



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
METROPOLITANA**

División de Ciencias Biológicas y de la Salud Unidad Iztapalapa

**Aprovechamiento de almidón de
amaranto (*A. hypochondriacus*) como
almidón resistente**

TESIS

Para obtener el grado de

Maestra en Biotecnología

Presenta

E. en B. MONICA ALEJANDRA ROBLES ARIAS

Director de proyecto

Dr. Gerardo Ramírez Romero[†]

Dr. Héctor Escalona Buendía

Asesora

Dra. Alma Cruz Guerrero

Asesora externa

Dra. Hirán Moran Bañuelos

México, Ciudad de México, Agosto 2017





“La Maestría en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa está incluida en el Padrón Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), con la referencia 001465”

Este trabajo contó con el apoyo de CONACyT a través de la beca 621321.



Casa abierta al tiempo

Ciudad de México, Agosto 2017

El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la tesis de maestría

**Aprovechamiento de almidón de amaranto (*A. hypochondriacus*)
como almidón resistente**

Presentada por:

E. en B. Monica Alejandra Robles Arias

Comité Tutorial:

Director: Dr. Gerardo Ramírez Romero[†]

Director: Dr. Héctor Bernardo Escalona Buendía

Asesora: Dra. Alma Elizabeth Cruz Guerrero

Asesora: Dra. Sara Hirán Morán Bañuelos

Jurado de evaluación:

Dra. Alma Elizabeth Cruz Guerrero

Presidenta

M.C. Lorena del Carmen Gómez Ruiz

Secretaria

Dr. Sara Hirán Morán Bañuelos

Vocal

Dr. Luis Guillermo González Olivares

Vocal

Three handwritten signatures are present, each written over a horizontal line. The first signature is for the President, the second for the Secretary, and the third for a Vocal member.



Dedicatoria.

Mamá, gracias por tu confianza, tu apoyo y tu amor incondicional, por impulsarme a ser mejor cada día y a nunca rendirme, por todos esos momentos en los que has estado conmigo, gracias por enseñarme que la humildad, el agradecimiento, el trabajo constante y la dedicación son las bases para lograr todo lo que me propongo, te amo.

Hermanita, gracias por estar conmigo, por motivarme día a día, por todas las risas, por tu amor incondicional, por nunca dejarme y estar siempre conmigo, te amo mucho pequeña.

A ti papá porque nunca me has dejado sola, gracias por seguir siendo el mejor padre del mundo y sobre todo por esos hermosos momentos que pasamos como familia y que son los que me impulsan a seguir adelante.

A mi abuela, porque siempre que he necesitado algo ha estado para mí no importa si es de día o de noche o incluso si está lloviendo, gracias abuelita por todo.

A mis hermanos, Many, Dany, Erihn y a mi tía por todos los momentos divertidos que hemos pasado juntos, los quiero.

Gracias madrina y Alex por estar al pendiente de mí y por haber compartido momentos tan especiales conmigo.

Carlos, gracias por estar siempre que te he necesitado y por enseñarme que los lazos de amistad pueden ser tan fuertes como los lazos de familia.

Dr. Gerardo, gracias por su apoyo en todo momento y por las oportunidades brindadas, por los conocimientos transmitidos, por las pláticas y todos los buenos momentos que llevo en el corazón, por su impulso y por ayudarme a formarme como futura investigadora, no sabe la falta que me ha hecho y que me hará siempre, muchísimas gracias por todo.



Agradecimientos.

Dra. Alma, gracias por su tiempo, sus consejos en este proyecto y por ayudarme a continuarlo, pero sobre todo gracias por tenderme su mano cuando más lo necesitaba, por preocuparse no sólo en sacar adelante el proyecto si no por sacarme a mi adelante como profesionalista, muchísimas gracias por todo.

Dr. Escalona, gracias por ayudarme, estar conmigo a lo largo del camino de este proyecto, por sus comentarios y aportaciones, por todo el conocimiento transmitido y por el apoyo en los momentos difíciles.

Dra. Hirán por la motivación que me ha brindado desde que empecé este proyecto y por su apoyo y ayuda siempre que he necesitado algo.

Maestra Lorena, gracias por sus comentarios y apoyo en éste proyecto, por los conocimientos transmitidos y por las pláticas que hemos tenido.

Dra. Lilia muchas gracias por apoyarme, por siempre hacer que me supere y sobre todo por la confianza que me inyecta cada vez que platico con usted, gracias por sus palabras y los conocimientos que ha compartido conmigo porque el trabajar con usted fue el punto de partida para que me interesará por la investigación.

Gracias Dr. Gaby, Dr. Mariano y Dr. Sergio gracias por sus comentarios y aportes en este proyecto, pero sobre todo por haberme abierto las puertas de la PP2.

Les agradezco a todos los que me han ayudado a llegar hasta donde estoy.



Abstract.

Nowadays in Mexico, there has been a remarkable increase about health issues in population, from de-nutrition problems to bad-nutrition, cardiovascular and gastrointestinal problems, due to bad habits alimentations and the few availability of health foods.

Resistant starch (RS) is the fraction of the starch that it is not hydrolyzate in the small intestine in the first 120 minutes after being consumed, but it can be fermented in the colon, due to this when it is added to the food it can get down the glycemic index.

Amaranth seed is composed by starch, being only 0.48%-0.65% of resistant starch. Most of the researchers are only about protein extraction to obtain bio-actives peptides.

In this work the use of protein and lipid extraction residue was study, this procedure left available the 63% of amaranth starch which was used to give it a value added when it is turn into RS and evaluate his pre-biotic activity.

The extract of amaranth starch was brought under acid hydrolysis with chloride acid (3.4%) making a 40% starch solid solution, the reaction conditions was 4 hours and 50°C, this allow us to obtain a starch with 39.27% hydrolysis degree, after this procedure, two modification process was carrying out: succination and phosphating. In the first method octenyl succinic anhydride (3% w/w) was used as succinate agent, under reaction condition of 30°C, 6 hours of reaction and pH 7.5, achieving 46.69% of resistant starch. In the phosphating method 56.67% of resistant starch was achieved using sodium tri-phosphate (0.4%) and reaction conditions of 40°C, pH 6.5 and one hour of reaction.

The method of starch obtaining in this research might cause a modification in the starch granules, since in the photomicrograph the typical morphological structure is not observed, besides the starch extract has a low water absorption (10.92%) and water solubility (22.05%) characteristics that did not change when the starch are brought under succination modification this starch presented an absorption index of 7% and solubility index of 9.20 meanwhile starch phosphate presented an absorption index of 6.68% and solubility index of 6.68%

The starch phosphate under the best condition to obtain the highest conversion from native starch to resistant starch did not present pre-biotic characteristics when it is used as carbon source in the growth of *Lactobacillus casei* Shirota, *Lactobacillus rhamnosus* GG., *Lactobacillus delbruekii*, *Lactobacillus fermentum*, *Pediococcus pentosaceus*, *Bifidobacterium longum* y *Lactococcus lactis* subsp. cremoris NCFB-712 y *Lactobacillus casei* Shirota y *Pediococcus pentosaceus*.



Resumen.

En México hay un incremento notable en los problemas de salud de la población que van desde problemas de malnutrición, problemas cardiovasculares y gastrointestinales debido a los malos hábitos de alimentación y la escasa disponibilidad de alimentos saludables.

El almidón resistente (AR) es la fracción del almidón que no es hidrolizado en el intestino delgado entre los 120 minutos después de ser consumido, pero puede ser fermentado en el colón, por lo que al ser adicionado en los alimentos disminuye el índice glucémico (IG) de éstos, además existen evidencias de poseer capacidad prebiótica.

La semilla de amaranto está compuesta principalmente de almidón, siendo únicamente de 0.48-0.65% almidón resistente. La mayoría de las investigaciones se basan en la extracción de proteína de la semilla de amaranto para la obtención de péptidos bioactivos.

En este trabajo se estudió el uso del residuo de la extracción de proteínas y lípidos el cual deja disponible el 63.6% de almidón de amaranto para darle un valor agregado al convertirlo a AR y evaluar su capacidad prebiótica.

El extracto de almidón de la semilla fue sometido a hidrólisis ácida con ácido clorhídrico al 3.4% realizando una solución al 40% de sólidos de almidón, las condiciones de reacción fueron de 4 horas y 50 °C, lo que permitió obtener un almidón con un grado de hidrólisis de 39.27%, posteriormente se llevaron a cabo dos reacciones de modificación: succinatación y fosfatación. En el primer método se empleó como agente succinatante anhídrido octenil succínico (OSA) al 3% y condiciones de reacción de 30°C, 6 horas de reacción y pH 7.5 logrando obtener un contenido de almidón resistente de 46.69%. En el método de fosfatación se obtuvo un 56.67% de almidón resistente empleando tripolifosfato de sodio (TPS) al 0.4% y condiciones de reacción de 40 °C, pH 6.5 y 1 hora de reacción.

El método de obtención de almidón utilizado en esta investigación causó una modificación en los gránulos de almidón, en las micrografías obtenidas no se observa la estructura morfológica característica, además el extracto de almidón presentó una baja capacidad de absorción (10.92%) y solubilización en agua (22.05%), características que no cambiaron al ser sometidos a los procesos de modificación por de succinatación, el cual presentó un índice de absorción de agua del 7% y de solubilidad en agua de 9.20% y fosfatación el cual presentó un índice de absorción de agua de 6.68% un índice de solubilidad en agua de 3.12%, mientras que en el proceso

El almidón modificado por fosfatación bajo las condiciones en las que se obtiene una mayor conversión de almidón nativo a almidón resistente no presentó características prebióticas al ser empleado como fuente de carbono empleando como microorganismos *Lactobacillus casei* Shirota, *Lactobacillus rhamnosus* GG., *Lactobacillus delbruekii*, *Lactobacillus fermentum*, *Pediococcus pentosaceus*, *Bifidobacterium longum* y *Lactococcus lactis* subsp. cremoris NCFB-712 y *Lactobacillus casei* Shirota y *Pediococcus pentosaceus*.



Índice.

| | |
|--|----|
| Dedicatoria..... | 4 |
| Agradecimientos..... | 6 |
| Abstract..... | 7 |
| Resumen..... | 8 |
| Índice..... | 9 |
| Índice de tablas..... | 12 |
| Índice de Figuras..... | 13 |
| 1. Introducción..... | 14 |
| 2. Antecedentes..... | 15 |
| 2.1. Características generales de la semilla de amaranto..... | 15 |
| 2.1.1. Aspectos botánicos..... | 15 |
| 2.1.2. Tamaño y estructura..... | 16 |
| 2.1.3. Composición química..... | 17 |
| 2.1.3.1. Proteínas..... | 18 |
| 2.1.3.2. Lípidos..... | 19 |
| 2.2. Principales usos de la semilla de amaranto..... | 20 |
| 2.3. Almidón de amaranto..... | 21 |
| 2.3.1. Cambios en el almidón durante el procesamiento térmico de la semilla de amaranto..... | 22 |
| 2.3.2. Almidón resistente..... | 23 |
| 2.3.3. Enzimas que hidrolizan almidón..... | 25 |
| 2.4. Procesos de modificación del almidón..... | 27 |
| 2.4.1. Almidón modificado por hidrólisis ácida..... | 28 |
| 2.4.2. Almidón modificado por succinatación..... | 28 |
| 2.4.3. Almidón modificado por fosfatación..... | 30 |
| 2.5. Prebióticos..... | 33 |
| 2.6. Probióticos..... | 33 |
| 2.6.1. <i>Lactobacillus casei</i> Shirota..... | 34 |
| 2.6.2. <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG..... | 35 |
| 2.6.3. <i>Lactobacillus delbrueckii</i> | 35 |
| 2.6.4. <i>Lactobacillus fermentum</i> | 35 |
| 2.6.5. <i>Pediococcus pentosaceus</i> | 36 |



| | |
|---|----|
| 2.6.6. <i>Bifidobacterium longum</i> | 36 |
| 2.6.7. <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> | 37 |
| 3. Planteamiento del problema..... | 38 |
| 3.1. Elevado consumo de alimentos ricos en azúcares refinados y grasas..... | 38 |
| 3.2. Bajo consumo de alimentos con efecto benéfico en la flora intestinal | 38 |
| 4. Justificación..... | 40 |
| 5. Hipótesis general..... | 40 |
| 6. Objetivo general..... | 41 |
| 7. Objetivos particulares..... | 41 |
| 8. Metodología..... | 42 |
| 8.1. Plan general de trabajo..... | 42 |
| 8.2. Obtención del almidón de amaranto..... | 43 |
| 8.3. Conversión de almidón nativo a almidón resistente..... | 43 |
| 8.3.1. Hidrólisis ácida..... | 43 |
| 8.3.1.1. Determinación del rendimiento de hidrólisis..... | 44 |
| 8.3.2. Almidón modificado por succinatación..... | 44 |
| 8.3.3. Almidón modificado por fosfatación..... | 45 |
| 8.4. Cuantificación de almidón total..... | 46 |
| 8.5. Cuantificación del contenido de almidón resistente..... | 47 |
| 8.6. Índice de absorción de agua (IAA) e índice de solubilidad en agua (ISA)..... | 48 |
| 8.7. Microscopía electrónica de barrido (MEB)..... | 49 |
| 8.8. Evaluación de la capacidad prebiótica..... | 50 |
| 8.8.1. Pre-activación de los microorganismos probióticos e inoculación..... | 50 |
| 8.8.2. Determinación de azúcares consumidos..... | 51 |
| 8.8.3. Cuantificación de crecimiento..... | 51 |
| 8.8.4. Cuantificación de glucosa libre..... | 52 |
| 8.8.5. Cuantificación de azúcares reductores..... | 53 |
| 8.8.6. Evaluación de azúcares por cromatografía en capa fina..... | 54 |
| 8.9. Análisis estadístico..... | 55 |
| 9. Resultados y discusiones..... | 56 |
| 9.1. Contenido de almidón y de almidón resistente en harina de amaranto y extracto..... | 56 |
| 9.2. Almidón modificado por hidrólisis ácida..... | 57 |
| 9.3. Almidón modificado por succinatación..... | 57 |



| | |
|--|----|
| 9.3.1. Efecto de pH durante la reacción de succinatación. | 57 |
| 9.3.2. Efecto del tiempo durante la reacción de succinatación. | 58 |
| 9.4. Obtención de almidón resistente por fosfatación. | 59 |
| 9.4.1. Efecto de la temperatura durante la reacción de fosfatación. | 59 |
| 9.4.2. Efecto del tiempo durante la reacción de fosfatación. | 60 |
| 9.5. Caracterización fisicoquímica del extracto de almidón. | 61 |
| 9.5.1. Determinación del Índice de absorción de agua (IAA) e Índice de solubilidad en agua (ISA). | 61 |
| 9.6. Caracterización morfológica. | 64 |
| 9.7. Capacidad de efecto prebiótico de los almidones modificados de amaranto. | 67 |
| 10. Conclusiones. | 72 |
| 11. Perspectivas. | 72 |
| 12. Bibliografía. | 73 |
| 13. Apéndice | 81 |
| 13.1 Curva patrón de glucosa para la cuantificación de almidón total y almidón resistente por la reacción de glucosa oxidasa-peroxidasa empleando el reactivo a Glucosa-SL (Sekisui Diagnostics). | 81 |
| 13.2. Curva patrón de glucosa para la cuantificación de azúcares totales por la técnica de fenol-sulfúrico. | 82 |
| 13.4. Curva patrón de glucosa para la cuantificación de azúcares reductores por DNS. | 84 |
| 13.5 Placa cromatográfica de los estándares de azucares para la identificación de los compuestos presentes en los almidones estudiados. | 85 |



Índice de tablas.

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Composición de la semilla de amaranto (Orosco, 2013)..... | 17 |
| Tabla 2. Contenido de aminoácidos de amaranto y los cereales más consumidos mg AA/ g N (Bressani, 2006)..... | 18 |
| Tabla 3. Contenido de ácidos grasos en el aceite de la semilla de amaranto y otros productos (Kraujalis & Venskutonis 2013). | 19 |
| Tabla 4. Composición química de harina de amaranto y extracto de almidón..... | 56 |
| Tabla 5. Contenido de almidón resistente en el extracto almidón de amaranto sometido a reacción de succinatación con OSA a diferente pH..... | 58 |
| Tabla 6. Contenido de almidón resistente en el extracto de almidón al someter a succinatación con OSA a diferentes tiempos de reacción | 58 |
| Tabla 7. Contenido de almidón resistente en el extracto de almidón al someter a fosfatación a diferentes temperaturas de reacción con TPS. | 60 |
| Tabla 8. Contenido de almidón resistente en el extracto de almidón al someter a fosfatación a diferentes tiempos de reacción con TPS. | 60 |
| Tabla 9. IAA e ISA del almidón de amaranto sometido a reacción de succinatación con OSA a diferente pH de reacción..... | 61 |
| Tabla 10. IAA e ISA del almidón de amaranto sometido a reacción de succinatación con OSA a diferentes tiempos de reacción..... | 61 |
| Tabla 11. IAA e ISA del almidón de extracto de amaranto sometido a reacción de fosfatación a diferente temperatura de reacción..... | 62 |
| Tabla 12. IAA e ISA del almidón de amaranto sometido a reacción de fosfatación a diferente tiempo de reacción..... | 62 |
| Tabla 13. IAA e ISA de harina y almidón de amaranto sometido a reacciones de modificación química. | 63 |
| Tabla 14. Azúcares consumidos (%) por bacterias lácticas en medio TSB empleando diferentes fuentes de carbono. | 67 |
| Tabla 15. Azúcares reductores y azúcares totales presentes en los almidones estudiados. | 69 |
| Tabla 16. Rf calculados por CCP de los almidones modificados y consumidos por <i>Pediococcus pentosaceus</i> | 71 |
| Tabla 17. Datos para la cuantificación de almidón total y resistente | 81 |
| Tabla 18. Datos para la cuantificación de azúcares totales. | 82 |
| Tabla 19. Datos para la elaboración de la curva estándar de glucosa libre | 83 |
| Tabla 20. Datos para la elaboración de la curva estándar de azúcares reductores. | 84 |
| Tabla 21. Rf de los estándares de azúcar | 85 |



Índice de Figuras.

| | |
|---|----|
| Figura 1. Apariencia del cultivo de amaranto..... | 15 |
| Figura 2. Estructura de la semilla de amaranto (Sánchez, 2007)..... | 16 |
| Figura 3. Estructura de los gránulos de almidón A) Semilla nativa (Xiangli, K., Jingsong, B. & Harold, C., 2008), B) Semilla reventada (Lara & Ruales, 1999)..... | 22 |
| Figura 4. Reacciones químicas durante la acetilación del almidón (Xu, Miladinov & Hanna, 2004)..... | 29 |
| Figura 5. Almidón modificado OSA (García, 2011)..... | 29 |
| Figura 6. Almidón fosfatado (García, 2011)..... | 30 |
| Figura 7. Obtención de almidón trifosfatado con Tri-metafosfato de sodio (Rodríguez, 2009)..... | 31 |
| Figura 8. Transformación de trifosfato mono-almidón a mono y di-almidón fosfato (Rodríguez, 2009)..... | 32 |
| Figura 9. Proceso de reacción de la GOD-POD para la cuantificación de glucosa (Pérez & Brambila, 2005)..... | 52 |
| Figura 10. Diagrama de aplicación de muestras en placa cromatográfica..... | 54 |
| Figura 11. Micrografías del proceso de obtención de almidón de amaranto y su modificación con un acercamiento de 2000x y voltaje de aceleración de 10 kV. A) Harina de amaranto, B) Harina de amaranto a 90 °C, C) Almidón de amaranto D) Extracto de almidón, E) Almidón hidrolizado, F) Almidón modificado por fosfatación, G) Almidón modificado por succinatación. | 65 |
| Figura 12. Micrografía de harina de amaranto hidrolizada A) y extracto de almidón B) de amaranto hidrolizado. | 66 |
| Figura 13. Micrografía de harina de amaranto succinatada A) y extracto de almidón B) succinatado. | 66 |
| Figura 14. Micrografía de harina de amaranto fosfatada A) y extracto de almidón B) de amaranto fosfatado. | 66 |
| Figura 15. Crecimiento de bacterias lácticas en medio TSB empleando distintas fuentes de carbono. | 68 |
| Figura 16. Crecimiento de dos bacterias lácticas empleando diferentes fuentes de carbono. | 69 |
| Figura 17. Placa cromatográfica de los almidones estudiados e inoculados con <i>Pediococcus pentosaceus</i> . Carril 1: Almidón hidrolizado, carril 2: Almidón hidrolizado consumido por <i>Pediococcus pentosaceus</i> , carril 3: Almidón modificado por fosfatación, carril 4: Almidón modificado por fosfatación consumido por <i>Pediococcus pentosaceus</i> | 70 |
| Figura 18. Curva estándar para la cuantificación de almidón resistente..... | 81 |
| Figura 19. Curva estándar para la cuantificación de azúcares totales..... | 82 |
| Figura 20. Curva estándar para la cuantificación de glucosa libre..... | 83 |
| Figura 21. Curva estándar para la cuantificación de azúcares reductores..... | 84 |
| Figura 22. Placa cromatográfica de estándares de azúcar..... | 85 |



1. Introducción.

El almidón resistente (AR) es la fracción del almidón que no es hidrolizado por la α -amilasa salival y pancreática en el intestino delgado entre los 120 minutos después de ser consumido, pero el cual puede ser fermentado en el colon; dependiendo de la naturaleza del almidón resistente éste puede ser dividido en cuatro categorías.

La semilla de amaranto presenta de un 50 a 60% de almidón, el cual consta de gránulos uniformes de tamaño pequeño, por lo que presenta características especiales como una mayor capacidad de hincharse, baja solubilidad, gran capacidad de unión al agua y baja susceptibilidad a la hidrólisis de α -amilasas, sin embargo la mayoría de las investigaciones se basan en la extracción de proteína de la semilla de amaranto debido a la calidad de ésta (contiene todos los aminoácidos esenciales) y de péptidos bioactivos, con lo cual se emplean agentes muy agresivos que dañan el resto de los componentes desaprovechándolos, por esta razón en este trabajo se empleó el residuo proveniente de la extracción enzimática de proteínas y lípidos, el cual deja disponible una cantidad considerable de almidón de amaranto.

En este trabajo se buscó darle un valor agregado al almidón de la semilla de amaranto al convertirlo a almidón resistente para lo cual se recurrió a un pretratamiento ácido con ácido clorhídrico, seguido de un método de succinación con anhídrido octenil succínico y de fosfatación empleando tripolifosfato de sodio lo que permitió obtener una considerable cantidad almidón resistente.

El almidón obtenido en esta investigación mediante la extracción enzimática de proteínas y su posterior extracción de lípidos pudiera haber ocasionado una modificación en los gránulos de almidón. Debido a esto se realizó una microscopía electrónica de barrido a los almidones obtenidos en este estudio y a la harina de amaranto sometida a los mismos procesos de modificación a los que fueron sometidos el extracto de almidón; este proceso de obtención y modificación podría afectar la capacidad de absorber y de solubilizarse en agua, razón por la cual estas características fisicoquímicas también se evaluaron.

En esta investigación se cuantificó la cantidad de azúcares reductores y glucosa libre y el análisis de la composición de los almidones obtenidos mediante cromatografía en capa fina, esto con el fin de determinar los azúcares totales consumidos de estos almidones como fuente de carbono para 6 diferentes bacterias ácido lácticas (BAL) inoculadas en dos medios de crecimiento diferente con el fin de evaluar la capacidad prebiótica de los almidones.

2. Antecedentes.

2.1. Características generales de la semilla de amaranto.

2.1.1. Aspectos botánicos.

El amaranto (Figura 1) pertenece a la familia de las amarantáceas compuesta por 70 géneros. El género *Amaranthus* comprende alrededor de 60 especies.

Es una planta dicotiledónea no gramínea que produce semillas tipo grano, por lo que se le ha denominado un pseudo cereal. Por el tipo de usos que tiene, el amaranto se clasifica también en amaranto de graneado y foliáceo, aunque también se usa con fines ornamentales. Los primeros se reconocen como originarios de América y comprenden tres especies: *A. cruentus*, *A. hypocondriacus* y *A. caudatus*, mientras que entre los amarantos productores de hoja, se encuentran *A. cruentus*, *A. dubius*, *A. hybridus* y *A. tricolor*, todos ellos cultivados principalmente en Asia y África (Huerta, Maldonado & Barba de la Rosa, 2012).

Además de las especies que producen granos, existen otras especies que ofrecen sus hojas como verdura de alto valor nutritivo tanto por su contenido de proteína como de vitaminas y minerales (Rodas & Bressani 2009).



Figura 1. Apariencia del cultivo de amaranto.

2.1.2. Tamaño y estructura.

Las semillas de amaranto son granos en forma de discos que tienen un diámetro de entre 1 y 2 mm. Su color varía del blanco al negro, pasando por el dorado y morado, dependiendo de la especie de la cual provengan.

Las semillas contienen una sola capa de testa y una de tegumento formada por células con engrosamientos en forma de estrías; la cutícula constituye la cubierta protectora del embrión. El embrión es de forma circular con las puntas de la raíz tocando el extremo de los cotiledones. Las células del embrión varían en tamaño y forma y aparecen heterogéneas en el contenido celular. Algunas células de la pared delgada del parénquima contienen reservas en forma de cuerpos esféricos de naturaleza proteínica incrustados en una matriz esponjosa que tiene propiedades típicas de lípidos o complejos lipídicos. El centro de la semilla se denomina perispermo y es el tejido principal de almacenamiento, consiste de células del parénquima llenas de gránulos de almidón (Figura 2). La mayor parte de las proteínas de reserva se encuentran contenidas en cuerpo proteínicos de aproximadamente 1.5 a 2 μm de diámetro en el embrión y de menor tamaño en el endospermo (Sánchez, 2007).

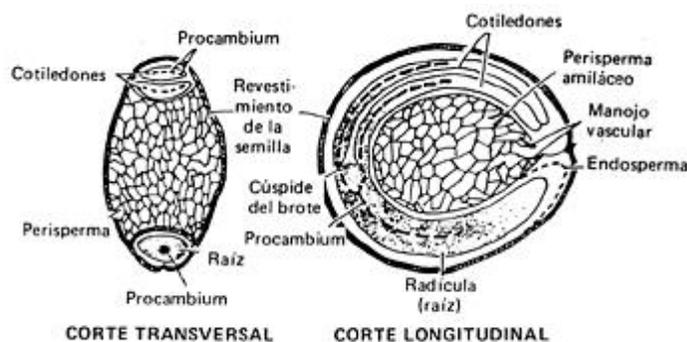


Figura 2. Estructura de la semilla de amaranto (Sánchez, 2007).



2.1.3. Composición química.

El componente principal de la semilla de amaranto es el almidón, que representa entre el 50 y 60% (Tabla 1) de su peso seco. El segundo componente en mayor proporción son las proteínas, contenido que varía dependiendo del tipo de amaranto y las condiciones de cultivo. Por su parte el aceite presente en la semilla de amaranto es considerado como un aceite comestible de alta calidad debido al porcentaje de ácidos grasos insaturados (Orosco, 2013), además presenta un alto contenido de fibra en comparación con otros cereales como maíz (2.2%), trigo (2%), avena (1.6%) y arroz (0.7%) (Tovar, 2008).

Tabla 1. Composición de la semilla de amaranto (Orosco, 2013).

| Componente | Contenido (%) |
|----------------------|----------------------|
| Carbohidratos | 55 - 60 |
| Proteína | 12 - 18 |
| Lípidos | 5 - 8.1 |
| Fibra | 2.2 - 5.8 |
| Cenizas | 2.8 - 4.4 |



2.1.3.1. Proteínas.

El contenido promedio de proteína en la semilla de amaranto es del 18% mientras que en el trigo es de 10%, en el arroz 6% y en el maíz del 5.5%. El contenido de proteína varía dependiendo del tipo de amaranto y las condiciones de su cultivo.

El amaranto cuenta con una proteína de excelente calidad, ya que es la única entre los vegetales de su tipo que contiene todos los aminoácidos esenciales, los cuales son básicos para la buena salud del humano, además se encuentran en mayor proporción en la proteína de amaranto que en la de muchos otros cereales como el trigo, arroz, maíz, etc. (Tabla 2). De hecho, casi todos los cereales tienen una deficiencia del amino ácido esencial lisina y por lo tanto este constituye el amino ácido limitante para muchas de las proteínas de origen vegetal. El amaranto en cambio, contiene el doble de lisina que la proteína del trigo y el triple que la del maíz, por lo tanto, es un complemento nutricional óptimo y balanceado en comparación con los cereales convencionales (Bressani, 2006).

Tabla 2. Contenido de aminoácidos de amaranto y los cereales más consumidos mg AA/g N (Bressani, 2006).

| Aminoácidos | Amaranto | Maíz | Trigo | Arroz | Sorgo | Patrón FAO |
|--------------|----------|------|-------|-------|-------|---------------|
| Lisina | 358 | 180 | 160 | 235 | 170 | 340 |
| Treonina | 245 | 248 | 168 | 233 | 224 | 250 |
| Metionina | 124 | 116 | 89 | 107 | 108 | - |
| Cistina | 125 | 81 | 128 | 81 | 104 | 220 |
| Valina | 257 | 319 | 270 | 416 | 357 | 310 |
| Isoleucina | 230 | 289 | 253 | 279 | 340 | 250 |
| Leucina | 358 | 810 | 391 | 513 | 1004 | 440 |
| Fenilalanina | 272 | 284 | 288 | 299 | 311 | - |
| Tirosina | 227 | 382 | 218 | 272 | 172 | 380 |
| Triptófano | 86 | 38 | 72 | 64 | 70 | 60 |
| Histidina | 159 | 129 | 119 | 100 | 120 | - |
| Arginina | 534 | 220 | 279 | 343 | 237 | - |



2.1.3.2. Lípidos.

Entre los compuestos de lípidos de las semillas de amaranto se encuentran triacilgliceroles (TAGs), fosfolípidos, escualeno y vitaminas liposolubles como el tocoferol que son los principales componentes de la fracción lipídica. Varios compuestos menores como los fitoesteroles, ceras, y alcoholes terpenos también han sido reportados en diferentes especies de amaranto (Venskutonis & Kraujalis, 2013).

El contenido de aceite en semillas de amaranto oscila entre 5 y 8% dependiendo de las condiciones ambientales, especies de planta y variedad, así como algunos otros factores. El aceite de amaranto es considerado un aceite comestible de alta calidad debido a los remarcables porcentajes de ácidos grasos insaturados linoléico y oléico, los cuales constituyen del 70-80% (Kraujalis & Venskutonis, 2013). El aceite de amaranto es similar en composición al aceite de maíz y de soya (Tabla 3), sin embargo no tiene los factores antinutricionales tan frecuentes en leguminosas como esta última (Cortes *et al.*, 2008).

El aceite de amaranto promueve actividades biológicas interesantes gracias a sus componentes entre los que hay que destacar a los tocoferoles y tocotrienoles conocidos por su actividad antioxidante, a los fitoesteroles y escualeno los cuales disminuyen el colesterol en sangre. Además, varios de los componentes del aceite se han utilizado para el cuidado de la salud de la piel o como cosméticos, lo cual amplía el campo de aplicación del aceite de amaranto además de su aplicación en alimentos funcionales. (González, 2012).

Tabla 3. Contenido de ácidos grasos en el aceite de la semilla de amaranto y otros productos (Kraujalis & Venskutonis 2013).

| Ácido graso | Ácido graso (%) | | |
|-------------|-----------------|------|------|
| | Amaranto | Maíz | Soya |
| Palmítico | 18.8 | 11.0 | 10.7 |
| Esteárico | 3.8 | 2.0 | 3.9 |
| Oléico | 24.1 | 24.1 | 22.8 |
| Linoléico | 51.0 | 61.9 | 50.8 |
| Linolénico | 0.8 | 0.7 | 6.8 |



2.2. Principales usos de la semilla de amaranto.

La mayoría de los usos de la semilla de amaranto se basan en el aprovechamiento de su proteína debido a la cantidad y calidad de la misma, ya sea consumiendo el tradicional dulce de “alegría”, agregando la harina directamente en un producto o en la extracción de proteína para el aprovechamiento de péptidos bioactivos.

En el caso de la adición directa de harina de amaranto, ésta ha sido usada en la panadería con el fin de elevar el valor nutricional, sin embargo el bajo contenido de gluteninas y gliadinas no permiten la formación y desarrollo del gluten el cual es responsable de la formación de una masa elástica y extensible (Flores, 2014), cuando la harina de amaranto es mezclada con harina de trigo se modifica la proporción de gluteninas y gliadinas por lo que en proporciones mayores a un 20% en relación a la harina de trigo se obtiene un pan con un tamaño de poro de miga pequeño, hogazas más compactas y mayor tendencia a desmoronar (Montero *et al.*, 2015; Aveleida & Vázquez, 2010).

En la actualidad, la proteína de la semilla de amaranto está siendo ampliamente estudiada debido a la presencia de péptidos bioactivos con diferentes actividades: antitrombótica, antiamnésica, opiáceas, inmunomoduladores, inmonoestimulantes, embriotóxico, antihipertensivo y antioxidante, por ejemplo, para la extracción de proteínas se emplean soluciones de sulfito de sodio (Paredes, 2013), sin embargo, estos procesos dañan los componentes restantes de la semilla como el almidón y la fibra inutilizando el aprovechamiento íntegro de la semilla.

Por su parte, la extracción de almidón implica el uso de agentes químicos como ácido clorhídrico, hidróxido de sodio y sulfitos, con lo cual se dañan las proteínas de la semilla de amaranto provocando su desnaturalización.

En la Universidad Autónoma Metropolitana, en un trabajo previo reportado por Robles (2015) se realizó la extracción simultánea de proteína y lípidos de amaranto con proteasa obteniendo un rendimiento de extracción de proteínas del 85%, dejando disponible el almidón, al cual se le puede dar un valor agregado convirtiéndolo en almidón resistente.



2.3. Almidón de amaranto.

El contenido de almidón en amaranto se encuentra en el rango de 48% para *A. cruentus* a 69% para *A. hypochondriacus* dependiendo de las zonas y condiciones de cultivo siendo únicamente del 0.48-0.65% almidón resistente (Elke & Zannini, 2013; Prieto, *et al.*, 2005; Capriles *et al.*, 2008).

El almidón de amaranto presenta una morfología de gránulos uniformes de pequeño tamaño (0.5-2 μm de diámetro), un patrón de rayos X de tipo A (típico en los cereales) (Loubes, *et al.*, 2012; Kong *et al.*, 2009), y presenta características especiales como una mayor capacidad de hincharse, baja solubilidad, gran capacidad de unión al agua y debido a su alto contenido de amilopectina presenta baja susceptibilidad a la hidrólisis de la enzima α -amilasa (Huerta, Maldonado & Barba de la Rosa, 2012)

Los gránulos de almidón consisten en dos diferentes fuentes de polímeros de glucosa denominados amilosa y amilopectina. La amilosa es esencialmente un polímero lineal que consiste de largas cadenas de moléculas de glucosa unidas por enlaces α -1,4; y constituye en promedio de 20 a 30% del almidón de los gránulos. La amilopectina es un polímero ramificado de cadenas lineales de moléculas de glucosa unidas por enlaces α -1,4 con ramificaciones en α -1,6; estos puntos de ramificación ocurren cada 12-20 moléculas de glucosa, en una distancia de alrededor de 9 nm a lo largo del eje de la molécula (Sánchez, 2007).

En el género *Amaranthus* se han encontrado tres tipos de almidones basado en el contenido de amilosa:

- Normal: Está formado por 19.4-27.8% de amilosa. Este tipo de almidón lo presenta la especie *Amaranthus cruentus*.
- Glutinoso, opaco o ceroso. Está formado en su mayoría por amilopectina y presenta únicamente de 0 a 1% de amilosa. Este tipo de almidón lo presentan las especies *Amaranthus cruentus* R104 y *Amaranthus hybridus* D88-1.
- No ceroso, traslucido. Está formado por un contenido de amilosa de 6.6-12.6%. Este tipo de almidón lo presentan *Amaranthus cruentus* K350 y K459. (Naoyoshi *et al.*, 1999).

En comparación con otras especies como el maíz, trigo, sorgo y papa, las cuales son las principales fuentes comerciales de almidón comercial, el amaranto presenta una menor cantidad de este carbohidrato (Paredes *et al.*, 1989), sin embargo al ser una semilla de uso no muy común es de alta disponibilidad y bajo costo, por lo cual uno de sus usos podría ser remplazar el almidón de maíz (Teli *et al.*, 2009).

Los gránulos de almidón del amaranto son mucho más pequeños que los encontrados en granos de cereales como maíz (5-20 μm) y arroz (3-8 μm) por lo que presentan una mayor superficie de contacto por unidad de peso (Hevia *et al.*, 2002).

2.3.1. Cambios en el almidón durante el procesamiento térmico de la semilla de amaranto.

En México la semilla de amaranto tiende a consumirse de forma “reventada”, este método se logra a través del contacto de la semilla con una superficie caliente a 120 °C por 20-30 segundos o de forma industrializada a través de un lecho fluidizado donde la semilla entra en contacto con aire a 260 °C por 15 segundos. El grano se expande 5-6 veces en volumen y ofrece de esta forma, más facilidad para su consumo y una funcionalidad atractiva (Bressani, 2006), se cree que este aumento de volumen ocurre cuando la presión interna causada por la evaporación del agua excede la fuerza de tracción de la capa de la semilla, provocando que esta capa reviente y su morfología cambie a una especie de dos burbujas de jabón o forma de mariposa. (Murakami *et al.*, 2014) .

El proceso térmico al que es sometida la semilla de amaranto tiene efectos sobre el contenido nutrimental por ejemplo, algunas vitaminas importantes como la (niacina, riboflavina, folato, vitamina B6 y ácido pantoténico disminuyen (Muyonga, Andabati & Ssepuyua, 2014 ; Murakami *et al.*, 2014). Algunos macroelementos como el sodio, magnesio, fósforo, potasio y calcio aumentan. En cuanto a valor nutrimental el contenido de aminoácidos disminuye, sin embargo aumenta su biodisponibilidad (Bressani, 2006) y en el caso del contenido lipídico este aumenta al igual que algunos lípidos con actividad antioxidante como el escualeno (Rodas & Bressani, 2009)

Durante el reventado se lleva a cabo primero la gelatinización parcial del almidón y luego se produce un cambio repentino del estado de agua dentro de la semilla ocurriendo un cambio en la morfología de los gránulos de almidón los cuales pasan de tener una apariencia granular (Figura 3 A) compacta en el estado nativo a una apariencia de membranas infladas semi-destruidas en el grano reventado debido a la subsecuente ruptura que han sufrido los gránulos de almidón (Figura 3 B), además debido al proceso térmico ocurre una degradación de almidón de aproximadamente el 19% (Lara & Ruales, 1999).

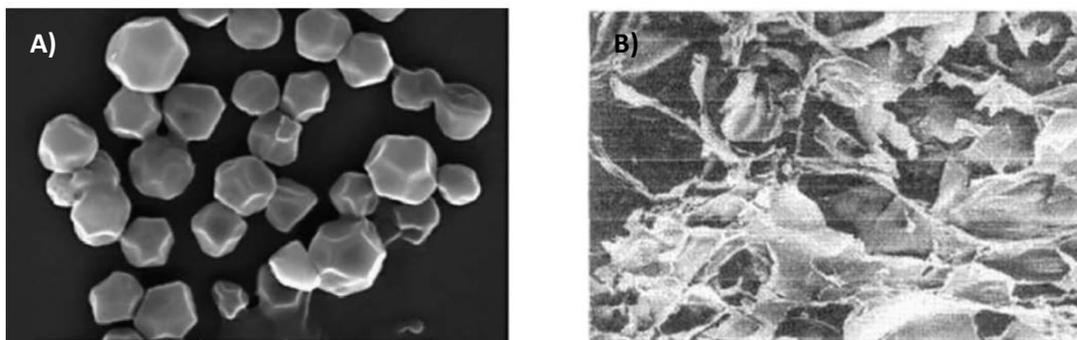


Figura 3. Estructura de los gránulos de almidón A) Semilla nativa (Xiangli, K., Jingsong, B. & Harold, C., 2008), B) Semilla reventada (Lara & Ruales, 1999)



2.3.2. Almidón resistente.

El almidón resistente (AR) es la fracción del almidón que no es hidrolizado por la α -amilasa salival y pancreática en el intestino delgado entre los 120 minutos después de ser consumido, pero el cual es fermentado en el colon. Muchos estudios han demostrado que el almidón resistente es una molécula lineal de α -1,4 glucano, esencialmente derivado de la retrogradación de la fracción de amilosa y que tiene un peso molecular relativamente bajo (1.2×10^5 Da) (Fuentes *et al.*, 2010).

Diversos factores contribuyen a la resistencia del almidón a la hidrólisis de amilasas, estos factores van desde la naturaleza de sus fuentes botánicas, así como resultado de los procesos térmicos o químicos a los que son sometidos, por lo cual se han clasificado en cuatro categorías, cada una con propiedades de resistencia similares:

- AR₁- almidón físicamente incluido: Estos gránulos de almidón se encuentran físicamente envueltos dentro de una matriz, de tal modo que las enzimas digestivas no pueden tener acceso a ellos o, si lo hacen, es con retraso. Esto puede suceder en granos enteros o parcialmente molidos, semillas, cereales o legumbres. El AR₁ existente resultará afectado por la elaboración de los alimentos y puede disminuir o ser eliminado durante la molienda.
- AR₂- gránulos de almidón resistente: Se sabe que ciertos gránulos de almidón nativo como el de las papas y los plátanos verdes, son resistentes al ataque de la α -amilasa. Esto está relacionado con la naturaleza cristalina del almidón (Haralampu, 2000).
- AR₃-Almidón retrogradado: La amilosa y amilopectina, integrantes del almidón sufren la retrogradación en un proceso dependiente del tiempo después de que el almidón haya sido gelatinizado/cocinado. La velocidad a la cual la amilosa se retrograda, es superior a la de la amilopectina que posee cadenas mucho más cortas. La amilosa puede ser retrogradada hacia una forma que resiste la dispersión en agua y la hidrólisis de α -amilasa. Esta forma de almidón resistente puede generarse durante la elaboración de alimentos (FAO, 1999 ; Haralampu, 2000).
- AR₄- Almidón químicamente modificado: En este tipo de almidón se forman nuevos enlaces químicos además de los enlaces α -1,4 y α -1,6. Son incluidos en esta categoría los almidones modificados obtenidos por varios tipos o tratamientos químicos que interfieren con la digestión de las enzimas, ejemplos de ellos son almidones modificados químicamente por entrecruzamiento o por sustitución de grupos químicos como fosfatos, succinatos, acetatos, éteres, esterres, etc. (Martínez, 2010). Los almidones con un leve grado de entrecruzamiento pierden la habilidad de hincharse durante la cocción, consecuentemente, los almidones altamente entrecruzados permanecen en su forma regular después de ser sometidos a altas temperaturas, con una ligera susceptibilidad enzimática, y no pueden ser hidrolizados por amilasas o fermentados por microorganismo. La adición de derivados químicos al almidón como los grupos octenil succinatos o grupos acetil, cambia la estructura del almidón y restringe la hidrólisis enzimática de la molécula de almidón, resultando en un almidón resistente. La región del almidón sin los derivados puede ser hidrolizado por las amilasas bacterianas y fermentado para producir ácidos grasos de cadena corta (Birt *et al.*, 2013)



Las propiedades físicas del AR₄ particularmente son su alta capacidad de retener agua, lo cual permite que sea un ingrediente funcional que provee una buena manipulación y provee textura en el producto final. Con un control cuidadoso en las condiciones de procesamiento empleadas, por ejemplo, contenido de humedad, pH, temperatura, duración del calentamiento, ciclos repetitivos de calentamiento-enfriamiento, el contenido de almidón resistente puede alcanzar hasta un 30%.

El AR₄ ha mostrado proveer cualidades en los alimentos debido a un incremento en la expansión como una textura crujiente y una reducción en la absorción de aceite en las comidas freídas, contrario a la fibra dietética que imparte una textura arenosa y un fuerte sabor (Fuentes *et al.*, 2010)

El AR₄ es de particular interés debido a su estabilidad térmica, esto le permite ser estable en la mayoría de las operaciones de cocción y permite su uso como ingrediente en una variedad mundial de comidas convencionales (Haralampu, 2000), además su uso como ingrediente alimentario ayuda a aumentar el contenido en fibra dietética de los alimentos. (FAO, 1999).



2.3.3. Enzimas que hidrolizan almidón.

En la naturaleza existen diversas enzimas capaces de hidrolizar los enlaces α -glucosídicos del almidón, estas enzimas son llamadas amilolíticas o α -glucanasas y los sustratos son designados α -glucanos (Arellano & Olmos, 1999).

Actualmente se sabe que existen múltiples isoformas de las enzimas que degradan el almidón, como son α - y β -amilasas, enzimas desramificadoras, almidón fosforilasa, glucosidasas y enzimas desramificantes (Bernal & Martínez, 2006).

2.3.3.1 Alfa amilasa.

La α -amilasa (E.C. 3.2.1.1) es una endoenzima que cataliza al azar la hidrólisis de enlaces glicosídicos α -1,4, de polisacáridos como el almidón y el glicógeno, para producir oligosacáridos de diferentes tamaños y cadenas más o menos ramificadas llamadas dextrinas límitantes. La α -amilasa es una enzima que requiere la presencia de un cofactor (Ca^{+2}) para mejorar su actividad catalítica.

El mecanismo catalítico establecido para la familia α -amilasa incluye dos tipos de reacciones $\text{S}_{\text{N}}2$; los aminoácidos que intervienen en la catálisis son Glu 230 que actúa como donador seguido de un ataque nucleofílico por el Asp 206 (Espinel & López, 2009; Peña, 2009).

2.3.3.2. Beta amilasa.

La β -amilasa (E.C. 3.2.1.2) es una exoenzima que libera unidades de maltosa del extremo no reductor de la cadena de polisacáridos mediante la hidrólisis del enlace α -1,4 glucano. Comienza a hidrolizar la amilopectina por el extremo no reductor, escindiendo de dos en dos unidades de glucosa, deteniendo su acción 2 a 3 unidades antes de cualquier ramificación.

Dado que es incapaz de hidrolizar los enlaces ramificados en las cadenas ramificadas de polisacáridos como glucógeno o amilopectina, la hidrólisis es incompleta y permanecen dextrinas limitantes macromoleculares así como glucosa y maltosa (Worthington, 2017; Zvietcovich, 1976).



2.3.3.3. Glucoamilasa.

La glucoamilasa es una enzima hidrolítica del grupo de amilasas, también conocida como amiloglucosidasa, su nombre sistemático es 1,4- α -D-glucohidrolasa (E.C. 3.2.1.3), es una exoenzima que hidroliza los enlaces glucosídicos α -1,4 y α -1,6 de la cadena de almidón dando como resultado, monómeros de glucosa. (Manera *et al.*, 2008; Amano, 2007). La tasa de hidrólisis depende del tipo de enlace así como de la longitud de la cadena, los enlaces α -1,4 son hidrolizados con mayor rapidez que los enlaces α -1,6, y las maltotriosas y maltosa son hidrolizadas a una velocidad menor que las cadenas largas de oligosacáridos (Novozymes, 2016) .

Se ha asumido que la glucoamilasa actúa principalmente en los productos de digestión de la α -amilasa, convirtiéndolos rápidamente en glucosa, lo cual tiene la ventaja de remover los efectos inhibitorios de la maltosa en la actividad de la amilasa durante tiempos prolongados de digestión. La glucoamilasa es capaz de hidrolizar los enlaces α -1,6, los cuales son imposibles de hidrolizar por la α -amilasa, removiendo dextrinas limite lo cual permite que la digestión del almidón se lleve a cabo completamente (Warren *et al.*, 2015).



2.4. Procesos de modificación del almidón.

El almidón es modificado comúnmente con el fin de mejorar sus propiedades funcionales. Los tres enfoques generales para modificar el almidón son físicos, químicos y enzimáticos. Después de la modificación, las propiedades físicoquímicas del almidón nativo son alterados vía escisión molecular, reagrupamiento molecular, oxidación e introducción de grupos químicos (Bai *et al.*, 2014).

La estructura de los almidones sustituidos está caracterizada por tres niveles: universal, granular y molecular. A nivel universal, el almidón sustituido está caracterizado por el grado de grupos químicos en las cadenas de glucosa. A nivel granular el almidón modificado está caracterizado en función de si la sustitución ocurre en la superficie o en el interior de los gránulos y si ocurre en la zona amorfa o cristalina. A nivel molecular el almidón está caracterizado por la sustitución de los grupos químicos en las cadenas repetitivas de unidades de glucosa anhidra (Richardson *et al.*, 2003).

La acetilación y el entrecruzamiento son los dos métodos de modificación del almidón más ampliamente utilizados en la industria de alimentos; sin embargo, la arquitectura del gránulo y su transformación durante el mismo, es poco conocida.

La introducción de grupos funcionales en los almidones utilizando técnicas de modificación química mejora las propiedades específicas de estos almidones. La alteración en las propiedades físicoquímicas es dependiente del tipo de modificación y grado de sustitución. Por otra parte, la susceptibilidad del almidón a la modificación química depende de las dimensiones del gránulo, estructura y origen botánico. El uso de estos métodos de modificación provoca un cambio en los niveles organizacionales del gránulo del almidón (granular, molecular y cristalino) (Sivoli, *et al.*, 2006).

Se ha sugerido que la actividad de las enzimas que hidrolizan almidón se ve interrumpida en presencia de grupos químicos sustituyentes en los residuos de glucosa con lo cual estos almidones no son hidrolizados por amilasas salivales y pancreáticas y al llegar al colon son consumidos por las bacterias que habitan en él, por lo que podrían ejercer un efecto prebiótico (Bai *et al.*, 2014).



2.4.1. Almidón modificado por hidrólisis ácida.

Los almidones convertidos por hidrólisis ácida o enzimática presentan diferentes características dependiendo en gran medida del grado de conversión, es decir, el grado al cual se han hidrolizado las moléculas del almidón. La conversión es acompañada por la interrupción de la estructura cristalina de los polímeros del almidón y de su reducción a moléculas más pequeñas (García, 2011).

Las soluciones empleadas en la hidrólisis ácida son: ácido clorhídrico o sulfúrico. Esta modificación da como resultado que el almidón forme geles de gran claridad y muy fuertes, y soluciones de menor viscosidad (Aguilar, 2007).

2.4.2. Almidón modificado por succinatación.

Entre los métodos de modificación química del almidón se encuentra la acetilación, este método consiste en una reacción de esterificación agregando anhídrido de alquénil succínico o vinil acetato en un medio alcalino, produciendo acetato de almidón (Becerril *et al.*, 2015). El anhídrido más utilizado para esta modificación es el octenilsuccinato (OSA) (García, 2011).

Mark & Mehlreter (1970) desarrollaron un método simple para preparar tri-acetato de almidón sin ningún pretratamiento empleando hidróxido de sodio como catalizador. En la Figura 4 se ilustra el mecanismo de reacción. En la primera reacción ocurre la acetilación con un anhídrido acético y un catalizador base. Este es un ejemplo de sustitución nucleofílica de anhídrido acético en un átomo de carbono insaturado. La sustitución toma lugar por un mecanismo de adición-eliminación. Además, los tres grupos OH- libres tienen diferentes reactividades. El primer OH- en el carbono 6 es más reactivo y se acetila más rápidamente que los secundarios en el carbono 2 y carbono 3 debido al impedimento estérico. El primer OH- localizado al exterior de la superficie de las moléculas de almidón reaccionan más rápidamente con los grupos anhídridos, mientras que los secundarios localizados entre la superficie interior del almidón forman puentes de hidrógeno en las unidades vecinas de glucosa. De los dos grupos OH- secundarios, el OH- en el carbono 2, es más reactivo que el del carbono 3, debido principalmente porque el primero está más cerca al enlace hemiacetal y más ácido que el anterior. Las reacciones laterales 2 y 3 raramente ocurren porque casi no existe agua en el sistema de reacción (Xu, Miladinov & Hanna, 2004).

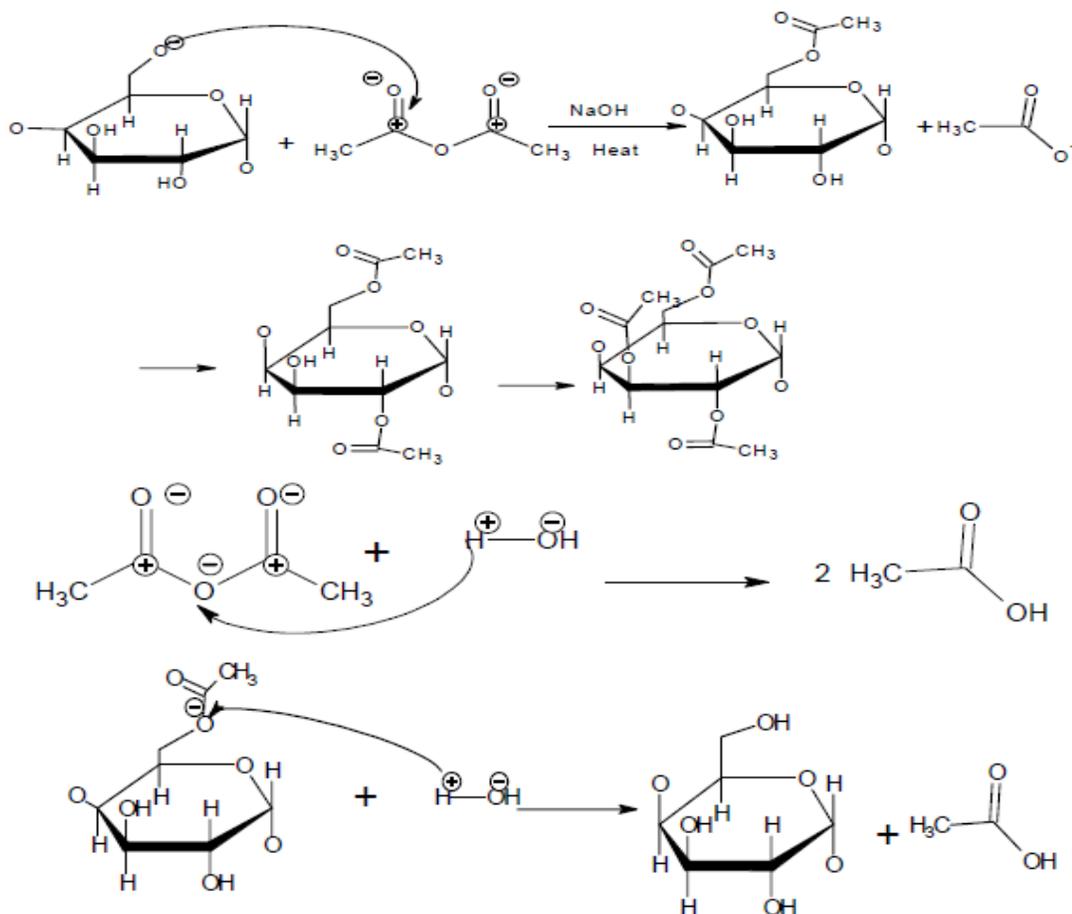


Figura 4. Reacciones químicas durante la acetilación del almidón (Xu, Miladinov & Hanna, 2004)

Los almidones octenil succinatados (Figura 5) de grado alimenticio están limitados legalmente a tratamientos con un máximo de 3% (p/p) del reactivo de anhídrido octenil succínico (OSA). A nivel granular, la mayoría de los gránulos de almidón son accesibles y reaccionan con OSA. La sustitución de OSA ocurre primeramente en la región amorfa principalmente en los grupos OH-2 y OH-3 (Bai *et al.*, 2014).

Estos almidones modificados son efectivos emulsificadores por tener grupos bifuncionales tanto hidrofóbicos como hidrofílicos. A diferencia de los surfactantes típicos, los almidones alquienil succinatados forman películas fuertes en la interfase aceite/agua (García, 2011).

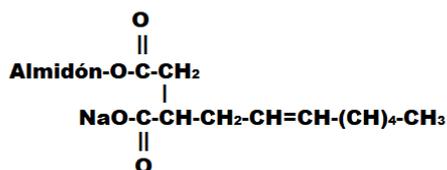


Figura 5. Almidón modificado OSA (García, 2011)

Como características, estos almidones presentan baja temperatura de gelatinización, poca tendencia a retrogradar y a formar geles formando una pasta clara. Son usados para la elaboración de alimentos congelados, estabilizadores de emulsiones y en la elaboración de productos de encapsulados (Becerril, M. *et al.*, 2015).

Actualmente se está estudiando la obtención de almidón de amaranto resistente debido a la naturaleza cerosa de éste. Bhosale & Singhal (2006) realizaron la succinación de almidón de amaranto a la par de almidón ceroso de maíz, obteniendo que el almidón de amaranto necesita una menor temperatura (30 °C) y menor tiempo de reacción (6 horas) que el almidón ceroso de maíz el cual necesita una temperatura de 40 °C y 24 horas de reacción para alcanzar almidón resistente con un grado de sustitución de 0.02.

2.4.3. Almidón modificado por fosfatación.

Los almidones fosfatados (Figura 6) tienen un importante papel en la industria alimentaria, los almidones con altos niveles de fosforilación son deseables debido a que estos presentan mejores propiedades funcionales como solubilidad, propiedades de aglutinantes, digestibilidad y emulsificación (Kim, Shih & Champagne, 1999). El almidón es fosfatado generalmente mediante calentamiento en presencia de agentes químicos como tripolifosfato de sodio (TPS) o trimetafosfato de sodio (TMS) (Castro, 2014).

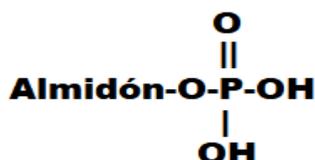


Figura 6. Almidón fosfatado (García, 2011)

De acuerdo a lo reportado por Huang y colaboradores (2011) la fosforilación ocurre principalmente en los carbonos 3 y 6 de los residuos de glucosa, este enlace se da principalmente por el monofosfato de mono-almidón.

Sang *et al.* (2007) propusieron la siguiente ruta de la reacción del almidón con STMP (trimetafosfato de sodio) en una solución acuosa de hidróxido de sodio a un pH de 9.5 a 12.5. (Figura 7).

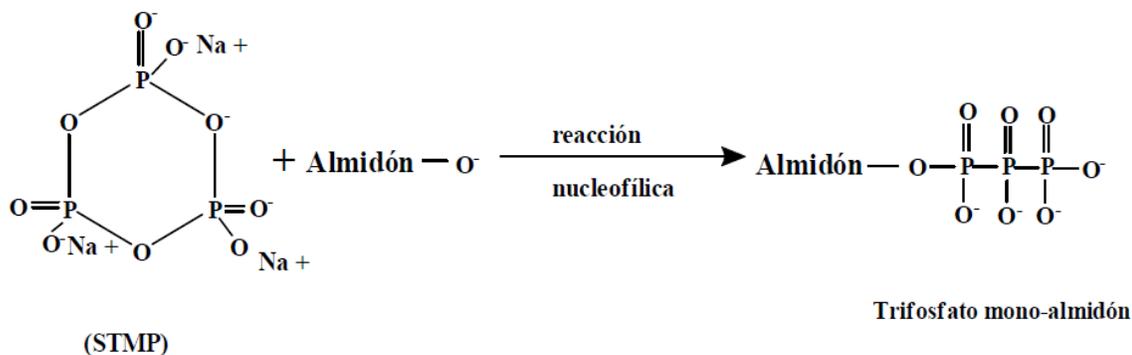


Figura 7. Obtención de almidón trifosfatado con Tri-metafosfato de sodio (Rodríguez, 2009)

En el primer paso se abre el anillo del STMP por efecto de un ataque del ion alcoholato de un almidón en el STMP para formar el compuesto intermediario tripolifosfato mono-almidón.

En un pH alcalino los cuatro hidrógenos ionizables en el trifosfato mono-almidón intermediario podrían estar negativamente cargados, mientras que a pH ácidos se favorecen las reacciones de sustitución por los grupos negativos del agente fosfatante (Kim *et al.*, 1999); Los tratamientos de almidón a concentraciones altas de ácido y temperaturas relativamente bajas (20-40 °C) resultan en una hidrólisis específica de la zona amorfa de los gránulos de almidón dando como resultado un almidón cristalino (Blennow *et al.*, 2000).

Los tres grupos fosforil a lo largo de la cadena trifosforil tienen un OH- fuertemente ionizable. Aparentemente, los pirofosfatos en el compuesto intermediario ionizado, son más fáciles de separar que los grupos ortofosfatos cuando el ion hidróxido o el ion alcoholato-almidón atacan al producto intermediario trifosfato mono-almidón. El ataque del ion RO⁻ u OH⁻ en el α-fósforo del grupo trifosfato es más eficaz que cualquiera de los átomos de fósforo β ó γ y sólo forma di-almidón monofosfato (DAMF) y mono-almidón monofosfato (MAMF) (Figura 8).

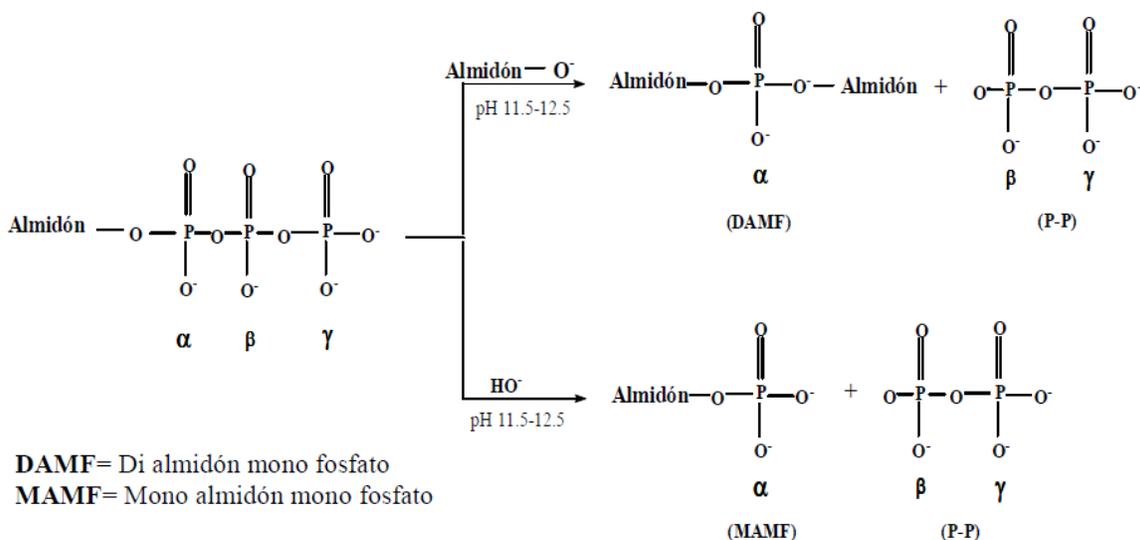


Figura 8. Transformación de trifosfato mono-almidón a mono y di-almidón fosfato (Rodríguez, 2009).

Asimismo, el almidón tripolifosfato reacciona lentamente por un mecanismo de competición. Al parecer el grupo γ -fosforil se pierde por el mecanismo de eliminación el cual es una reacción unimolecular (Sang *et al.*, 2010).

El almidón de amaranto ha sido sometido a reacciones de fosfatación-extrusión con el fin de producir almidones como agentes encapsulantes, obteniendo almidones fosfatados con un grado de sustitución de 0.041. En este proceso se realizó la aspersión de TPS a las muestras de almidón y se sometieron a extrusión ajustando la temperatura del barril a 50 °C, 130 °C y 170 °C para la zona de alimentación, transición y de alta presión respectivamente, así como una velocidad de tornillo de 80 rpm (García, 2011).



2.5. Prebióticos.

Un prebiótico es el sustrato trófico del probiótico (Silveira *et al.*, 2003). Son sustancias de la dieta (principalmente polisacáridos y oligosacáridos no digeribles por enzimas humanas) que nutren grupos seleccionados de microorganismos que habitan en el intestino y favorecen el crecimiento de bacterias beneficiosas por sobre las nocivas (Garisch, *et al.*, 2011).

Para que un ingrediente alimenticio sea considerado prebiótico debe cumplir con los siguientes criterios:

- No debe ser hidrolizado o absorbido en la parte alta del tracto digestivo.
- Debe ser fermentado selectivamente por una o un número limitado de bacterias potencialmente benéficas del colon.
- Debe ser capaz de alterar la microbiota colónica tornándola saludable, por ejemplo reduciendo el número de organismos putrefactivos e incrementando las especies sacarolíticas (Olagnero, Abad & Bendersky, 2007).

Como ejemplos de prebióticos tenemos carbohidratos no digeribles/fermentables como la inulina, oligofruktosa, polidextrosa, galactooligosacáridos y hemicelulosa (Olagnero, Abad & Bendersky, 2007) así como otros compuestos menos definibles químicamente como fibras solubles de la dieta (Martí, Moreno & Martínez 2003).

La fibra no sólo es fundamental en la regulación del ritmo y el tránsito intestinal, debido a que es fermentada en el colon, los productos de este proceso son ácidos grasos de cadena corta (AGCC), los cuales son benéficos para la salud del hospedero, además genera energía y tiene efectos metabólicos sistémicos y en el colon. Algunas fibras como el almidón resistente participan en el mantenimiento y crecimiento de la población bacteriana gracias a su efecto prebiótico (García & Velasco, 2007).

2.6. Probióticos.

El término “probiótico” fue utilizado por primera vez en el año 1965 para describir en un principio aquellas sustancias secretadas por un microorganismo que estimulan el crecimiento de otros microorganismos; sin embargo, fue posteriormente cuando se acuñó la palabra como se conoce actualmente, aludiendo a microorganismos incluidos en productos dietéticos que contribuyen al balance microbiano intestinal (López-Brea & Domingo, 2007).

Los probióticos son microorganismos vivos que al ser ingeridos en cantidades adecuadas ejercen una influencia positiva en la salud o en la fisiología del hospedero. Una vez que los probióticos son ingeridos ocurren cambios en la microbiota intestinal que repercuten positivamente en el estado de salud del consumidor (González, Gómez & Jiménez, 2003). En la actualidad todavía se desconocen muchos aspectos relativos a sus mecanismos de acción; sin embargo, se reconoce su



funcionalidad en la prevención y el tratamiento de trastornos gastrointestinales, reducción de intolerancia a la lactosa, modulación del sistema inmune y reducción de los niveles de colesterol (Saenz & Collado, 2003).

Para que un organismo sea considerado probiótico debe reunir algunas características como ser habitante normal del intestino humano, no ser patógeno ni tóxico, sobrevivir al medio ácido del estómago y efecto de la bilis en el duodeno, capacidad de adhesión a las células epiteliales, adaptarse a la microbiota intestinal sin desplazar la microbiota nativa ya existente, producir sustancias antimicrobianas y tener capacidad para aumentar de modo positivo las funciones inmunes y las actividades metabólicas (Villena, M. *et al.*, 2009).

En pocos años los probióticos han evolucionado desde productos pioneros, como *Lactobacillus acidophilus*, hasta la gran variedad que existe actualmente con varios tipos de *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Lactococcus lactis*, *Pediococcus pentosaceus*, *Streptococcus thermophilus*, *Enterococcus faecium* e incluso hongos y levaduras como *Aspergillus oryzae* y *Candida pintolopesli* (Amores *et al.*, 2004).

Es responsabilidad de la microbiota intestinal, fundamentalmente las bifidobacterias y los lactobacilos, la producción AGCC y ácido láctico, como consecuencia de la fermentación de carbohidratos no digeribles. Estos productos disminuyen el pH en el colon creando un ambiente donde las bacterias potencialmente patógenas no pueden crecer y desarrollarse.

Los prebióticos constituyen el sustrato fundamental (el “alimento”) de las bacterias probióticas estimulando su crecimiento (Gómez, Nova & Marcos 2008).

2.6.1. *Lactobacillus casei* Shirota.

Lactobacillus casei Shirota es una bacteria Gram positiva, no amilolítica y homofermentativa facultativa productora de ácido láctico, es miembro de la amplia clasificación de las bacterias ácido lácticas (BAL), esta bacteria presenta una morfología en forma de barra de 0.4-0.6 x 2-3 μm de largo y se encuentra formando parejas o en cadenas cortas de tres a cuatro células. Esta cepa es capaz de crecer a temperaturas entre los 27 y 43 °C con un óptimo de 37 °C (Heimbach, 2012).

Lactobacillus casei Shirota es uno de los probióticos más estudiados, ha sido empleado en la producción de leche fermentada por más de 70 años, y ha sido probado como un importante probiótico con muchos beneficios como mejorar el balance de la microbiota intestinal, producción de ácidos grasos volátiles, acción antitumoral, estimulante del sistema inmune y actividad antimicrobial (Figuroa *et al.*, 2010).



2.6.2. *Lactobacillus rhamnosus* GG.

Lactobacillus rhamnosus GG (LGG) pertenece al grupo de las BAL es una bacteria Gram positiva, anaerobia facultativa. LGG es una bacteria heterofermentativa que es capaz de metabolizar almidón, pero prefiere metabolizar disacáridos por sobre tri y tetrasacáridos, produce ácido láctico y etanol bajo condiciones de anaerobiosis. (Villavicencio, 2006; Gänzle & Follador, 2012; De Vos *et al.*, 2009).

LGG es una bacteria en forma de bastones de 0.8-1.0 x 2.0 – 4.9 μm con extremos terminales redondeados y frecuentemente se encuentra como células individuales o en cadenas (De Vos *et al.*, 2009).

LGG fue aislado hace más de 20 años por Goldin y Gorbach de una muestra fecal de un adulto sano basado en un severo criterio de selección. Este criterio incluía una alta capacidad de adhesión *in vitro*, alta resistencia a la acidez gástrica y alta actividad antimicrobiana contra patógenos como *Salmonella*. Estudios *in vivo* han demostrado la buena capacidad de LGG de persistir en el tracto gastrointestinal humano y se ha probado su capacidad de prevenir y aliviar ciertos tipos de diarrea y prevenir ciertas enfermedades atópicas (Lebeer *et al.*, 2011) .

2.6.3. *Lactobacillus delbrueckii*.

Lactobacillus delbrueckii es una bacteria no móvil con extremos redondeados y tamaño de 0.5-0.8 x 2-9 μm de largo, ésta se encuentra de forma individual y en cadenas cortas. Se trata de una bacteria homofermentativa obligatoria, sus condiciones óptimas de crecimiento son 45 °C de temperatura y pH entre 5.5 y 6 (De Vos *et al.*, 2009).

Esta bacteria metaboliza diferentes carbohidratos en función de la cepa, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii* es capaz de metabolizar manosa y sacarosa, no así celobiosa, lactosa, melobiosa y rafinosa. Mientras *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* metaboliza lactosa, maltosa, manosa, sacarosa y trealosa, no así manitol, melobiosa y rafinosa (De Vos *et al.*, 2009).; *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* metaboliza lactosa, sacarosa y almidón de papa (Feoli, Escobar & Marin, 1995).

2.6.4. *Lactobacillus fermentum*.

Lactobacillus fermentum es una bacteria no móvil de grosor y longitud ampliamente variable (0.5-0.9 μm), se encuentra comúnmente de forma individual o en pares. Es una bacteria heterofermentativa obligatoria, ha sido aislada de productos lácteos, masas fermentadas, boca y heces humanas (De Vos *et al.*, 2009).



Las condiciones óptimas de crecimiento para esta bacteria son: una temperatura óptima entre 41-42 °C y pH de 4-6 (LeBlanc, Garro & Savoy de Giori, 2004).

Esta bacteria es capaz de metabolizar diferentes tipos de carbohidratos como galactosa, maltosa, melibiosa, rafinosa, ribosa, sacarosa y de hidrolizar el almidón (De Vos *et al.*, 2009 ; Talamond, Noirod & de Kochko, 2006). Además se ha asociado con una disminución en los niveles de glucosa en sangre al administrarse un simbiótico de Raftilosa p95 con *Lactobacillus fermentum* en pacientes con diabetes, por lo que aparentemente muestra un alto potencial de metabolismo de carbohidratos (tanto hexosas como pentosas) en el intestino, limitando la absorción de azúcares en sangre (Mikelsaar & Zilmer, 2009).

Lactobacillus fermentum presenta actividad antimicrobiana al producir diversos compuestos como peróxido de hidrógeno, bacteriocinas y biosurfactantes por lo que es capaz de inhibir el crecimiento de patógenos intestinales y urogenitales (Mikelsaar & Zilmer, 2009; Tulumoğlu, Kaya & Şimşek, 2014).

2.6.5. *Pediococcus pentosaceus*.

Pediococcus pentosaceus es una bacteria perteneciente a la familia *Lactobacillaceae*, es Gram positiva, anaerobia facultativa, homofermentativa, de morfología coco esférica de 0.5 a 0.8 µm de diámetro, es una bacteria no móvil que se dispone en pares, pero también en tétradas debido a que se dividen en dos planos, pero nunca como cadenas elongadas características de los lactobacilos (Olivera, 2011; Todorv *et al.*, 2017).

Las condiciones óptimas de crecimiento de *Pediococcus pentosaceus* son a pH entre 6 y 6.5, pero su crecimiento se puede dar a pH de 8, temperatura óptima de crecimiento entre 28 y 32°C (De Vos *et al.*, 2009) .

Pediococcus pentosaceus ha sido reportada como una bacteria capaz de consumir almidón como fuente de carbono en diferentes condiciones de cultivo, sin embargo, en ensayos *in vitro* a 30 o 37 °C se encontró la ausencia de amilasas extracelulares, por lo que se puede afirmar que estas enzimas se encuentran ancladas a la célula (Escamilla *et al.*, 2000).

2.6.6. *Bifidobacterium longum*.

Las bifidobacterias son bacilos Gram positivos que se pueden presentar solos o en cadenas de muchos elementos, en agregados formando una estrella o en forma de "V". No forman esporas y no son móviles. Son estrictamente anaerobios, sin embargo, la sensibilidad al oxígeno varía notablemente entre cepas y especies. Esta variación se debe a que, en condiciones aerobias, tienden a acumular peróxido de hidrógeno, el cual es reducido por un sistema NADH peroxidasa, que varía dependiendo de la cepa. El pH óptimo de crecimiento se encuentra entre 6 y 7, sin crecimiento por



debajo de 4.5-5.0, o bien por encima de 8.0-8.5. La temperatura óptima oscila de 37-41°C con un desarrollo mínimo a 25-28° C y 43-45° C (Iñiguez & Acedo, 2006).

La actividad metabólica de carbohidratos varía considerablemente dependiendo de la cepa de bifidobacteria. De acuerdo a lo reportado por Pokusaeva *et al.* (2011) quienes ensayaron con la cepa *Bifidobacterium longum* subps. *longum* NCC2705, la cual fue capaz de metabolizar melobiosa, fructosa, sacarosa, maltosa, y rafinosa pero no es capaz de metabolizar trealosa, manitol, glicerol, xilitol y almidón (Pokusaeva, Fitzgerald & Van Sinderen, 2011).

2.6.7. *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*.

Lactococcus lactis es un microorganismo mesófilo de morfología esférica u ovoide que se encuentra en forma individual, en pares o en cadenas y frecuentemente elongada en dirección de la cadena. Es una bacteria Gram positiva no formadora de endosporas (De Vos *et al.*, 2009).

Lactococcus lactis es capaz de fermentar la lactosa y almidón produciendo ácido láctico en gran cantidad siendo el principal producto de la fermentación glucosa, de la misma forma es capaz de producir bacteriocinas; ambos factores, acidez y bacteriocinas, son capaces de inhibir el crecimiento de un amplio espectro de microorganismos (Benavides & Hermida, 2008; Serna & Rodriguez, 2005).



3. Planteamiento del problema.

Las enfermedades gastrointestinales son uno de los principales problemas de salud pública en México. Se transmiten, ya sea por vía fecal-oral, o bien por el consumo de agua y alimentos contaminados. Afectan principalmente a la población infantil, y tanto su incidencia como su prevalencia dependen del nivel socioeconómico de los pacientes. Los agentes patógenos involucrados son virus, parásitos y bacterias.

Diversos factores han contribuido al aumento de enfermedades gastrointestinales como el consumo de alimentos altos en grasa, azúcares y el bajo consumo de alimentos que refuercen la flora intestinal.

3.1. Elevado consumo de alimentos ricos en azúcares refinados y grasas.

El mundo ha experimentado modificaciones drásticas en los patrones de procesamiento de alimentos. En el pasado, éste se realizaba de forma predominante en el hogar y dependía de tecnología relativamente simple, con algún grado de procesamiento artesanal en el ámbito colectivo local. En la actualidad, varios de los alimentos consumidos por la población se procesan de manera industrial mediante tecnología compleja, en centros que concentran volúmenes elevados de producción, casi siempre alejados del ámbito local.

La mala alimentación, los excesos de grasa, sal, azúcar y el poco tiempo destinado a la preparación de los alimentos y a su consumo, se asocian con algunas enfermedades como el estreñimiento, diarrea y gastritis, enfermedades que pueden ser evitadas y/o controladas positivamente con una dieta adecuada. En el caso de estreñimiento y gastritis el consumo de café y alimentos con alto contenido de grasa deben ser evitados. En el caso de diarrea la ingesta de alimentos se debe reducir. Se recomienda comer menos y beber más agua. Muchos encuentran los refrescos o las gaseosas deliciosas, pero es mejor sólo tomar al agua potable sin gas.

3.2. Bajo consumo de alimentos con efecto benéfico en la flora intestinal.

La dieta consumida hace un millón de años por nuestros antecesores contenía un 50% menos de proteínas, 75% menos de grasas saturadas y un 90% menos de sodio. El hombre del Paleolítico consumía entre 4 y 10 veces más fruta y fibra que el actual, lo que le aportaba 10 veces más vitaminas y antioxidantes. Pero la diferencia más llamativa con nuestros ancestros es que en su dieta ingerían diariamente más de 109 bacterias beneficiosas para la salud, entre otras, distintas especies de *Lactobacillus*. Este aporte de microorganismos beneficiosos para la salud era debido a que estos alimentos, sobre todo vegetales, eran almacenados durante mucho tiempo



produciéndose fermentaciones, entre ellas la láctica. Algunos de estos alimentos se siguen consumiendo en la actualidad como el ogi (África), el kenkey (Ghana) y el pozol (México).

La microbiota intestinal ejerce un papel importante en el efecto barrera de la mucosa intestinal frente a infecciones. Sus mecanismos de acción son muy variados: modificar los niveles de adhesión celular, producir sustancias antimicrobianas o la estimulación de órganos linfoides asociados al tracto intestinal. El resultado es una estimulación del efecto barrera que puede prevenir la invasión de patógenos.

Directamente relacionados con estos productos surgen los conceptos de probiótico y prebiótico. Para que los organismos probióticos cumplan su correcta función dentro de la microbiota intestinal necesitan alimentarse, es ahí donde toman parte los prebióticos.



4. Justificación.

En México hay un notable incremento en los problemas de salud de la población los cuales van desde problemas de desnutrición hasta problemas de malnutrición como el sobrepeso y la obesidad debido al consumo de alimentos ricos en grasas y carbohidratos así como el bajo consumo de alimentos ricos en fibra; además de problemas gastrointestinales por el bajo o nulo consumo de alimentos que refuercen la flora gastrointestinal debido a los malos hábitos de alimentación y a la escasa disponibilidad de alimentos saludables.

La semilla de amaranto es un alimento funcional que presenta una cantidad y calidad considerable de proteínas por lo cual ha sido adicionada en forma de harina en algunos alimentos sobre todo en panadería, sin embargo debido a sus condiciones reológicas no es posible obtener las características deseadas en el producto final, es por ello que la mayoría de los estudios se han enfocado en la extracción de proteínas, desaprovechando el resto de los componentes cuando el principal componente de la semilla es el almidón. Una de las formas de consumir la semilla íntegramente es en el dulce de alegría, sin embargo, por su alto contenido de azúcares este no puede ser consumido por toda la población en especial por aquellos que padecen diabetes, además no es una buena alternativa si lo que se pretende es combatir la obesidad.

Por estas razones la justificación de este proyecto es aprovechar el almidón nativo de la semilla de amaranto como subproducto de la extracción de proteínas, darle un valor agregado al convertirlo a almidón resistente, el cual es conocido por ser de lenta digestión, además de ser una fuente de fibra insoluble y evaluar si este podría tener capacidad como prebiótico empleando los almidones modificados como fuente de carbono en el crecimiento de diferentes bacterias ácido lácticas.

5. Hipótesis general.

Es posible utilizar el almidón proveniente de la extracción de la fracción lípido-proteica de la semilla de amaranto, transformarlo a almidón resistente y que este tenga efecto prebiótico.



6. Objetivo general.

Convertir el extracto de almidón de amaranto a almidón resistente y evaluar su efecto como prebiótico.

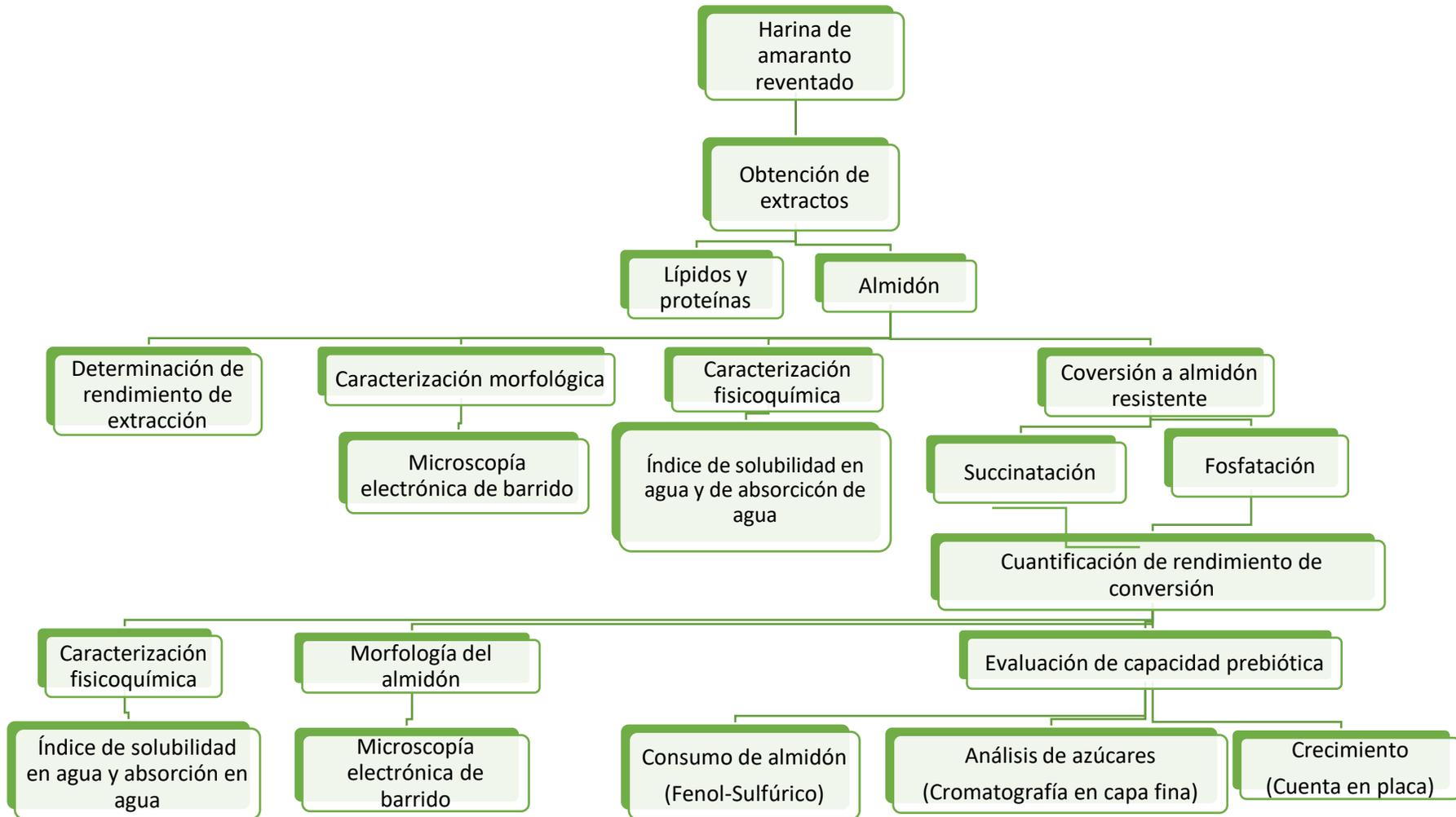
7. Objetivos particulares.

- Cuantificar el contenido de almidón en el residuo de la harina de amaranto sometida a hidrólisis enzimática para la extracción de proteínas.
- Convertir el almidón nativo a almidón resistente por los métodos de fosfatación y succinatación y cuantificar el contenido de almidón resistente alcanzado.
- Caracterizar fisicoquímicamente y morfológicamente el extracto de almidón de amaranto, almidón hidrolizado, almidón succinatado y almidón fosfatado de amaranto.
- Determinar el efecto prebiótico de almidón de amaranto, almidón hidrolizado y almidón fosfatado de amaranto.



8. Metodología.

8.1. Plan general de trabajo.





8.2. Obtención del almidón de amaranto.

Para la obtención de almidón de la semilla de amaranto se extrajeron las proteínas y lípidos de esta semilla de acuerdo a lo descrito por Robles (2015), con este método el residuo de la hidrólisis enzimática corresponde a almidón-fibra y un contenido bajo de proteínas que se empleó en la presente investigación.

La semilla de amaranto reventado se molió en un molino de café (Kraups GX4100) y posteriormente se pasó a través de un tamiz de 250 μm .

Se realizó una suspensión de harina de amaranto en agua destilada en una proporción 1:4 (agua:amaranto) a 90 °C y se mantuvo la temperatura durante 10 minutos, la mezcla se dejó enfriar a temperatura ambiente de acuerdo a lo reportado por (Hanmoungjai, Pyle & Niranjan, 2001).

Se ajustó la temperatura de la suspensión a 50 °C, se agregó proteasa de *Bacillus licheniformis*, (E.C. 3.4.21.62. ≥ 2.4 U/g, Sigma Aldrich) en una proporción de 0.036 U/g, para favorecer la actividad enzimática la suspensión se incubó en un baño termostático con agitación horizontal (LabTech LSB-015S) durante 4 horas a 100 rpm a 50°C.

Para inactivar a la proteasa, la suspensión se llevó a un baño con agua a 90 °C y se mantuvo esta temperatura durante 10 minutos.

La suspensión se centrifugó a 6000 rpm (Eppendorf 5804R) durante 40 minutos a 21 °C.

El sobrenadante consistente en proteínas y lípidos se separó del residuo fue sometido a extracción de materia grasa mediante Soxhlet empleando hexano como solvente y un tiempo de extracción de seis horas, el residuo consistente en almidón-fibra se secó a 45 °C por 24 h en un horno (Riosa), se molió en un molino de café (Kraups GX4100), se tamizó con un tamiz de 250 μm , se almacenó en bolsas selladas a vacío y se mantuvieron en refrigeración hasta su uso.

8.3. Conversión de almidón nativo a almidón resistente.

8.3.1. Hidrólisis ácida.

Como etapa previa a la succinatación y fosfatación del almidón, se llevó a cabo una hidrólisis ácida con el objetivo de hacer más eficiente el grado de sustitución de los mismos y aumentar su solubilidad. Los almidones fueron hidrolizados de acuerdo a lo reportado por García (2011). Se preparó una suspensión de almidón al 40% de sólidos en una solución de HCl (Meyer 36.46% de pureza) en una concentración de 3.4% con respecto a los sólidos de almidón. La hidrólisis se llevó a cabo a una temperatura de 50 ± 2 °C en un baño termostático (LabTech LSB-015S), manteniéndose en agitación horizontal de 100 rpm durante 4 horas. Posteriormente se ajustó el pH



a 5 con una solución de NaOH al 3% y la suspensión se centrifugó a 6000 rpm (Eppendorf 5804R) durante 10 minutos.

El sobrenadante se descartó y el sedimento fue recuperado, este se lavó con 100 ml de agua destilada y se centrifugó a 6000 rpm, este procedimiento se realizó dos veces con el fin de eliminar los residuos de ácido clorhídrico. La pasta de almidón se secó a 35 °C en una estufa (Felisa FE-291AD) por 24 h, el almidón se molió (Nutriblender) y tamizó con una malla de 250 µm para su posterior modificación química.

8.3.1.1. Determinación del rendimiento de hidrólisis.

Para determinar el rendimiento de hidrólisis que del extracto de almidón durante la hidrólisis con ácido clorhídrico se realizó el procedimiento detallado en la sección anterior, al finalizar la hidrólisis ácida, el sedimento fue secado durante 24 horas a 35 °C en una estufa (Felisa FE-291AD) y pesado.

El rendimiento de hidrólisis (%) se calculó de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\text{Hidrólisis (\%)} = \frac{\text{Peso muestra hidrolizada}}{\text{Peso inicial de la muestra}} \times 100$$

8.3.2. Almidón modificado por succinación.

La succinación del almidón de amaranto se realizó de acuerdo al método descrito por Bhosale & Singhal (2006).

Se preparó una suspensión de almidón hidrolizado en una proporción de Almidón hidrolizado:Agua (1:3.8), se mantuvo en agitación horizontal constante a 100 rpm en un baño termostático (LabTech LSB-015S) a 30 °C y durante dos horas se adicionó por goteo 3 ml de anhídrido n-octenil succínico (OSA) (2-Octen-1, succinil anhídrido, mezcla de cis y trans 97%. Sigma Aldrich) por cada 100 g de almidón. Los pH ensayados para llevar a cabo la reacción de succinación (6, 6.5, 7, 7.5 y 8) se ajustaron continuamente con una solución de NaOH (Luzeren) al 3% con ayuda de un potenciómetro (Thermo Orion). Se ensayaron distintos tiempos de reacción (3, 4, 5, 6 y 7 h). Al finalizar la reacción de succinación el pH se ajustó a 6.5 y la suspensión se centrifugó a 6000 rpm (Eppendorf 5804 R) durante 10 minutos. Se llevaron a cabo dos lavados del sedimento con 100 ml de agua destilada centrifugando a 6000 rpm después de cada lavado para eliminar los residuos del reactivo. La pasta de almidón succinatado se secó en una estufa (Felisa FE-291AD) a una temperatura de 35°C por 24 h, el almidón seco se molió en un procesador de alimentos (Nutriblender) y se tamizó en una malla de 250 µm.



8.3.3. Almidón modificado por fosfatación.

La fosfatación del almidón de amaranto se realizó de acuerdo al método descrito por Paschall (1964) con algunas modificaciones. Se realizó una suspensión de Almidón hidrolizado y tripolifosfato de sodio (TPS) (Trifosfato de sodio pentabásico, Sigma Aldrich, Pureza $\geq 98\%$) al 0.4% en una proporción 1:5 y se ajustó a un pH 6 con NaOH al 10%. La reacción se llevó a cabo en un baño termostático (LabTech LSB-015S) con agitación horizontal de 100 rpm, estudiando distintas temperaturas (30, 40, 50 y 60 °C) y tiempos de reacción (1, 2, 3, 4 y 5 h). Al término de la reacción, la suspensión fue centrifugada a 5000 rpm por 5 minutos (Eppendorf 5804R), el sobrenadante fue descartado y el residuo fue lavado con agua destilada y centrifugado a 5000 rpm (Eppendorf 5804R) por 5 minutos, esta operación se repitió dos veces. El residuo fue secado en una estufa (Felisa FE-291AD) a 35 °C durante 24 h, molido y tamizado. El almidón fosfatado se guardó en bolsas de celofán y se sometió a diálisis en agua fría durante 4 días, cambiando diariamente el agua, esto con el fin de eliminar los residuos de fosfato que no reaccionaron con el almidón. El almidón se secó nuevamente bajo las condiciones antes mencionadas.



8.4. Cuantificación de almidón total.

La cuantificación de contenido de almidón se realizó de acuerdo a lo descrito por Soraya & Soto, (2010). Este método permite determinar la cantidad de almidón total de una muestra, con una disponibilidad completa del almidón a la degradación enzimática, en este procedimiento la etapa de gelatinización y licuefacción se realizó al mismo tiempo.

Se emplearon α -amilasa termoestable de *Bacillus licheniformis* (E.C. 3.2.1.1, 1 U/ml Sigma Aldrich), amiloglucosidasa de *Aspergillus niger* (E.C. 3.2.1.3, 30-60 U/mg proteína (Sigma, Aldrich) y kit enzimático que contiene la enzima glucosa oxidasa-peroxidasa (Glucose-SL. Sekisui Diagnostics) para cuantificar el almidón como glucosa liberada.

Se pesaron 100 mg de la muestra de almidón y se colocó en un tubo de centrifuga de 50 ml, se adicionó 6 ml de agua destilada y se agregó 50 μ l de α -amilasa, se mezcló la suspensión y se colocó en un baño de agua a 97 °C por 15 minutos agitando el tubo cada 5 minutos. Se dejó enfriar el tubo a temperatura ambiente y se continuó con la agitación, una vez frío se transfirió la muestra a un matraz volumétrico de 25 ml, se diluyó enjuagando cuidadosamente el tubo con agua destilada y se aforó el matraz con agua destilada.

Se tomó 1 ml de la muestra y se transfirió a un tubo de centrifuga, a este se le agregó 2 ml de buffer de acetato de sodio (Sigma Aldrich) a pH 4.75 y 0.1 M. Posteriormente se agregó 50 μ l de amiloglucosidasa de *Aspergillus niger*, la muestra se incubó a 60 °C (Combi-SV12 FINE PCR) por 30 minutos mezclando con cuidado cada 5 minutos.

La muestra se centrifugó a 6000 rpm (Eppendorf 5804R), el sobrenadante se transfirió a un matraz volumétrico de 100 ml, se diluyó enjuagando el tubo anterior con agua destilada y se aforó el matraz. Se tomaron 20 μ l de esta solución y se transfiere a un tubo de centrifuga, se agregó 20 μ l de agua destilada y 2 ml del reactivo para cuantificación de glucosa. Finalmente, las absorbancias de las muestras fueron registradas empleando una longitud de onda de 500 nm en un espectrofotómetro de luz UV (Genesys 20 Thermo Scientific) y se utilizó una curva de calibración de glucosa anhidra (α -D Glucosa anhidra 96% Sigma Aldrich) para la cuantificación de glucosa (Apéndice 12.1).

La cuantificación de almidón total se lleva a cabo empleando la siguiente ecuación:

$$AT(\%) = \frac{\mu\text{g de glucosa} \times 10^{-3} \times 25 \times 100 \times 0.9}{\text{Peso de la muestra (mg)}} \times 100$$



8.5. Cuantificación del contenido de almidón resistente.

La cuantificación de AR se realizó de acuerdo al método descrito por Goñi *et al.* (1996). Este método determina la presencia de almidón resistente en los alimentos y aparenta en lo más posible las condiciones fisiológicas estomacales. Los propósitos principales de este procedimiento analítico son: eliminación de la proteína, eliminación del almidón digerible, solubilización del hidrolizado enzimático del almidón resistente; y la cuantificación del almidón resistente como glucosa liberada multiplicada por el factor 0.9.

Se emplearon las siguientes enzimas: Pepsina de mucosa gástrica porcina (E.C. 3.4.23.1, ≥ 250 U/mg sólido, Sigma Aldrich), α -amilasa pancreática porcina Tipo VI-B (E.C. 3.2.1.1, ≥ 10 U/mg, Sigma Aldrich), amiloglucosidasa de *Aspergillus niger* (E.C. 3.2.1.3, 30-60 U/mg proteína (Sigma, Aldrich) y reactivo para la cuantificación de glucosa Glucosa-SL (Sekisui Diagnostics).

Se pesaron 100 mg de la muestra y se colocaron en un tubo de centrifuga de 50 ml, se agregaron 10 ml de buffer Cloruro de potasio-Ácido clorhídrico (KCl-HCl) a pH de 1.5 (se ajusta el pH con 2M de HCl o 0.5M de NaOH, se agregaron 0.02 ml de la solución de pepsina (1 g de pepsina/10 ml de buffer KCl-HCl pH 1.5), se mezclaron y se dejaron en baño termostático (LabTech LSB-015S) a 40 °C durante 60 minutos con agitación horizontal constante de 100 rpm. La solución se enfrió a temperatura ambiente y se adicionaron 9 ml de buffer Tris-maleato 0.1 M (Tris-hidroximetil aminometano, Sigma Aldrich) a pH 6.9. Posteriormente se adicionó 1 ml de α -amilasa pancreática porcina (40 mg de α -amilasa/ml de buffer 0.1M Tris-maleato a pH 6.9), se mezclaron suavemente y se incubaron durante 16 h a 37 °C con agitación constante (Combi-SV12 FINE PCR).

Las muestras se centrifugaron por 15 minutos a 7000 rpm (Eppendorf 5804R) y se desecharon los sobrenadantes. Se lavaron dos veces con 10 ml de agua destilada, se centrifugó y nuevamente se desecharon los sobrenadantes. Se agregaron 3 ml de agua destilada al residuo para humedecer la muestra seguida de 3 ml de hidróxido de potasio (90% de pureza, Sigma Aldrich) a una concentración 4 M y se dejaron reposar 30 minutos a temperatura ambiente con agitación constante.

Se agregaron 5.5 ml de HCl 2 M y 3 ml de buffer de acetato de sodio-ácido acético 0.4 M pH 4.75, el pH de trabajo fue de 6.9, se agregaron 50 μ l de amiloglucosidasa (3.5 mg de amiloglucosidasa/ml de sulfato de amonio 3.2 M), se mezclaron y se dejaron reposar 45 min en baño de agua a 60 °C.

Las muestras se centrifugaron por 15 min a 6000 rpm (Eppendorf 5804R), se recolectaron los sobrenadantes y se guardaron en un frasco volumétrico. Se lavaron los residuos con 10 ml de agua destilada, se centrifugaron nuevamente y se combinaron los sobrenadantes, trabajando con un volumen final 25 ml.

Se tomaron 20 μ l de la muestra y se agregaron 2 ml del reactivo para cuantificación de glucosa, se agitó y se dejó reposar por 30 min a 37 °C con agitación en una incubadora de hibridación FINE PCR combi-SV12.



La cuantificación de AR se realizó mediante espectrofotometría a una longitud de onda de 340 nm en un espectrofotómetro de luz UV (Genesys 20. Thermo scientific) y utilizando una curva de calibración de glucosa anhidra (α -D Glucosa anhidra 96% Sigma Aldrich) para la cuantificación de glucosa (Apéndice 12.1).

La cuantificación de AR se lleva a cabo empleando la siguiente ecuación:

$$AR (\%) = \frac{\mu g \text{ de glucosa} \times 10^{-3} \times 25 \times 700 \times 0.9}{\text{Peso de la muestra (mg)}} \times 100$$

8.6. Índice de absorción de agua (IAA) e índice de solubilidad en agua (ISA).

Ambos índices se determinaron siguiendo la metodología descrita por Anderson (1969). Se pesaron 0.25 g de muestra de almidón (extracto de almidón, almidón hidrolizado, almidón fosfatado y almidón succinatado, harina de amaranto, harina de amaranto hidrolizada, harina de amaranto fosfatada y harina de amaranto succinatada) en un tubo de centrifuga de 50 ml y se adicionaron 3 ml de agua destilada. Los tubos fueron mantenidos a una temperatura de 30 °C y agitación constante a 200 rpm por 30 minutos en un baño con agitación horizontal (LabTech LSB-015S). Las muestras fueron centrifugadas a 6000 rpm (Ependorf 5804R) por 10 minutos. El sobrenadante separó con ayuda de una propipeta y fue depositado en un vaso de precipitados de 10 ml previamente puesto a peso constante. Se registró el peso del tubo con el gel sedimentado (residuo de la centrifugación). El sobrenadante se sometió a un proceso de evaporación en una estufa (Felisa FE-291AD) a 80°C durante 16 horas. El peso del residuo en el vaso se registró como residuo de evaporación.

El índice de absorción de agua (IAA) y el índice de solubilidad en agua (ISA) se calcularon de acuerdo a las siguientes ecuaciones:

$$IAA = \frac{\text{Peso del residuo de la centrifugación}}{\text{Peso seco de la muestra} - \text{Peso del residuo de la evaporación}}$$

$$ISA = \frac{\text{Peso del residuo de la evaporación}}{\text{Peso seco de la muestra}}$$



8.7. Microscopía electrónica de barrido (MEB).

Una gran variedad de microscopios y técnicas de imágenes han sido usadas para estudiar y documentar la microestructura de los gránulos de almidón en cereales y los cambios durante su procesamiento.

Mediante este tipo de técnicas se ha observado que las proteínas forman una matriz que envuelve a los almidones, así como también la formación de aglomerados proteicos irregulares que se encuentran intercalados en los gránulos de almidón (Tovar, 2008).

La modificación de los almidones involucra fenómenos físicos, químicos y bioquímicos en la superficie de contacto de las fases, por lo que la microscopía electrónica de barrido (MEB) ha tenido un papel importante en el entendimiento y morfología granular de los almidones modificados. La microscopía se emplea para detectar cambios en la estructura causados por las modificaciones químicas (Rodríguez, 2009).

Para comprobar si existía un cambio en la morfología de los gránulos de almidón durante los distintos tratamientos a los que fue sometido, las muestras de almidón fosfatado y succinatado que presentaron un mayor porcentaje de conversión a almidón resistente, así como el almidón hidrolizado, el almidón residual procedente de la extracción de proteína, harina de amaranto sometida a los mismos proceso de modificación que el almidón fueron visualizados en un microscopio electrónico de barrido y emisión secundaria con control de rangos variables de vacío de presión variable (JEOL JSM-5900 LV), con un espectrómetro EDS acoplado (Oxford). Para ello, las muestras fueron montadas sobre un pedestal metálico provisto de una cinta adhesiva conductora de doble capa (teniendo especial cuidado que la muestra quedara uniformemente esparcida sobre la cinta y evitando la formación de grumos) y recubiertas con oro (Dentum Vacuum Desk III), las condiciones fueron las siguientes: deposición de oro durante 60 segundos hasta completar 4 minutos de deposición bajo condiciones de vacío de 50 mTorr. Las muestras se guardaron en una caja Petri sellada y se dejaron secar durante 24 horas. Las muestras fueron visualizadas bajo condiciones de vacío empleando un voltaje de aceleración de 10 kV.



8.8. Evaluación de la capacidad prebiótica.

8.8.1. Pre-activación de los microorganismos probióticos e inoculación.

Para comprobar si el almidón modificado de amaranto presenta capacidad prebiótica se emplearon extracto de almidón, almidón hidrolizado, almidón fosfatado y almidón succinatado de amaranto como fuente de carbono.

Para ello se realizó la pre-activación en caldo MRS de 8 diferentes microorganismos (*Lactobacillus casei shirota*, *Lactobacillus rhamnosus* g.g., *Lactococcus lactis* sp. cremoris NCFB 712, *Pediococcus pentosaceus*, *Bifidobacterium longum* proporcionadas por el grupo de Biotecnología Alimentaria perteneciente a la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. También se empleó una cápsula de probióticos (Laboratorios Carnot) que contenía *Lactobacillus delbruekii* y *Lactobacillus fermentum*). Los microorganismos se pre-activaron en 10 ml de caldo MRS (Difco) estéril y se incubaron a 37 °C durante 24 h (LabTech).

Para evaluar el efecto prebiótico los almidones se prepararon medios de crecimiento diferentes: Caldo Triptona-Soya (TSB) y Base Nitrogenada de Levadura (YNB).

El medio TSB se preparó con la siguiente formulación: 0.017g/ ml de peptona de caseína (MCD Lab), 0.003 g/ml de triptona de soya (BD. Bixon), 0.005 g/ml de cloruro de sodio (J.T. Baker ≥99%) y 0.0025 g/ml de fosfato dipotásico (Caledon 98%).

El medio YNB fue preparado siguiendo la siguiente formulación: 0.005 g/ ml de YNB(Difco) 0.005 g/ml de cloruro de sodio y 0.0025 g/ml de fosfato dipotásico.

En ambos medios se utilizó como fuente de carbono solución de extracto de almidón, almidón hidrolizado y almidón fosfatado de amaranto en medio TSB; en medio YNB se emplearon únicamente almidón y almidón hidrolizado de amaranto todos en una concentración de 0.5%. Los medios de fuente de nitrógeno con sales y la solución de almidón fueron esterilizados por separado.

Una vez que los medios estuvieron estériles se mezclaron para dar un volumen final de 9.9 ml y fueron inoculados con 0.1 ml de los microorganismos previamente mencionados, en el medio YNB éste se inoculó únicamente con *Lactobacillus casei shirota* y *Pediococcus pentosaceus*. Los medios inoculados se incubaron a 35 °C con agitación constante durante 24 h (FINE PCR combi-SV12).



8.8.2. Determinación de azúcares consumidos.

Para determinar si los microorganismos probióticos consumen las distintas fuentes de carbono empleadas se cuantificaron los azúcares totales por el método de fenol-sulfúrico (Ávila *et al*, 2012) al inicio y al final de la fermentación. Se tomó 1 ml de las diferentes muestras y se llevaron a aforo a 25 ml con agua destilada, de este se tomó 1 ml de dilución y se aforó a 10 ml con agua destilada. De este último se tomó 1 ml de las diferentes muestras y se llevó a un tubo de ensaye donde se adicionó 1 ml de fenol (Sigma Aldrich) al 5% en agua destilada y 5 ml de ácido sulfúrico concentrado (Meyer 98.08%) dejando resbalar lentamente por las paredes, este mismo procedimiento se realizó reemplazando la muestra por agua para emplearlo como blanco, los tubos se dejaron enfriar por 15 minutos y se registraron las absorbancias en un espectrofotómetro de luz UV (Genesys 20 Thermo Scientific) a una longitud de onda de 490 nm, para la cuantificación de azúcares totales se utilizó una curva patrón con glucosa como estándar (Apéndice 12.2).

8.8.3. Cuantificación de crecimiento.

El recuento bacteriano se realizó por duplicado por el método de la gota de acuerdo a la técnica de Herigstad, Hamilton & Heersink (2001) con algunas modificaciones, para ello se tomó una alícuota de 1 ml de los medios inoculados al inicio y a las 24 h de inoculación y se colocó en 9 ml de agua peptonada (0.001 g/ml de peptona de caseína y 0.0085 g/ml de NaCl), la cual corresponde a la dilución 10^{-1} , la dilución se homogenizó con ayuda de un vortex, se tomó 1 ml de la dilución anterior y se agregó a 9 ml de agua peptonada, éste corresponde a la dilución 10^{-2} , se realizó el paso anterior hasta llegar a la dilución 10^{-6} para el tiempo cero y 10^{-7} para las 24 horas. Posteriormente se tomó 5 μ l de la dilución 10^{-3} a 10^{-6} para el tiempo cero y 10^{-4} a 10^{-7} para 24 horas y se colocaron en cajas Petri con agar MRS (Difco). Las cajas se incubaron a 37 °C (LabTech) por 24 horas, transcurrido este tiempo se realizó el conteo de colonias.

8.8.4. Cuantificación de glucosa libre.

La glucosa oxidasa (GOD) cataliza la oxidación de glucosa a ácido glucónico. El peróxido de hidrógeno (H_2O_2) producido se detecta mediante un aceptor cromogénico de oxígeno, fenol-ampirona en presencia de peroxidasa (POD) (Figura 9)

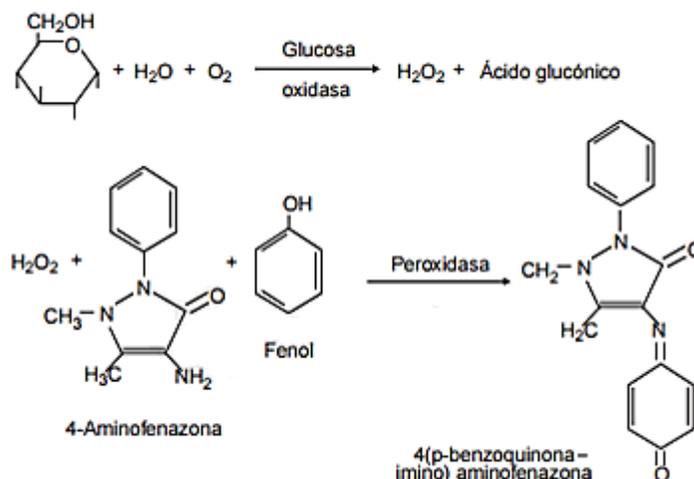


Figura 9. Proceso de reacción de la GOD-POD para la cuantificación de glucosa (Pérez & Brambila, 2005)

La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de glucosa presente en la muestra ensayada.

Para ello se hizo reaccionar 10 μ l de la muestra de los diferentes almidones preparados en una concentración al 0.5% en agua con 1 ml del reactivo de GOD-POD (Wiener Lab.), éste se incubó durante 15 minutos a 37 $^{\circ}$ C en una incubadora, posteriormente se leyó en un espectrofotómetro (Shimadzu) a una longitud de onda de 500 nm, para la cuantificación de glucosa libre se utilizó una curva patrón de glucosa anhidra (α -D Glucosa anhidra 96% Sigma Aldrich) (Apéndice 12.3).



8.8.5. Cuantificación de azúcares reductores.

Según el método Dubois, los azúcares reductores pueden reducir al ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) bajo determinadas condiciones. Cuando el ácido 3,5-dinitrosalicílico es reducido en presencia de calor, por los azúcares reductores que entran en contacto con él, se desarrolla un cambio de color parecido al café (con variaciones de amarillo hasta café). El cambio de coloración puede entonces determinarse por lecturas de densidad óptica, leídas por espectrofotometría a una determinada longitud de onda (Ávila *et al.*, 2012).

Se preparó el reactivo de DNS disolviendo 0.8 g de NaOH (Silver Quim 97%) en agua destilada, 15 g de tartrato de sodio y potasio tetra hidratado (Caledon 98%) y 0.5 g de DNS (Sigma Chemical Company), esta mezcla se aforo con 50 ml de agua destilada.

Se hizo reaccionar 1 ml de las diferentes soluciones de almidón en una concentración al 0.5% en agua con 1 ml del reactivo de DNS, este se llevó a un baño de agua a temperatura de ebullición por 10 minutos, transcurrido ese tiempo se agregaron 8 ml de agua destilada, las absorbancias fueron registradas en un espectrofotómetro (UV 1800 Shimadzu) a una longitud de onda de 540 nm (Rojas *et al.*, 2008). Para la cuantificación de glucosa libre se utilizó una curva patrón de glucosa anhidra (Sigma Aldrich) (Apéndice 12.4).

8.8.6. Evaluación de azúcares por cromatografía en capa fina.

La técnica se llevó a cabo de acuerdo a lo descrito por Martínez (1996) para ello, se utilizaron placas de sílice gel 0.2 mm (PolygramSilG Macherey-Nagel).

En una de las placas se corrieron los estándares de azúcares al 0.5% en agua destilada los cuales fueron: glucosa (D-(+)-Glucosa. Sigma Aldrich), melobiosa ($\geq 98\%$ Sigma Aldrich), Dextrina (99.5% Sigma Aldrich), maltosa y almidón comercial de fécula de papa (Hycel).

Las muestras sometidas a cromatografía fueron: extracto de almidón de amaranto, almidón hidrolizado de amaranto, almidón fosfatado de amaranto y almidón hidrolizado de amaranto después de la fermentación de 24 h por *Pediococcus pentosaceus*, éstos se preparon en una concentración al 5% en una solución de ácido acético (99.7%, Sigma Aldrich) al 1.5%

Se aplicaron 2 μ l de muestra a una distancia de 2 cm del borde inferior, a 1 cm de los bordes laterales y con 1.5 cm de espaciamento entre muestras (Figura 10). Se dejó secar. Se aplicaron después 2 μ l más y se dejaron secar. Este proceso se repitió hasta completar 16 μ l en total.

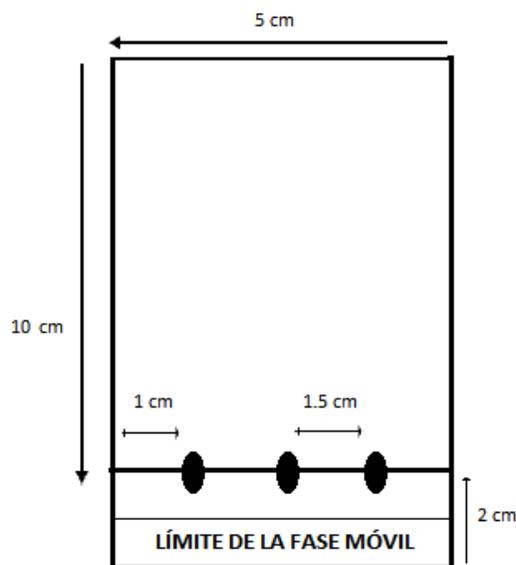


Figura 10. Diagrama de aplicación de muestras en placa cromatográfica.

Se colocó la placa en una cámara cromatográfica previamente saturada con una fase móvil consistente en acetona: agua destilada: cloroformo: metanol, en una proporción 75:5:10:10 y con aproximadamente 1 cm de altura de ésta. Se tuvo la precaución de que la fase móvil no mojara las muestras directamente. Se dejó eluir hasta que el frente del solvente alcanzó aproximadamente 0.5 cm debajo del borde superior de la placa. El frente de la placa se marcó con lápiz tan pronto como se retiró de la cámara. Se dejó evaporar el eluyente antes de revelar la placa.

Las placas se dejaron correr 5 veces con el fin de obtener una buena separación de las muestras.



La solución reveladora consistió en ácido sulfúrico al 20% en metanol, la placa fue sumergida en esta solución para posteriormente ser revelada en estufa a 150 °C (Termolyne 19200) hasta la aparición de manchas cafés bien definidas.

Los R_f se calcularon según la siguiente fórmula:

$$R_f = \frac{Dm}{F}$$

Donde:

Dm= Distancia recorrida por la mancha desde su punto de aplicación, expresada en cm.

F= Frente. Distancia recorrida por la fase móvil, medida desde el punto de aplicación de las muestras, expresada en cm.

8.9. Análisis estadístico.

Cada medición se llevó a cabo usando tres muestras independientes. Los resultados fueron reportados como la media y su desviación estándar. Los datos fueron sujetos a un análisis de varianza (ANOVA) usando el software estadístico SPSS. Se llevó a cabo la prueba de Tukey para determinar la diferencia de medias del ANOVA empleando un nivel de significancia de 5% ($p < 0.05$).

9. Resultados y discusiones.

9.1. Contenido de almidón y de almidón resistente en harina de amaranto y extracto.

En la Tabla 4 se reporta la composición química de la semilla de amaranto reventado, se observa que la harina de amaranto tiene un contenido de almidón del 54%, 15.41% de proteína y 9.6% de lípidos, la cantidad de almidón y proteína concuerda con lo reportado por otros autores quienes establecen que el contenido de almidón en la semilla de amaranto varía de un 50 a 60% y el contenido de proteína de 14-18% para *A. hypochondriacus* (Paredes *et al.*, 1989; Yanez *et al.*, 1986; Rodas & Bressani, 2009), en cuanto al contenido de lípidos, éste es mayor a lo reportado en la bibliografía, diversos autores reportan un contenido de lípidos en la semilla de amaranto de 5 a 11%, sin embargo depende de la variedad y condiciones de cultivo (Kraujalis & Venskutonis, 2013; Shevkani *et al.* 2014)

Tabla 4. Composición química de harina de amaranto y extracto de almidón.

| Muestra | Almidón (%) | Almidón resistente (%) | Proteína (%) | Lípidos (%) |
|---------------------|-------------|------------------------|--------------|-------------|
| Harina de amaranto | 54 | 6.9 | 15.41 | 9.6 |
| Extracto de almidón | 95 | 18 | 5 | 0 |

El rendimiento de extracción de almidón-fibra con respecto a la semilla fue de 63.6%, este método permite obtener rendimiento de extracción considerable con un bajo contenido de proteínas y lípidos en comparación con otros métodos como: molienda húmeda con previa hidrólisis con proteasa y tratamiento alcalino en el cual se obtiene un rendimiento de 46.18% o molienda húmeda empleando soluciones de sulfito en el que obtienen un rendimiento de extracción de 67.67% (Villarreal, Ribotta & Iturriaga 2013).

El contenido de almidón resistente en semilla de amaranto (6.9%) fue menor que en el extracto de almidón (18%), esto pudo ser ocasionado por el proceso de obtención de almidón, la temperatura empleada y el tiempo de reacción causaron la gelatinización del almidón y al dejar enfriar este pudo sufrir un proceso de retrogradación, lo cual corresponde a un almidón resistente de tipo 3. Esto concuerda con lo reportado por Hung, Vien & Lan Phi, (2016) quienes reportaron que tras someter al almidón de arroz a tratamientos de calor-humedad, el almidón de lenta digestión como el almidón resistente incrementaron.

En harinas gelatinizadas como la de sorgo se reporta una asociación entre proteínas y almidones dando como resultado una estructura similar a una red la cual impide la digestión del almidón por enzimas amilolíticas (Henry, 2007), el aumento en la cantidad de almidón resistente



podría deberse al proceso de obtención del almidón en el que la temperatura y los tiempos de reacción empleados pudiera haber generado una interacción proteína-almidón, motivo por el cual estas proteínas no fueron extraídas durante la hidrólisis con proteasa.

9.2. Almidón modificado por hidrólisis ácida.

El extracto de almidón sometido a hidrólisis ácida presentó un rendimiento de hidrólisis de 39.276 ± 1.357 el cual es menor a lo reportado por Garcia *et al.*, (2016) quienes obtuvieron un rendimiento de hidrólisis 57.12% para el almidón de maíz. Esto se debe a que el almidón de amaranto presenta pocas zonas amorfas (en las cuales se lleva a cabo con mayor rapidez la hidrólisis del almidón), además estas zonas son removidas durante el proceso de hidrólisis ácida (Saari *et al.*, 2016), en la zona cristalina se lleva a cabo la hidrólisis con una menor rapidez debido a que el empaquetamiento denso de la zona cristalina retarda la penetración de los iones H_3O^+ (Park & Lim, 2015).

9.3. Almidón modificado por succinatación.

Con el fin de encontrar las condiciones bajo las cuales se obtenía la mayor conversión de almidón nativo a almidón resistente mediante reacción de succinatación empleando como reactivo OSA se ensayaron distintos pH y tiempos de reacción empleando almidón modificado por hidrólisis ácida como materia prima.

9.3.1. Efecto de pH durante la reacción de succinatación.

Se llevó a cabo la succinatación del extracto del almidón de amaranto previamente sometido al proceso de hidrólisis ácida (Sección 8.3.2). Para esto fue necesario determinar el pH al cual se lleva a cabo una mayor conversión de almidón (Tabla 5), como se puede observar a pH 7.5 se obtuvo la mayor conversión (47.92%), seguido por el pH de 8, mientras que, a pH de 6, 6.5 y 7 no presentaron diferencia significativa. Los resultados obtenidos se relacionan con el hecho de que a pH menores de 8 se favorece la hidrólisis anhidra mientras que pH mayores que 8 no se activan suficientemente los grupos hidroxilos del almidón para que se dé el ataque nucleofílico de los restos del OSA (Bhosale & Singhal, 2006). Debido a esto un pH de 7.5 fue seleccionado para estudios posteriores.

Este valor de AR (47.92%) es mayor a lo reportado por Bai *et al.* (2014) quienes a pH de 7.5 y contenido de OSA de 3% en relación a los sólidos de almidón y en un tiempo de reacción de 30 minutos empleando almidón de maíz ceroso logró obtener 26.7% de almidón resistente.

Tabla 5. Contenido de almidón resistente en el extracto almidón de amaranto sometido a reacción de succinación con OSA a diferente pH.

| pH | Almidón resistente (%) |
|-----|-------------------------------|
| 6 | 36.250 ± 0.931 ^d |
| 6.5 | 38.088 ± 0.609 ^{c,d} |
| 7 | 38.940 ± 0.931 ^c |
| 7.5 | 47.007 ± 0.931 ^a |
| 8 | 42.790 ± 0.933 ^b |

9.3.2. Efecto del tiempo durante la reacción de succinación.

Para determinar a qué tiempo se lleva a cabo una mayor conversión de almidón nativo a almidón resistente se probaron diferentes tiempos de reacción de succinación, los cuales fueron de 3, 4, 5, 6 y 7 horas y se mantuvo constante el pH a 7.5.

Como se puede observar en la Tabla 6, la mayor conversión a AR se obtuvo en un tiempo de reacción de 6 horas, logrando un contenido de AR de 46.69%. Bhosale & Singhal (2006) obtuvieron almidón succinatado con un alto grado de sustitución (0.018) bajo las siguientes: 6 horas de reacción, pH 8 y 30 °C. Almidones con alto grado de sustitución están asociados a la resistencia a la hidrólisis enzimática y por lo tanto al contenido de almidón resistente (Amaya & Bello, 2010).

Tabla 6. Contenido de almidón resistente en el extracto de almidón al someter a succinación con OSA a diferentes tiempos de reacción

| Tiempo (h) | Almidón resistente (%) |
|------------|-----------------------------|
| 3 | 30.806 ± 0.841 ^c |
| 4 | 31.906 ± 0.807 ^c |
| 5 | 35.255 ± 0.854 ^b |
| 6 | 46.696 ± 0.636 ^a |
| 7 | 18.396 ± 0.11 ^d |



A 5 horas de reacción de succinación se obtuvo 35.25% de AR, mientras que a 3 y 4 horas no presentan diferencia significativa entre ellas, sin embargo, al aumentar el tiempo de hidrólisis a 7 horas se observó una disminución en la conversión a almidón resistente (18.39%). La mejora en la succinación por la prolongación de la duración de la reacción es consecuencia directa del efecto favorable de la difusión y adsorción de los reactivos entre los agentes modificadores y la molécula de almidón, la cual estará en función de las diferencias en el origen botánico y morfológico de los gránulos de almidón. El aumento gradual en el porcentaje de conversión a almidón resistente seguida de una disminución se debe al hecho de que a medida que la reacción de succinación procede, el monómero de OSA se agota, los sitios reactivos del almidón disminuyen debido a la modificación estructural en la cadena principal de almidón y el hidróxido de sodio (presente en el medio empleado para mejorar la nucleofilicidad del grupo hidroxilo de las moléculas de almidón) reacciona con el agente succinatante dando lugar a reacciones secundarias (Murúa, Beristain & Martínez, 2009; Hui *et al.*, 2009).

El contenido de almidón resistente alcanzado mediante esta técnica es mayor a lo reportado por Remya *et al* (2017) quienes lograron en almidón de papa un contenido de almidón resistente de 27.9% empleando como condiciones de reacción 3% (p/p) OSA, pH 8.5, 5 horas de reacción a 37 °C.

9.4. Obtención de almidón resistente por fosfatación.

Con el fin de encontrar las condiciones bajo las cuales se obtenía la mayor conversión de almidón modificado por hidrólisis ácida a almidón resistente mediante reacción de fosfatación empleando como reactivo tripolifosfato de sodio se ensayaron distintas temperaturas y tiempos de reacción.

9.4.1. Efecto de la temperatura durante la reacción de fosfatación.

En la Tabla 7 se observa que a 40 y 50°C de temperatura durante la fosfatación se obtiene la mayor conversión a almidón resistente sin presentar diferencia significativa entre ellas por lo que se decidió elegir la temperatura de 40°C.

Se empleó 40°C como temperatura de reacción, sin embargo el contenido de almidón resistente obtenido fue menor a lo reportado por Sang *et al* (2010) en almidón de trigo, estos autores emplearon las siguientes condiciones de reacción: 45 °C , pH 9, 3 horas de reacción y una solución de fosfatos (Monofosfato de sodio, sulfato de sodio y tripolifosfato de sodio); bajo estas condiciones obtuvieron 68% de almidón resistente.

La diferencia en la obtención de almidón resistente a lo reportado por estos autores podría deberse al uso de una mayor proporción de agentes fosfatantes lo cual ayuda a que el reactivo no

se agote y se dé una mayor sustitución de grupos fosfatos en la molécula de almidón, además sería recomendable ensayar valores de pH más alcalinos.

Tabla 7. Contenido de almidón resistente en el extracto de almidón al someter a fosfatación a diferentes temperaturas de reacción con TPS.

| Temperatura (°C) | Almidón resistente (%) |
|------------------|-----------------------------|
| 30 | 26.126 ± 3.419 ^d |
| 40 | 54.467 ± 5.040 ^a |
| 50 | 56.709 ± 2.030 ^a |
| 60 | 47.254 ± 4.122 ^c |

9.4.2. Efecto del tiempo durante la reacción de fosfatación.

Se procedió a ensayar distintos tiempos de reacción de fosfatación manteniendo constante la temperatura a 40 °C y pH 6 para encontrar la mayor conversión a almidón resistente, encontrándose que a 1 hora de reacción se lograba la mayor conversión a almidón resistente y mientras se aumentaban los tiempos de reacción disminuía el grado de conversión (Tabla 8), por lo que sería conveniente ensayar tiempos de reacción menores.

Tabla 8. Contenido de almidón resistente en el extracto de almidón al someter a fosfatación a diferentes tiempos de reacción con TPS.

| Tiempo (h) | Almidón resistente (%) |
|------------|-----------------------------|
| 1 | 56.671 ± 4.130 ^d |
| 2 | 44.177 ± 4.515 ^b |
| 3 | 38.870 ± 4.233 ^c |
| 4 | 22.841 ± 0.430 ^d |
| 5 | 19.976 ± 2.155 ^d |

Sang *et al* (2010) obtuvieron 77 y 3% de almidón resistente de para almidón de papa y harina de trigo respectivamente a pH de 11.5, empleando trimetafosfato de sodio (STMP) como agente fosfatante en un tiempo de reacción de 3 h a 45 °C, esta diferencia puede deberse a la diferencia de la fuente botánica del almidón, además sería recomendable ensayar valores de pH más alcalinos y tiempos de reacción más cortos para comprobar si con ello se obtiene un mayor rendimiento de conversión a almidón resistente.

9.5. Caracterización fisicoquímica del extracto de almidón.

Con la finalidad de determinar cómo afectaron las condiciones de reacción las propiedades fisicoquímicas del almidón de amaranto se determinó el índice de absorción de agua y el índice de solubilidad en agua del extracto de almidón, almidón modificado por hidrólisis ácida y almidones modificados por succinación y fosfatación, así como de la harina de amaranto sometida a los mismos tratamientos a los que fue sometido el extracto de almidón.

9.5.1. Determinación del Índice de absorción de agua (IAA) e Índice de solubilidad en agua (ISA).

El índice de absorción de agua tiene como objetivo indicar la capacidad de hidratación de los almidones modificados o hidrolizados (Castro, 2014).

El índice de absorción de agua del almidón de amaranto varía dependiendo de las condiciones de reacción debido a que éstas influyen en el grado de asociación intermolecular entre los polímeros de almidón debido a las fuerzas de asociación como uniones covalentes y de hidrógeno (Paredes, *et al.*, 1989).

Se puede observar que al aumentar el pH (Tabla 9) y el tiempo de reacción (Tabla 10) durante la reacción de succinación, el IAA aumenta; esto se debe a que conforme aumenta el contenido de almidón resistente debido a la inclusión de grupos químicos se forman enlaces entrecruzados entre las moléculas, reduciendo su capacidad para hidratarse (García, 2011)

Tabla 9. IAA e ISA del almidón de amaranto sometido a reacción de succinación con OSA a diferente pH de reacción.

| pH | IAA | ISA |
|-----|----------------------------|-------------------------------|
| 6 | 4.776 ± 0.139 ^c | 11.886 ± 1.169 ^a |
| 6.5 | 4.686 ± 0.204 ^c | 11.021 ± 0.534 ^{a,b} |
| 7 | 4.716 ± 0.223 ^c | 12.187 ± 0.212 ^a |
| 7.5 | 7.044 ± 0.701 ^b | 9.148 ± 2.310 ^{b,c} |
| 8 | 8.284 ± 0.710 ^a | 7.408 ± 1.661 ^c |

Tabla 10. IAA e ISA del almidón de amaranto sometido a reacción de succinación con OSA a diferentes tiempos de reacción.

| Tiempo (h) | IAA | ISA |
|------------|------------------------------|-----------------------------|
| 3 | 5.618 ± 0.197 ^b | 4.524 ± 0.1513 ^c |
| 4 | 6.304 ± 0.060 ^{a,b} | 9.015 ± 0.611 ^b |
| 5 | 6.398 ± 0.598 ^{a,b} | 6.558 ± 2.131 ^c |
| 6 | 7.009 ± 0.747 ^a | 9.202 ± 0.583 ^b |
| 7 | 7.126 ± 0.472 ^a | 11.837 ± 1.562 ^a |

El ISA indica la cantidad de sólidos capaces de disolverse con el agua, altos valores de ISA indican la presencia de grandes cantidades de sustancias solubles (García, 2011).

El ISA no sigue una pauta de aumento o descenso si la reacción de succinación se lleva a cabo en medio alcalinos o ácidos (Tabla 9), igualmente un aumento en el tiempo de reacción no tiene efecto en el incremento o decremento en este parámetro (Tabla 10).

En la Tabla 11 se observa la temperatura de la reacción de fosfatación afecta el IAA, donde a 40°C se obtuvo el máximo índice de absorción, sin ser proporcional el aumento en la absorción de agua con el aumento de temperatura. Mientras que en el índice de solubilidad en agua no hay diferencia significativa cuando se modifica la temperatura de reacción.

Tabla 11. IAA e ISA del almidón de extracto de amaranto sometido a reacción de fosfatación a diferente temperatura de reacción.

| Temperatura (°C) | IAA | ISA |
|------------------|----------------------------|-----------------------------|
| 30 | 5.884 ± 0.274 ^c | 18.701 ± 0.416 ^a |
| 40 | 6.658 ± 0.197 ^b | 3.123 ± 0.581 ^b |
| 50 | 5.321 ± 0.280 ^d | 4.433 ± 0.640 ^b |
| 60 | 7.327 ± 0.388 ^a | 6.696 ± 1.161 ^c |

Cuando se somete el almidón hidrolizado a reacción de fosfatación el índice de absorción de agua disminuye al aumentar los tiempos de reacción sin presentar diferencia significativa en tiempos de 3 a 5 horas. Mientras que el mayor ISA se obtuvo a las 2 horas, disminuyendo considerablemente cuando se aumenta el tiempo de reacción.

Tabla 12. IAA e ISA del almidón de amaranto sometido a reacción de fosfatación a diferente tiempo de reacción.

| Tiempo (h) | IAA | ISA |
|------------|----------------------------|------------------------------|
| 1 | 6.687 ± 0.197 ^a | 3.123 ± 0.581 ^c |
| 2 | 6.579 ± 0.312 ^a | 7.675 ± 2.13 ^a |
| 3 | 5.673 ± 0.272 ^b | 5.513 ± 0.357 ^{b,c} |
| 4 | 5.751 ± 0.101 ^b | 3.772 ± 0.737 ^{b,c} |
| 5 | 5.884 ± 0.205 ^b | 4.571 ± 0.419 ^{b,c} |

En la Tabla 13 se muestran los valores del ISA e IAA de la harina y almidón de amaranto sin tratamiento y con reacciones de succinación y fosfatación bajo las condiciones en las que se obtenía un mayor porcentaje de conversión a almidón resistente.

Tabla 13. IAA e ISA de harina y almidón de amaranto sometido a reacciones de modificación química.

| Muestra | IAA | ISA |
|---------------------|------------------------------|-------------------------------|
| Harina amaranto | 10.927 ± 0.465 ^c | 22.054 ± 2.113 ^b |
| Harina hidrolizada | 4.931 ± 0.280 ^{a,b} | 59.832 ± 1.320 ^d |
| Harina succinatada | 4.481 ± 0.324 ^a | 7.101 ± 4.203 ^a |
| Harina fosfatada | 7.072 ± 0.522 ^b | 9.281 ± 3.261 ^a |
| Extracto de almidón | 4.552 ± 1.182 ^a | 57.362 ± 1.115 ^{c,d} |
| Almidón hidrolizado | 4.730 ± 1.221 ^{a,b} | 36.222 ± 3.166 ^{b,c} |
| Almidón succinatado | 7.009 ± 0.747 ^{a,b} | 9.202 ± 0.583 ^a |
| Almidón fosfatado | 6.687 ± 0.197 ^{a,b} | 3.123 ± 0.581 ^a |

La harina de amaranto presenta una mayor capacidad para absorber agua, esta capacidad disminuye al someter la harina a hidrólisis ácida y al someter a reacción de succinación esto se debe a que posterior a la hidrólisis ácida se forman cadenas cortas de almidón lo que disminuye su capacidad para retener agua (Hung, Vien & Lan Phi, 2016), sin embargo aumenta notablemente cuando ésta es fosfatada. El extracto de almidón presenta una IAA menor que la harina de amaranto debido a la ausencia de proteínas y lípidos los cuales ayudan en la retención de agua. El extracto de almidón y sus posteriores modificaciones presentan una baja capacidad de solubilidad en agua que es lo que se busca al someter el almidón a reacciones de modificación.

El extracto de almidón de amaranto presentó un ISA mayor (57.36%) a lo reportado por García (2011) quien reporta un ISA de almidón de amaranto de 6.25, mientras que en el almidón hidrolizado fue de 36.22% esto se debe principalmente a dos razones: la primera es que la semilla de amaranto empleada en esta investigación fue sometida a un proceso de expansión en lecho fluidizado el cual es un proceso que causa una degradación en los polímeros de almidón aumentando su solubilidad (Lara & Ruales, 1999), además el proceso de obtención de almidón en esta investigación incluye la acción de proteasa la cual probablemente atacó la matriz proteica que protege los gránulos de almidón provocando que éstos se dispersaran y con ello disminuyera su capacidad de retener agua provocando por ende un aumento de su solubilidad.

Los valores de ISA obtenidos en este experimento para los almidones modificados por succinación y fosfatación son menores a los reportados por García (2011) quien obtuvo un ISA de 71.66 para el almidón fosfatado y 61.42 para el almidón succinatado. Esto puede deberse a que el proceso de obtención del almidón produce una modificación en los gránulos. Es decir, la naturaleza de los gránulos es el factor que provee la capacidad de hidratación y solubilización del almidón en agua independientemente de la inclusión de grupos químicos (Contreras *et al.*, 2013). Algunos autores han reportado que al incrementarse el contenido de AR se da una disminución en los valores de solubilidad, lo cual es atribuido a la formación de zonas cristalinas, almidones con una mayor proporción de zonas cristalinas tienden a tener una menor capacidad de solubilizarse en agua (Suarez & Guerrero, 2016).

9.6. Caracterización morfológica.

En la Figura 11 (A, B y C) se puede observar el cambio en la morfología que ocurre en la harina de amaranto durante el proceso de extracción de proteína y lípidos y en la fracción residual correspondiente a la fracción de almidón-fibra de amaranto.

En la Figura 11 D) se observa que los agregados de almidón de amaranto son más redondeados y espaciados unos entre otros, lo cual difiere a lo reportado por otros autores, en donde su morfología es descrita como gránulos agrupados de forma poligonal sin fisuras en la superficie (Paredes, *et al.*, 1989 ; Shindu & Singh, 2016). Esto se debe a dos razones, la primera es debida a que el amaranto que se empleó en este trabajo fue sometido a un proceso de expansión, proceso que causa un cambio en la morfología del gránulo de almidón, la segunda razón es el proceso de obtención de almidón ya que los procesos convencionales se llevan a cabo con una solución de hidróxido de sodio a bajas temperatura lo que permite obtener gránulos de almidón con pequeños cambios en las propiedades físicas, químicas y reológicas (Perez, Bahnassey & Breene, 1993). En esta investigación, la remoción de proteína y lípidos de los gránulos de almidón influye en la morfología final del gránulo, ya que estos dos constituyentes son considerados como los responsables de la aglomeración de las moléculas de almidón (JianYa Qian & Manfred Kuhn, 1999).

Al someter el extracto de almidón de amaranto a hidrólisis ácida se observa un cambio notable en su morfología (Figura 11 E)), esto concuerda a lo reportado con Martín & López (2009) quienes notaron que el gránulo de almidón de yuca presentaba cambios en la zona externa del mismo, modificando su superficie lisa por regiones un poco más ásperas, además notaron que los gránulos más pequeños se hidrolizan más rápidamente debido a que tienen una mayor superficie disponible (Sanguanpong *et al.*, 2003), así mismo este almidón presenta una superficie arrugada probablemente debido a la contracción del aglomerado de almidón causada por las altas temperaturas del proceso tanto de obtención del almidón como de la hidrólisis ácida del mismo (Altay & Gunasekaran, 2006).

En las Figuras 11 E), F) y G) se observa que al iniciar el proceso de modificación (introducción de grupos químicos dentro de la molécula) el tamaño de los aglomerados de almidón pareciera haber aumentado. En general, estos incrementos son debidos a la inclusión de grupos fosfatos y succinatos dentro de los aglomerados del almidón, los cuales crean ciertas fuerzas de repulsión que pudieran aumentar los espacios inter e intra moleculares permitiendo la inclusión de un mayor número de moléculas de agua (Sivoli *et al.*, 2006).

En la Figura 11 F) se observa que el almidón succinatado presenta una superficie áspera, donde algunas pequeñas partículas se unieron a la superficie del almidón, esto sucede a medida que aumenta el grado de sustitución se reemplaza su estructura característica por una estructura parecida a una fibra (Xu, Miladino & Hanna, 2004).

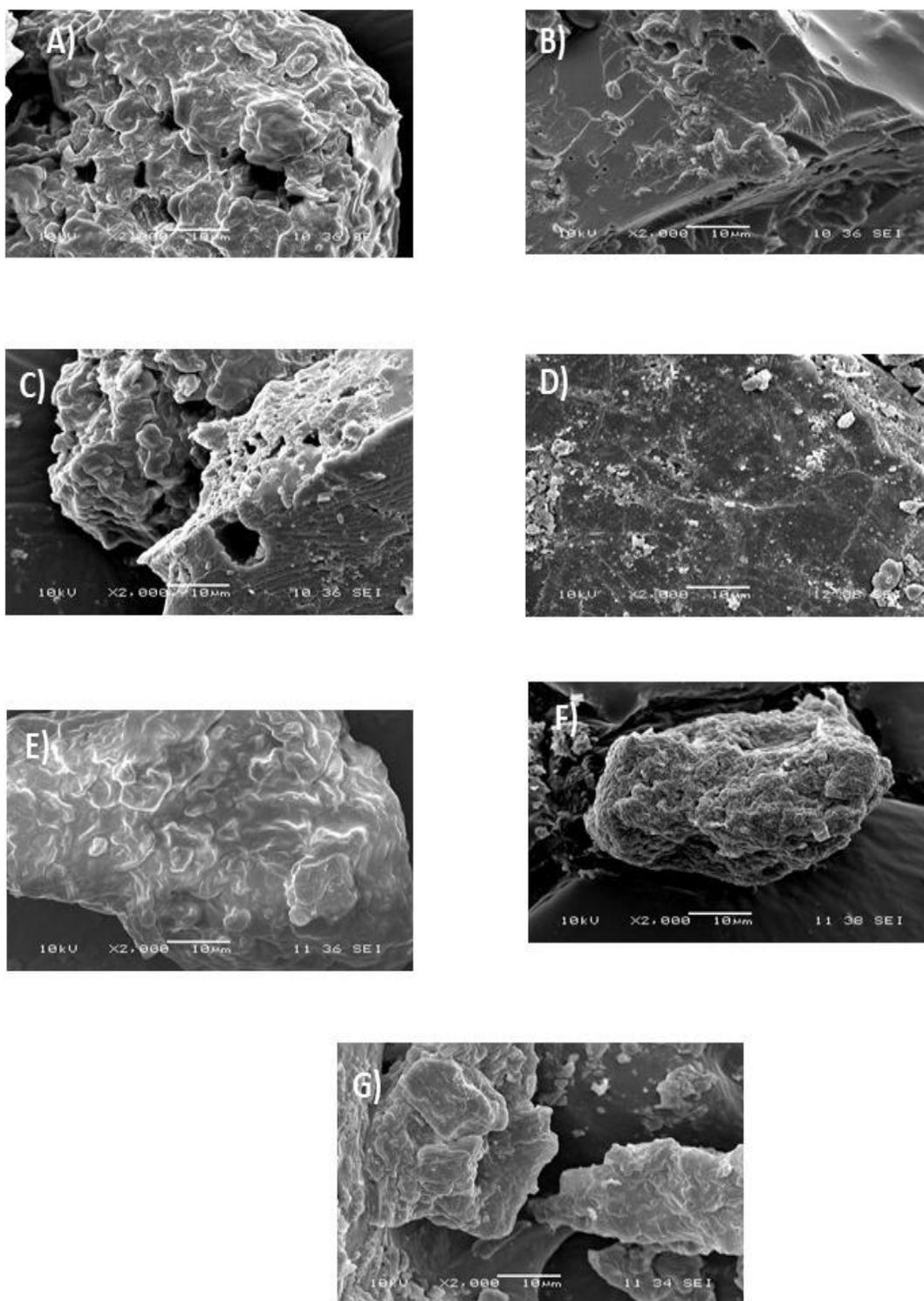


Figura 11. Micrografías del proceso de obtención de almidón de amaranto y su modificación con un acercamiento de 2000x y voltaje de aceleración de 10 kV. A) Harina de amaranto, B) Harina de amaranto a 90 °C, C) Almidón de amaranto D) Extracto de almidón, E) Almidón hidrolizado, F) Almidón modificado por fosfatación, G) Almidón modificado por succinatación.

Para determinar si la presencia de proteínas y lípidos tenían influencia en el cambio morfológico debido al proceso de modificación química, la harina de amaranto reventado se sometió a los mismos procesos de modificación que el almidón de amaranto. En las Figuras 12 a 14, se observa que aunado a los procesos de extracción de almidón la presencia de proteínas y lípidos influyen en las características físicas del gránulo.

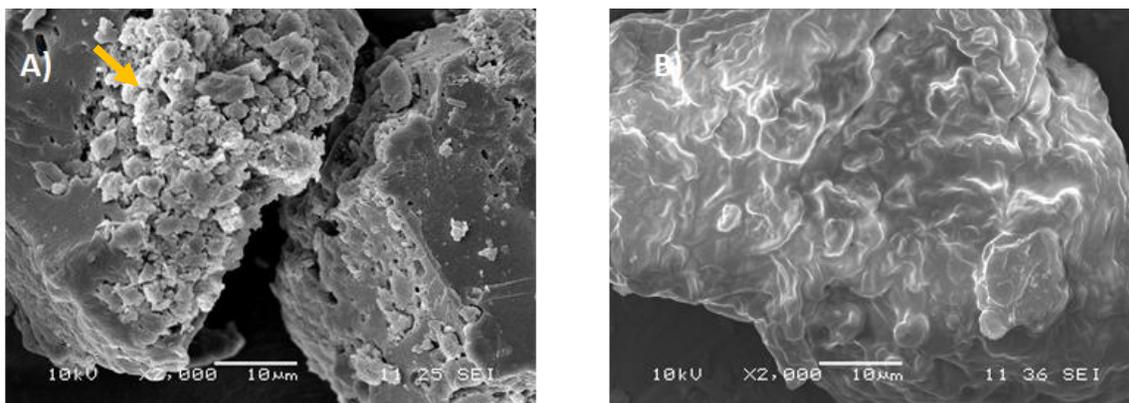


Figura 12. Micrografía de harina de amaranto hidrolizada A) y extracto de almidón B) de amaranto hidrolizado.

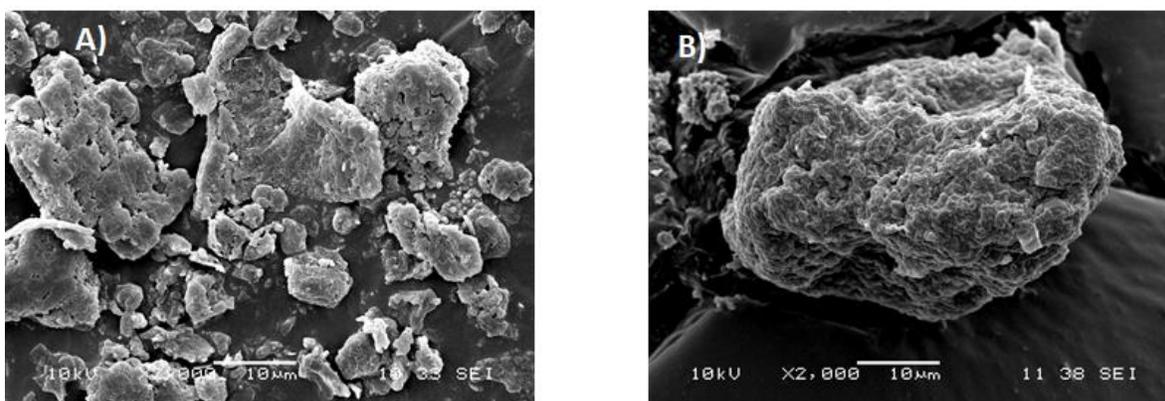


Figura 13. Micrografía de harina de amaranto succinada A) y extracto de almidón B) succinado.

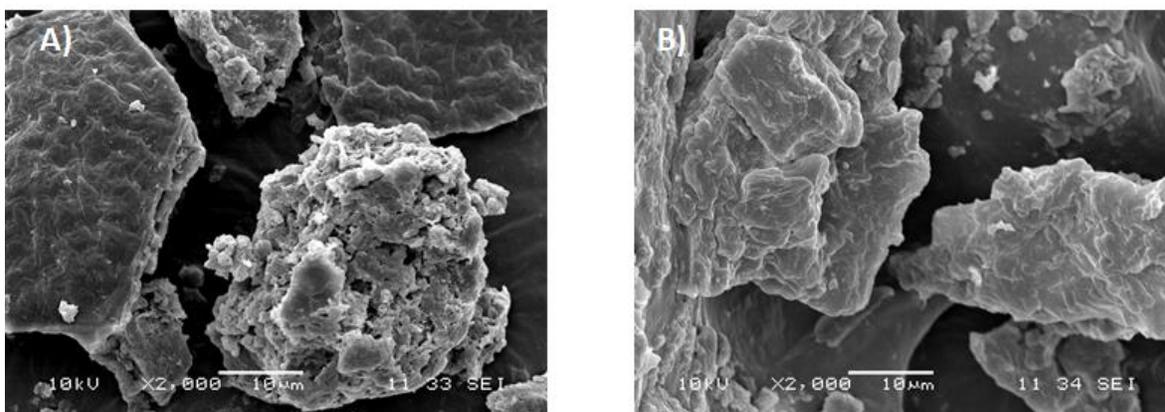


Figura 14. Micrografía de harina de amaranto fosfatada A) y extracto de almidón B) de amaranto fosfatado.

9.7. Capacidad de efecto prebiótico de los almidones modificados de amaranto.

Con el fin de evaluar la capacidad de los microorganismos empleados en este estudio para consumir los almidones obtenidos como fuente de carbono, se cuantificó la concentración de azúcares totales (Ávila *et al*, 2012) en el medio de crecimiento TSB y al término del ensayo (24 h).

En la Tabla 14 se reporta el consumo de azúcares de los microorganismos.

Tabla 14. Azúcares consumidos (%) por bacterias lácticas en medio TSB empleando diferentes fuentes de carbono.

| Microorganismo | Extracto de almidón | Almidón hidrolizado | Almidón fosfatado |
|--|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| | Azúcares consumidos (%) | Azúcares consumidos (%) | Azúcares consumidos (%) |
| <i>Lactobacillus casei</i> Shirota | 19.893 ± 1.575 ^{d,e} | 23.244 ± 4.361 ^d | 19.456 ± 0.664 ^{d,e} |
| <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG | 25.256 ± 0 ^{c,d} | 34.294 ± 1.298 ^b | 21.885 ± 0.142 ^d |
| <i>Bifidobacterium longum</i> | 16.252 ± 1.100 ^{d,e} | 49.546 ± 0.001 ^a | 17.951 ± 2.648 ^{d,e} |
| <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> NCFB-712 | 16.414 ± 5.766 ^{d,e} | 34.351 ± 4.996 ^b | 16.621 ± 0.236 ^{d,e} |
| <i>Pediococcus pentosaceus</i> | 24.110 ± 0.522 ^{c,d} | 44.081 ± 1.405 ^a | 17.471 ± 1.600 ^{d,e} |
| Cápsula (<i>Lactobacillus delbruekii</i> y <i>Lactobacillus fermentum</i>) | 15.645 ± 3.436 ^{d,e} | 32.173 ± 3.763 ^{b,c} | 11.475 ± 0.208 ^{d,e} |

En el medio TSB con extracto de almidón el mayor consumo se observó con *Lactobacillus rhamnosus* GG y *Pediococcus pentosaceus* sin presentar diferencias significativas entre ellos, este resultado es el esperado, ya que ésta reportado que estas dos bacterias tienen la capacidad de hidrolizar almidón (Escamilla *et al.*, 2000; De Vos *et al.*, 2009). Además se observó un consumo de azúcares similares en las otras bacterias, sin embargo eso no era lo esperado porque *Lactobacillus casei* Shirota y *Bifidobacterium longum* no presentan actividad amilolítica (Heimbach, 2012; Pokusaeva, Fitzgerald & Van Sinderen, 2011), mientras que *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* y los microorganismos presentes en la cápsula están reportados como microorganismos capaces de metabolizar almidón (Mikelsaar & Zilmer, 2009 ;Serna & Rodríguez, 2005 ; Feoli, Escobar & Marin, 1995).

En el caso del medio TSB con almidón hidrolizado *Bifidobacterium longum* y *Pediococcus pentosaceus* fueron los microorganismos que más azúcares consumieron sin presentar diferencia significativa entre ellos, mientras que *Lactobacillus casei* Shirota fue la bacteria que tuvo el menor consumo.

En el medio TSB con almidón fosfatado el *Lactobacillus rhamnosus* GG fue el que tuvo el mayor consumo de azúcares, mientras que entre las otras bacterias no hubo diferencia significativa.

En la Figura 15 se observa el crecimiento de las distintas bacterias probióticas empleando medio TSB adicionado con almidón, este se reporta como la diferencia del crecimiento en medio TSB y el crecimiento en medio TSB adicionado con los distintos almidones, con el objetivo de conocer el crecimiento de los microorganismos a partir del metabolismo de los almidones como fuente de carbono. En los casos donde no se ve una barra quiere decir que no hubo crecimiento en el medio adicionado con almidón.

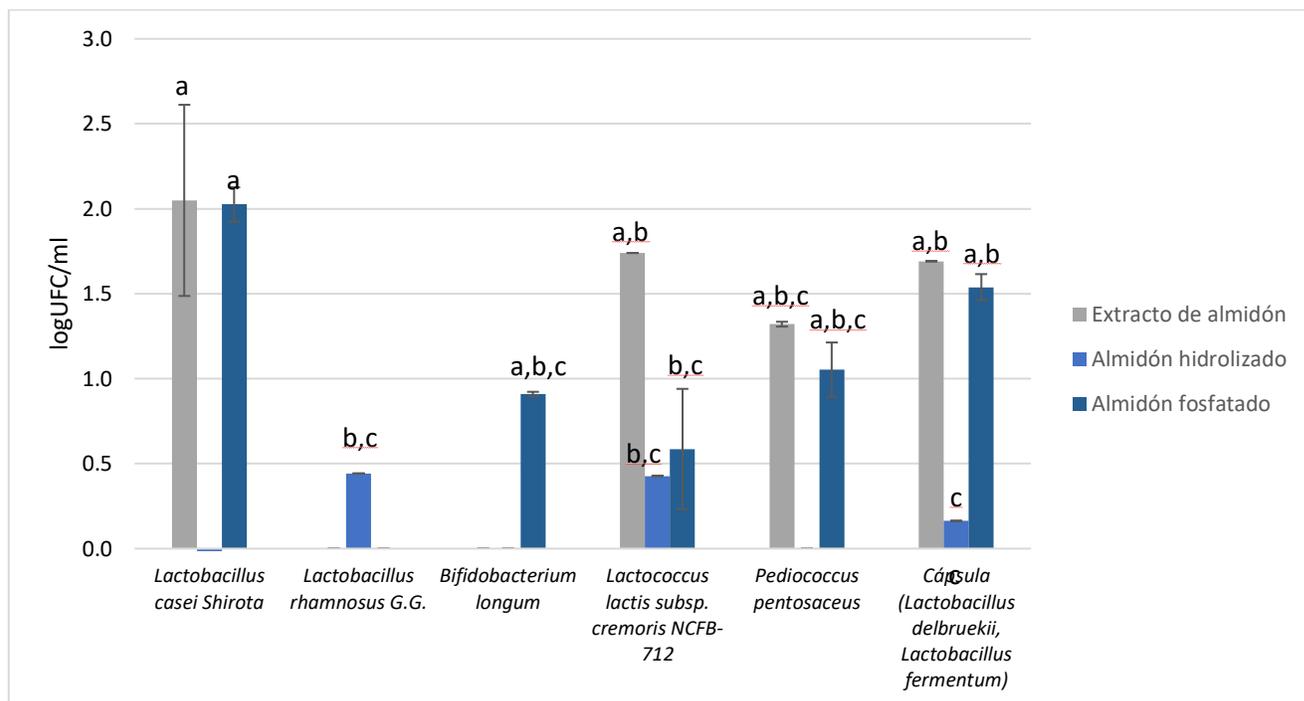


Figura 15. Crecimiento de bacterias lácticas en medio TSB empleando distintas fuentes de carbono.

Lactobacillus casei Shirota tuvo un mayor crecimiento a partir del extracto de almidón de amaranto al igual que *Pediococcus pentosaceus*, *Lactococcus lactis* y la cápsula compuesta por los dos probióticos (*Lactobacillus delbruekii* y *Lactobacillus fermentum*). El menor crecimiento en todas las BAL estudiadas se obtuvo cuando se adicionó almidón hidrolizado como fuente de carbono.

Para comprobar que el crecimiento observado en la Figura 15 era debido a el consumo de los almidones se procedió a cuantificar la glucosa y los azúcares reductores los cuales se reportan en la Tabla 15, donde se observa que todos los almidones estudiados tiene azúcares reductores (que pudieran ser oligosacáridos) y glucosa libre, los cuales pueden ser utilizados como fuente de carbono de fácil acceso a las BAL, sin embargo se obtendría un crecimiento mínimo dada la concentración tan baja de éstos, debido a ello se procedió a cuantificar la cantidad de carbohidratos presentes en el medio TSB encontrándose que este contenía una gran cantidad de carbohidratos (5.28 ± 0.073 mg/ml) a partir de los cuales los microorganismos estaban creciendo.

Tabla 15. Azúcares reductores y azúcares totales presentes en los almidones estudiados.

| Muestra | Azúcares reductores (g/ g almidón) | Glucosa libre (g/g almidón) |
|---------------------|---------------------------------------|--------------------------------|
| Extracto de almidón | 0.1883 ± 0.006 ^a | 0.00019 ± 0 ^a |
| Almidón hidrolizado | 0.1181 ± 0.006 ^b | 0.0009 ± 0 ^b |
| Almidón succinatado | 0.1265 ± 0 ^b | 0.0002 ± 0 ^a |
| Almidón fosfatado | 0.1066 ± 0.022 ^b | 0.0004 ± 0 ^c |

Para comprobar si los almidones estudiados presentaban capacidad prebiótica se procedió a cambiar el medio TSB por medio YNB libre de carbohidratos, estos medios se inocularon con *Lactobacillus casei* Shirota como control negativo ya que se trata de una bacteria no amilolítica y *Pediococcus pentosaceus* que tiene la capacidad de hidrolizar almidón.

En la Figura 16 se observa que no existe diferencia significativa en el crecimiento de *Lactobacillus casei* Shirota y *Pediococcus pentosaceus* al ser inoculadas en medio YNB adicionado con almidón hidrolizado y el medio compuesto únicamente con almidón hidrolizado, lo cual nos indica que probablemente solo están consumiendo los azúcares sencillos (glucosa y oligosacáridos) presentes en el almidón hidrolizado y que *Pediococcus pentosaceus* no mostró la capacidad de asimilar el almidón.

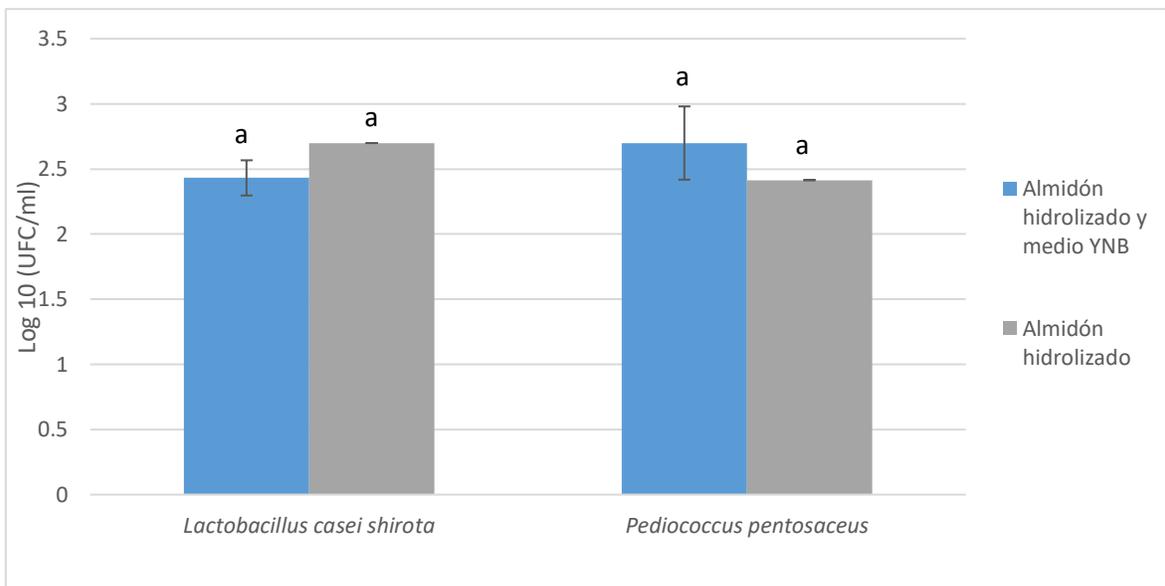


Figura 16. Crecimiento de dos bacterias lácticas empleando diferentes fuentes de carbono.

Con el fin de conocer los azúcares consumidos por las bacterias, se realizó la cromatografía en capa de los medios de crecimiento con YNB. En la Figura 17 se observa que en el almidón hidrolizado hay cinco fracciones mayoritarias (denominadas como PM1-PM5), en el almidón hidrolizado inoculado con *Pediococcus pentosaceus* se conservaron cuatro fracciones (PM1-PM4), finalmente en el almidón fosfatado, y almidón fosfatado inoculado con *Pediococcus pentosaceus* se conservaron tres fracciones (PM1-PM3).

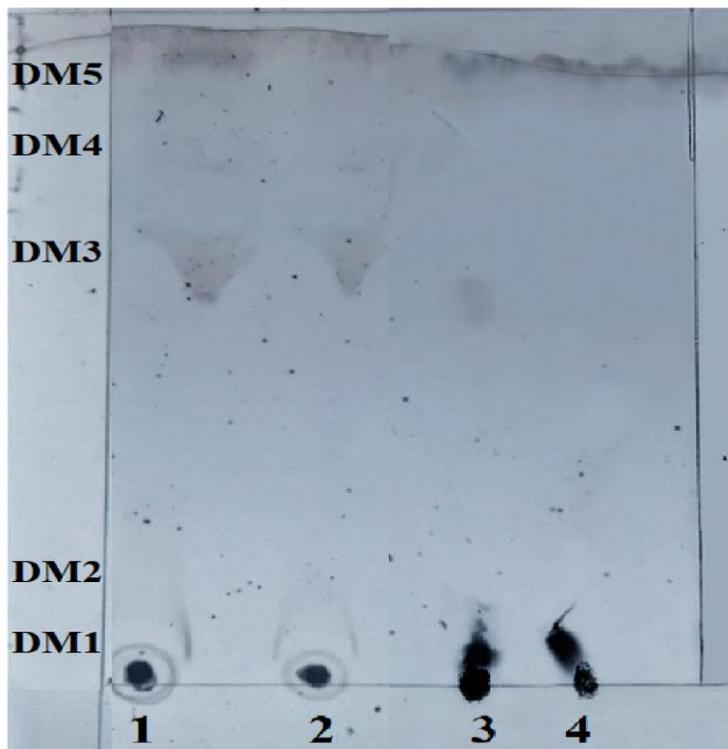


Figura 17. Placa cromatográfica de los almidones estudiados e inoculados con *Pediococcus pentosaceus*. Carril 1: Almidón hidrolizado, carril 2: Almidón hidrolizado consumido por *Pediococcus pentosaceus*, carril 3: Almidón modificado por fosfatación, carril 4: Almidón modificado por fosfatación consumido por *Pediococcus pentosaceus*.

En la Tabla 16 se reportan los Rf de los azúcares observados en la Figura 17 de los almidones estudiados. Para el almidón modificado por hidrólisis ácida se calcularon cinco Rf, los cuales al ser comparados con los de los estándares de almidón, glucosa, melibiosa, dextrina y maltosa (Anexo 12.5) podemos decir que este almidón está compuesto por almidón, polímero de alto peso molecular, disacárido de peso molecular del orden de melobiosa, disacárido del orden de maltosa y un monosacárido de peso molecular similar a glucosa.

Tabla 16. Rf calculados por CCP de los almidones modificados y consumidos por *Pediococcus pentosaceus*.

| Muestra | Rf ₁ | Rf ₂ | Rf ₃ | Rf ₄ | Rf ₅ |
|--|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Extracto de almidón | 0 | 0.04 | 0.63 | 0.79 | 0.92 |
| Almidón modificado por hidrólisis ácida | 0 | 0.04 | 0.61 | 0.78 | 0.95 |
| Almidón modificado por hidrólisis ácida consumido por <i>Pediococcus pentosaceus</i> | 0 | 0.04 | 0.64 | 0.78 | |
| Almidón modificado por fosfatación | 0 | 0.04 | 0.64 | | |
| Almidón modificado por fosfatación consumido por <i>Pediococcus pentosaceus</i> | 0 | 0.08 | 0.68 | | |

Rf₁: Compuesto de peso molecular similar al almidón, Rf₂: Compuesto de un polímero de alto peso molecular, Rf₃: Compuesto de peso molecular similar a melobiosa, Rf₄: Compuesto de peso molecular similar a maltosa, Rf₅: Compuesto de peso molecular similar a glucosa.

El almidón modificado por hidrólisis ácida consumido por *Pediococcus pentosaceus* no se observa el azúcar correspondiente a glucosa por lo que se puede decir que este azúcar fue consumido por el microorganismo.

En el caso del almidón fosfatado este se encuentra compuesto principalmente por almidón y disacáridos y al ser empleado para el crecimiento de *Pediococcus pentosaceus* no se observó ningún cambio en la cromatografía y por tanto no se puede considerar a los almidones modificados obtenidos en esta investigación como prebióticos.

El hecho de que el almidón fosfatado no presente efecto prebiótico puede deberse al tamaño del almidón, esta característica física está relacionada con la digestibilidad, de acuerdo a la relación entre el área de la superficie y el volumen de almidón y por lo tanto, el contacto entre el sustrato y la enzima, mientras más grande sea el gránulo, presenta una menor capacidad para ser digerido, (Escobar, 2008), esto coincide con las micrografías obtenidas para el almidón fosfatado (Figura 15, Sección 9.7), en la cual se observa que al someterse a la reacción de fosfatación, el tamaño de los aglomerados de almidón aumentó.

Resultados similares han sido reportados por diversos autores, Araiza, *et al.* (2000) estudiaron la capacidad prebiótica de una dextrina modificada comercial (AOBA Trading, Japón) sobre el crecimiento de *Bifidobacterium longum* ATCC55813 obteniendo que esta dextrina no presentaba efecto prebiótico sobre esta cepa, sin embargo Haryadi & Nur (2013) reportaron que el almidón resistente de maíz obtenido mediante fosfatación con cloruro de fosforilo estimuló el crecimiento de *Bifidobacterium longum* y *Lactobacillus plantarum*, no así con *Lactobacillus acidophilus*.



10. Conclusiones.

Se obtuvo un rendimiento de extracción de almidón de 63.6% a partir de amaranto reventado. El cual aunque mostro una buena capacidad de disolverse, tiene poca capacidad de absorber agua.

Se obtuvo un 46.69% de rendimiento de almidón resistente por succinación, mientras que con el método de fosfatación se obtuvo un 56.67% de rendimiento; estos almidones presentaron baja capacidad de absorber agua y sobre todo una baja capacidad de solubilizarse en agua que es el principal propósito de obtener almidones modificados.

De acuerdo a las micrografías obtenidas de los almidones se observa que tanto el efecto del reventado de la semilla y el método de obtención de almidón modifica su estructura formando agregados, los cual incrementan su tamaño al momento de ser modificados químicamente.

Las bacterias probióticas empleadas en este estudio no crecieron a partir de los almidones modificados, estos microorganismos crecieron a partir de azúcares simples presentes en el almidón, por lo que los almidones resistentes obtenidos no presentan capacidades prebióticas.

El almidón obtenido mediante el proceso enzimático en este proyecto presentó características diferentes a los obtenidos mediante extracción hidróxido de sodio, sin embargo, los almidones modificados pueden ser empleados en la elaboración de alimentos bajos en carbohidratos disponibles.

11. Perspectivas.

La obtención de almidón como sub-producto de la extracción de proteínas y lípidos no es recomendable si se desea obtener almidón con las propiedades que lo caracterizan, sin embargo, es una alternativa para obtener almidón resistente.

Comparar los rendimientos de conversión a almidón resistente a partir de semilla de amaranto sin reventar y almidón de amaranto obtenido por métodos convencionales.

Optimizar las condiciones de reacción para succinación y fosfatación para obtener mayores rendimientos de conversión a almidón resistente, mediante diseños de superficie de respuesta y modelamiento matemático.

Evaluar si existe una relación entre el rendimiento de conversión a almidón resistente con la capacidad prebiótica y su resistencia a la hidrólisis enzimática en condiciones fisiológicas.

Evaluar la funcionalidad tecnológica de los almidones resistentes en frituras, dado que no tienen una alta capacidad de absorber agua, probablemente la retención de grasa será menor.

Probar su uso en diferentes matrices alimentarias y evaluar su efecto en diferentes parámetros sensoriales.



12. Bibliografía.

- Aguilar, C. 2007. "Optimización Del Proceso de Modificación Del Almidón de Maíz Ceroso Por Extrusión Y El Uso de Mezclas de Almidones Para La Encapsulación de Aceite Esencial de Naranja Empleando El Secado Por Asperción." Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.
- Altay, F. & Gunasekaran, S. 2006. "Influence of Drying Temperature, Water Content, and Heating Rate on Gelatinization of Corn Starches." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54: 4235–45.
- Amano. 2007. "Dictionary of Enzymes." <http://www.amano-enzyme.co.jp/eng/enzyme/4.html>.
- Amaya, C & Bello, L. 2010. "Propiedades de Digestión de Almidón de Plátano (*Musa Paradisiaca* L.) Doblemente Modificado." In *XIII Congreso Nacional de Ciencia Y Tecnología de Alimentos*. México.
- Amores, R., Calvo, A., Maestre, J. & Martínez, D. 2004. "Probióticos." *Rev Esp Quimioterap* 17 (Nº 2): 131–39.
- Anderson, R. 1969. "Water Absorption and Solubility and Amylograph Characteristics of Roll-Cooked Small Grain Products." *Cereal Chemistry* 59 (4): 265–69.
- Araiza, M, de la Mora, M., Ogura, T. 2000. "Efecto Prebiótico de Dextrina Modificada E Inulina de Agave En Diferentes Cepas de Bifidobacterias." México.
- Arellano, F. & Olmos, J. 1999. "Enzimas Amilolíticas Microbianas." *Biotecnología*.
- Aveleida, N. & Vázquez, L. 2010. "Características Del Pan Elaborado Con Diferentes Mezclas Trigo-Amaranto Y Dos Metodos Diferentes de Panificación." *XIII Congreso Nacional de Ciencia Y Tecnología de Alimentos*.
- Ávila, R., Rivas, B., Hernández, R., & Chirinos, M. 2012. "Contenido de Azúcares Totales , Reductores Y No Reductores En Agave Cocui Trelease." *Multiciencias* 12 (2): 129–35. doi:10.5897/AJB11.3143.
- Bai, Y., Kaufman, R., Wilson, R. & Shi, R. 2014. "Position of Modifying Groups on Starch Chains of Octenylsuccinic Anhydride-Modified Waxy Maize Starch." *Food Chemistry* 153. Elsevier Ltd: 193–99. doi:10.1016/j.foodchem.2013.12.012.
- Becerril, M., Carmona, R. & Aguirre, A. 2015. "Obtención Y Caracterización Estructural Y Funcional de Almidón Acetilado de Malanga (*Colocasia Esculenta* Schott)" 6: 905–12.
- Benavides, G., & Hermida, A. 2008. "Aislamiento E Identificación De Flora Bacteriana Nativa Del Suelo De Los Páramos Cruz Verde Y Guasca (Cundinamarca)." Pontificia Universidad Javeriana. <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis145.pdf>.
- Bernal, L. & Martínez, E. 2006. "Una Nueva Vision de La Degradación Del Almidón." *Red de Revistas Científicas de América Latina, El Caribe, España Y Portugal* 7 (1405–6690): 15.
- Bhosale, R. & Singhal R. 2006. "Process Optimization for the Synthesis of Octenyl Succinyl Derivative of Waxy Corn and Amaranth Starches." *Carbohydrate Polymers* 66 (4): 521–27. doi:10.1016/j.carbpol.2006.04.007.



- Birt, D., Boylston, T., Hendrich, S., Jane, J., Hollis, L. & McClelland, J. 2013. "Resistant Starch : Promise for Improving Human Health." *American Society for Nutrition* 4: 587–601. doi:10.3945/an.113.004325.TABLE.
- Blennow, A., Bay-Smidt, A., Olsen, C. & Moller, B. 2000. "The Distribution of Covalently Bound Phosphate in the Starch Granule in Relation to Starch Crystallinity." *International Journal of Biological Macromolecules* 27 (3): 211–18. doi:10.1016/S0141-8130(00)00121-5.
- Bressani, R. 2006. "“ Estudios Sobre La Industrialización Del Grano de Amaranto , Caracterización Química Y Nutricional de Productos Intermedios Y Finales Del Procesamiento .”" Guatemala.
- Capriles, V., Coelho, K., Guerra-Matias, A. & Arêas, J. 2008. "Effects of Processing Methods on Amaranth Starch Digestibility and Predicted Glycemic Index." *Journal of Food Science* 73 (7). doi:10.1111/j.1750-3841.2008.00869.x.
- Castro, Y. 2014. "Evaluación de La Protección de Diferentes Matrices de Almidón Modificado Como Materiales Encapsulantes Durante Ña Extrusión Termoplástica de Compuestos de Sabor Encapsulados." Instituto Politécnico Nacional. Unidad Queretaro.
- Contreras, B., Morales, E., Reyes, M. & Gaytán, M. 2013. "Propiedades Funcionales de Harinas de Maíz Nixtamalizado Obtenidas Por Extrusión a Baja Temperatura." *CyTA - Journal of Food* 12 (3). Taylor & Francis: 263–70. doi:10.1080/19476337.2013.840804.
- Cortes, M., Misset, A., Prats, S., Rocha, H., Rosas, K. & Vazquez, O. 2008. "Exportación Y Los Mercados Internacionales."
- De Vos, P., Garrity, G., Jones, D. Krieg, N., Ludwig, W., Rainey, F. & Whitman, W. 2009. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Volume Three The Firmicutes. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 3. doi:10.1007/978-0-387-68489-5.
- Elke, K. & Zannini, E. 2013. "Cereal Grains for the Food and Beverage Industries." In , edited by Woodhead Publishing, 439–73. United Kingdom. doi:10.1533/9780857098924.439.
- Escamilla, M., Valdés, S., Soriano, J. & Tomasini, A. 2000. "Effect of Some Nutritional and Environmental Parameters on the Production of Diacetyl and on Starch Consumption by *Pediococcus Pentosaceus* and *Lactobacillus Acidophilus* in Submerged Cultures." *Journal of Applied Microbiology* 88 (1): 142–53. doi:10.1046/j.1365-2672.2000.00934.x.
- Escobar, M. 2008. "Efecto de La Incorporación de Un Microorganismo Probiótico Y de Almidón de Haba En La Calidad de Un Queso Fresco Tipo Panela." Universidad Autónoma de Queretaro.
- Espinel, E., & López, E. 2009. "Purificación Y Caracterización de α -Amilasa de *Penicillium Commune* Producida Mediante Fermentación En Fase Sólida." *Revista Colombiana de Química* 38 (2): 1–15.
- FAO. 1999. "Los Carbohidratos En La Nutrición Humana." *Los Carbohidratos En La Nutrición Humana*. Roma.
- Feoli, M., Escobar, C. & Marin, R. 1995. "Obtención de Ácido Láctico Por Fermentación Con *Lactobacillus Delbrueckii Bulgaricus*." *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*.
- Figuerola, I., Hernández, H., Rodríguez, G., Gómez, L., García, M. & Cruz, A. 2010. "Antimicrobial Effect of *Lactobacillus* Strain Shirota Co-Cultivated with *Escherichia Coli* UAM 403." *Revista*



Mexicana De Ingenieria Quimica 9 (1): 11–16.

- Flores, R. 2014. "El Gluten Del Trigo Y Su Rol En La Industria de La Panificación." *Ingeniería Industrial*, no. 32: 231–46.
- Fuentes, E., Riquelme, M., Sánchez, E. & Pérez, P. 2010. "Resistant Starch as Functional Ingredient: A Review." *Food Research International* 43 (4). Elsevier Ltd: 931–42. doi:10.1016/j.foodres.2010.02.004.
- Gänzle, M. & Follador, R. 2012. "Metabolism of Oligosaccharides and Starch in Lactobacilli: A Review." *Frontiers in Microbiology* 3 (SEP): 1–15. doi:10.3389/fmicb.2012.00340.
- García, A. 2011. "Obtención Y Caracterización de Almidones Modificacos Y Su Aplicación Como Agentes Encapsulantes Del Bioinsecticida Bacillus Thuringiensis." Universidad Autónoma de Querétaro.
- García, P. & Velasco, G. 2007. "Evolución En El Conocimiento de La Fibra." *Nutrición Hospitalaria* 22 (2): 20–25. http://scielo.isciii.es/scielo.php?pid=S0212-16112007000500004&script=sci_arttext.
- Garcia, S., Hernandez, C., Escalona, H., Bello, L., Vernon, E. & Alvarez, J. 2016. "Effects of CaCO₃ Treatment on the Morphology, Crystallinity, Rheology and Hydrolysis of Gelatinized Maize Starch Dispersions." *Food Chemistry* 207. Elsevier Ltd: 139–47. doi:10.1016/j.foodchem.2016.03.095.
- Garisch, J., Eliakim, R., Shanahan, F., Ellen, M. & Sanders. 2011. "Probióticos Y Prebióticos." *Guías Mundiales de La Organización Mundial de Gastroenterología*.
- Gómez, S., Nova, E. & Marcos, A. 2008. "Probióticos." In *Alimentos Funcionales. Aproximación a Una Nueva Alimentación*, 90–103. Madrid, España.
- Gonzales, C. 2012. "Evaluación Físicoquímica Y Capacidad Antioxidante Del Aceite de Amaranto (Amaranthus Hypochondriacus) Y Estabilidad Oxidativa de Diferentes Sistemas de Encapsulación." Universidad Autónoma de Querétaro.
- González, B., Gómez, M. & Jiménez, Z. 2003. "Bacteriocinas De Probióticos." *Revista Salud Publica Y Nutricion* 4 (2): 8. <http://www.medigraphic.com/pdfs/quirurgicas/rmq-2008/rmq084c.pdf>.
- Goñi, I. García, L. Mañas, E., & Saura, F. 1996. "Análisis de Almidón Resistente: Un Método Para Alimentos Y Productos Alimenticios." *Revista de Química Alimenticia* 56: 445–49.
- Hanmoungjai, P., Pyle, D. & Niranjana, K. 2001. "Enzymatic Process for Extracting Oil and Protein from Rice Bran." *Journal of the American Oil Chemists' Society* 78 (8): 817–21.
- Haralampu, S. 2000. "Resistant Starch—a Review of the Physical Properties and Biological Impact of RS3." *Carbohydrate Polymers* 41 (3): 285–92. doi:10.1016/S0144-8617(99)00147-2.
- Haryadi, A., & Nur, M. 2013. "Prebiotic Activity of Phosphorylated Resistant Corn Starch." Indonesia.
- Heimbach, J. 2012. Generally Recognized as Safe (GRAS). Determination for the use of Lactobacillus casei Strain Shirota As a Food Ingredient. 21 CFR 170.36, issued 2012.
- Henry, C. 2007. "Modified Carbohydrates with Lower Glycemic Index." In *Novel Food Ingredients for Weight Control*, 208.



- Herigstad, B., Hamilton, M. & Heersink, J. 2001. "How to Optimize the Drop Plate Method for Enumerating Bacteria." *Journal of Microbiological Methods* 44 (2): 121–29. doi:10.1016/S0167-7012(00)00241-4.
- Hevia, F., Berti, M., Wilckens, R & Yévenes, C. 2002. "Contenido de Proteína Y Algunas Características Del Almidón En Semillas de Amarantho (Amaranthus SPP.) Cultivado En Chillan, Chile." *Agro Sur* 20 (1): 54.
- Huerta, J., Maldonado, E. & Barba de la Rosa, A. 2012. "Amaranto: Ciencia Y Tecnología." In *Amaranto: Ciencia Y Tecnología*, edited by E Espitia, Primera, 316. México: INIFAP.
- Hui, R., Qi-he, C., Ming-liang, F. Qiong, X. & Guo-qing, H. 2009. "Preparation and Properties of Octenyl Succinic Anhydride Modified Potato Starch." *Food Chemistry* 114 (1). Elsevier Ltd: 81–86. doi:10.1016/j.foodchem.2008.09.019.
- Hung, P., Lam Vien, N. & Thi Lan Phi, N. 2016. "Resistant Starch Improvement of Rice Starches under a Combination of Acid and Heat-Moisture Treatments." *Food Chemistry* 191. Elsevier Ltd: 67–73. doi:10.1016/j.foodchem.2015.02.002.
- Iñiguez, C. & Acedo, E. 2006. "Mecanismos de Adhesión Al Tracto Intestinal Y Antagonismo de Bifidobacterium." *Revista de La Facultad de Salud Pública Y Nutrición* 7 (2).
- JianYa, Y. & Manfred Kuhn. 1999. "Characterization of Amaranthus Cruentus and Chenopodium Quinoa Starch." *Starch/Stärke* 114 (1997): 116–20. doi:10.1002/(sici)1521-379x(199904)51:4<116::aid-star116>3.0.co;2-r.
- Kim, C., Shih, F. & Et Champagne. 1999. "Effects of Phosphorylating Salts and Temperature on the Preparation of Rice Starch Phosphates by Extrusion." *Starch - Stärke* 57 (4): 1009–13. doi:10.1002/(SICI)1521-379X(199909)51:8/9<280::AID-STAR280>3.0.CO;2-V.
- Kim, H., Park, S. & Taik Lim, S. 2015. "Preparation, Characterization and Utilization of Starch Nanoparticles." *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 126. Elsevier B.V.: 607–20. doi:10.1016/j.colsurfb.2014.11.011.
- Kong, X., Bao, J. & Corke, H. 2009. "Physical Properties of Amaranthus Starch." *Food Chemistry* 113 (2). Elsevier Ltd: 371–76. doi:10.1016/j.foodchem.2008.06.028.
- Kraujalis, P. & Venskutonis, P. 2013a. "Optimisation of Supercritical Carbon Dioxide Extraction of Amaranth Seeds by Response Surface Methodology and Characterization of Extracts Isolated from Different Plant Cultivars." *Journal of Supercritical Fluids* 73 (January). Elsevier B.V.: 80–86. doi:10.1016/j.supflu.2012.11.009.
- . 2013b. "Supercritical Carbon Dioxide Extraction of Squalene and Tocopherols from Amaranth and Assessment of Extracts Antioxidant Activity." *Journal of Supercritical Fluids* 80 (August). Elsevier B.V.: 78–85. doi:10.1016/j.supflu.2013.04.005.
- Lara, N. & Ruales, J. 1999. "Efecto Del Proceso de Reventado Sobre Las Características Del Almidón de Amarantho (Amaranthus Caudatus)." Escuela Politécnica Nacional.
- Lebeer, S., Claes, I., Verhoeven, T., Vanderleyden, J. & De Keersmaecker, S. 2011. "Exopolysaccharides of Lactobacillus Rhamnosus GG Form a Protective Shield against Innate Immune Factors in the Intestine." *Microbial Biotechnology* 4 (3): 368–74. doi:10.1111/j.1751-7915.2010.00199.x.



- LeBlanc, J., Garro, M. & Savoy de Giori, G. 2004. "Effect of pH on Lactobacillus Fermentum Growth, Raffinose Removal, Alpha-Galactosidase Activity and Fermentation Products." *Applied Microbiology and Biotechnology* 65: 119–23. doi:10.1007/s00253-003-1532-z.
- López-Brea, M. & Domingo, D. 2007. "Antibioticoterapia Con Probióticos." *Revista Espanola de Quimioterapia* 20 (2): 170–81.
- Loubes, M., Calzetta, A., Tolaba, M. & Suarez, C. 2012. "Mechanical and Thermal Characteristics of Amaranth Starch Isolated by Acid Wet-Milling Procedure." *LWT - Food Science and Technology* 46 (2): 519–24. doi:10.1016/j.lwt.2011.11.015.
- Manera, A., Kamimura, E., Brites, L. & Kalill, S. 2008. "Adsorption of Amyloglucosidase from Aspergillus Niger NRRL 3122 Using Ion Exchange Resin." *Brazilian Archives of Biology and Technology* 51 (5): 1015–24. doi:10.1590/S1516-89132008000500019.
- Mark, M. & Mehltreter, C. 1970. "Acetylation of High-Amylose Corn Starch. Influence of Pretreatment Techniques on Reaction Rate and Triacetate Solubility." *Starch* 22 (4): 108–10.
- Martí, A., Moreno, M. & Martínez, A. 2003. "Efecto de Los Prebióticos Sobre El Metabolismo Lipídico." *Nutricion Hospitalaria* 18 (4): 181–88.
- Martín, J. & López, E. 2009. "Modificación Física Del Almidón de Yuca Y Evaluación de La Susceptibilidad a La Hidrólisis Enzimática Por Una Alfa-Amilasa." *Revista Colombiana de Química* 38 (3): 395–408.
- Martínez, F. 2010. "Obtención Y Caracterización de Almidón Resistente Tipo IV En Sistemas Modelo de Almidón de Papa Mediante Introducción de Ligaciones Cruzadas Por Extrusión Y Su Evaluación En La Preparación de Yogurt." In *Congreso Internacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos*. Nuevo León.
- Martínez, M. 1996. "Determinación, Cuantificación E Hidrólisis de Inulina En El Aguamiel de Agave Pulquero, Agave Atrovierens." Universidad Nacional Autónoma de México.
- Mikelsaar, M. & Zilmer, M. 2009. "Lactobacillus Fermentum ME-3-an Antimicrobial and Antioxidative Probiotic." *Microbial Ecology in Health and Disease* 21: 1–27. doi:10.1080/08910600902815561.
- Montero, K., Moreno, R., Molina, E., Segundo, M. & Sánchez, A. 2015. "REGIMENES DIETÉTICOS." *Interciencia*, July.
- Murakami, T., Yutani, A., Yamano, R., Iyota, H. & Konishi, Y. 2014. "Effects of Popping on Nutrient Contents of Amaranth Seed." *Plant Foods for Human Nutrition* 69 (1): 25–29. doi:10.1007/s11130-013-0392-7.
- Murúa, B., Beristain, C. & Martínez, F. 2009. "Preparation of Starch Derivatives Using Reactive Extrusion and Evaluation of Modified Starches as Shell Materials for Encapsulation of Flavoring Agents by Spray Drying." *Journal of Food Engineering* 91 (3). Elsevier Ltd: 380–86. doi:10.1016/j.jfoodeng.2008.09.035.
- Muyonga, J., Andabati, B. & Ssepunya, G. 2014. "Effect of Heat Processing on Selected Grain Amaranth Physicochemical Properties." *Food Science & Nutrition* 2 (1): 9–16. doi:10.1002/fsn3.75.



- Naoyoshi, I., Keisuke, N., Shinji, T., Motoko, A., Yasutaka, K., Yoshimi, J., Yotaro, K., Shaoxian, Y. & Hidetsugu, F. 1999. "Characterization of Amaranth and Quinoa Starches." *J Appl Glycosci* 46 (3): 233–40. doi:10.5458/jag.46.233.
- Novozymes. 2016. "Enzymes for Education." *Amyloglucosidase*. <http://www.ncbe.reading.ac.uk/MATERIALS/Enzymes/amyloglucosidase.html>.
- Olagnero, G., Abad, A., Bendersky, S., Genevois, C., Granzella, L. & Montonati, M. 2007. "Alimentos Funcionales: Fibra, Prebióticos, Probióticos Y Simbióticos." *Diaeta* 25 (121): 20–33. http://www.fmed.uba.ar/depto/nutrinormal/funcionales_fibra.pdf.
- Olivera, J. 2011. "Caracterización Tecnológica de Cepas de Bacterias Ácido Lácticas Aisladas de La Leche." Universidad de la República de Uruguay. <http://www.bib.fcien.edu.uy/files/etd/pasan/uy24-15316.pdf>.
- Orosco, E. 2013. "Actividad Biológica de Péptidos de Amaranto Obtenidos Por Acción de Microorganismos." Universidad Nacional de La Plata.
- Paredes, F. 2013. "Identificación de Extractos de Fuentes Naturales Con Actividad Inhibitoria de Tirosina." Universidad Autónoma Metropolitana.
- Paredes, O., Schevenin, M., Hernández, D. & Cárabez, A. 1989. "Amaranth Starch - Isolation and Partial Characterization." *Starch - Stärke* 41 (6): 205–7. doi:10.1002/star.19890410602.
- Paschall, E. 1964. "Phosphatation with Inorganic Phosphate Salts." In *Methods in Carbohydrate Chemistry: Starch*, Academic P, 294–96. New York: Whistler, R.L.
- Peña, A. 2009. "Hidrólisis De Almidón De Yuca Mediante La Utilización De Preparaciones Solubles E Insolubilizadas De Alfa-Amilasa (Aspergillus Niger)." Universidad Industrial de Santander. doi:10.1017/CBO9781107415324.004.
- Perez, E., Bhanassy, Y. & Breene, W. 1993. "A Simple Laboratory Scale Method for Isolation of Amaranth Starch." *Starch/Stärke* 45: 211–14.
- Pérez, M. & Brambila, E. 2005. "Preparación Y Evaluación de Un Equipo de Reactivos Para La Determinación de Glucosa (Glucosa Oxidasa / Peroxidasa)." *Bioquimia* 30 (4): 110–17. www.redalyc.org.
- Pokusaeva, K., Fitzgerald, G. & Van Sinderen, D. 2011. "Carbohydrate Metabolism in Bifidobacteria." *Genes and Nutrition* 6 (3): 285–306. doi:10.1007/s12263-010-0206-6.
- Remya, R., Jyothi, A. & Sreekumar, J. 2017. "Comparative Study of RS4 Type Resistant Starches Derived from Cassava and Potato Starches via Octenyl Succinylation." *Starch/Stärke* 1600264: 1–11. doi:10.1002/star.201600264.
- Richardson, S., Nilsson, G., Cohen, A., Momcilovic, D., Brinkmalm, G. & Gorton, L. 2003. "Enzyme-Aided Investigation of the Substituent Distribution in Cationic Potato Amylopectin Starch." *Analytical Chemistry* 75 (23): 6499–6508. doi:10.1021/ac0300688.
- Robles, M. 2015. "Extracción Secuencial de Proteínas Y Lípidos de La Semilla de Amaranto (Amaranthus Hypochondriacus L.) Por Vía Enzimática." Universidad Autónoma Metropolitana.
- Rodas, B. & Bressani, R. 2009. "Contenido de Aceite, Ácidos Grasos Y Escualeno En Variedades Crudas



- Y Procesadas de Grano de Amaranto." *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 59 (4): 82–87.
- Rodríguez, M. 2009. "Efecto de Tres Agentes Entrecruzantes Sobre Las Propiedades Físicoquímicas Y Características Morfológicas Del Almidón de Platano." Instituto Politécnico Nacional.
- Rojas, L., Caicedo, L., Aguilar, J. & Martínez, L. 2008. "Evaluación de La Sacarificación de Yuca Mediante El Proceso Convencional Y El Proceso Low - Energy , Para Su Posterior Determinación de La Cinética de Reacción." *Tecnológicas*, no. 21.
- Saari, H., Heravifar, K., Rayner, M., Wahlgren, M. & Sjöö, M. 2016. "Preparation and Characterization of Starch Particles for Use in Pickering Emulsions." *Cereal Chemistry* 93 (2): 116–24. doi:10.1094/CCHEM-05-15-0107-R.
- Saenz, Y., Collado, M. & Dalmau, J. 2003. "Probióticos: Criterios de Calidad Y Orientaciones Para El Consumo." *Acta Pediátrica Española* 61 (9): 476–82.
- Sánchez, S. 2007. "Caracterización Físicoquímica Amaranto (*Amaranthus Hypochondriacus*) Cultivado En San Luis Potosí." Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.
- Sang, . Y, Prakash, O. & Seib, P. 2007. "Characterization of Phosphorylated Cross-Linked Resistant Starch by P Nuclear Magnetic Resonance (³¹ P NMR) Spectroscopy" 67: 201–12. doi:10.1016/j.carbpol.2006.05.009.
- Sang, Y., Seib, P., Herrera, A., Prakash, O. & Cheng Shi, Y. 2010. "Effects of Alkaline Treatment on the Structure of Phosphorylated Wheat Starch and Its Digestibility." *Food Chemistry* 118 (2). Elsevier Ltd: 323–27. doi:10.1016/j.foodchem.2009.04.121.
- Sanguanpong, V., Chotineeranat, S., Piyachomkwan, K., Oates, C., Chinachoti, P. & Sriroth, K. 2003. "Hydration and Physicochemical Properties of Small-Particle Cassava Starch." *Journal of the Science of Food and Agriculture* 83 (2): 123–32. doi:10.1002/jsfa.1285.
- Serna, L. & Rodriguez, A. 2005. "Producción Biotecnológica de Ácido Láctico: Estado Del Arte." *Ciencia Y Tecnología Alimentaria* 5 (1): 54–65. doi:10.1080/11358120509487672.
- Shevkani, K., Singh, N., Kaur, A. & Rana, J. 2014. "Physicochemical, Pasting, and Functional Properties of Amaranth Seed Flours: Effects of Lipids Removal." *Journal of Food Science* 79 (7). doi:10.1111/1750-3841.12493.
- Shindu, R., & Singh, B. 2016. "Characterization of Amaranth (*Amaranthus Hypochondriacus*) Starch." *International Journal of Engineering Research & Technology* 5 (6): 463–69.
- Silveira, M., Monereo, S. & Molina, B. 2003. "Alimentos Funcionales Y Nutrición Óptima. ¿Cerca O Lejos?" *Revista Espanola de Salud Publica* 77 (3): 317–31. doi:10.1590/S1135-57272003000300003.
- Sivoli, L., Pérez, E. Rodríguez, P., De Abrisqueta, A. & Raymúndez, M. 2006. "Cambios En La Estructura Granular Durante El Proceso de Modificación Química (Fosfatado- Acetilado) Del Almidón de Yuca Analizados Por Microscopía Óptica Y Electrónica." *Acta Microscópica* 14 (1): 5–9.
- Soraya, V. & Soto, A. 2010. "Cuantificación de Almidón Total Y de Almidón Resistente En Harina de Platano Verde (*Musa Cavendishii*) Y Banana Verde (*Musa Paradisiaca*)." *Revista Boliviana de Química* 27 (2): 94–99.



- Suarez, N. & Guerrero, A. 2016. "Efecto de La Extrusión-Cocción En La Formación de Almidón Resistente." *Investigación Y Desarrollo En Ciencia Y Tecnología de Alimentos* 1 (1): 36–41.
- Talamond, P., Noirot, M. & de Kochko, A. 2006. "The Mechanism of Action of α -Amylase from *Lactobacillus Fermentum* on Maltooligosaccharides." *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 834 (1–2): 42–47. doi:10.1016/j.jchromb.2006.02.005.
- Teli, M., Rohera, P. Sheikh, J. & Singhal, R. 2009. "Use of *Amaranthus* (Rajgeera) Starch Vis-À-Vis Wheat Starch in Printing of Vat Dyes." *Carbohydrate Polymers* 76 (3). Elsevier Ltd: 460–63. doi:10.1016/j.carbpol.2008.11.007.
- Todorov, S., LeBlanc, J., Franco, B. & Vaz-Velho, M. 2012. "Bacteriocin-Producing Lactic Acid Bacteria for Biopreservation: Example of Application in Raw and Processed Salmon." In *Lactobacilli: Classification Uses and Health Implications*, edited by Alba Perez and Arturo Leon, 65–91. Brazil: Nova Science Publishers, Inc.
- Tovar, . 2008. "Caracterización Morfológica Y Térmica Del Almidón De Maíz (*Zea Mays* L) Obtenido Por Diferentes Métodos de Aislamiento," 68.
- Tulumoğlu, Ş., Kaya, H. & Şimşek, O. 2014. "Probiotic Characteristics of *Lactobacillus Fermentum* Strains Isolated from Tulum Cheese." *Anaerobe* 30: 120–25. doi:10.1016/j.anaerobe.2014.09.015.
- Venskutonis, P., & Kraujalis, P. 2013. "Nutritional Components of Amaranth Seeds and Vegetables: A Review on Composition, Properties, and Uses." *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 12 (4): 381–412. doi:10.1111/1541-4337.12021.
- Villarreal, M., Ribotta, P. & Iturriaga, L. 2013. "Comparing Methods for Extracting *Amaranthus* Starch and the Properties of the Isolated Starches." *LWT - Food Science and Technology* 51 (2). Elsevier Ltd: 441–47. doi:10.1016/j.lwt.2012.11.009.
- Villavicencio, L. 2006. "Viabilidad de *Lactobacillus Casei* Shirota Y *Lactobacillus Rhamnosus* GG En Jugo de Cranberry." Universidad Austral de Chile.
- Villena, M., Hernández, M., Lara, G. & Martínez, R. 2009. "Técnicas de Microencapsulación : Una Propuesta Para Microencapsular." *Ars Pharmaceutica* 50 (1): 43–50.
- Warren, F., Zhang, B., Waltzer, G., Gidley, M. & Dhital, S. 2015. "The Interplay of α -Amylase and Amyloglucosidase Activities on the Digestion of Starch in in Vitro Enzymic Systems." *Carbohydrate Polymers* 117. Elsevier Ltd.: 192–200. doi:10.1016/j.carbpol.2014.09.043.
- Worthington. 2017. "Enzyme Manual: Beta Amylase." <http://www.worthington-biochem.com:8080/enzyme-manual/BA/>.
- Xu, Y., Miladinov, V. & Hanna, M. 2004. "Synthesis and Characterization of Starch Acetates with High Substitution." *Cereal Chemistry* 81 (6): 735–40. doi:10.1094/cchem.2004.81.6.735.
- Yanez, G., Messinger, J., Walker, C. & Rupnow, J. 1986. "*Amaranthus Hypochondriacus*: Starch Isolation and Partial Characterization." *American Association of Cereal Chemists*. <http://www.aaccnet.org/publications/cc/backissues/1986/Documents/CC1986a63.html>.
- Zvietcovich, G. 1976. "Hojas de Quinoa." In *II Convención Internacional de Quenopodiácea*

13. Apéndice

13.1 Curva patrón de glucosa para la cuantificación de almidón total y almidón resistente por la reacción de glucosa oxidasa-peroxidasa empleando el reactivo a Glucosa-SL (Sekisui Diagnostics).

Tabla 17. Datos para la cuantificación de almidón total y resistente

| Glucosa (mmol/L) | Absorbancia (nm) |
|------------------|------------------|
| 0.2 | 0.014 |
| 0.4 | 0.028 |
| 0.6 | 0.04 |
| 0.8 | 0.052 |
| 1 | 0.072 |

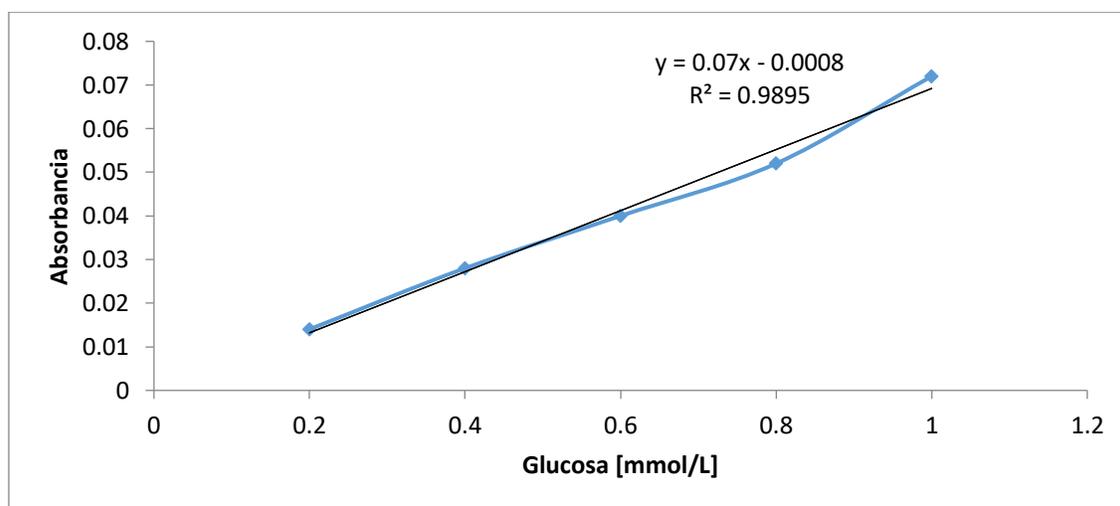


Figura 18. Curva estándar para la cuantificación de almidón resistente

13.2. Curva patrón de glucosa para la cuantificación de azúcares totales por la técnica de fenol-sulfúrico.

Tabla 18. Datos para la cuantificación de azúcares totales.

| Glucosa (µg/ml) | Absorbancia (nm) |
|-----------------|------------------|
| 0 | 0 |
| 10 | 0.134 |
| 20 | 0.247 |
| 40 | 0.432 |
| 60 | 0.618 |
| 80 | 0.873 |
| 100 | 1.04 |

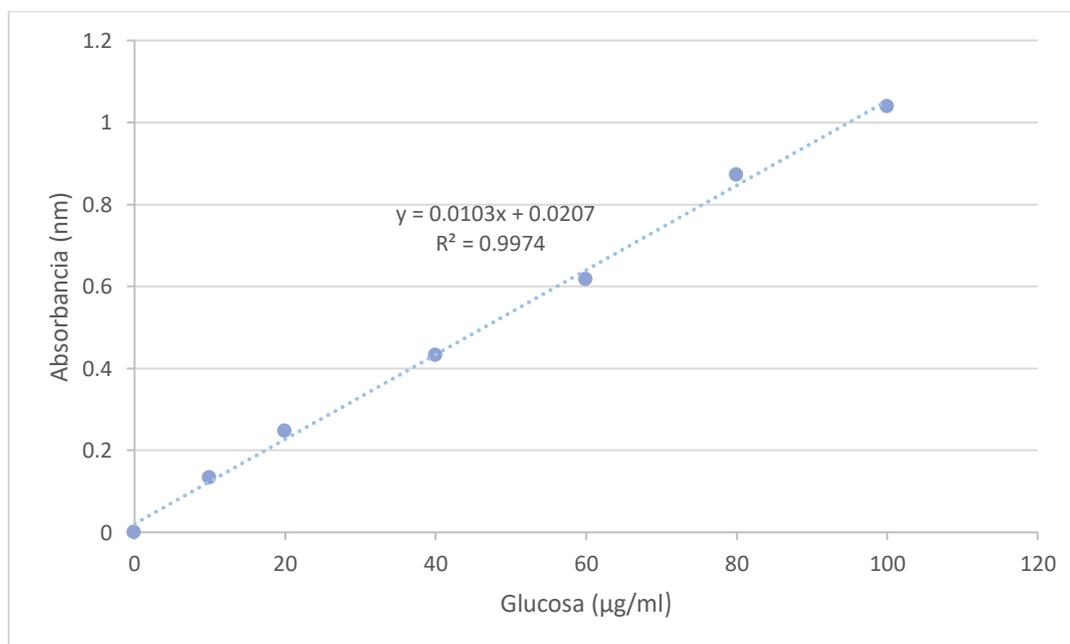


Figura 19. Curva estándar para la cuantificación de azúcares totales.



13.3. Curva patrón para la cuantificación de glucosa libre mediante la técnica de glucosa oxidasa-peroxidasa (Wiener Lab.).

Tabla 19. Datos para la elaboración de la curva estándar de glucosa libre

| Glucosa ($\mu\text{g/ml}$) | Absorbancia (nm) |
|------------------------------|------------------|
| 0 | 0 |
| 10 | 0.108 |
| 20 | 0.282 |
| 30 | 0.419 |
| 40 | 0.5 |
| 50 | 0.661 |

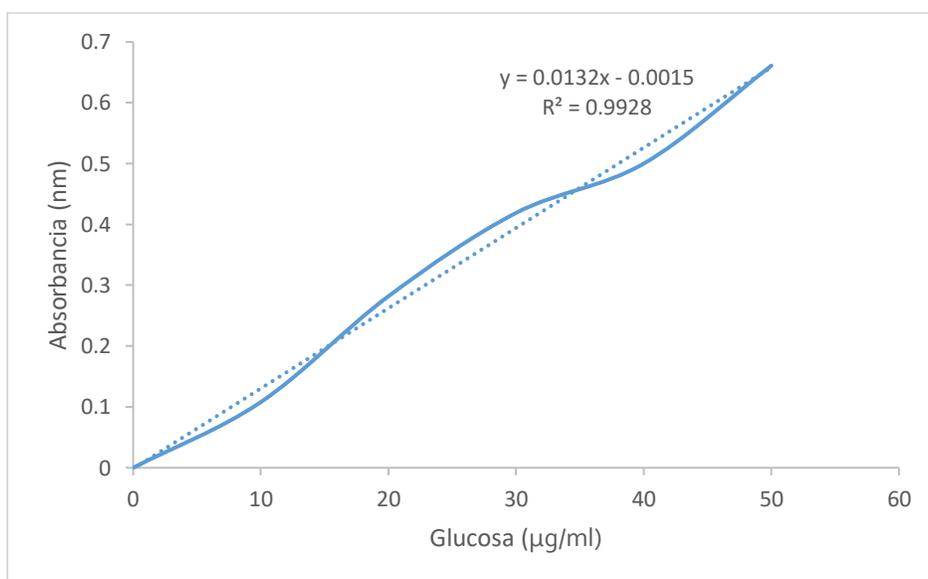


Figura 20. Curva estándar para la cuantificación de glucosa libre.

13.4. Curva patrón de glucosa para la cuantificación de azúcares reductores por DNS.

Tabla 20. Datos para la elaboración de la curva estándar de azúcares reductores.

| Glucosa (mg/mL) | Absorbancia (nm) |
|-----------------|------------------|
| 0 | 0 |
| 0.2 | 0.041 |
| 0.4 | 0.106 |
| 0.6 | 0.184 |
| 0.8 | 0.239 |
| 1 | 0.304 |

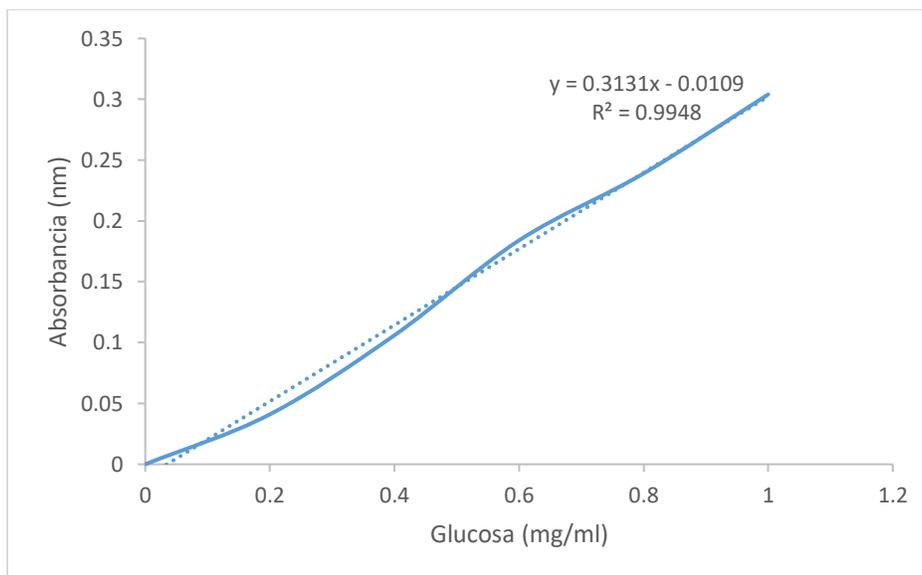


Figura 21. Curva estándar para la cuantificación de azúcares reductores.

13.5 Placa cromatográfica de los estándares de azúcares para la identificación de los compuestos presentes en los almidones estudiados.

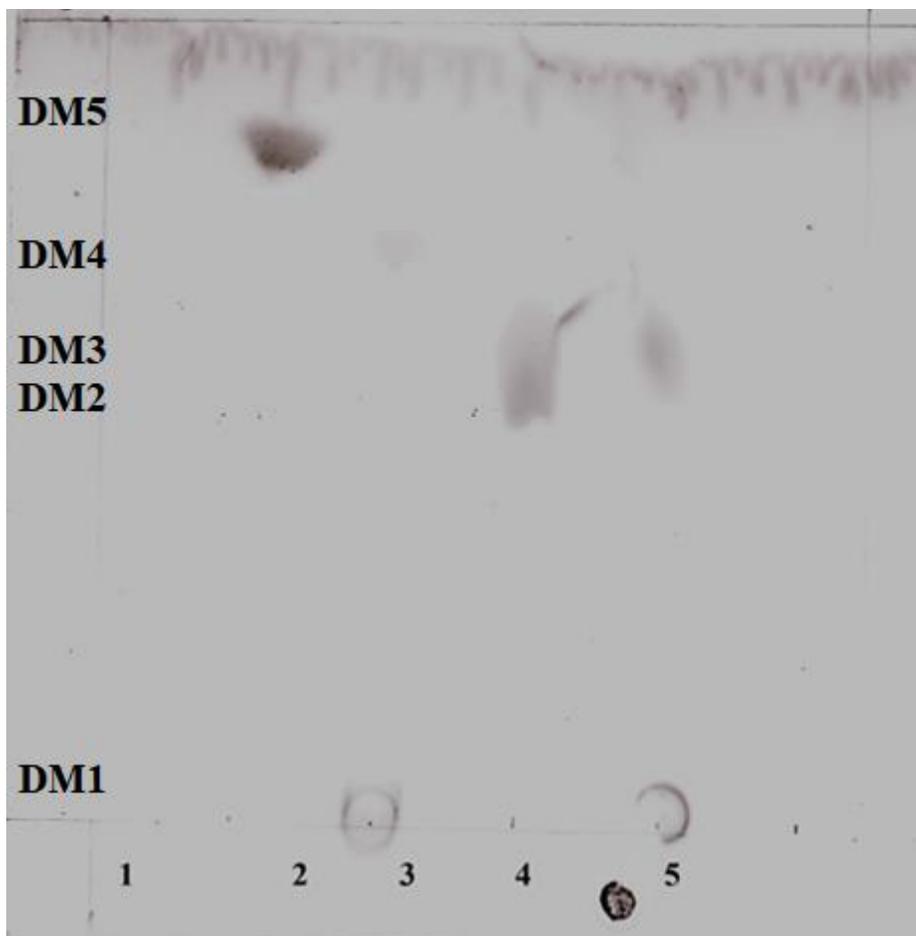


Figura 22. Placa cromatográfica de estándares de azúcar.

Tabla 21. Rf de los estándares de azúcar

| Patrón | Rf |
|---------------------|------|
| 1. Almidón (PM 1) | 0 |
| 2. Glucosa (PM 5) | 0.83 |
| 3. Maltosa (PM 4) | 0.71 |
| 4. Melobiosa (PM 3) | 0.60 |
| 5. Dextrina (PM 2) | 0.59 |