative study. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, *26*(5), 271-275.
- Diplock, A., Aggett, P., Ashwell, M., Borner, F., Fern, E., & Roberfroid, M. (1999). Scientific Concepts in Functional Foods in Europe: Consensus Document. *British Journal of Nutrition (United Kingdom)*.
- Dorta, E., González, M., Lobo, M. G., Sánchez-Moreno, C., & de Ancos, B. (2014). Screening of phenolic compounds in by-product extracts from mangoes (*Mangifera indica* L.) by HPLC-ESI-QTOF-MS and multivariate analysis for use as a food ingredient. *Food research international*, *57*, 51-60.
- Elbaz, A., Sobhi, A., & ElMekawy, A. (2015). Purification and characterization of cyclodextrin  $\beta$ -glucanotransferase from novel alkalophilic bacilli. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, *38*(4), 767-776. doi:10.1007/s00449-014-1318-y
- Fang, Z., & Bhandari, B. (2010). Encapsulation of polyphenols – a review. *Trends in Food Science & Technology*, *21*(10), 510-523. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2010.08.003>

- 
- Feederle, R., Pajatsch, M., Kremmer, E., & Böck, A. (1996). Metabolism of cyclodextrins by *Klebsiella oxytoca* M5a1: purification and characterisation of a cytoplasmically located cyclodextrinase. *Archives of microbiology*, 165(3), 206-212.
- Freitas, T. L. d., Monti, R., & Contiero, J. (2004). Production of CGTase by a *Bacillus* alkalophilic CGII strain isolated from wastewater of a manioc flour industry. *Brazilian Journal of Microbiology*, 35(3), 255-260.
- Gastón, J. A. R., Szerman, N., Costa, H., Krymkiewicz, N., & Ferrarotti, S. A. (2009). Cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans* DF 9R: Activity and kinetic studies. *Enzyme and Microbial Technology*, 45(1), 36-41. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.enzmictec.2009.04.002>
- Gawande, B., & Patkar, A. (2001). Purification and properties of a novel raw starch degrading-cyclodextrin glycosyltransferase from *Klebsiella pneumoniae* AS-22. *Enzyme and Microbial Technology*, 28(9), 735-743.
- Goh, K. M., Mahadi, N. M., Hassan, O., Rahman, R. N. Z. R. A., & Illias, R. M. (2007). The effects of reaction conditions on the production of  $\gamma$ -cyclodextrin from tapioca starch by using a novel recombinant engineered CGTase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 49(1), 118-126.
- Górnas, P., Neunert, G., Baczyński, K., & Polewski, K. (2009). Beta-cyclodextrin complexes with chlorogenic and caffeic acids from coffee brew: Spectroscopic, thermodynamic and molecular modelling study. *Food Chemistry*, 114(1), 190-196. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.09.048>
- Guerrero, J. C. M., Mata, N. V., & Castignoli, R. B. (2009). *El amaranto: características físicas, químicas, toxicológicas y funcionales y aporte nutricional*: Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.

- 
- Higashi, K., Tozuka, Y., Moribe, K., & Yamamoto, K. (2010). Salicylic acid/ $\gamma$ -cyclodextrin 2: 1 and 4: 1 complex formation by sealed-heating method. *Journal of pharmaceutical sciences*, 99(10), 4192-4200.
- Hoover, R., Hughes, T., Chung, H., & Liu, Q. (2010). Composition, molecular structure, properties, and modification of pulse starches: A review. *Food research international*, 43(2), 399-413.
- Huang, D., Ou, B., & Prior, R. L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(6), 1841-1856.
- Ibrahim, A. S., El-Tayeb, M. A., Elbadawi, Y. B., & Al-Salamah, A. A. (2011). Effects of substrates and reaction conditions on production of cyclodextrins using cyclodextrin glucanotransferase from newly isolated *Bacillus agaradhaerens* KSU-A11. *Electronic Journal of Biotechnology*, 14(5), 4-4.
- Norma de la organización internacional para la estandarización sobre determinación de amilosa, (1987).
- Israkarn, K., Na Nakornpanom, N., & Hongsprabhas, P. (2014). Physicochemical properties of starches and proteins in alkali-treated mungbean and cassava starch granules. *Carbohydrate Polymers*, 105(0), 34-40. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.01.054>
- Jaitak, V., Kaul, V. K., Kumar, N., Singh, B., Savergave, L., Jogdand, V., & Nene, S. (2009). Simple and efficient enzymatic transglycosylation of stevioside by  $\beta$ -cyclodextrin glucanotransferase from *Bacillus firmus*. *Biotechnology Letters*, 31(9), 1415-1420.
- Jullian, C., Moyano, L., Yañez, C., & Olea-Azar, C. (2007). Complexation of quercetin with three kinds of cyclodextrins: An antioxidant study. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 67(1), 230-234. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.saa.2006.07.006>

- 
- Keckešová, M., Palenčárová, E., Gálová, Z., Gažo, J., & Hricová, A. (2013). Nutritional quality of grain amaranths (*Amaranthus L.*) compared to putative mutant lines. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 2(2), 1716-1724.
- Kim, T.-J., Kim, B.-C., & Lee, H.-S. (1995). Production of cyclodextrins using moderately heat-treated cornstarch. *Enzyme and Microbial Technology*, 17(12), 1057-1061.
- Kitahata, S., Tsuyama, N., & Okada, S. (1974). Purification and some properties of cyclodextrin glycosyltransferase from a strain of *Bacillus* species. *Agricultural and Biological Chemistry*, 38(2), 387-393.
- Kong, X., Bao, J., & Corke, H. (2009). Physical properties of *Amaranthus* starch. *Food Chemistry*, 113(2), 371-376. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.06.028>
- Kong, X., Bertoft, E., Bao, J., & Corke, H. (2008). Molecular structure of amylopectin from amaranth starch and its effect on physicochemical properties. *International Journal of Biological Macromolecules*, 43(4), 377-382. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2008.07.018>
- Kong, X., Corke, H., & Bertoft, E. (2009). Fine structure characterization of amylopectins from grain amaranth starch. *Carbohydrate Research*, 344(13), 1701-1708. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.carres.2009.05.032>
- Kraujalis, P., Venskutonis, P. R., Kraujalienė, V., & Pukalskas, A. (2013). Antioxidant properties and preliminary evaluation of phytochemical composition of different anatomical parts of amaranth. *Plant foods for human nutrition*, 68(3), 322-328.
- Kruger, N. J. (2009). The Bradford method for protein quantitation *The protein protocols handbook* (pp. 17-24): Springer.

- 
- Kurkov, S. V., & Loftsson, T. (2013). Cyclodextrins. *International Journal of Pharmaceutics*, 453(1), 167-180.  
doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.06.055>
- Laemmli, U. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *nature*, 227(5259), 680.
- Lee, Y.-D., & Kim, H.-S. (1991). Enhancement of enzymatic production of cyclodextrins by organic solvents. *Enzyme and Microbial Technology*, 13(6), 499-503.
- Lee, Y. D., & Kim, H. S. (1992). Effect of organic solvents on enzymatic production of cyclodextrins from unliquefied corn starch in an attrition bioreactor. *Biotechnology and bioengineering*, 39(10), 977-983.
- Leemhuis, H., Kelly, R. M., & Dijkhuizen, L. (2010). Engineering of cyclodextrin glucanotransferases and the impact for biotechnological applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85(4), 823-835.
- Liggett, R. W., & Koffler, H. (1948). Corn steep liquor in microbiology. *Bacteriological reviews*, 12(4), 297.
- Lindeboom, N., Chang, P. R., & Tyler, R. T. (2004). Analytical, biochemical and physicochemical aspects of starch granule size, with emphasis on small granule starches: a review. *Starch-Starke*, 56(3), 89-99.
- López-Nicolás, J. M., & García-Carmona, F. (2007). Use of cyclodextrins as secondary antioxidants to improve the color of fresh pear juice. *Journal of agricultural and food chemistry*, 55(15), 6330-6338.
- Lu, Z., Chen, R., Liu, H., Hu, Y., Cheng, B., & Zou, G. (2009). Study of the complexation of resveratrol with cyclodextrins by spectroscopy and

- 
- molecular modeling. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 63(3-4), 295-300.
- Maestrelli, F., Cecchi, M., Cirri, M., Capasso, G., Mennini, N., & Mura, P. (2009). Comparative study of oxaprozin complexation with natural and chemically-modified cyclodextrins in solution and in the solid state. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 63(1-2), 17-25.
- Mahat, M. K., Illias, R. M., Rahman, R. A., Rashid, N. A. A., Mahmood, N. A. N., Hassan, O., . . . Kamaruddin, K. (2004). Production of cyclodextrin glucanotransferase (CGTase) from alkalophilic *Bacillus* sp. TS1-1: media optimization using experimental design. *Enzyme and Microbial Technology*, 35(5), 467-473. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.enzmictec.2004.07.008>
- Mäkelä, M., Korpela, T., & Laakso, S. (1987). Colorimetric determination of  $\beta$ -cyclodextrin: two assay modifications based on molecular complexation of phenolphthalein. *Journal of biochemical and biophysical methods*, 14(2), 85-92.
- Mancuso, C., & Santangelo, R. (2014). Ferulic acid: pharmacological and toxicological aspects. *Food and Chemical Toxicology*, 65, 185-195.
- Mangolim, C. S., Moriwaki, C., Nogueira, A. C., Sato, F., Baesso, M. L., Neto, A. M., & Matioli, G. (2014). Curcumin- $\beta$ -cyclodextrin inclusion complex: Stability, solubility, characterisation by FT-IR, FT-Raman, X-ray diffraction and photoacoustic spectroscopy, and food application. *Food Chemistry*, 153(0), 361-370. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.12.067>
- Mansouri, M. T., Farbood, Y., Sameri, M. J., Sarkaki, A., Naghizadeh, B., & Rafeirad, M. (2013). Neuroprotective effects of oral gallic acid against oxidative stress induced by 6-hydroxydopamine in rats. *Food Chemistry*, 138(2), 1028-1033.

- 
- Martínez, G., & Gómez, M. (2007). Ciclodextrinas: Complejos de inclusión con polímeros. *Revista Iberoamericana de Polímeros (España)*, 8(4), 300-312.
- Martins, R. F., & Hatti-Kaul, R. (2002). A new cyclodextrin glycosyltransferase from an alkaliphilic *Bacillus agaradhaerens* isolate: purification and characterisation. *Enzyme and Microbial Technology*, 30(1), 116-124.
- Matioli, G., Zanin, G. M., & De Moraes, F. F. (2002). Influence of substrate and product concentrations on the production of cyclodextrins by CGTase of *Bacillus firmus*, strain no. 37 *Biotechnology for Fuels and Chemicals* (pp. 947-961): Springer.
- Mendonça, S., Saldiva, P. H., Cruz, R. J., & Arêas, J. A. G. (2009). Amaranth protein presents cholesterol-lowering effect. *Food Chemistry*, 116(3), 738-742. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.03.021>
- Menocci, V., Goulart, A. J., Adalberto, P. R., Tavano, O. L., Marques, D. P., Contiero, J., & Monti, R. (2008). Cyclodextrin glycosyltransferase production by new *Bacillus* sp. strains isolated from Brazilian soil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 39(4), 682-688.
- Miller, G. L. (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*, 31(3), 426-428. doi:10.1021/ac60147a030
- Mitchell, D. A., Stuart, D. M., & Tanner, R. D. (1999). Solid state fermentation, microbial growth kinetics. *Encyclopedia of Bioprocess Technology*.
- Molins, R., Martins, P., & Delgado, G. (2011). *Aplicación de la nanotecnología en los sectores alimentario y agropecuario: posibles consecuencias para la inocuidad de los alimentos*. Paper presented at the COMUNIICA (IICA) v. 4 (2da etapa) p. 38-53.

- 
- Mora, M. M. M., Sánchez, K. H., Santana, R. V., Rojas, A. P., Ramírez, H. L., & Torres-Labandeira, J. J. (2012). Partial purification and properties of cyclodextrin glycosyltransferase (CGTase) from alkalophilic *Bacillus* species. *SpringerPlus*, 1(1), 1-6.
- Morales, G., Vázquez, M., & Bressani, C. (2009). El amaranto características físicas, químicas toxicológicas y funcionales y aporte nutricional. *Instituto deficiencias médicas y nutrición Salvador Zubirán Vasco de Quiroga*, 15.
- Moriwaki, C., Costa, G. L., Pazzetto, R., Zanin, G. M., Moraes, F. F., Portilho, M., & Matioli, G. (2007). Production and characterization of a new cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus firmus* isolated from Brazilian soil. *Process Biochemistry*, 42(10), 1384-1390.
- Moriwaki, C., Ferreira, L. R., Rodella, J. R. T., & Matioli, G. (2009). A novel cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus sphaericus* strain 41: Production, characterization and catalytic properties. *Biochemical engineering journal*, 48(1), 124-131.
- Mourtzinou, I., Salta, F., Yannakopoulou, K., Chiou, A., & Karathanos, V. T. (2007). Encapsulation of olive leaf extract in  $\beta$ -cyclodextrin. *J. of Agricultural and Food Chemistry*, 55(20), 8088-8094.
- Munin, A., & Edwards-Lévy, F. (2010). Encapsulation of natural polyphenolic compounds; a review. *Pharmaceutics*, 3(4), 793-829.
- Mura, P., Cirri, M., Faucci, M. T., Ginès-Dorado, J. M., & Bettinetti, G. P. (2002). Investigation of the effects of grinding and co-grinding on physicochemical properties of glisentide. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 30(2), 227-237. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0731-7085\(02\)00252-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0731-7085(02)00252-2)

- 
- Otegbayo, B., Oguniyan, D., & Akinwumi, O. (2014). Physicochemical and functional characterization of yam starch for potential industrial applications. *Starch-Stärke*, 66(3-4), 235-250.
- Paredes-López, O. (1990). *Amaranto: características alimentarias y aprovechamiento agroindustrial*: Secretaria General de la Organización de los Estados Americanos.
- Paredes Lopez, O. E. A., Lara, F. G., & Pérez, L. A. B. (2006). *Los alimentos mágicos de las culturas indígenas mesoamericanas*: Secretaría de Educación Pública.
- Paško, P., Sajewicz, M., Gorinstein, S., & Zachwieja, Z. (2008). Analysis of selected phenolic acids and flavonoids in *Amaranthus cruentus* and *Chenopodium quinoa* seeds and sprouts by HPLC. *Acta Chromatographica*, 20(4), 661-672.
- Patel, H., Suhagia, B., Shah, S., Rathod, I., & Parmar, V. (2007). Preparation and characterization of etoricoxib- $\beta$ -cyclodextrin complexes prepared by the kneading method. *Acta pharmaceutica*, 57(3), 351-359.
- Patras, A., Brunton, N. P., Tiwari, B., & Butler, F. (2011). Stability and degradation kinetics of bioactive compounds and colour in strawberry jam during storage. *Food and Bioprocess Technology*, 4(7), 1245-1252.
- Pelissari, F. M., Andrade-Mahecha, M. M., Sobral, P. J. d. A., & Menegalli, F. C. (2012). Isolation and characterization of the flour and starch of plantain bananas (*Musa paradisiaca*). *Starch-Stärke*, 64(5), 382-391.
- Penninga, D., Strokopytov, B., Rozeboom, H. J., Lawson, C. L., Dijkstra, B. W., Bergsma, J., & Dijkhuizen, L. (1995). Site-directed mutations in tyrosine 195 of cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans* strain 251 affect activity and product specificity. *Biochemistry*, 34(10), 3368-3376.

- 
- Pérez, S., & Bertoft, E. (2010). The molecular structures of starch components and their contribution to the architecture of starch granules: A comprehensive review. *Starch-Stärke*, 62(8), 389-420.
- Pishtiyski, I., Popova, V., & Zhekova, B. (2008). Characterization of cyclodextrin glucanotransferase produced by *Bacillus megaterium*. *Applied biochemistry and biotechnology*, 144(3), 263-272.
- Pishtiyski, I., & Zhekova, B. (2006). Effect of different substrates and their preliminary treatment on cyclodextrin production. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22(2), 109-114. doi:10.1007/s11274-005-9004-5
- Pluth, M. D., & Raymond, K. N. (2007). Reversible guest exchange mechanisms in supramolecular host-guest assemblies. *Chemical Society Reviews*, 36(2), 161-171. doi:10.1039/b603168b
- Rakmai, J., & Cheirsilp, B. (2016). Continuous production of  $\beta$ -cyclodextrin by cyclodextrin glycosyltransferase immobilized in mixed gel beads: Comparative study in continuous stirred tank reactor and packed bed reactor. *Biochemical engineering journal*, 105, Part A, 107-113. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2015.09.011
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical biology and medicine*, 26(9), 1231-1237.
- Rimphanitchayakit, V., Tono-zuka, T., & Sakano, Y. (2005). Construction of chimeric cyclodextrin glucanotransferases from *Bacillus circulans* A11 and *Paenibacillus macerans* IAM1243 and analysis of their product specificity. *Carbohydrate Research*, 340(14), 2279-2289.

- 
- Rodrigues, A., & Emeje, M. (2012). Recent applications of starch derivatives in nanodrug delivery. *Carbohydrate Polymers*, 87(2), 987-994. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.09.044>
- Saéñz, C., Tapia, S., Chávez, J., & Robert, P. (2009). Microencapsulation by spray drying of bioactive compounds from cactus pear (*Opuntia ficus-indica*). *Food Chemistry*, 114(2), 616-622.
- SAGARPA, S. (2014). Servicio de información agroalimentaria y pesquera. Producción anual.
- Sani, H. A., Rahmat, A., Ismail, M., Rosli, R., & Endrini, S. (2004). Potential anticancer effect of red spinach (*Amaranthus gangeticus*) extract. *Asia Pac J Clin Nutr*, 13(4), 396-400.
- Sarkar, B., Khodre, S., Patel, P., & Mandaniya, M. (2014). HPLC analysis and antioxidant potential of plant extract of *Cassia alata*. *Asian Journal of Pharmaceutical Science & Technology*, 4(1), 4-7.
- Schallmeyer, M., Singh, A., & Ward, O. P. (2004). Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. *Canadian Journal of Microbiology*, 50(1), 1-17. doi:10.1139/w03-076
- Seo, E.-J., Min, S.-G., & Choi, M.-J. (2010). Release characteristics of freeze-dried eugenol encapsulated with  $\beta$ -cyclodextrin by molecular inclusion method. *Journal of microencapsulation*, 27(6), 496-505.
- Singh, R., Bharti, N., Madan, J., & Hiremath, S. (2010). Characterization of cyclodextrin inclusion complexes—a review. *J. Pharm. Sci. Technol*, 2(3), 171-183.
- Singhania, R. R., Sukumaran, R. K., Patel, A. K., Larroche, C., & Pandey, A. (2010). Advancement and comparative profiles in the production technologies using

- 
- solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. *Enzyme and Microbial Technology*, 46(7), 541-549.
- Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. M. (1999). [14] *Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent* (Vol. 299).
- Sivakumar, N., & Shakilabanu, S. (2013). Production of cyclodextrin glycosyl transferase by *Bacillus megaterium*. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci*, 2(7), 44-55.
- Smits, J. P. (1998). *Solid-state fermentation: modelling fungal growth and activity*: publisher not identified.
- Soriano-Santos, J., & Avendaño, M. A. (2013). El amaranto Alcances y limitaciones de sus propiedades tecnofuncionales para su diversificación, Educación en ciencias e ingeniería. *Contactos*, pp. 11-21. Retrieved from <http://www.izt.uam.mx/newpage/contactos/index.php/Biblioteca/numero-89.html>
- Soriano-Santos, J., & Escalona-Buendía, H. (2013). Angiotensin I-Converting Enzyme inhibitory and antioxidant activities and surfactant properties of protein hydrolysates as obtained of *Amaranthus hypochondriacus* L. grain. *Journal of Food Science and Technology*, 1-10.
- Soriano-Santos, J., Reyes-Bautista, R., Guerrero-Legarreta, I., Ponce-Alquicira, E., Escalona-Buendía, H. B., Almanza-Pérez, J. C., . . . Román-Ramos, R. (2014). Dipeptidyl peptidase iv inhibitory activity of protein hydrolyzates from *amaranthus hypochondriacus* I. grain and their influence on postprandial glycemia in streptozotocin-induced diabetic mice. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative medicines (AJTCAM)*, 12(1), 90-98.

- 
- Soriano-Santos, J., Reyes-Bautista, R., Guerrero-Legarreta, I., Ponce-Alquicira, E., Escalona-Buendía, H. B., Almanza-Pérez, J. C., . . . Roman-Ramos, R. (2014). Dipeptidyl peptidase IV inhibitory activity of protein hydrolyzates from *Amaranthus hypochondriacus* L. Grain and their influence on postprandial glycemia in Streptozotocin-induced diabetic mice. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, *12*(1), 90-98.
- Souza, A. O. d., Santos-Jr, R. R., Sato, D. N., de Azevedo, M. M., Ferreira, D. A., Melo, P. S., . . . Durán, N. (2004). Free 2-propen-1-amine derivative and inclusion complexes with beta-cyclodextrin: scanning electron microscopy, dissolution, cytotoxicity and antimycobacterial activity. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, *15*(5), 682-689.
- Sriroth, K., Santisopasri, V., Petchalanuwat, C., Kurotjanawong, K., Piyachomkwan, K., & Oates, C. G. (1999). Cassava starch granule structure–function properties: influence of time and conditions at harvest on four cultivars of cassava starch. *Carbohydrate Polymers*, *38*(2), 161-170. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0144-8617\(98\)00117-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0144-8617(98)00117-9)
- Steffensen, S. K., Rinnan, Å., Mortensen, A. G., Laursen, B., de Troiani, R. M., Noellemeyer, E. J., . . . Taberner, A. (2011). Variations in the polyphenol content of seeds of field grown *Amaranthus* genotypes. *Food Chemistry*, *129*(1), 131-138.
- Strokopytov, B., Knegt, R. M., Penninga, D., Rozeboom, H. J., Kalk, K. H., Dijkhuizen, L., & Dijkstra, B. W. (1996). Structure of cyclodextrin glycosyltransferase complexed with a maltononase inhibitor at 2.6 Å resolution. Implications for product specificity. *Biochemistry*, *35*(13), 4241-4249.
- Suntinanalert, P., Petmaneechote, J., Damnian, N., & Hutadilok-Towatana, N. (1997). Purification and properties of cyclodextrin glycosyltransferase

- (CGTase) from an alkaline-tolerant *Bacillus* sp. PS304. *J Sci Soc Thailand*, 23, 381-388.
- Szejtli, J. (2013). *Cyclodextrin Technology*: Springer Netherlands.
- Szerman, N., Schroh, I., Rossi, A. L., Rosso, A. M., Krymkiewicz, N., & Ferrarotti, S. A. (2007). Cyclodextrin production by cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans* DF 9R. *Bioresource Technology*, 98(15), 2886-2891. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2006.09.056>
- Takahashi, H., Kashimura, M., Koiso, H., Kuda, T., & Kimura, B. (2013). Use of ferulic acid as a novel candidate of growth inhibiting agent against *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat food. *Food Control*, 33(1), 244-248.
- Taylor, J., Taylor, J. R., Belton, P. S., & Minnaar, A. (2009). Kafirin microparticle encapsulation of catechin and sorghum condensed tannins. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(16), 7523-7528.
- Tesfai, B., Wu, D., Chen, S., Chen, J., & Wu, J. (2013). Effect of organic solvents on the yield and specificity of cyclodextrins by recombinant cyclodextrin glucanotransferase (CGTase) from *Anaerobranca gottschalkii*. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 77(1-4), 147-153. doi:10.1007/s10847-012-0225-6
- Tesfai, B. T., Wu, D., Chen, S., Chen, J., & Wu, J. (2013). Effect of organic solvents on the yield and specificity of cyclodextrins by recombinant cyclodextrin glucanotransferase (CGTase) from *Anaerobranca gottschalkii*. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 77(1-4), 147-153.
- Uitdehaag, J. C., Mosi, R., Kalk, K. H., van der Veen, B. A., Dijkhuizen, L., Withers, S. G., & Dijkstra, B. W. (1999). X-ray structures along the reaction pathway of cyclodextrin glycosyltransferase elucidate catalysis in the  $\alpha$ -amylase family. *Nature Structural & Molecular Biology*, 6(5), 432-436.

- 
- Uitdehaag, J. C. M., van der Veen, B. A., Dijkhuizen, L., & Dijkstra, B. W. (2002). Catalytic mechanism and product specificity of cyclodextrin glycosyltransferase, a prototypical transglycosylase from the  $\alpha$ -amylase family. *Enzyme and Microbial Technology*, 30(3), 295-304. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0141-0229\(01\)00498-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0141-0229(01)00498-7)
- Urban, M., Beran, M., Adamek, L., Drahorád, J., Molík, P., & Matušová, K. (2012). Cyclodextrin production from amaranth starch by cyclodextrin glycosyltransferase produced by *Paenibacillus macerans* CCM 2012. *Czech Journal of Food Sciences*, 30(1), 15-20.
- Uriyapongson, J., & Rayas-Duarte, P. (1994). Comparison of yield and properties of amaranth starches using wet and dry-wet milling processes. *Cereal chemistry*, 71(6), 571-577.
- Usharani, L., Prasad, T., Sundar, S., Dhananjaya, K., & Mallesha, H. (2014a). Comparative study of  $\alpha$ -cyclodextrin production from the cgtase producing novel strains-its characterization and host-guest complex formation. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, 4(4), 77-81.
- Usharani, L., Prasad, T., Sundar, S., Dhananjaya, K., & Mallesha, H. (2014b). Comparative study of cyclodextrin production from the CGTase producing novel strains characterization and hostguest complex formation. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, 4(4).
- 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. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1656\(01\)00407-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1656(01)00407-2)
- Van der Veen, B., Uitdehaag, J., Dijkstra, B., & Dijkhuizen, L. (2000). Engineering of cyclodextrin glycosyltransferase reaction and product specificity.

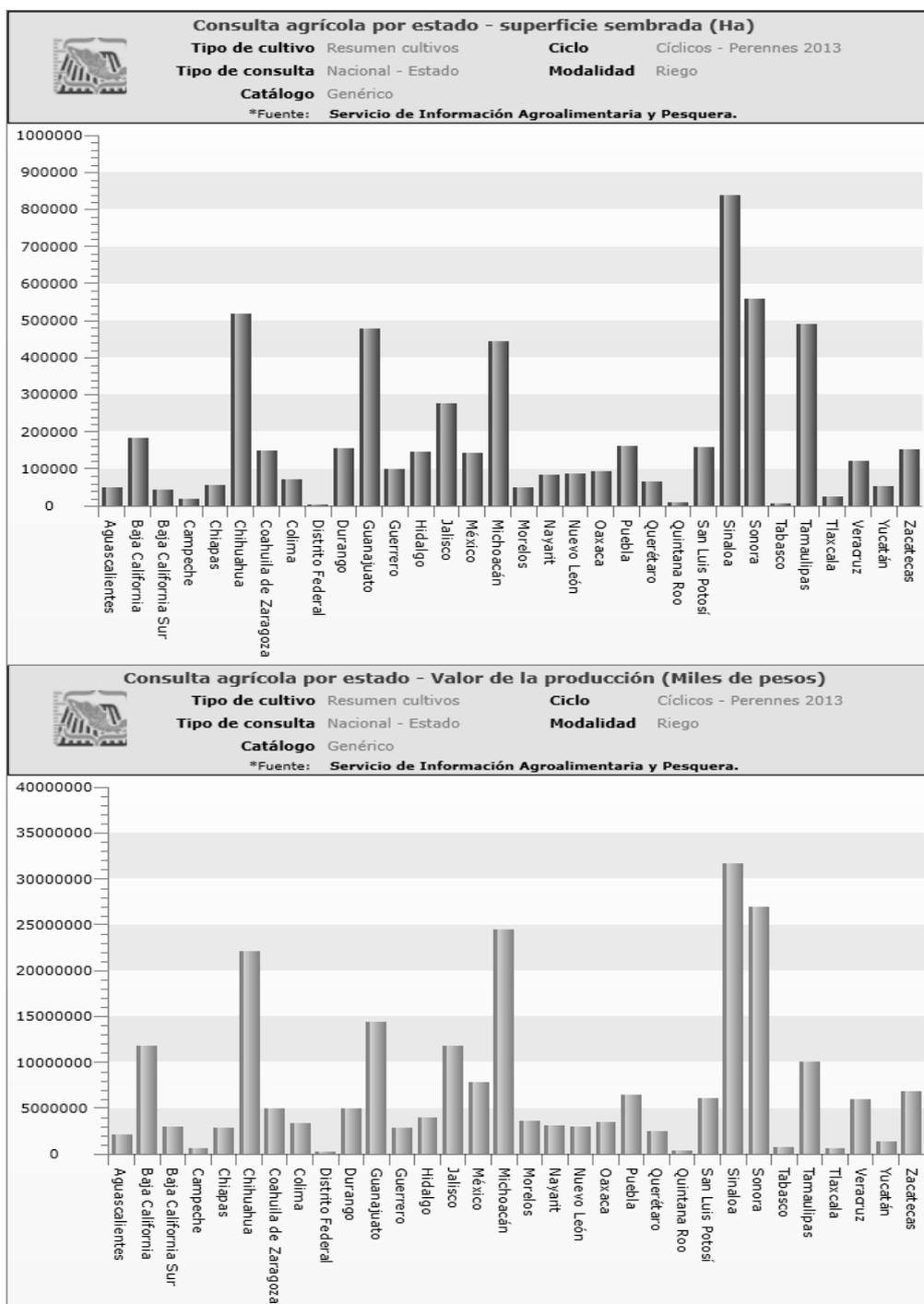
- 
- Biochimica et Biophysica Acta, Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1543(2), 336-360.
- Van der Veen, B. A., van Alebeek, G. J. W., Uitdehaag, J., Dijkstra, B. W., & Dijkhuizen, L. (2000). The three transglycosylation reactions catalyzed by cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans* (strain 251) proceed via different kinetic mechanisms. *European Journal of Biochemistry*, 267(3), 658-665.
- Vary, P. S., Biedendieck, R., Fuerch, T., Meinhardt, F., Rohde, M., Deckwer, W.-D., & Jahn, D. (2007). *Bacillus megaterium*—from simple soil bacterium to industrial protein production host. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 76(5), 957-967.
- 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. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2012.11.009>
- 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.
- Wang, J., Cao, Y., Sun, B., & Wang, C. (2011). Characterisation of inclusion complex of trans-ferulic acid and hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin. *Food Chemistry*, 124(3), 1069-1075. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.07.080>
- Waterschoot, J., Gomand, S. V., Fierens, E., & Delcour, J. A. (2015). Production, structure, physicochemical and functional properties of maize, cassava, wheat, potato and rice starches. *Starch-Stärke*, 67(1-2), 14-29.

- 
- Wei-hong, M., Yin, D., & Li, F. (2009). Isolation, Purification and Enzymatic Characteristics of Cyclodextrin Glucanotransferase [J]. *Food Science*, 13, 055.
- Wen, X., Tan, F., Jing, Z., & Liu, Z. (2004). Preparation and study the 1: 2 inclusion complex of carvedilol with  $\beta$ -cyclodextrin. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 34(3), 517-523.
- Wilhelm, E., Aberle, T., Burchard, W., & Landers, R. (2002). Peculiarities of Aqueous Amaranth Starch Suspensions. *Biomacromolecules*, 3(1), 17-26. doi:10.1021/bm000138+
- Yoon, C.-H., Chung, S.-J., Lee, S.-W., Park, Y.-B., Lee, S.-K., & Park, M.-C. (2013). Gallic acid, a natural polyphenolic acid, induces apoptosis and inhibits proinflammatory gene expressions in rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes. *Joint Bone Spine*, 80(3), 274-279.
- Zhao, M., Wang, H., Yang, B., & Tao, H. (2010). Identification of cyclodextrin inclusion complex of chlorogenic acid and its antimicrobial activity. *Food Chemistry*, 120(4), 1138-1142.
- Zhekova, B., Dobrev, G., Stanchev, V., & Pishtiyski, I. (2009). Approaches for yield increase of  $\beta$ -cyclodextrin formed by cyclodextrin glucanotransferase from *Bacillus megaterium*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25(6), 1043-1049.
- Zhekova, B. Y., Pishtiyski, I. G., & Stanchev, V. S. (2008). Investigation on cyclodextrin production with cyclodextrin glucanotransferase from *Bacillus megaterium*. *Food Technology and Biotechnology*, 46(3), 328-334.

ANEXOS

8.1 ANEXO I

Producción de Amaranto en México a nivel nacional, registrado en 2013 por SAGARPA.



## 8.2 ANEXO II

### Curva estándar para la cuantificación de glucosa

En la Tabla 10, se muestra las concentraciones utilizadas para la elaboración de la curva estándar, que sirvió de referencia para la cuantificación de almidón total en las muestras analizadas en el presente estudio.

En la gráfica 23 se muestra la curva de glucosa (mg/dL) versus absorbencia a 550 nm y su respectiva ecuación obtenida de su correspondiente linealización, para la determinación glucosa.

Tabla 14 Curva estándar de glucosa para cuantificación de almidón total

Glucosa (mg/dL)	Absorbencia (550 nm)
2	0.055±0.007
12	0.122±0.009
21	0.198±0.008
27	0.240±0.019
34	0.305±0.005

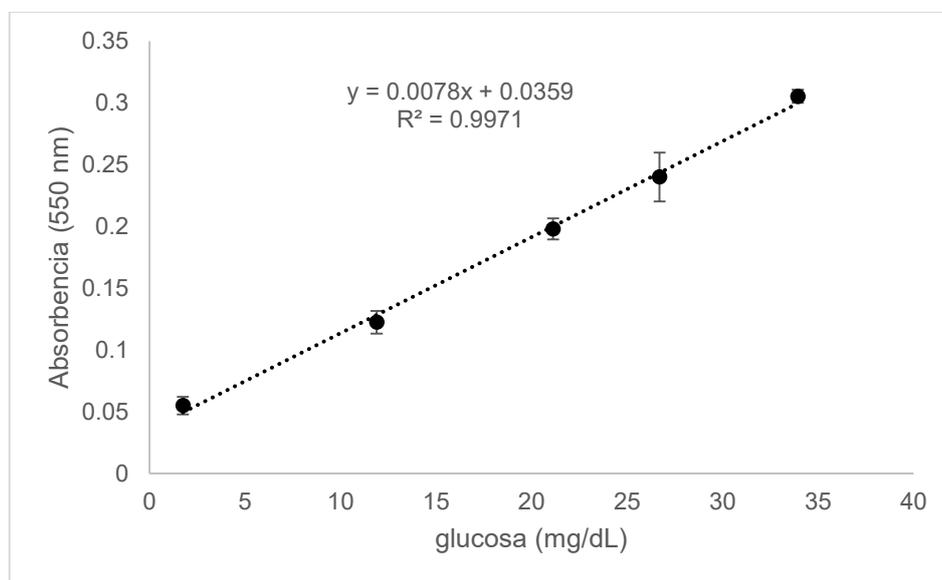


Figura 41. Curva estándar de glucosa para la cuantificación de almidón total.

### 8.3 ANEXO III

#### Curva estándar para la cuantificación de amilosa

En la Tabla 10, se muestra las concentraciones utilizadas para la elaboración de la curva estándar, que sirvió de referencia para la cuantificación de amilosa en las muestras analizadas en el presente estudio.

En la gráfica 23 se muestra la curva de amilosa (% p/v) versus absorbencia a 620 nm y su respectiva ecuación obtenida de su correspondiente linealización, para la determinación de % de amilosa.

Tabla 15 Curva estándar de amilosa

Amilosa (% p/v)	Absorbencia (620 nm)
0	0.0±0.0
10	0.127±0.026
20	0.289±0.011
25	0.368±0.005
30	0.425±0.005

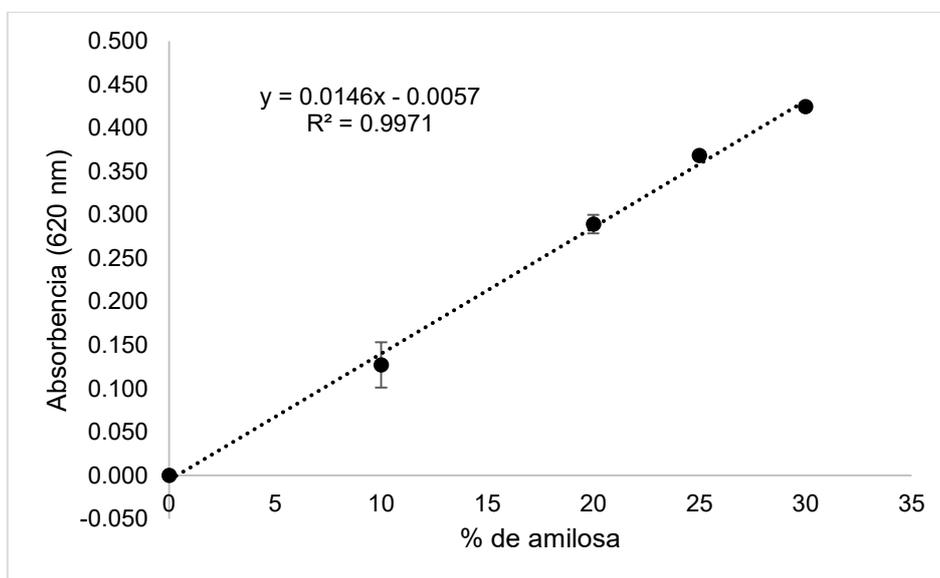


Figura 42. Curva estándar de amilosa.

#### 8.4 ANEXO IV

##### Curva estándar para la cuantificación de $\beta$ -ciclodextrina

En la Tabla 10, se muestra las concentraciones utilizadas para la elaboración de la curva estándar, que sirvió de referencia para la cuantificación de  $\beta$ -ciclodextrina en las muestras analizadas en el presente estudio.

En la gráfica 23 se muestra la curva de  $\beta$ -ciclodextrina (mM) versus absorbencia a 550 nm y su respectiva ecuación obtenida de su correspondiente linealización, para la determinación de  $\beta$ -ciclodextrina.

Tabla 16 Curva estándar de  $\beta$ -ciclodextrina

<b>B-CD (mM)</b>	<b>Absorbencia (550 nm)</b>
<b>7,86</b>	0.942±0.08
<b>19,6</b>	0.865±0.015
<b>39</b>	0.719±0.019
<b>78</b>	0.476±0.016
<b>118</b>	0.329±0.011
<b>157</b>	0.142±0.014

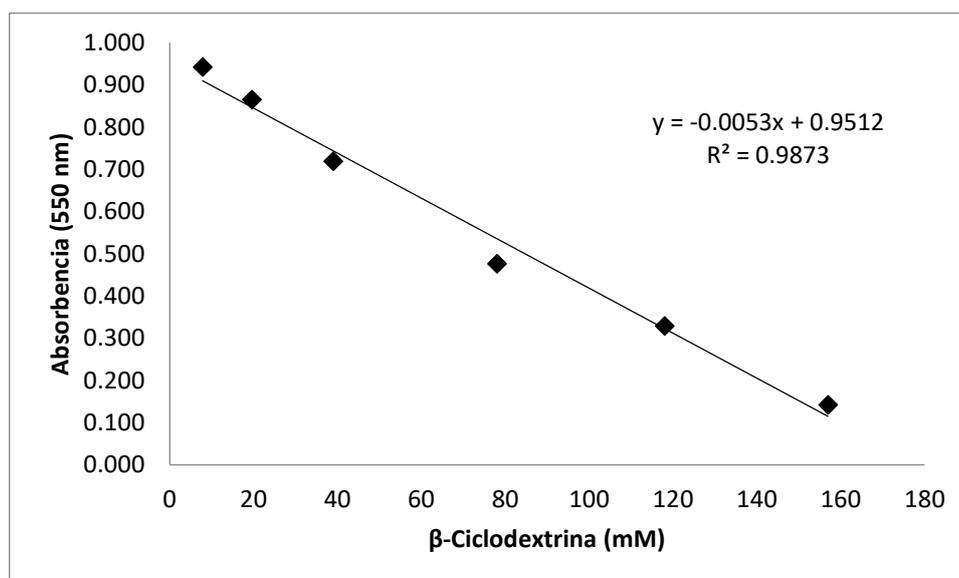


Figura 43. Curva estándar para la cuantificación de  $\beta$ -ciclodextrina.

## 8.5 ANEXO V

### Curva estándar para la cuantificación de polifenoles expresada en equivalentes de ácido gálico

En la Tabla 10, se muestra las concentraciones utilizadas para la elaboración de la curva estándar, que sirvió de referencia para la cuantificación de polifenoles totales en las muestras analizadas en el presente estudio.

En la gráfica 23 se muestra la curva de ácido gálico (mg/L) versus absorbencia a 725nm y su respectiva ecuación obtenida de su correspondiente linealización, para la determinación de polifenoles en equivalentes de ácido gálico.

Tabla 17 Curva estándar de ácido gálico para cuantificación de polifenoles totales

Ácido gálico (mg/L)	Absorbencia (725nm)
25	0.133±0.012
50	0.264±0.024
100	0.455±0.079
150	0.721±0.037
200	0.955±0.021

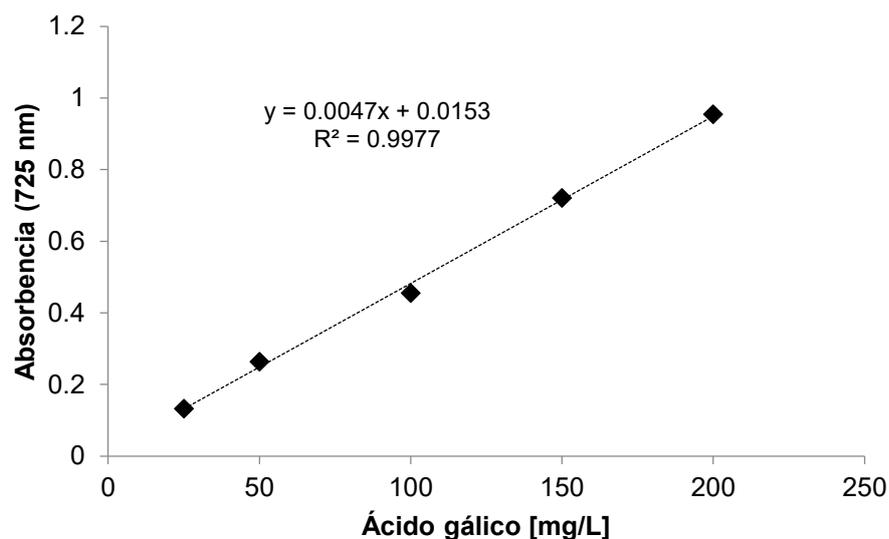


Figura 44. Curva estándar de Ácido gálico para la cuantificación de polifenoles.

## 8.6 ANEXO VI

### Diseño de reactor biológico

Reactor biológico de 1L con 4 entradas de muestreo y deflectores, de acero inoxidable 360.

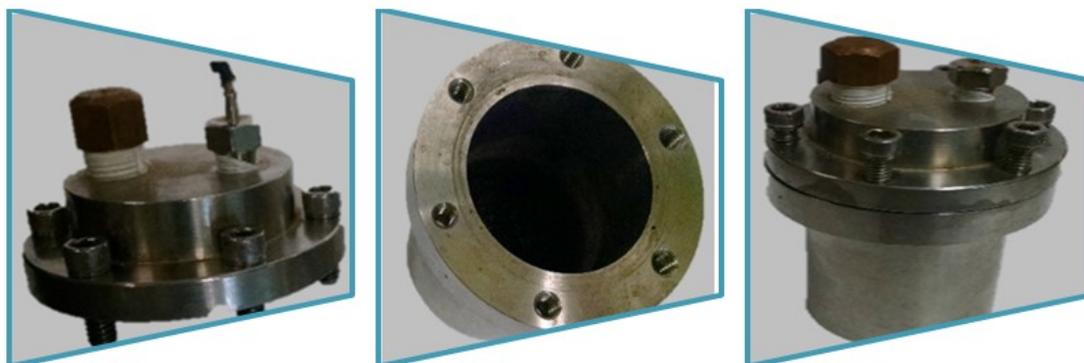


Reactor biológico de capacidad de 1 L . El vaso es de vidrio Pyrex®. El cuerpo es de acero inoxidable 316-L. Sobre la tapa se encuentran 2 tubos de muestreo (24 y 25 cm), 2 tubos de aireación (10 cm), 4 deflectores planos (17 cm x 11.1 mm calibre 20), 1 termopozo (15.5 cm x 10 mm) y 2 anillos de soporte

## 8.7 ANEXO VII

### Diseño de reactor químico

Reactor químico tipo Parr®, de 100 mL de acero inoxidable 360-L.



Cuenta con una tapa de 76 mm de diámetro y 23 mm de altura, se encuentra un termopar de 1/4 npt con un termopozo de teflón al centro, con una cuerda de 1/8 para manómetro. El vaso tiene un diámetro externo de 76 mm y diámetro interno de 48.5 mm, su altura es de 68.5 mm y 6 cuerdas internas para sujetar la tapa.