



INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL

CENTRO DE DESARROLLO DE PRODUCTOS BIOTICOS

**PROPIEDADES DE DIGESTIÓN DE ALMIDONES
NATIVOS Y MODIFICADOS DE PLÁTANO Y MANGO**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTORADO EN CIENCIAS EN DESARROLLO DE
PRODUCTOS BIÓTICOS

PRESENTA:

VICENTE ESPINOSA SOLIS

Director de tesis:

Dr. LUIS ARTURO BELLO PÉREZ



YAUTEPEC, MORELOS, ENERO 2012

Este trabajo fue realizado en el Departamento de Desarrollo Tecnológico del Centro de Desarrollo de Productos Bióticos (Yautepec, Morelos, México) que forma parte del Instituto Politécnico Nacional bajo la dirección del Dr. Luis Arturo Bello Pérez. En el laboratorio de química de los cereales del Centro Whistler para la Investigación de Carbohidratos localizado en el Departamento de Ciencia de los Alimentos de la Universidad Purdue (West Lafayette, Indiana, EUA), bajo la supervisión del Dr. Bruce R. Hamaker.

Se agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y al Programa Institucional de Formación de Investigadores (PIFI) por las becas otorgadas para la realización de estos estudios.



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

SIP-14

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de Yautepec siendo las 9:00 horas del día 28 del mes de Noviembre del 2011 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CEPROBI-IPN para examinar la tesis de titulada:

Propiedades de digestión de almidones nativos y modificados de plátano y mango.

Presentada por el alumno:

Espinosa
Apellido paterno

Solis
Apellido materno

Vicente
Nombre(s)

Con registro:

B	0	8	1	0	4	3
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de:

Doctorado en Ciencias en Desarrollo de Productos Bióticos

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **SU APROBACIÓN DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Director de tesis

Dr. Luis Arturo Belo Pérez

Dr. Antonio Ruperto Jiménez Aparicio

Dra. Rosalía América González Soto

Dra. Perla Osorio Díaz

Dr. Eduardo San Martín Martínez

Dra. Edith Agama Acevedo

EL PRESIDENTE DEL COLEGIO

Dr. Antonio Ruperto Jiménez Aparicio



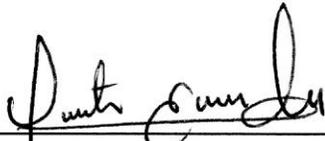
[Handwritten mark]

DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD

Con Base en el artículo 57 fracción I del Reglamento de Estudios de Posgrado vigente y en la Sección IV del Código de Ética del IPN, hacemos constar que el trabajo de tesis “**Propiedades de digestión de almidones nativos y modificados de plátano y mango**” es responsabilidad del **C. Dr. Luis Arturo Bello Pérez** y del **C. Vicente Espinosa Solis**, y que ni los datos experimentales ni el texto han sido usados para obtener el grado académico en el país o en el extranjero. Cualquier colaboración o cita textual fue declarada y reconocida en el documento.

Yautepec, Morelos, a 02 de Diciembre del 2011

ATENTAMENTE



Vicente Espinosa Solis
Alumno



Dr. Luis Arturo Bello Pérez
Director de Tesis

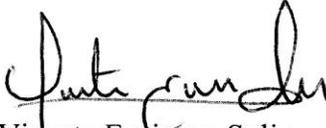


INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de Yauatepec el día 02 del mes Diciembre del año 2011 , el que suscribe **Vicente Espinosa Solis** alumno del Programa de **Doctorado en ciencias en desarrollo de productos bióticos** con número de registro **B081043**, adscrito a Centro de desarrollo de productos bióticos, manifiesta que es autor intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de **Dr. Luis Arturo Bello Pérez** y cede los derechos del trabajo intitulado “**Propiedades de digestión de almidones nativos y modificados de plátano y mango**”, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección carretera **Yauatepec - Jojutla, Km. 6, calle CEPROBI No. 8. Col. San Isidro, Yauatepec, Morelos, Mexico, C.P. 62731, tel: 735 394 2020 ext. 82509**. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.


Vicente Espinosa Solis

Nombre y firma

AGRADECIMIENTOS

Dr. Luis Arturo Bello Pérez por haberme permitido ser parte de su equipo de trabajo, por su apoyo y consejos en la dirección de esta tesis y por su paciencia expresada a lo largo de mi formación académica.

Dr. Bruce R. Hamaker por las facilidades, consejos y motivación recibidos durante la realización de la estancia en la Universidad Purdue.

A mis compañeros de la Universidad Purdue: Deepak, Byung-Hoo, Amandeep, Madhuvanti, Jung-Hwan, Pinthip, Dave y Amy lin, por su compañía fuera y dentro del laboratorio, por compartir su cultura y por aceptarme dentro de su grupo de amigos.

A mis compañeras del CEPROBI: Alma, Carolina, Erika, Fandila, Maria Luisa, Maribel y Sandra por los consejos personales, las vivencias compartidas, las horas de frustración y alegría. A Maria Guadalupe (la niña) por haberme brindado y demostrado su amistad en todo momento y por la compañía en los largos y fríos días de laboratorio.

A Nancy y John Maylath por haber me hecho sentir en familia aun estando a miles de kilómetros lejos de la mía propia.

DEDICATORIAS

A mis Padres Vicente Espinosa Peña y Aurelia Solis Leyva con todo mi amor y cariño, gracias por su comprensión, apoyo y amor incondicional

A mi sobrina Atala Espinosa, con tu presencia alegras nuestros días, te quiero mucho, nena!

A las personas que entraron, salieron y se quedaron durante este proyecto de vida, a todas ellas gracias por aportar algo en mi persona.

ÍNDICE DE CONTENIDO

	Página
ÍNDICE DE CONTENIDO	I
ÍNDICE DE CUADROS	IV
ÍNDICE DE FIGURAS	VI
LISTA DE ABREVIACIONES	IX
RESUMEN	XI
ABSTRACT	XII
<hr/>	
1. INTRODUCCION	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1 Estructura del gránulo de almidón	3
2.2 Gelatinización y retrogradación del almidón	9
2.3 Digestión del almidón	11
2.4 Digestibilidad de las fracciones de almidón	14
2.5 Almidón de digestión lenta (ADL)	14
2.6 Almidón resistente (AR)	17
2.6.1 Almidón físicamente inaccesible (AR1)	18
2.6.2 Almidón nativo (AR2)	19
2.6.3 Almidón retrogradado (AR3)	20
2.6.4 Almidón químicamente modificado (AR4)	22
2.7 Respuesta fisiológica del consumo de las fracciones de almidón	22
2.7.1 Efecto fisiológico del consumo de ADL	24
2.7.2 Efectos fisiológicos atribuidos al consumo de AR	26
2.8 Incremento de las fracciones de ADL y AR	27
2.9 Hidrólisis ácida (lintnerización)	30
2.10 Hidrólisis enzimática (desramificación)	33
2.11 Almidón de frutos	35
2.11.1 El plátano	35
2.11.2 El mango	37

3. JUSTIFICACION	38
4. OBJETIVOS	39
4.1 Objetivo general	39
4.2 Objetivos específicos	39
5. MATERIALES Y METODOS	40
5.1 Materiales	40
5.2 Métodos	40
5.2.1. Aislamiento del almidón de plátano	42
5.2.2. Aislamiento del almidón de mango	42
5.2.3 Almidón total	43
5.2.4 Amilosa total	44
5.2.5 Análisis rápido de la viscosidad	46
5.2.6 Modificación de los gránulos de almidón mediante hidrólisis ácida	47
5.2.7 Modificación de los gránulos de almidón mediante hidrólisis enzimática	48
5.2.8 Propiedades de digestión ADR, ADL y AR	49
5.2.9 Microscopía electrónica de barrido	50
5.2.10 Distribución de tamaño molecular (intervalo de exclusión $1 \times 10^3 - 1 \times 10^5$)	51
5.2.11 Distribución de tamaño molecular (intervalo de exclusión $4 \times 10^4 - 2 \times 10^7$)	52
5.2.12 Determinación de difracción de rayos X	53
5.2.13 Calorimetría diferencial de barrido	54
5.2.14 Análisis estadístico	54
6. RESULTADOS Y DISCUSIONES	55
6.1 Propiedades de digestión de los almidones nativos de plátano y mango	55
6.1.1 Contenido de almidón total y amilosa total	55
6.1.2 Características morfológicas de los almidones nativos	57
6.1.3 Características estructurales de los almidones nativos	59
6.1.4 Características de digestibilidad de los almidones nativos	62
6.2 Propiedades de digestión de almidones de mango y plátano modificados mediante hidrólisis ácida (lintnerización)	66

6.2.1	Parámetros de hidrólisis ácida de los almidones de mango y plátano	66
6.2.2	Características morfológicas de los almidones modificados mediante hidrólisis ácida (lintnerización)	69
6.2.3	Características estructurales de los almidones de mango y plátano modificados mediante hidrólisis ácida	71
6.2.3.1	Distribución de tamaño molecular (CLARET-IR)	71
6.2.3.2	Patrón de difracción de rayos X	75
6.2.4	Características de digestibilidad de los almidones de mango y plátano modificados mediante hidrólisis ácida	77
6.2.5	Características térmicas de los almidones de mango y plátano modificados mediante hidrólisis ácida	82
6.3	Propiedades de digestión de almidones modificados mediante hidrólisis enzimática (desramificación)	87
6.3.1	Viscosidad de los almidones nativos de mango y plátano	87
6.3.2	Porcentaje de desramificación de los almidones de mango y plátano	89
6.3.3	Efecto del tiempo de desramificación sobre la digestibilidad de los almidones de mango y plátano	91
6.3.4	Efecto de la temperatura de almacenamiento sobre la digestibilidad de los almidones de mango y plátano	96
6.3.5	Características estructurales de los almidones nativos de mango y plátano y sus contrapartes desramificadas (mayor contenido de ADL)	99
6.3.6	Características térmicas de los almidones nativos de mango y plátano y contrapartes desramificadas	101
7.	CONCLUSIONES	105
8.	BIBLIOGRAFIA	107
9.	ANEXOS	118

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Página
1 Contenido de almidón total y amilosa de los almidones nativos de mango y plátano.	56
2 Distribución de longitud de cadena de almidones de mango y plátano desramificados y analizados mediante cromatografía de alta resolución por exclusión de tamaño (CLARET) acoplado a un detector de índice de refracción (IR).	61
3 Propiedades de digestión de los almidones nativos de mango y plátano, analizados mediante la prueba de Englyst.	63
4 Parámetros de velocidad y grado de hidrólisis ácida de los gránulos de almidón de mango y plátano.	68
5 Porcentaje de cristalinidad de almidones nativos y almidones lintnerizados de mango y plátano con diferente grados de hidrolisis.	78
6 Resultados de la prueba de Englyst para lintners de mango y plátano sin cocción y con diferente porcentaje de hidrólisis ácida.	80
7 Características térmicas de almidones nativos y lintnerizados con diferente porcentaje de hidrólisis. T_p = temperatura de pico; ΔH = cambio de entalpia y $T_f - T_i$ = intervalo de temperatura.	83

8	Características térmicas de almidones nativos y lintnerizados retrogradados por 7 días con diferente porcentaje de hidrolisis. T_P = temperatura pico y ΔH = incremento de la entalpia.	86
9	Porcentaje de desramificación de los almidones de mango y plátano.	92
10	Efecto del tiempo de desramificación sobre las propiedades de digestión ¹ de los almidones de mango y plátano.	93
11	Efecto de la temperatura de almacenamiento sobre las propiedades de digestión de los almidones de mango y plátano desramificados por 8 y 4 h, respectivamente.	97
12	Propiedades térmicas de los almidones de mango y plátano, desramificados por 8 h y 4 h.	102

ÍNDICE DE FIGURAS

Número		Página
1	Estructuras basicas de la amilosa (A), molecula esencialmente lineal y amilopectina (B) una molecula ramificada cuyas ramificaciones representan el 5% de sus enlaces totales.	4
2	Representación esquemática de la estructura del gránulo de almidón: de la amilopectina a los anillos de crecimiento	6
3	Empaquetamiento de las dobles hélices de cristales de amilosa: A) polimorfismo tipo A- y B) polimorfismo tipo B-.	8
4	Mecanismo de digestión lenta de almidones nativos de cereales.	16
5	Curvas de la respuesta glucémica en sangre las cuales muestran los factores alimenticios que afectan el IG.	23
6	Mecanismo de hidrólisis ácida del almidón.	32
7	Desramificación del almidón.	34
8	Diagrama con los procedimientos experimentales que se realizaron a los almidones de mango y plátano.	41
9	Micrografías de los gránulos de almidón nativo de plátano (A) y mango (B) a una magnificación de 2000 X.	58
10	Perfiles de elusión de los almidones de plátano (—) y mango (—) desramificados y analizados mediante cromatografía de alta resolución por exclusión de tamaño (CLARET) acoplado a un detector de índice de refracción (IR).	60

11	Hidrólisis ácida de los gránulos de almidón de mango (O) y plátano (Δ) tratados mediante ácido clorhídrico (2.2N, 35 °C).	67
12	Micrografías electrónicas de barrido de almidones modificados mediante hidrólisis ácida, a un 80 %: mango (A) y plátano (B).	70
13	Cromatogramas de CLARET-IR normalizados de lintners de almidón de frutos con 3, 7 y 15 días de hidrólisis. El número en paréntesis representa el grado de hidrólisis alcanzado. LM = lintner de mango, LP = lintner de plátano.	72
14	Perfiles normalizados de CLARET-IR de lintners desramificados con isoamilasa y sin desramificar. Los lintners fueron preparados de la hidrólisis de los almidones de mango y plátano a 35 °C. A= Fracción 1 con un GP (16-17), B = Fracción 2 con un GP (27-28).	74
15	Patrones de difracción de rayos X de almidón nativo de mango (MN) y plátano (PN) y almidón tratados mediante hidrólisis ácida: lintner de mango (LM) y lintner de plátano (LP). El número en paréntesis representa el grado de hidrólisis.	76
16	Perfiles de viscosidad de los almidones de mango y plátano: prueba y error para obtener viscosidades similares en ambos almidones. (.....) Almidón de plátano 10% bs, (.....) almidón de mango 10 % bs, (——) almidón de plátano 5% bs, (——) almidón de plátano 6.6 % bs.	88
17	Valor reductor de los almidones de mango y plátano desramificados con la enzima pululanasa a diferentes tiempos de reacción: (◆) almidón de mango, (■) almidón de plátano.	90

-
- 18 Perfiles de elusión de almidones nativos (—) y desramificados (—). 100
Almidón de mango desramificado por 8 h y almidón de plátano
desramificado por 4 h. IR = índice de refracción.
-

LISTA DE ABREVIATURAS

ADR	Almidón de digestión rápida
ADL	Almidón de digestión lenta
AR	Almidón resistente
AGCC	Ácido graso de cadena corta
AACC	Asociación americana de química de los cereales
GP	Grado de polimerización
CDB	Calorimetría diferencial de barrido
CLARET	Cromatografía líquida de alta resolución por exclusión de tamaño
IR	Índice de refracción
Con A	Lectina concavalina
DMSO	Dimetil sulfoxido
ARV	Análisis rápido de la viscosidad
DNS	Ácido 3,5 dinitrosalicílico
H ₃ O ⁺	Iones hidronio
LP3-(20)	Lintner de plátano a 3 días de reacción
LP7-(50)	Lintner de plátano a 7 días de reacción
LP15-(75)	Lintner de plátano a 15 días de reacción
LM3-(30)	Lintner de mango a 3 días de reacción
LM7-(60)	Lintner de mango a 7 días de reacción
LM15-(80)	Lintner de mango a 15 días de reacción
NM	Almidón nativo de mango
NP	Almidón nativo de plátano

NM-8h	Almidón de mango desramificados por 8 h
NP-4h	Almidón de plátano desramificado por 4 h
Tp	Temperatura pico
Ti	Temperatura inicial
Tf	Temperatura final
ΔH	Cambio de entalpia
Tg	Temperatura de transición vítrea
Tm	Temperatura de fusión
Vp	Viscosidad pico
Vf	Viscosidad final
Vr	Viscosidad de recuperación

RESUMEN

Las propiedades de digestión del almidón han sido clasificadas en base a la cantidad de glucosa liberada durante el transcurso de la digestión: almidón de digestión rápida (ADR), almidón de digestión lenta (ADL) y almidón resistente (AR). El ADL y AR presentan efectos fisiológicos benéficos sobre la salud de quienes los consumen. Debido a ello se han buscado diferentes estrategias para enriquecer dichas propiedades en los almidones comerciales. El presente trabajo analizó dos estrategias para aumentar el ADL y AR de los almidones de fuentes no convencionales: plátano y mango. Se utilizaron una modificación química (hidrólisis ácida) y una modificación enzimática (desramificación), y se caracterizaron fisicoquímica, morfológica y estructuralmente para poder explicar sus propiedades de digestión. Los almidones nativos de plátano y mango, sin gelatinizar, presentaron bajos contenidos de ADL (5.06 – 18.00 %) y altos contenidos de AR (86.40 – 63.42 %). El almidón nativo de plátano, tras ser gelatinizado, presentó un mayor contenido de ADL (15.50 %) en comparación con el almidón de mango (10.60 %), esto debido a la distribución de tamaño molecular de la molécula de amilopectina, ya que el almidón de plátano mostró mayor porcentaje de cadenas tipo B1, B2 y B3. La modificación mediante hidrólisis ácida no tuvo efecto sobre la propiedad de ADL para el caso del almidón de mango, mientras que en el almidón de plátano generó un incremento de 5.06% a 35.4 % alcanzado al 50 % de hidrólisis ácida. Por otra parte, el AR aumentó a partir del 50 % de hidrólisis ácida de 16.24 % (7 días de hidrólisis) a 21.9 % (15 días de hidrólisis). Los lintners (producto de la hidrólisis ácida) de plátano y mango a los 15 días de hidrólisis estuvieron formados de una cadena ramificada con grado de polimerización (GP =27-28) y por cadenas lineales (GP=16-17). Los almidones nativos de plátano y mango presentaron un patrón de difracción tipo C-, el cual tras la modificación con hidrólisis ácida se transformó en un patrón tipo A-. La temperatura promedio de gelatinización de ambos almidones incrementó a partir de los 7 días de hidrólisis ácida. La modificación mediante desramificación incrementó el contenido de ADL en el almidón de mango de 10.60% a 26 %, esto alcanzado con 8 h de reacción (83% desramificación), mientras que el almidón de plátano incrementó su contenido de ADL de 15.50 % a 19.15%, esto alcanzado a 4 h de reacción (67 % desramificación). La desramificación del almidón de mango incrementó el contenido AR de 2.94 % a 22.7 %, a 24 h de reacción (100 % desramificación), la desramificación del almidón de plátano incrementó el contenido de AR de 3.40% a 44.03%, a 24 h de reacción (100% desramificación). La temperatura promedio de gelatinización de los almidones desramificados incrementó y no hubo cambio en la entalpia de gelatinización debido a la desramificación. Por lo cual, los almidones desramificados tienen mayor estabilidad térmica.

ABSTRACT

The digestion properties of starch have been classified on the basis of the amount of glucose released during the digestion: rapidly digestible starch (RDS), slowly digestible starch (SDS) and resistant starch (RS). SDS and RS have beneficial physiological effects on the health of people that eats them. Due to this, it has searched different strategies to enrich these properties in commercial starches. The present work analyzed two strategies to increase the SDS and RS from no conventional sources of starch: banana and mango. It was used a chemical modification (acid hydrolysis) and enzymatic modification (debranching), and the products were physicochemical, morphological and structural characterized to explain the digestion properties. Native banana and mango starches, without gelatinization, presented low SDS content (5.06 – 18.00 %) and high RS content (86.40 – 63.42 %). Native banana starch, after gelatinization, presented higher SDS content (15.50%) in comparison with mango starch (10.60%). This is due to the molecular size distribution of amylopectin, banana starch showed a higher percentage of chains B1, B2 and B3. The acid hydrolysis had no effect on the SDS property for mango starch, whilst banana starch generated an increase from 5.06 % to 35.4 %, reached at 50 % of acid hydrolysis. On the other hand, RS increased from 50 % acid hydrolysis from 16.24% (7 days hydrolysis) to 21.9% (15 days of hydrolysis). Banana and mango lintners at 15 days of hydrolysis were made of chains with a single branch with a degree of polymerization ($DP = 27-28$) and by linear chains ($DP=16-17$). Native banana and mango starches presented a C-type X-ray diffraction pattern, which after the modification with acid hydrolysis was transformed to A-type pattern. Peak temperature of gelatinization in both starches increased from 7 days of acid hydrolysis. The modification by debranching increased the SDS content in mango starch from 10.60% to 26.5%, this was reached at 8 h of reaction (83% debranching), whilst banana starch increased the SDS content from 15.50% to 19.15%, this reached at 4 h of reaction (67% debranching). The debranching of mango starch increased RS content from 2.94% to 22.7%, at 24 h of reaction (100% debranching), and the debranching of banana starch increased RS content from 3.40 to 44.03%, at 24 h of reaction (100% debranching). Peak temperature of gelatinization of debranched starches increased compared with native starches, there was no change in the enthalpy of gelatinization. The debranched starches had higher thermal stability.

1. INTRODUCCION

El almidón es un carbohidrato esencial en la nutrición humana, se encuentra organizado en partículas conocidas como gránulos. Las características estructurales del almidón, tales como el arreglo del material amorfo y cristalino dentro del gránulo, y la estructura fina de la amilopectina, tienen repercusión sobre la velocidad y grado de digestión del almidón (Zhang *et al.*, 2006a).

Por motivos nutricionales y para poder diferenciar las propiedades de digestión del almidón, éste ha sido clasificado en almidón de digestión rápida (ADR), almidón de digestión lenta (ADL) y almidón resistente (RS) (Englyst *et al.*, 1992). El ADR es digerido rápidamente y absorbido en el intestino delgado, lo cual genera una elevación rápida de glucosa en sangre (Ludwig, 2002). El ADL es digerido lentamente a lo largo del intestino delgado para proveer una liberación lenta y prolongada de glucosa, lo cual crea un aporte de energía por mayor tiempo en comparación al ADR. El consumo a largo plazo de dietas que generen niveles elevados de glucosa en sangre, ha sido asociado con el desarrollo de obesidad, enfermedades cardiovasculares y/o diabetes. Por lo tanto, el consumo de ADL podría prevenir estos padecimientos (Jenkins *et al.*, 2002). Por su parte, el AR no es digerido en el intestino delgado, sino que es fermentado en el colon por la microflora produciendo ácidos grasos de cadena corta (AGCC), entre estos el butirato, el cual es benéfico para la salud del colon (Topping y Clifton, 2001).

Debido a los beneficios antes mencionados, se ha buscado modificar la digestión del almidón mediante uno o más tratamientos físicos, químicos o enzimáticos, los cuales

afectan la estructura interna y externa del gránulo de almidón, haciéndolo parcial o totalmente inaccesible para las enzimas digestivas. En general, la mayoría de las modificaciones hechas al almidón, se han enfocado en incrementar la fracción AR. Aparicio-Saguilan *et al.* (2005) modificaron el almidón de plátano utilizando un tratamiento de hidrólisis ácida y ciclos de calentamiento-enfriamiento, logrando incrementar el contenido de AR de 1.51 a 19.34 %; por su parte González-Soto *et al.* (2007a) utilizando un tratamiento enzimático (desramificación) y ciclos de autoclave, lograron incrementar el contenido de AR del almidón de plátano a 35.38%. Estas modificaciones de los almidones mediante un tratamiento de hidrólisis ácida y desramificación con pululanasa, podrían ser una alternativa para aumentar no tan solo la fracción AR si no también el ADL, debido a que el contenido de ADL se ha incrementado por dichas modificaciones en almidones de cereales (Shin *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2006b). Los almidones de frutos de mango (*Mangifera indica* L.) y plátano (*Musa cavendish*), son fuentes alternativas para la obtención de almidón y presentan características estructurales (distribución de longitud de las cadenas de amilopectina, contenido de amilosa y cristalinidad) diferentes (Espinosa-Solís *et al.*, 2009; Jane *et al.*, 1999), se espera que al aplicarles un tratamiento para modificar su estructura, éste tenga efecto sobre su digestibilidad.

En el presente trabajo se analizó el efecto que tienen las modificaciones química (hidrólisis ácida) y enzimática (desramificación) de los almidones de frutos para incrementar las propiedades ADL y AR, así mismo se evaluó las características estructurales, fisicoquímicas y morfológicas de dichos almidones para entender sus propiedades de digestión.

2. ANTECEDENTES

2.1 Estructura del gránulo de almidón

El almidón es el polisacárido de reserva de las plantas, que se encuentra en mayor cantidad. Es sintetizado en estructuras granulares semi-cristalinas en cereales, raíces, tubérculos, hojas y frutos. La morfología y estructura de los gránulos depende de la fuente botánica (Bello-Pérez y Paredes-López, 1999). Los gránulos de almidón muestran diferentes morfologías incluyendo formas esféricas, ovaladas, poligonales, elongadas, etc. Presentan diferentes dimensiones, que van desde 1 μm a 100 μm . Los gránulos de almidón son insolubles en agua, por lo cual son fácilmente aislados de los órganos de almacenamiento de las plantas, esto a través de molienda húmeda o a través de una extracción química.

El almidón está constituido por 2 glucanos de diferente estructura, la amilosa y la amilopectina. La amilopectina es una molécula altamente ramificada constituida por unidades de glucosa unidas mediante enlace α -(1 \rightarrow 4) y ramificaciones conectadas mediante enlaces α -(1 \rightarrow 6). La amilosa está compuesta principalmente de moléculas lineales con enlaces α -(1 \rightarrow 4), algunas consisten de pocas ramificaciones (Figura 1).

La amilopectina es el componente mayoritario del almidón, se encuentra en una proporción de 70-80% (almidones normales), en ciertos casos alcanza niveles de hasta un 98-99%, este tipo de almidones son definidos como cerosos (Zobel, 1988). Su estructura, composición y proporción en el gránulo contribuyen notablemente en las propiedades funcionales del almidón, por esta razón, ha sido estudiada ampliamente en términos de su

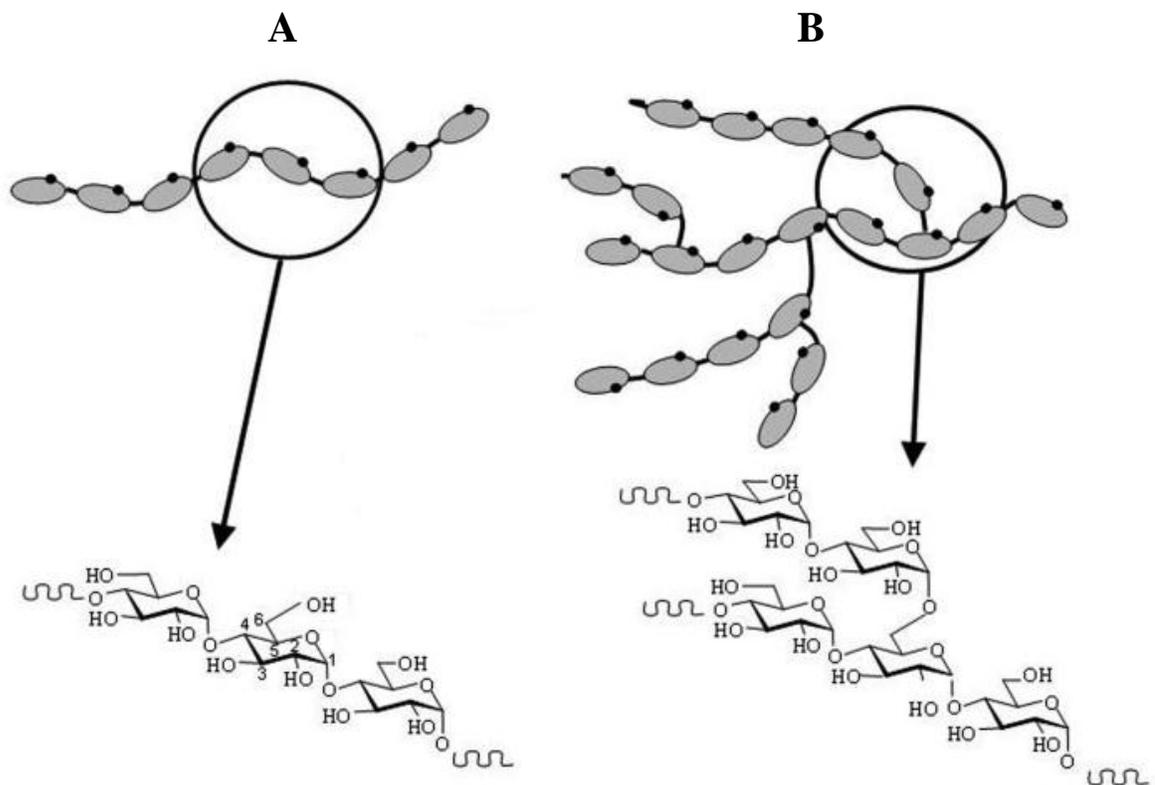


Figura 1. Estructuras químicas básicas de la amilosa (A), molécula esencialmente lineal y amilopectina (B) una molécula ramificada cuyas ramificaciones representan el 5% de sus enlaces totales.

Fuente: Perez y Bertoft, 2010

tamaño molecular, ramificación y longitud de las cadenas internas y externas (Bello-Pérez *et al.*, 2002).

El modelo más aceptado para explicar la estructura de la amilopectina es el modelo de “cluster” o racimo, el cual fue propuesto por French (1972), este modelo presentaba un patrón molecular compuesto de regiones amorfas y cristalinas. Este modelo fue posteriormente modificado por varios investigadores. Hizukuri (1986), desarrolló una estructura para la molécula de amilopectina, en la cual se presentan cadenas cortas tipo -A-, las cuales no presentan ramificaciones; cadenas tipo -B-, las cuales pueden presentar ramificaciones por cadenas -A- o -B-. Las cadenas -B- fueron divididas en cadenas -B₁-, que al igual a las cadena -A- se pueden encontrar en un sólo cluster, mientras que las cadenas -B₂-, -B₃- y -B₄-, se extienden sobre 2, 3 o 4 clusters, respectivamente (Figura 2A). Hanashiro *et al.* (1996), utilizando cromatografía de intercambio anionico acoplado a un detector de pulsos amperométricos, lograron establecer el grado de polimerización (GP) de las cadenas de amilopectina. Las cadenas tipo A tienen un GP = 6-12 unidades de glucosa; las cadenas B₁, tienen un GP= 13-24; las cadenas tipo B₂ tienen un GP = 25-37, y las cadenas tipo B₃ tienen un GP ≥ 37.

La amilopectina llega a conformar racimos (Figura 2B), los cuales se alinean perpendicularmente en la estructura granular llegando a formar anillos de crecimiento compuestos por regiones amorfas y cristalinas (Figura 2C y 2D), estos anillos crecen hacia la superficie del gránulo en un arreglo radial. La amilopectina y la amilosa están arregladas en los gránulos en forma radial, la amilosa por su parte se encuentra en una forma amorfa interlazada e inter cruzada con la amilopectina (Jane *et al.*, 1992). El arreglo ordenado de

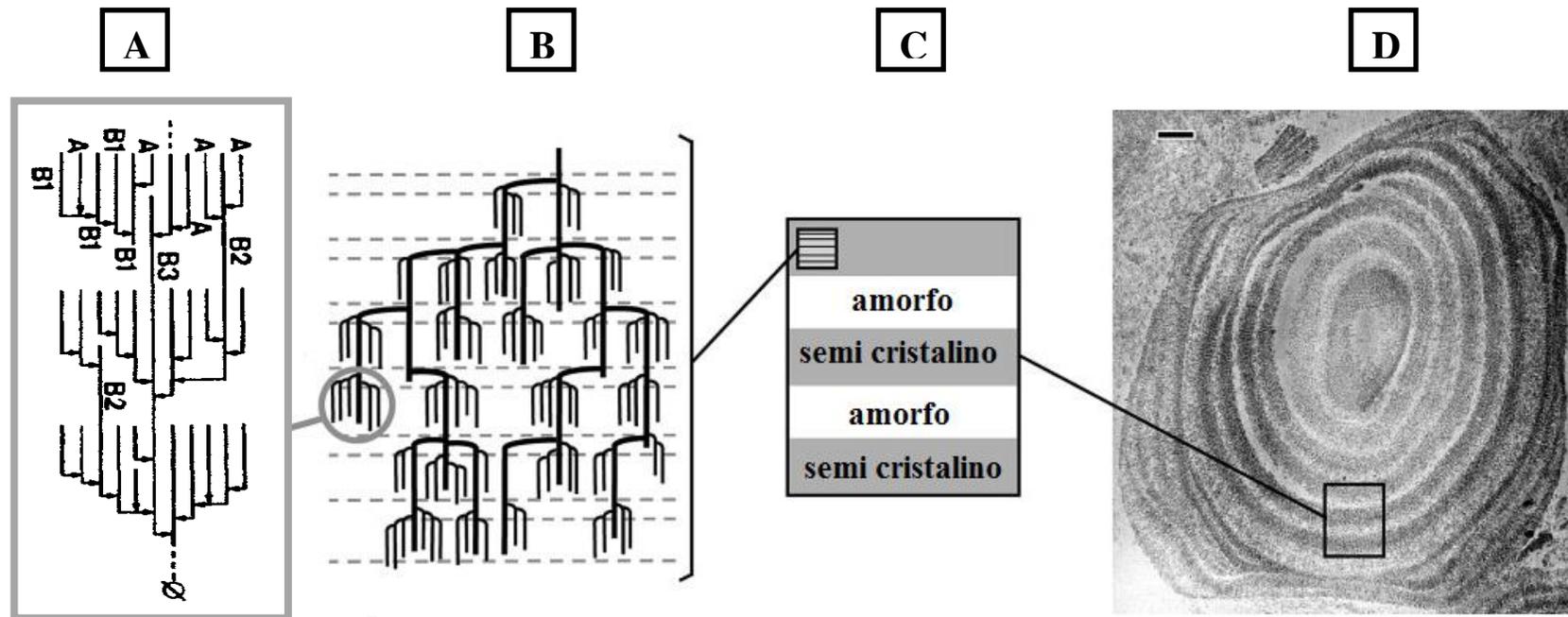


Figura 2. Representación esquemática de la estructura del gránulo de almidón: de la amilopectina a los anillos de crecimiento.

- A. Detalle del racimo de la amilopectina, el cual muestra los diferentes tipos de cadenas A y B1, B2, B3 (Hizukuri, 1986).
- B. Modelo de cluster o racimo de la amilopectina (las líneas discontinua dividen a la lamela amorfa y semi cristalina).
- C. Anillos de crecimiento alternados: amorfos y semi-cristalinos
- D. Micrografía de transmisión electrónica de una sección delgada del gránulo de almidón ceroso de maíz.

Fuente: Buleon *et al.*, 2007

los componentes del almidón da como resultado el patrón de cruz de malta cuando los gránulos son observados bajo luz polarizada.

Las estructuras semi-cristalinas de los gránulos nativos de almidón se dividen en tres tipos de polimorfismos. El polimorfismo A-, es encontrado regularmente en la mayoría de los cereales y algunas raíces (yuca y camote), tiene una celda unitaria monoclinica y contienen de 4-8 moléculas de agua (Figura 3A), el polimorfismo tipo B-, que por lo regular es encontrado en almidones de tubérculos y raíces (papa y canna), tiene una celda unitaria hexagonal con 36 moléculas de agua (Figura 3B), y el polimorfismo tipo C- es una combinación de los polimorfismos A- y B-, es característico de almidones de leguminosas. (Buleon *et al.*, 1998).

Las moléculas de amilopectina de los almidones tipo B- tienen menor proporción de cadenas cortas en comparación con el polimorfismo A- (Hizukuri, 1985). Los puntos de ramificación de la amilopectina en polimorfismo B- se encuentran mayormente localizadas en las regiones amorfas, mientras que los puntos de ramificación de la amilopectina del polimorfismo A- se encuentra esparcidos en ambas regiones cristalina y amorfa. (Jane *et al.*, 1997). Los gránulos de almidón tipo B- y C- son más resistentes al ataque de enzimas de hidrolisis, mientras que los gránulos de almidón tipo A- son fácilmente hidrolizados. Los gránulos tipo A- presentan poros o canales en su estructura. Los gránulos de almidón tipo B- presentan una estructura interna homogénea, lo cual puede atribuirse a la gran proporción de ramificaciones de longitud larga, las cuales se expanden a través de diferentes racimos y mantienen unida la lámina cristalina (Srichuwong y Jane, 2007).

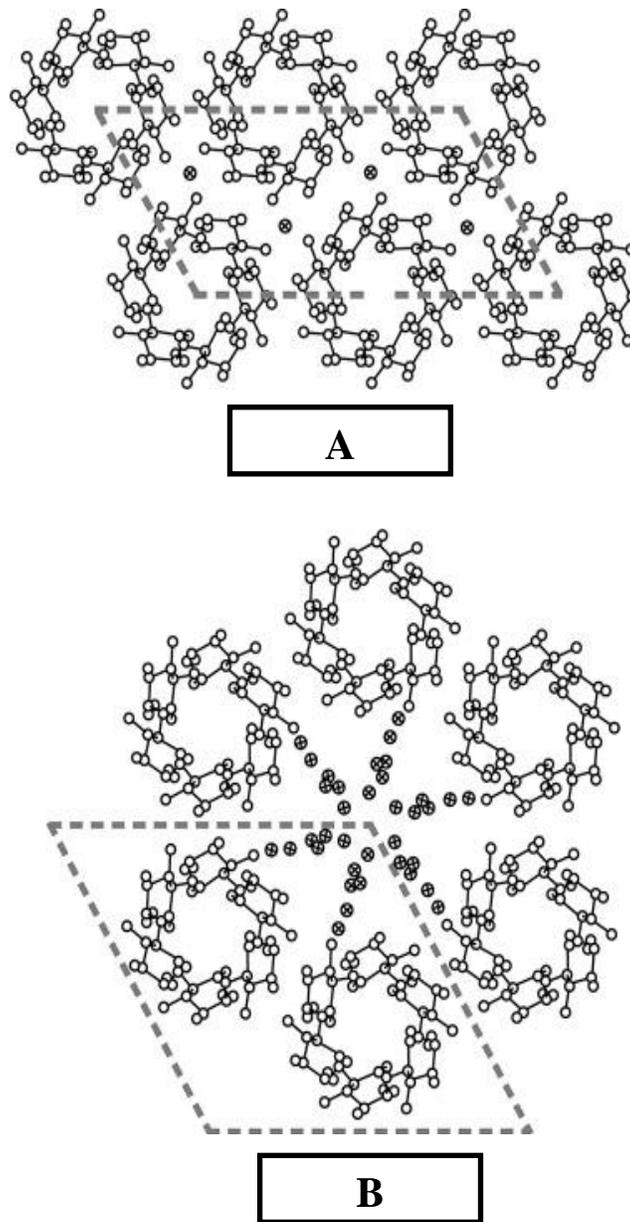


Figura 3. Empaquetamiento de las dobles hélices de cristales de amilosa: A) polimorfismo tipo A- y B) polimorfismo tipo B-

Fuente: Buleon *et al.*, 2007

Dentro del gránulo de almidón, el contenido de amilosa varia, ya que se presenta en mayor cantidad hacia la periferia del gránulo en comparación con el centro (Pan y Jane, 2000), las moléculas de amilopectina en la periferia presentan mayor cantidad de cadenas cortas en comparación con las moléculas de amilopectina localizadas en el centro del gránulo (Pan y Jane, 2000).

2.2 Gelatinización y retrogradación del almidón

Calentar los gránulos de almidón con suficiente agua causa un cambio irreversible en la estructura semi-cristalina, lo que genera una estructura amorfa, en un proceso conocido como gelatinización (Atwell *et al.*, 1988). Calentar los gránulos de almidón en agua por debajo de su temperatura de gelatinización causa que el gránulo de almidón se hinche, y este proceso de hinchamiento es reversible. El proceso de gelatinización se ha asociado con la disociación de las dobles hélices en el gránulo de almidón. Las propiedades de gelatinización (temperatura y entalpia de gelatinización), entre otros factores, dependen de la estructura de la amilopectina y del contenido de amilosa (Srichuwong y Jane, 2007).

Las moléculas de amilopectina con mayor contenido de ramificaciones de cadena corta (GP = 6-12), muestran una temperatura de gelatinización menor en comparación a aquellas moléculas de amilopectina con menor cantidad de estas ramificaciones, esto se debe a que las ramificaciones de cadena corta no abarcan por completo lo largo de la lámina cristalina, lo cual genera defectos en el empaquetamiento de los gránulos de almidón (Jane *et al.*, 1999). La amilosa está presente en forma amorfa en los gránulos de

almidón reduciendo su cristalinidad y, consecuentemente, reduciendo el cambio de entalpia de gelatinización. Los almidones altos en amilosa presentan temperaturas de gelatinización por encima de los 100 °C, debido a que presentan moléculas de amilopectina con gran proporción de ramificaciones de longitud larga y alto contenido de amilosa, lo cual aumenta las interacciones de ambas moléculas dentro del gránulo (Li *et al.*, 2008).

Las moléculas de almidón gelatinizado (amorfos) tienden a recristalizarse en estructuras de dobles hélices durante el almacenamiento, lo cual es conocido como retrogradación. La velocidad de retrogradación depende de: el contenido de amilosa, la estructura de la amilopectina, el contenido de lípidos, la temperatura de almacenamiento, el contenido de agua de la pasta de almidón. La amilosa retrograda más rápido que la amilopectina debido a la estructura lineal y su elevada movilidad (Sievert y Wusch 1993). La temperatura de disociación de la amilosa retrogradada se encuentra por encima de los 120 °C (Klucinec y Thompson, 1999). La retrogradación de las moléculas de amilopectina requiere de varios días de almacenamiento debido a la longitud de sus cortas cadenas.

Las cadenas cortas de la amilopectina (GP 6-12) retrogradan en menor grado en comparación con cadenas de longitud larga (Jane *et al.*, 1999). La presencia de lípidos y fosfolípidos restringen el hinchamiento del gránulo y la dispersión de las moléculas de almidón durante su cocción, lo cual mantiene a las moléculas de almidón en una proximidad cercana para la retrogradación (Jane *et al.*, 1999). La presencia de lípidos lleva a la formación de complejos con la amilosa y previene a que la amilosa retrograde (Slade y Levine, 1987).

La velocidad de retrogradación puede ser modificada mediante el cambio de la temperatura de almacenamiento para llevar a cabo los procesos de nucleación, propagación y maduración de los cristales de almidón (Slade y Levine, 1987). Los núcleos de los cristales de almidón se forman más rápidamente a una temperatura baja (cerca de la temperatura de transición vítrea), mientras que la propagación de los cristales de almidón es mayor a una temperatura alta (cerca de la temperatura de fusión).

2.3 Digestión del almidón

La hidrólisis enzimática de las moléculas de almidón para producir glucosa es importante para diversos procesos: proveer energía para el metabolismo de la planta, para ser utilizado como alimento o como fuente para la producción de etanol. Los gránulos de almidón son hidrolizados por las enzimas a una velocidad menor que las moléculas de almidón gelatinizado. La susceptibilidad del gránulo de almidón depende del tamaño del gránulo, del tipo de polimorfismo, de la estructura de la amilopectina, del contenido de amilosa y del contenido de lípidos. En general, los gránulos de almidón de mayor tamaño son digeridos a una velocidad menor en comparación a los gránulos de almidón de menor tamaño, debido a que los gránulos de mayor tamaño tienen una superficie relativa más pequeña para la hidrólisis enzimática (Tester *et al.*, 2004).

En los humanos, el almidón y sus derivados son digeridos en varias etapas. En la boca, entra en contacto con la enzima α -amilasa salival, los polímeros de almidón son rotos en pequeños oligosacáridos, una vez que entran al intestino delgado, este material

parcialmente digerido es hidrolizado por la enzima α -amilasa pancreática. La velocidad inicial de reacción de esta hidrólisis disminuye con el aumento del grado de ramificación del polisacárido, principalmente debido a un impedimento estérico. Los productos sobrantes de esta reacción: maltosas y dextrinas ramificadas son convertidos en glucosa por las enzimas maltosa-glucoamilasa y sucrosa-isomaltasa intestinal y entra al torrente sanguíneo (Lehmann y Robin, 2007)

La digestión de los gránulos de almidón es un proceso complejo, incluye diferentes etapas: la difusión de la enzima hacia el sustrato; la adsorción de la enzima al sustrato y el evento hidrolítico. La difusión de la enzima α -amilasa hacia el sustrato es considerado un paso importante de la hidrólisis. Las interacciones del almidón con lípidos, proteínas y otros componentes de los alimentos pueden evitar una difusión y adsorción efectiva de la enzima hacia el almidón (Colonna *et al.*, 1992).

Los patrones de digestión en almidones de cereales, tubérculos y leguminosas son distintos. Los almidones nativos de cereales tales como el maíz y el sorgo contienen poros y/o canales, los cuales permiten la penetración de la enzima α -amilasa, resultando en un mecanismo de digestión de dentro del gránulo hacia fuera (Zhang *et al.*, 2006a). En contraste el almidón de papa y otros almidones tipo B son digeridos por un proceso conocido como exocorrosión, empezando en la superficie del gránulo hacia su interior (Gallant *et al.*, 1997).

La estructura cristalina y el empaquetamiento de la fase amorfa también tienen influencia sobre la susceptibilidad enzimática. Gallant *et al.* (1992) propusieron que la

digestión de las regiones amorfas se veía favorecida, debido a que las dobles hélices de las regiones cristalinas no pueden ser digeridas a menos de que estén desdobladas. Sin embargo, recientemente Zhang *et al.* (2006a) demostraron que la digestión de las regiones cristalinas y amorfas se llevan a cabo a la par en un mecanismo que denominaron capa a capa, estableciendo que aunque las regiones amorfas son más susceptibles a la hidrólisis, estas se encuentran densamente empaquetadas con las regiones cristalinas, lo cual inhibe la hidrólisis de las mismas.

Asimismo el tipo de arreglo cristalino afecta la digestibilidad, generalmente los cristales tipo A tienen una mayor susceptibilidad a la hidrólisis en comparación con los cristales tipo B, esto debido a que difieren en el arreglo de las dobles hélices y en la longitud de las cadenas de la amilopectina. Los almidones tipo A tienen dobles hélices con mayor proporción de cadenas cortas en comparación a los almidones tipo B (Jane *et al.*, 1999). Una mayor proporción de cadenas largas forman dobles hélices de mayor longitud, las cuales son estabilizadas por un mayor número de puentes de hidrógeno, lo cual las hace más estables, éstas se distribuyen por la toda la región cristalina y causan disminución de la digestibilidad.

Se ha encontrado que el contenido de amilosa está negativamente correlacionado con la susceptibilidad del almidón a la hidrólisis por enzimas amilasas (Dombrink-Kurtzman y Knutson, 1997). Los almidones cerosos (0-8% amilosa) son más susceptibles a la hidrólisis enzimática que los gránulos de almidón normal (~25% amilosa), y los gránulos de almidón normal son más susceptibles a la hidrólisis enzimática que los almidones altos en amilosa (>50% amilosa) (Fuwa *et al.*, 1977).

2.4 Digestibilidad de las fracciones de almidón

Uno de los métodos más ampliamente utilizados para el análisis de la cinética de digestión del almidón *in vitro* fue publicado por Englyst *et al.* (1992). Este consiste de varios pasos, los cuales simulan la digestión enzimática del almidón en el estómago e intestino delgado y mide la liberación de glucosa conforme transcurre la hidrólisis. Las fracciones de almidón son definidas como: almidón de digestión rápida (ADR) = cantidad de glucosa liberada después de 20 min; almidón de digestión lenta (ADL) = cantidad de glucosa liberada entre los 20 y 120 min de hidrólisis y almidón resistente (AR) = almidón total – cantidad de glucosa liberada después de 120 min de hidrólisis. Las fracciones de ADR, ADL y AR son a menudo interdependientes y no son fácilmente separadas unas de otras. Se pretende que el almidón como ingrediente alimenticio contenga la mayor cantidad de AR y ADL.

2.5 Almidón de digestión lenta (ADL)

El concepto que actualmente se tiene acerca del ADL está basado en la determinación cuantitativa de glucosa y no se tienen especificaciones sobre los requerimientos estructurales del almidón, por lo cual se ha dificultado la elaboración de materiales ricos en ADL basándose solo en su definición. Los datos disponibles muestran que hay dos mecanismos fundamentales del ADL: 1) estructuras físicas que disminuyen la accesibilidad enzimática y 2) estructuras químicas que limitan la velocidad de acción de las enzimas. (Zhang y Hamaker, 2009).

A menudo, en alimentos procesados tales como pasta y espagueti, se encuentran estructuras físicas que llevan la característica de ADL, en las cuales los componentes del almidón están protegidos por componentes del alimento tales como proteínas. Similarmente, una estructura polimérica que pueda encapsular almidón en micro-esferas genera un ADL con un mecanismo de digestión que procede de la periferia hacia el interior (Venkatachalam *et al.*, 2006). La mejor representación de un material rico en ADL, causado por una estructura física, son los almidones nativos de cereales, el mecanismo de digestión lenta de los almidones de cereales (Figura 4) provee las bases teóricas para el desarrollo de materiales ricos en ADL, a través de estructuras físicas.

En cuanto a las estructuras químicas que limitan la velocidad de acción de las enzimas, investigaciones realizadas por Zhang *et al.* (2008a) utilizando variedades de maíz genéticamente manipulados, revelaron una relación parabólica entre el contenido de ADL y la relación de cadenas cortas ($GP < 13$) y cadenas largas ($GP \geq 13$) de la molécula de amilopectina, lo que demostró que amilopectinas con mayor cantidad de cadenas cortas o mayor cantidad de cadenas largas tienen alto contenido de ADL. Zhang *et al.* (2008b) demostraron que existe dos mecanismos que generan la propiedad de digestión lenta en almidones gelatinizados, para almidones con amilopectinas con mayor contenido de ramificaciones de cadenas largas, el contenido de ADL en comparación con el tiempo de retrogradación, muestran un patrón en forma de campana, lo cual está asociado con la formación de cristales imperfectos durante la retrogradación, mientras que los almidones con amilopectinas con mayor cantidad de ramificaciones de cadena corta, la estructura molecular *per se* es la responsable de la propiedad de digestión lenta.

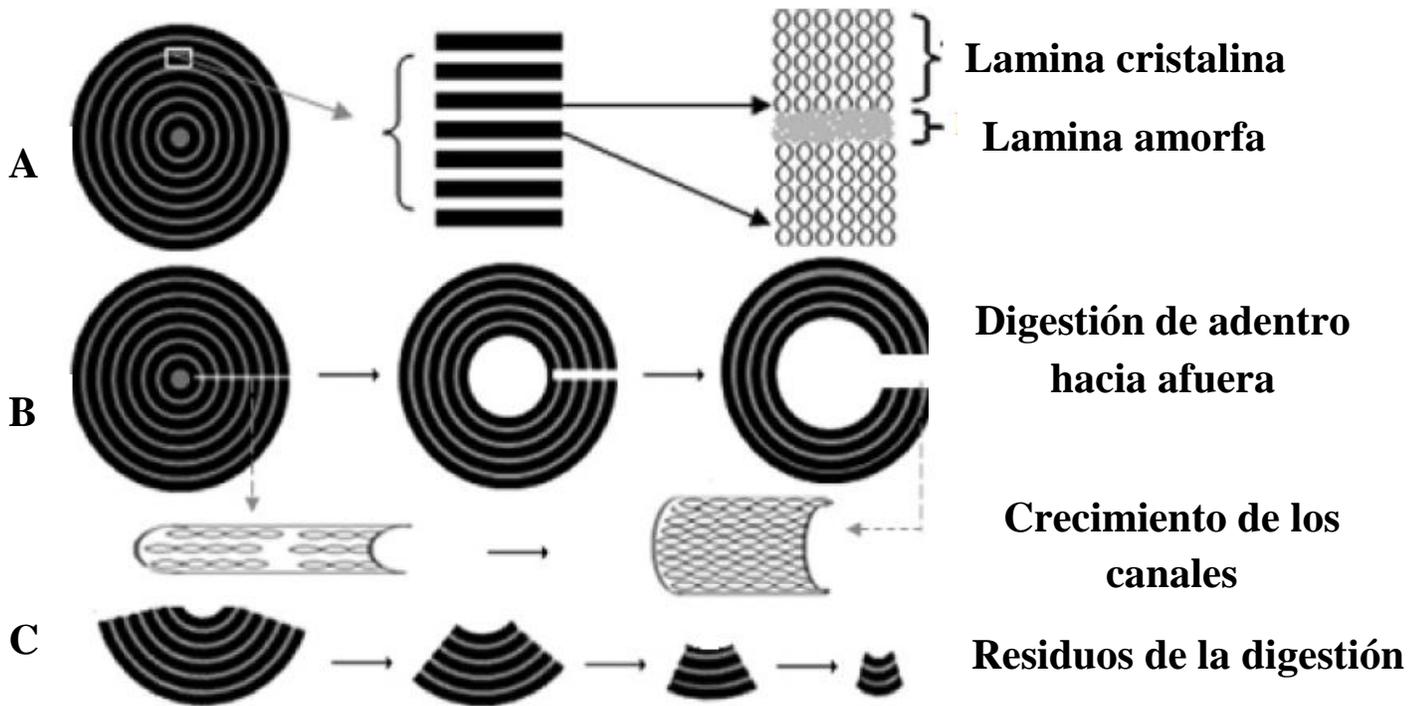


Figura 4. Mecanismo de digestión lenta de almidones nativos de cereales.

- A). Estructura cristalina y amorfa del granulo
- B). La digestión de adentro hacia fuera, capa a capa, empieza en el canal y siempre termina en la capa cristalina (negro)
- C). Digestión (capa a capa) lo cual aumenta el tamaño de los canales. Residuos en forma de pirámide con menos capas después de la fragmentación de los gránulos.

Fuente: Zhang *et al.*, 2006a

Los procesos térmicos, los cuales causan la gelatinización del almidón en exceso de agua, son esenciales para la calidad y seguridad de los alimentos, pero con estos procesos se pierde la propiedad de ADL en los alimentos térmicamente procesados, por lo cual, es la estructura molecular de las moléculas de almidón el principal factor que se debería cambiar para alcanzar una propiedad de digestión lenta, lo cual se puede lograr mediante métodos químicos, enzimáticos y genéticos para conseguir estructuras que sean lentamente digeribles.

2.6 Almidón resistente a la digestión (AR)

Hace algunos años se consideraba que el almidón era completamente digerido y absorbido en el intestino delgado. Posteriormente, se encontró que una fracción del almidón (almidón resistente o AR) resistía la hidrólisis enzimática en el tracto digestivo (Englyst y Cummings, 1985; Faisant *et al.*, 2007). El AR no es absorbido en el intestino delgado, es llevado al colon donde es fermentado por la microflora intestinal. Ejemplos de AR incluyen almidón nativo de papa, almidones nativos altos en amilosa, almidón de plátano, almidón retrogradado (Englyst y Cummings, 1985). Numerosos factores contribuyen a la resistencia del almidón a la digestión, lo cual ha llevado a la generación de 4 categorías, cada una con propiedades similares. Almidón resistente físicamente inaccesible a la digestión debido a una matriz que lo rodea (AR1); Almidón nativo, propio de la estructura del gránulo (AR2); Almidón resistente retrogradado (AR3) y Almidón químicamente modificado (AR4).

2.6.1 Almidón físicamente inaccesible (AR1)

El AR1 se encuentra protegido por una matriz de origen proteico o con material de la pared celular, por lo cual, no se encuentra físicamente accesible para la hidrólisis enzimática. Por ejemplo, los gránulos de almidón en el endospermo vítreo de granos de cereal, estos se encuentran incrustados en una matriz proteica, esta matriz es relativamente impermeable, lo cual retarda el hinchamiento del gránulo durante la cocción y actúa como una barrera contra las enzimas amilasas (Correa *et al.*, 2002). La molienda de los granos o semillas incrementa la susceptibilidad de almidón al ataque enzimático, debido a que los gránulos están libres de esta matriz proteica.

Los gránulos de almidón presentes en pasta o espagueti, también se encuentran incrustados en una matriz proteica, la cual es atribuida al gran contenido de proteínas del trigo durum. La matriz proteica forma una barrera que previene la difusión de agua hacia el centro de la pasta (Cunin *et al.*, 1995). Como resultado, los gránulos de almidón en el centro de la pasta no gelatinizan completamente durante el proceso de cocción y por lo tanto son menos susceptibles a las hidrólisis con enzimas amilasas, esto en comparación al almidón presente en el pan blanco. La digestibilidad del almidón en pasta o espagueti incrementa cuando se remueve el contenido de proteína mediante el uso de proteasas (Zhang y Hamaker, 1998).

El AR1 en las semillas de leguminosas está rodeado de la pared celular. La pared celular rígida retarda la penetración de agua hacia la semilla, lo cual previene al granulo de obtener suficiente agua para gelatinizar durante la cocción, por lo cual, los gránulos de

almidón en los frijoles cocidos no están completamente gelatinizados y son menos digeribles que los frijoles molidos. Aunque el AR1 muestra beneficios a la salud de los humanos, este almidón atrapado no se encuentra disponible para proveer energía para el crecimiento y desarrollo de animales de engorda, tampoco no es deseable para la producción de etanol, porque reduce la producción final de etanol.

2.6.2 Almidón nativo (AR2)

Los gránulos de almidón que presentan los polimorfismos B- y C-, como el almidón nativo de papa, almidón de plátano, almidones altos en amilosa, son resistentes al ataque enzimático, lo cual es atribuido a una estructura interna homogénea (Jane, 2007).

En general, el AR2 pierde su resistencia al ataque enzimático después de ser procesado mediante calor. La gelatinización del almidón durante un proceso de calentamiento convierte la estructura semi-cristalina (AR2) en una estructura altamente digerible y amorfa (Knutson *et al.*, 1982). La estabilidad térmica y la resistencia al ataque enzimático del almidón granular (AR2) puede aumentarse utilizando tratamientos hidrotérmicos (Brumovsky y Thompson, 2001). Estos tratamientos permiten que los cristales del almidón se re-arreglen en una estructura cristalina más perfecta. El incremento en la cristalinidad y la perfección de los cristales de almidón da como resultado un incremento en el contenido de AR del almidón granular.

2.6.3 Almidón retrogradado (AR3)

El AR3 es de particular interés, debido a su estabilidad térmica. Esto le permite ser estable en la mayoría de las operaciones térmicas, y permite su uso como un ingrediente en una amplia variedad de alimentos convencionales tales como pastas, tortillas, galletas, etc. Durante la retrogradación, las moléculas de almidón se re-asocian, y pueden formar estructuras empaquetadas, las cuales son estabilizadas por puentes de hidrógeno. El proceso de asociación puede aumentarse mediante la deshidratación. Estas estructuras son térmicamente muy estables, y pueden ser desorganizadas entre 80-150 °C, dependiendo del grado y naturaleza de la retrogradación.

La amilosa forma complejos AR3 térmicamente estables, resistentes a las enzimas amilasas (Jane y Robyt, 1984). En la formación de AR3, el gránulo de almidón nativo es completamente hidratado. La amilosa lixivia de gránulo hacia la solución en un estado de ovillo al azar, después de enfriarse, las cadenas del polímero comienzan a re-asociarse en dobles hélices, estabilizadas por puentes de hidrógeno. Las hélices individuales contienen 6 unidades de glucosa por vuelta, y conforme avanza la retrogradación las dobles hélices se empaquetan en una celda unitaria hexagonal (Haralampu, 2000). La amilopectina interfiere con la retrogradación de la amilosa (Berry, 1986).

Almidones con alto contenido de amilosa y/o amilopectinas con ramificaciones de cadena largas, como lo son los almidones de leguminosas y cereales altos en amilosa, han sido utilizados para la producción de AR3 (Sievert y Pomeranz, 1989; Vasathan y Bhatta, 1998). Las cadenas largas de la amilopectina, tienen propiedades similares a la amilosa, lo

cual incrementa el contenido de amilosa del almidón. Por el contrario, las cadenas cortas de la amilopectina forman dobles hélices, las cuales no son suficientemente largas para producir cristales.

El proceso de extrusión ha sido utilizado para la producción de AR3 a partir de almidón (Bello-Pérez *et al.*, 2005a; 2006). La extrusión es comúnmente utilizada en la industria de alimentos para la elaboración de cereales para desayuno, botanas, y otros productos similares. El contenido de AR en los alimentos extrudidos depende de la velocidad del tornillo de extrusor, la temperatura de extrusión y el contenido de humedad. El contenido óptimo de AR se obtiene cuando el almidón es cocido por extrusión a bajas velocidades (tiempo de residencia alto), lo cual permite que las cadenas de amilosa retrograden (Agustiniano-Osornio *et al.*, 2005). Sin embargo, el material recién extruido, usualmente contiene contenidos de AR3 por debajo del 10% debido a que es altamente amorfo.

Técnicas como la desramificación e hidrólisis ácida del almidón pueden incrementar las cadenas lineales para aumentar la retrogradación del almidón (Gonzalez-Soto *et al.*, 2007a; Aparicio-Saguilan *et al.*, 2005). Las enzimas desramificantes tales como isoamilasa y pululanasa, hidrolizan los enlaces glucosídicos α -(1→6) pertenecientes a las ramificaciones de la amilopectina, lo cual produce cadenas lineales, por otra parte, la hidrólisis ácida remueve las partes amorfas de los gránulos de almidón, donde se localizan en su mayoría, los puntos de ramificación de la amilopectina, lo cual produce cadenas lineales.

2.6.4 Almidón químicamente modificado (AR4)

Las modificaciones químicas tales como: esterificación utilizando anhídrido acético, óxido de propileno, anhídrido octenil succínico, han sido utilizadas para incrementar la resistencia de los gránulos de almidón a la hidrólisis enzimática (Chung *et al.*, 2008, He *et al.*, 2008). Las fracciones hidrofóbicas, tales como los grupos acetilo, hidroxipropilo y octenilo, disminuyen la solubilidad de los gránulos de almidón y con ello la accesibilidad de las enzimas para poder hidrolizar el almidón, estos grupos, previenen a las moléculas de almidón a que puedan encajar los sitios activos de enlace de las enzimas y así ser hidrolizados.

2.7 Respuesta fisiológica del consumo de las fracciones de almidón

En las últimas décadas se ha incrementado el interés del público por conocer los efectos de la dieta sobre la salud humana, y se ha tenido especial énfasis sobre los carbohidratos. Una de las herramientas para poder medir la respuesta en sangre del consumo de carbohidratos es el índice glucémico (IG). Originalmente, el IG (Figura 3) fue desarrollado para pacientes diabéticos, para poder evitar el consumo de alimentos altos en almidón digerible, el cual causa un rápido incremento de la respuesta glucémica postprandial (Jenkins *et al.*, 2002). El IG típico (Figura 5A) es definido como el incremento del área bajo la curva de la respuesta en sangre de una porción de 50 g de carbohidratos disponibles de un alimento de prueba, expresado como el porcentaje de la respuesta a la misma cantidad de carbohidrato de un alimento estándar ingerido por un mismo sujeto

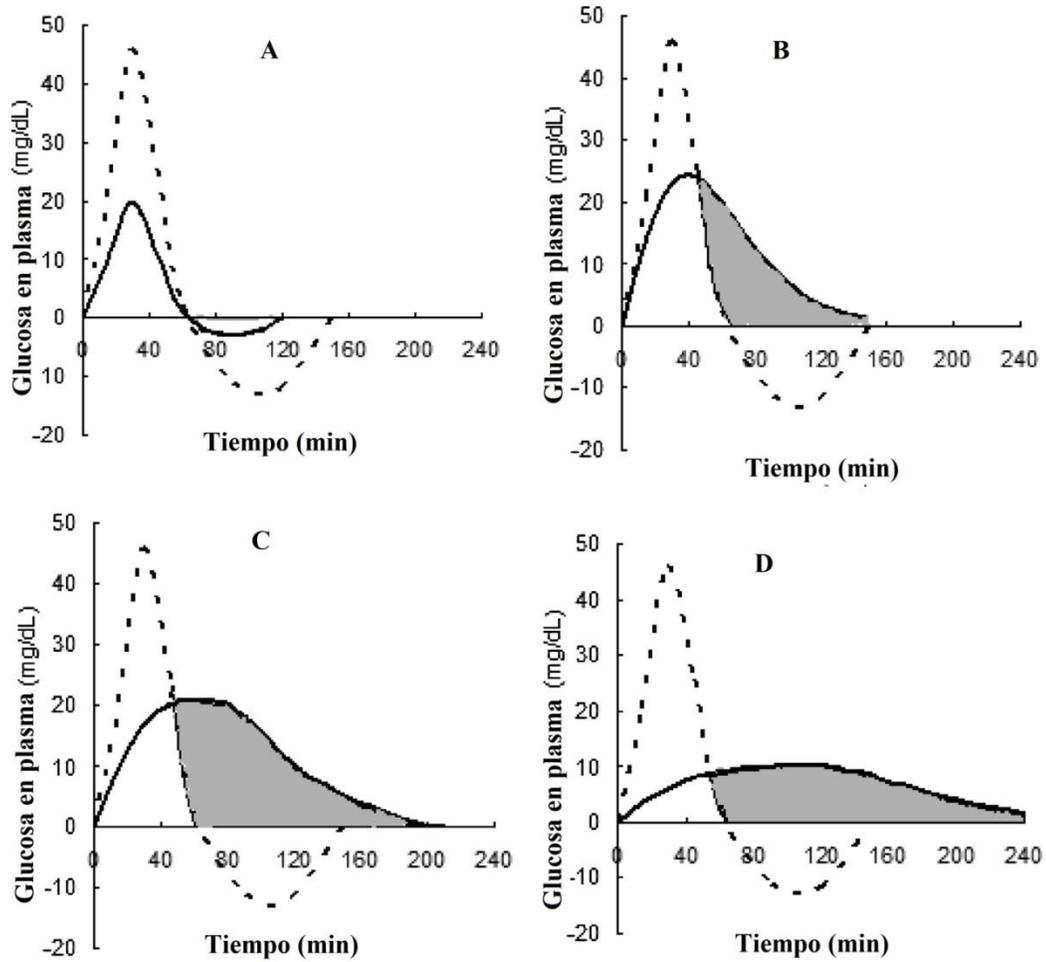


Figura 5. Curvas de la respuesta glucémica en sangre las cuales muestran los factores alimenticios que afectan el IG. La línea punteada representa la muestra control (glucosa) y la línea sólida representa diferentes muestras de alimentos. (A) Típico alimento bajo en IG, (B) alimento bajo en IG, (C) alimento con un IG alto y una respuesta glucémica prolongada, (D) alimento ideal con una extensión de respuesta glucémica.

Fuente: Zhang y Hamaker, 2009

(FAO/WHO). Existe alimentos con que generan un IG bajo (Figura 5B), altos (Figura 5C) y alimentos que generan un IG bajo y prolongado (Figura 5D).

La glucosa es el combustible metabólico necesario para una serie de procesos fisiológicos, es la fuente de energía preferida por el sistema nervioso (Peters *et al.*, 2004), y la única fuente de energía para la células rojas de la sangre. La glucosa también es una molécula señal en el metabolismo, la cual regula la secreción de insulina, estimula la utilización de glucosa e inhibe de la producción de glucosa endógena, por lo cual, la concentración de glucosa en sangre está controlada para así poder mantener un funcionamiento óptimo de los procesos fisiológicos. La mayoría de los efectos fisiológicos benéficos de las fracciones ADL y AR están en función de la glucosa.

2.7.1 Efecto fisiológico del consumo de ADL

Las propiedades nutricionales del ADL aún no son claras y actualmente continúan bajo investigación. La mayoría de los efectos benéficos a la salud atribuidos al consumo de ADL han sido deducidos de alimentos que generan un IG bajo, los cuales pueden tener una respuesta glucémica similar al ADL. Además, se han encontrado relaciones negativas entre el ADR y ADL en cuanto a estudios estructurales (Zhang *et al.*, 2008a), lo cual indica que los beneficios de ADL pueden ser entendidos a partir del estrés y daño inducido por el consumo a largo plazo de ADR (Ludwig, 2002).

Jenkins *et al.* (2002), establecieron que una dieta que produce un IG bajo ésta asociada con la disminución del riesgo de padecer enfermedades cardíacas. Por otra parte, se ha reportado que el ADL produce un IG de medio a bajo y así reduce la carga glucémica total de un alimento, en comparación con ADR el cual produce un IG alto (Englyst *et al.*, 2003; Ells *et al.*, 2005). Por lo que el consumo de ADL ofrece la ventaja de un incremento lento de los niveles de glucosa postprandial y mantiene estables los niveles de glucosa sobre un periodo de tiempo, y a la larga puede disminuir el riesgo de padecer enfermedades cardíacas.

En cuanto al manejo de diabetes, se busca reducir la hiperglucemia después de consumir un alimento. Existen estudios que sugieren que reducir picos de glucosa postprandial reduce episodios de hipoglucemia, mejora la respuesta de lípidos y una mayor sensibilidad a la insulina, los cuales son benéficos para el manejo de esta enfermedad. (Wolever, 2003). El consumo de ADL resulta en una respuesta metabólica benéfica para estas condiciones, por lo cual es recomendado para el manejo y prevención de la diabetes (Axelsen *et al.*, 1999; Ells *et al.*, 2005). El consumo a largo plazo de ADR podrían inducir niveles anormales de glucosa, lo cual dañaría a las células, tejidos, y órganos a través de varios mecanismos, incluyendo incremento del flujo de glucosa vía ruta metabólica de los polioles, producción de radicales libres de O₂ en mitocondria, resultando en un estrés oxidativo que daña a las membranas celulares (peroxidación de lípidos) y ADN (Brownlee, 2005). Un cambio de ADR por ADL reduciría el estrés oxidativo y disminuiría estas complicaciones.

Ells *et al.*, (2005) propusieron que el consumo de ADL puede reducir los factores potenciales del síndrome metabólico. El síndrome metabólico es una combinación de desórdenes médicos los cuales incluyen obesidad abdominal, intolerancia a la glucosa, hipertensión y dislipidemia (Kaplan, 1989), la mayoría de estos desordenes están asociados a un metabolismo energético anormal. Este síndrome está asociado con el tejido adiposo abdominal que actúa como un órgano endocrino liberando altas concentraciones de ácidos grasos libres, angiotensina II, adipocitos que circulan en sangre, lo que conlleva a hipertensión, resistencia a la insulina e inflamación. Aunque la predisposición genética está asociada con este síndrome, el sobrepeso es un factor de riesgo. El consumo a largo plazo de dietas con alto contenido de ADR, lo cual favorece el almacenamiento de energía, a través de la ruta hexosamina (Marshall, 2006), podría llevar a una condición de sobrepeso y obesidad. Lo anterior está soportado por un reciente estudio de dietas a ratas (25 semanas), mostrando que una dieta alta en IG incrementó la grasa corporal y triglicéridos hepáticos al doble, en comparación con una dieta con bajo IG (Scribner *et al.*, 2007).

2.7.2 Efectos fisiológicos atribuidos al consumo de AR

Existen varios efectos fisiológicos atribuidos al AR. El AR al escapar de la digestión en el intestino delgado, tiene poca interacción con otros componentes del tracto gastrointestinal superior, es fermentado en el intestino grueso, lo que resulta en la producción de gases como el dióxido de carbono, metano, hidrógeno, y de compuestos como los ácidos orgánicos (por ejemplo ácido láctico) y ácidos grasos de cadena corta

(AGCC). Sin embargo, se cree que el AR sólo produce una modesta cantidad de estos gases comparados con otros carbohidratos no digeribles como: oligosacáridos, fructooligosacaridos y lactulosa

Los AGCC son los productos metabólicos de la fermentación de polisacáridos, oligosacáridos, proteínas, péptidos y precursores de glicoproteínas, llevada a cabo por bacterias anaerobias en el intestino grueso, incluyendo también aquellos carbohidratos derivados de la fibra dietética y AR (Andoh *et al.*, 2003). Los principales AGCC son butirato, propionato y acetato, aunque otros AGCC son también producidos en menor proporción (MacFarlane y MacFarlane, 2003). Los AGCC son utilizados por las células que cubren el colon (colonocitos), estas últimas incrementan el flujo de sangre, reducen el pH luminal y ayudan a prevenir el desarrollo de poblaciones de células anormales (Topping y Clifton, 2001). En los humanos, la abundancia de AGCC es normalmente en el siguiente orden acetato > propionato > butirato. El butirato es el combustible preferido de los colonocitos (Schwiertz *et al.*, 2002). Por lo que el consumo de AR puede ayudar a mantener un estado óptimo de las células del colon, lo cual puede prevenir el desarrollo de cáncer en el colon.

2.8 Incremento de las fracciones ADL y AR

Como resultado de los beneficios que se le han atribuido al ADL y AR, estas fracciones del almidón han recibido mucha atención por parte de investigadores

académicos, expertos en mejoramiento de cultivos, la industria alimenticia y profesionales de la salud.

Actualmente, en el mercado existen productos ricos en almidón resistente: hi-maize[®], un almidón alto en amilosa, es un AR2 y es comercializado por la empresa National Starch Food Innovation, EUA. Contiene alrededor de 60% de AR, este almidón puede ser adicionado a productos como pan, pastas, cereales de desayuno, sustituyendo parcialmente la harina presente en estos productos. También existen productos AR3 como: CrystaLean[®] (Opta Food Ingredients, Inc., Bedford, Mass., EUA) y Novelose 330[®] (National Starch Food Innovation, EUA), los cuales han sido obtenidos mediante desramificación enzimática de la amilopectina, seguido de ciclos de calentamiento-enfriamiento de un almidón alto en amilosa, lo que permite la generación de almidón resistente AR3, el cual produce regiones cristalinas resistentes a la hidrólisis enzimática.

Actualmente, no existe ADL comercialmente disponible, pero hay diversos procesos para su producción, así como distintas estrategias para aumentar el contenido de ADL en los almidones, como diversos tipos de modificaciones, las cuales son utilizadas separadas o en secuencia, para poder obtener derivados de almidón con alto contenido de ADL. Se pueden diferenciar tres tipos de tratamientos: los físicos (Wongsagonsup *et al.*, 2008), los enzimáticos (Ao *et al.*, 2007) y los químicos (Han y BeMiller, 2007).

El efecto de las modificaciones químicas sobre la cinética de digestión de almidones de maíz ceroso y altos en amilosa cocinados fue reportado por Wolf *et al.* (1999). Los autores observaron que no existen cambios significativos sobre la digestibilidad de los

almidones entrecruzados, mientras que la eterificación y oxidación reducían la extensión de la hidrólisis. Al aumentar el grado de sustitución se disminuía la esterificación del almidón, lo que sugiere un aumento en el contenido de AR. Sin embargo, la velocidad de digestión del almidón no fue modificada significativamente. Han y BeMiller (2007), llevaron a cabo modificaciones duales de almidón de maíz normal y maíz ceroso, para obtener productos de almidón con alto contenido de ADL. Encontrándose que el mayor contenido de ADL fue obtenido mediante la esterificación con anhídrido octenilsuccinico y posteriormente un tratamiento físico de calentamiento a 130 °C.

En cuanto a las modificaciones enzimáticas, Ao *et al.* (2007) realizaron hidrolisis enzimáticas de almidón de maíz normal mediante cuatro tratamientos, utilizando β -amilasa, una mezcla de β -amilasa y transglucosidasa, α -amilasa maltogénica y una mezcla de esta última y transglucosidasa obteniendo como resultados la disminución de la fracción de ADR y un incremento de la fracción de ADL al igual que la fracción AR, esto debido a un incremento en la cantidad de enlaces α -(1 \rightarrow 6) y disminución en los α -(1 \rightarrow 4), así como también la disminución de la longitud de las cadenas de la amilopectina.

Las modificaciones físicas han sido empleadas para cambiar la estructura interna [tratamientos hidrotérmicos: templado (annealing) y tratamiento de calor – humedad] y la estructura externa (extrusión, autoclave y ciclos térmicos) de los gránulos de almidón. Wongsagonsup *et al.*, (2008), emplearon un tratamiento de calor-humedad a granos enteros de maíz normal y ceroso seguido de un ciclo de calentamiento-enfriamiento, para aumentar la fracción de ADL; ellos encontraron las temperaturas óptimas para acelerar la formación de cristales en los gránulos y con ello aumentar el contenido de ADL y AR.

Por su parte, Guraya *et al.* (2001), realizaron una modificación dual para obtener productos enriquecido en la fracción de ADL y AR a partir de almidones de arroz ceroso y normal. Ellos desramificaron enzimáticamente y posteriormente utilizaron un ciclo de calentamiento – enfriamiento, variando la concentración de enzima, el tiempo de hidrólisis y la temperatura de enfriamiento, encontrando las condiciones para generar un aumento en la fracción de ADL.

La mayoría de las investigaciones sobre las propiedades de digestión de los almidones se han llevado a cabo en almidones de cereales, y poco son los estudios sobre almidones de fuentes no convencionales, como los frutos. Una de las estrategias utilizadas en almidones de fuente no convencionales fue la reportada por Aparicio-Saguilan *et al.* (2005), quienes estudiaron el efecto de ciclos de autoclave (tratamiento físico) sobre los gránulos de almidón nativo y lintnerizado de plátano (*Musa paradisiaca* L.). Se encontró que el contenido de almidón resistente aumentó con esta modificación dual. Se tienen estudios sobre la obtención de almidón resistente de los almidones de mango y plátano (Agustiniano-Osornio *et al.*, 2005; González-Soto *et al.*, 2007); sin embargo, la propiedad digestión lenta de estos almidones no ha sido evaluada.

2.9 Hidrólisis ácida (Lintnerización)

La hidrólisis ácida extensiva ha sido utilizada por muchos años para modificar la estructura del gránulo de almidón y producir “almidón soluble”. El tratamiento ácido prolongado puede llevarse a cabo con ácido sulfúrico o ácido clorhídrico lo cual produce

amilodextrinas de Nägeli y almidones lintnerizados, respectivamente (Srichuwong *et al.*, 2005). Durante la hidrólisis ácida, el ion hidronio (H_3O^+) realiza un ataque electrofílico sobre el átomo de oxígeno de enlace glucosídico α -(1 \rightarrow 4) (Figura 6A). A continuación, los electrones en uno de los enlaces carbono-oxígeno se mueve hacia el átomo de oxígeno (Figura 6B) para generar un intermediario de alta energía (carbocación) (Figura 6C), este carbocación es un ácido de Lewis, por lo cual subsecuentemente reacciona con el agua (Figura 6D), la cual es una base de Lewis, para regenerar el grupo hidroxilo (Figura 6E).

Cuando el almidón es lintnerizado (2.2 N HCl y 35 °C), éste muestra un patrón de hidrólisis en 2 etapas. Una velocidad de hidrólisis relativamente alta, presentada durante los primeros 8 días, la cual es seguida por una etapa a una velocidad más lenta. La etapa más rápida corresponde a la hidrólisis de las partes amorfas del gránulo de almidón. Durante la segunda etapa, el material cristalino es lentamente degradado.

Existen dos hipótesis para explicar la hidrólisis lenta de las partes cristalinas. La primera establece que el denso empaquetamiento de las cadenas lineales dentro del almidón no permite la penetración constante de los iones H_3O^+ hacia esas regiones del gránulo. La segunda hipótesis establece que la hidrólisis ácida de un enlace glucosídico puede requerir un cambio en la conformación de la unidad D-glucopiranososa (silla \rightarrow media silla). Por consiguiente, si la estructura cristalina inmoviliza la conformación del azúcar, entonces la transición de silla a media silla sería estéricamente imposible. Las diferencias en la velocidad y grado de hidrólisis entre diferentes almidones han sido atribuidas a diferencias en el tamaño de gránulo, en el grado de interacciones entre las cadenas de almidón (dentro

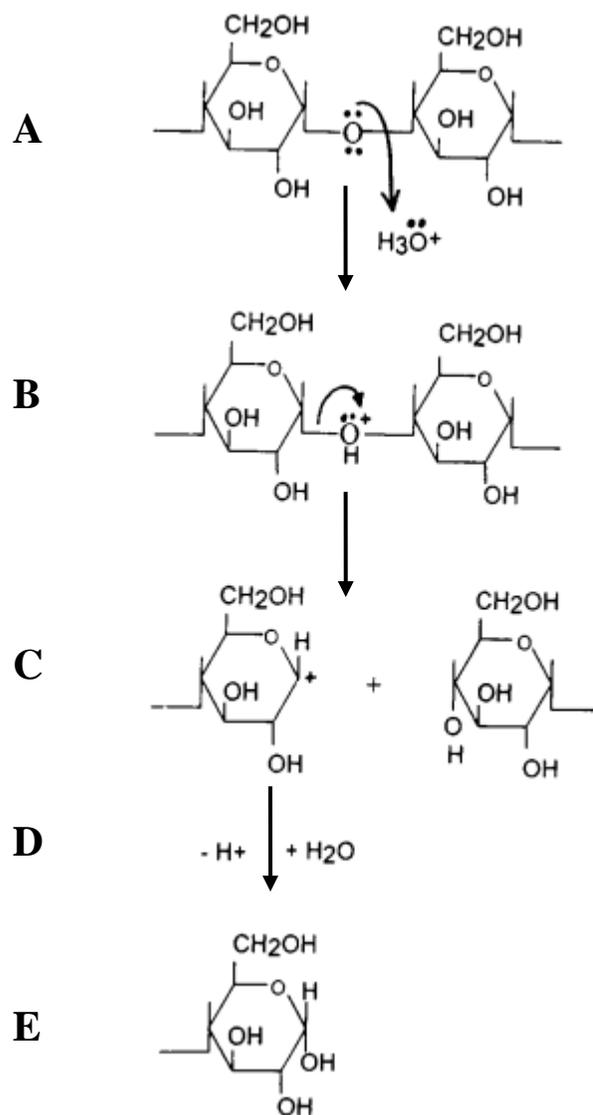


Figura 6. Mecanismo de hidrólisis ácida del almidón. Ataque electrofilico sobre enlace glucosidico (A), generación de un carbocation (B), carbocation (C), reacción del carbocation con agua (D), generación del grupo hidroxilo (E).

Fuente: Hoover, 2000

de las regiones cristalinas y amorfas del gránulo), la composición del almidón (grado de fosforilación, contenido de amilosa, complejos amilosa-lípidos). Diversos investigadores han demostrado que el residuo que queda después de una hidrólisis ácida prolongada consiste principalmente de partes cristalinas de amilopectina resistentes al ataque ácido.

2.10 Hidrólisis enzimática (desramificación).

La desramificación del almidón mediante la enzima pululanasa, tiene como objetivo modificar la estructura de la molécula de amilopectina (Figura 7A) mediante la hidrólisis de los enlaces α -(1 \rightarrow 6) (Figura 7B), lo que genera cadenas lineales, las cuales llegan a formar interacciones entre la amilosa y entre ellas misma, llevando a la formación de complejos (Figura 7C) que son resistentes a la hidrólisis enzimática.

Existen diversos factores que afectan la desramificación de la molécula de amilopectina. Guraya *et al.*, (2001) analizó el efecto de la concentración de enzima, el tiempo de hidrólisis y temperatura de almacenamiento sobre el contenido de ADL de almidón ceroso y normal de arroz modificados mediante la enzima pululanasa; ellos encontraron que el contenido de amilosa y el grado de desramificación influyen la cinética de hidrólisis. La desramificación de los almidones cerosos resultó en la formación de complejos de cadenas cortas, lo que favoreció la formación de dobles hélices que se agregaron en arreglos cristalinos durante el almacenamiento, estos cristales son resistentes a la digestión. Por el contrario, la presencia de amilosa de cadena larga en el almidón normal de arroz, no presentó agregación, resultando en la formación de una red entrecruzada, esto

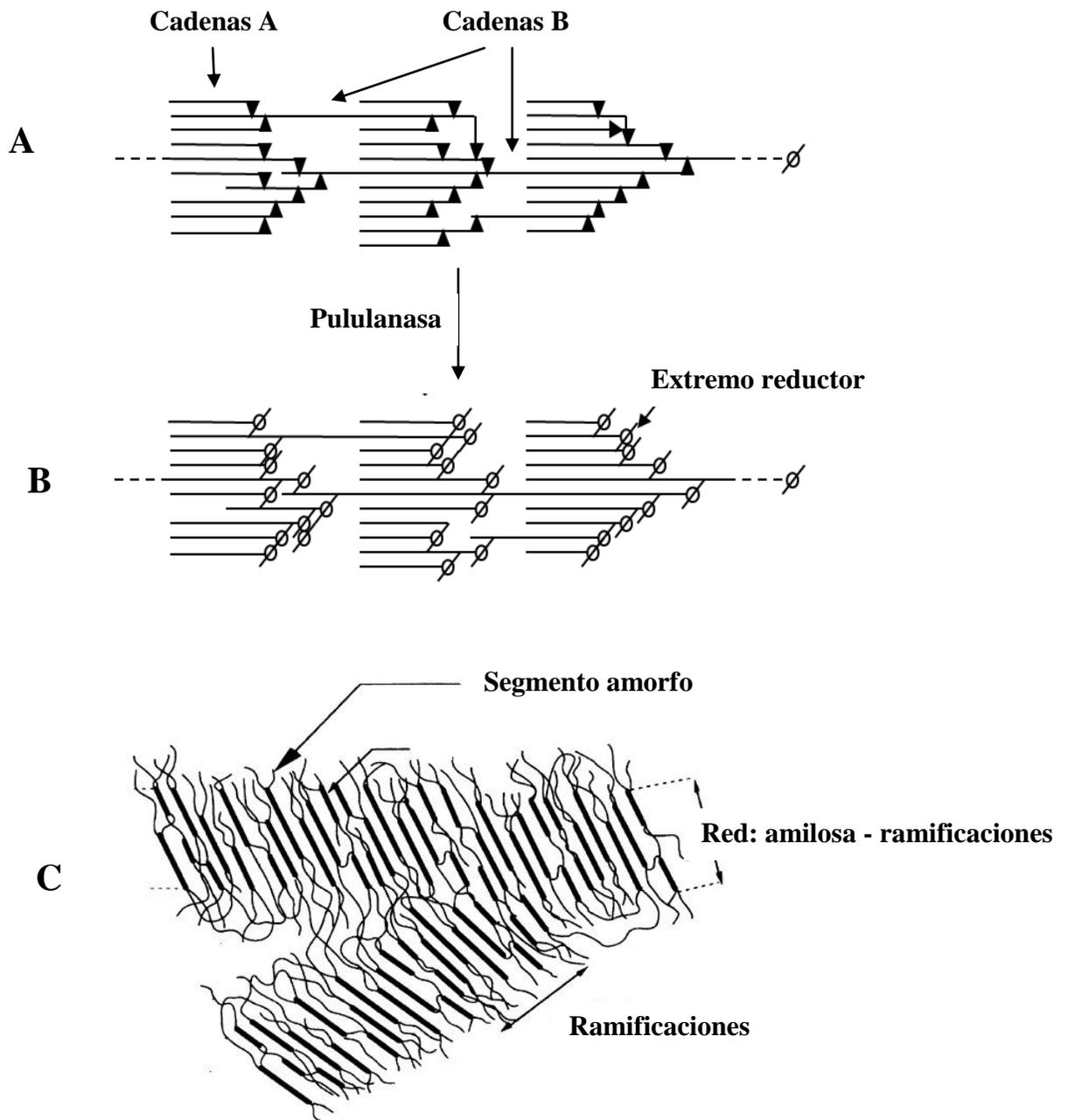


Figura 7. Desramificación del almidón. Estructura de la molécula de amilopectina (A), cadenas lineales de la amilopectina desramificada (B), Posibles interacciones formadas tras la desramificación de almidón (C).

Fuente: Lehmann y Robin, 2007

durante el enfriamiento. Lo que llevó a la formación de material digerible. La formación de ADL se favoreció cuando se llevó una desramificación parcial del almidón.

2.11 Almidón de frutos

Numerosas frutas acumulan almidón durante su desarrollo. Sin embargo, debido a que son pocas las frutas que tienen niveles significativos de almidón cuando son consumidos, la caracterización de estos almidones ha recibido poca atención. El contenido de almidón y sus propiedades han mostrado influencia sobre la textura de frutas de calabaza y manzana, y por dichas razones has sido estudiadas en términos de la estructura fina de la amilopectina, el contenido de amilosa y sus propiedades térmicas (Stevenson, *et al.*, 2006a; 2006b) para poder ser relacionadas con las características de textura o para encontrar almidones con nuevas o mejores propiedades.

De todos los almidones de frutas, el almidón plátano ha recibido la mayor atención.

2.11.1 El plátano

La definición de plátano abarca un número de especies o híbridos del género *Musa* de la familia Musaceae. Casi todos los cultivares conocidos se generaron a partir de las especies *Musa acuminata* y *Musa balbisiana*, las cuales son nativas del sureste Asiático.

La pulpa de plátano llega a contener hasta un 70-80 % de almidón en base seca, un porcentaje comparable con el obtenido de endospermo de granos de maíz y la pulpa de papa. El almidón de plátano tiene el potencial para ser un almidón comercial debido a sus propiedades específicas y su potencial bajo costo de producción, esto debido principalmente a la utilización de plátanos de desecho (cuando se utilizan plátanos muy pequeños para ser empaquetados e importados, o plátanos que han sido dañados por plagas o durante su colecta) (Zhang *et al.*, 2005).

El almidón nativo de plátano es conocido por su alta resistencia a la hidrólisis por α -amilasa y glucoamilasa, en ensayos *in vivo*, mostrando que del 75-84 % de los gránulos de almidón ingeridos alcanzaron la terminal de ileum (Faisant *et al.*, 1995).

Espinosa-Solis *et al.* (2009) reportaron que los gránulos de almidón de plátano (*Musa paradisiaca* L.) tienen formas elongadas y de un tamaño en el intervalo de los 20-40 μm ., presenta un patrón de difracción de rayos X tipo C-; en cuanto a las propiedades fisicoquímicas se encontró una temperatura y entalpia de gelatinización de 76.5 ± 0.9 °C y 16.5 ± 0.7 J/g , respectivamente. Además, se encontró un mayor porcentaje de cadenas de longitud largas ($\text{GP} \geq 37$) en comparación con el almidón de maíz comercial, así como también un mayor porcentaje de amilosa aparente, lo cual podría contribuir a una mayor tendencia a formar complejos tras una modificación de la estructura interna del almidón.

2.11.2 El mango.

El mango (*Mangifera indica* L) pertenece a la familia de las *Anacardiaceae*. El género *Mangifera* comprende aproximadamente 50 especies nativas del suroeste de Asia. El carbohidrato predominante en el mango verde es el almidón, que en la fruta madura es reemplazado en gran parte por sacarosa, glucosa, y fructuosa. Agustiano-Osornio *et al.* (2005) reportaron un contenido de almidón en el fruto de mango verde del 90 % en base seca.

Bello-Perez *et al.* (2005b) Estudiaron las propiedades morfológicas, fisicoquímicas y funcionales de dos variedades de almidón de mango (*Mangifera indica*) variedad criollo y manila. Reportaron una temperatura de gelatinización de 70.5 y 69.2 °C para la variedad criollo y manila, respectivamente; mientras que el cambio de entalpia de gelatinización fue de 15.5 y 13.5 J/g para mango criollo y manila. Ambos almidones presentaron gránulos de forma ovalada con dimensiones de los 5 – 10 µm, y patrones de difracción tipo A-. Kaur *et al.* (2004), reportaron las propiedades fisicoquímicas, morfológicas, térmicas y reológicas del almidón obtenido de la semilla de 5 variedades de mango proveniente de la India. El contenido de amilosa varió de 9.1 – 16.3 %. El tamaño de los gránulos varió de los 10.9 - 27.2 µm en largo y 6.5-16.3 µm en ancho, con formas que variaban de ovalados a elípticos. Mientras que la temperatura de gelatinización estuvo entre 77.9 - 80.2 °C y la entalpia de gelatinización de 12.0 – 13.2 J/g. Sandhu y lim, (2008) estudiaron la digestibilidad de 2 variedades de almidón de mango obtenida de la semilla, encontrando que estos frutos tienen menos contenido de ADL en comparación con los almidones nativos de cereales.

3. JUSTIFICACION

Durante años ha estado latente la búsqueda de fuentes alternas para el aislamiento de almidón, los cuales presenten características estructurales que proporcionen la funcionalidad que se requiere para diversas aplicaciones. Los almidones de frutos como el plátano (*Musa cavendish*) y el mango (*Mangifera indica* L.) podrían ser una alternativa para la obtención de dicho polisacárido.

Se ha buscado modificar las características de digestión del almidón, para incrementar las fracciones de almidón lentamente digerible (ADL) y/o almidón resistente (AR), las cuales se han asociado con diversos efectos benéficos a la salud.

Hoy en día, no existen estudios reportados sobre la obtención de ADL mediante modificación de almidones de frutos como el plátano y el mango, ya que únicamente se han realizados estudios en almidón de cereales. Sin embargo, se tienen estudios sobre la obtención de AR a partir de los almidones de estas frutas, utilizando modificaciones químicas (hidrólisis ácida) y enzimáticas (desramificación).

Por lo cual, las modificaciones de hidrólisis ácida (lintnerización) e hidrolisis enzimática (desramificación) de los almidones no convencionales de plátano y mango, podrían ser una alternativa tecnológica para incrementar el contenido de ADL y AR, debido a que estas han sido utilizadas para incrementar dichas fracciones en almidón de maíz.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Evaluar el efecto de las modificaciones de hidrólisis ácida (lintnerización) e hidrólisis enzimática (desramificación), sobre las propiedades de digestión de los almidones nativos de plátano (*Musa cavendish*) y mango (*Mangifera indica* L.), mediante métodos fisicoquímicos, estructurales y moleculares.

4.2 Objetivos Específicos

- Evaluar las características morfológicas y estructurales de los almidones nativos de mango y plátano, para relacionarlo con sus propiedades de digestión.
- Evaluar el efecto de la hidrólisis ácida sobre las propiedades de digestión de los almidones de mango y plátano a diferentes tiempos de reacción, con la finalidad de incrementar las fracciones ADL y/o AR.
- Caracterizar los productos obtenidos de la hidrólisis ácida mediante difracción de rayos X, cromatografía líquida de alta resolución por exclusión de tamaño (CLARET) acoplado a un detector de índice de refracción (IR), y calorimetría de barrido diferencial (CBD), para elucidar su relación con las propiedades de digestión de estos productos.
- Evaluar el efecto de tiempo de desramificación y temperatura de almacenamiento sobre las propiedades de digestión de los almidones de mango y plátano, con la finalidad de incrementar las fracciones ADL y/o AR.
- Caracterizar las muestras con mayor contenido de ADL mediante CLARET-IR y CBD, para elucidar su relación con las propiedades de digestión de estos productos.

5. MATERIALES Y METODOS

5.1 Materiales

Se utilizaron frutos en estado inmaduro de plátano (*Musa Cavendish*) que fueron obtenidos de la compañía Chiquita (Colombia) y de mango (*Mangifera indica* L.) de la variedad “Tommy Atkins” que fueron comprados en el mercado local en Cuautla, (Mexico). Amiloglucosidasa (A7095-50 mL) de *Aspergillus niger* (300 U/mL), pepsina (P7000-25G) de mucosa gástrica porcina (1:10 000 U/mg), pancreatina (P7545-500G) de páncreas porcino (8x U.S.P), invertasa (I4504-1G) grado VII de levadura comercial (401 U/mg), pululanasa (Promozym) y goma guar de la compañía Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA). Los reactivos para el ensayo de glucosa oxidasa-peroxidasa (GOPOD) y la enzima isoamilasa (E-SAMY, 280 U/mL) fueron compradas en Megazyme International Ireland Ltd. (Wicklow, Ireland).

5.2 Métodos

En la Figura 8 se muestra un diagrama de los procedimientos realizados sobre los almidones de plátano (*Musa Cavendish*) y mango (*Mangifera indica* L.).

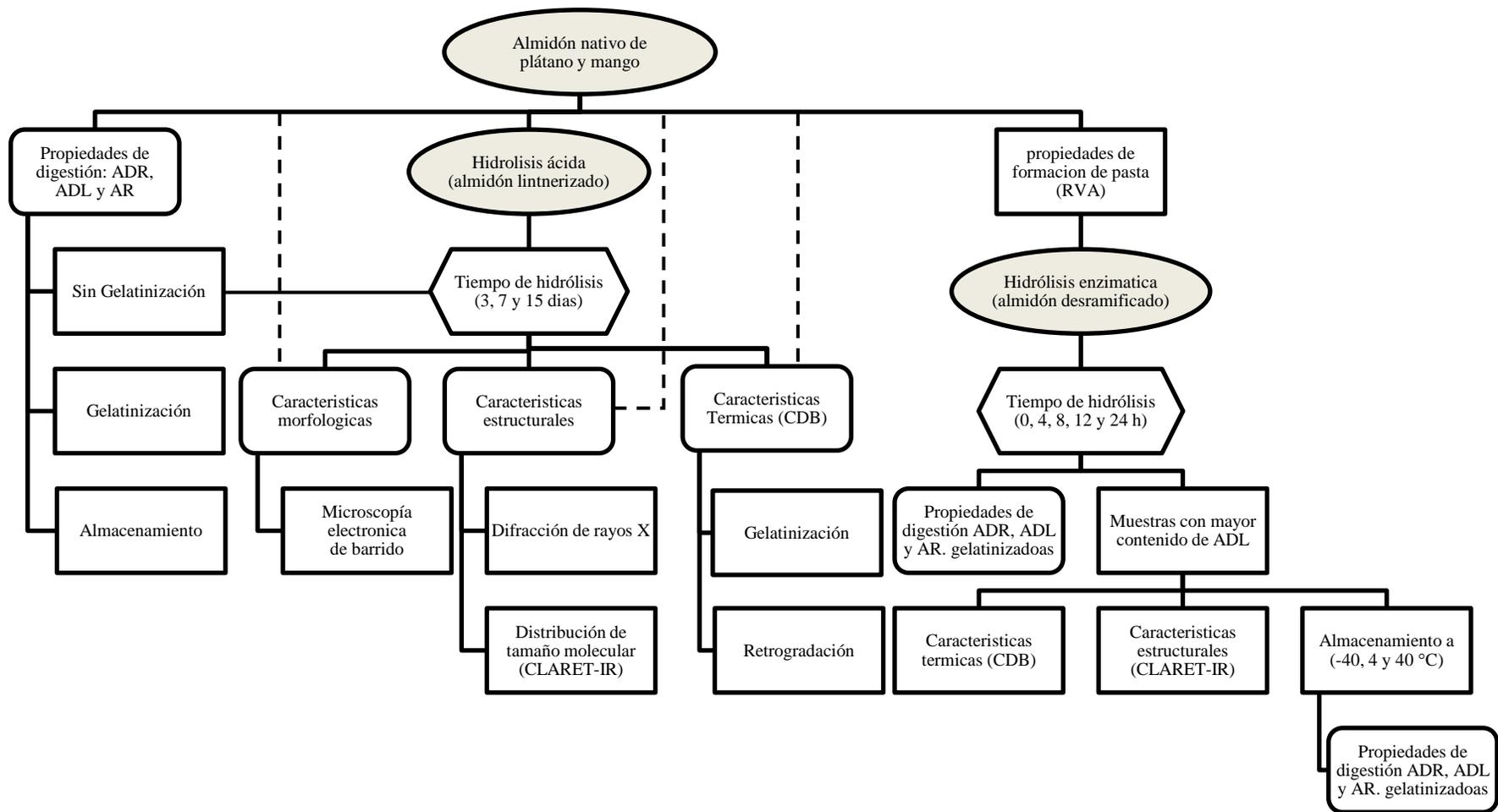


Figura 8. Diagrama con los procedimientos experimentales que se realizaron a los almidones de mango y plátano.

5.2.1. Aislamiento del almidón de plátano

El almidón de plátano fue aislado siguiendo la patente desarrollada por Whistler (1998). Los plátanos (18.14 Kg) fueron pelados y cortados en piezas de 5 mm de grosor e inmediatamente fueron sumergidos en una solución de sulfito de sodio (1%, p/p, pH 4.5) en una relación 1:2 plátano/solución. Posteriormente fueron molidos en una licuadora industrial, hasta obtener un puré, el cual se dejó reposar por 4 horas. Este paso del proceso permite que las enzimas del plátano: pectinasas y poligalacturonasa, trabajen para desintegrar la pared celular del plátano, lo cual permite la liberación de los gránulos de almidón. El puré de plátano fue cribado a través de diferente tamices (malla 100 (0.15mm), 200 (0.075mm) y 350 (0.045mm) U.S.). La solución filtrada fue sedimentada por toda una noche y decantada. Los gránulos sedimentados fueron lavados y centrifugados a 17700 x g. El material fue secado en un horno de convección a 35° C por toda la noche. El polvo obtenido (1.5kg) fue filtrado a través de un tamiz de malla No. 100 (0.149 mm) U.S. y almacenado hasta que fue utilizado.

5.2.2 Aislamiento del almidón de mango

El almidón de mango fue aislado siguiendo el método a nivel planta piloto seguido por Flores-Gorosquera *et al.* (2004). Al mango se le eliminó la cáscara y la semilla, el fruto fue procesado en una licuadora industrial conteniendo una solución de ácido cítrico (0.5g/L). En una relación 1:1 fruta/solución. La mezcla se homogeneizó a velocidad máxima durante 2 min y el fruto molido se cribó sucesivamente en mallas de 100

(0.15mm), 200 (0.075mm) y 350 (0.045mm) U.S. y lavado con suficiente agua, hasta obtener una solución transparente. La suspensión obtenida fue precipitada durante toda la noche. El precipitado se secó en un secador por aspersion (Niro Atomizer, modelo P-6.3, Conpenhagen, Denmark), con una temperatura de alimentación de 130-150 °C, una concentración de sólidos en la alimentación de 300-400 g/Kg y una temperatura de salida de 70-80 °C. El polvo fue cribado a través de una malla 100 (0.149 mm) U.S. y almacenado hasta su posterior utilización.

5.2.3 Almidón total

Para conocer la pureza de los almidones obtenidos, se determinó el contenido de almidón total siguiendo la metodología de la AACC 76.13. Para lo cual se utilizó el kit de la empresa Megazime International Ireland Ltd. (Wicklow, Ireland). 100 mg de almidón fueron agregados a un tubo de vidrio (16 x 120 mm), asegurándose que la muestra no se pegara a las paredes. Se agregaron 0.2 mL de etanol al 80%, para humectar el almidón y ayudar la dispersión. El tubo fue agitado en un vortex. Se agregó una barra magnética para homogenizar la muestra, y se colocaron los tubos en un baño de agua con hielos, a continuación 2 mL de una solución de KOH 2M fueron agregados a los tubos, se utilizó agitación durante 20 min. Se agregaron 8 mL de regulador de acetato de sodio (1.2 M, pH 3.8), esto mientras el agitador magnético aún seguía en funcionamiento. Inmediatamente después, se adicionaron 0.1 mL de la enzima α -amilasa y 0.1 mL de la enzima amilogucosidasa, y fueron mezcladas en un vortex. La mezcla fue colocada en un baño de

agua a 50 °C. los tubos fueron incubados por 30 min con agitación mediante vortex cada 5 min. Al término de la incubación el contenido de los tubos fue transferido a un matraz aforado de 100 mL utilizando agua desionizada. La muestra fue aforada a 100 mL y un alícuota fue centrifugada a 1800 x g por 10 min. Se transfirieron 2 alícuotas del sobrenadante (0.1 mL) al fondo de un tubo de ensayo y se agregaron 3 mL de reactivo GOPOD y estos fueron encubados por 20 min a 50 °C. Se leyó la absorbancia a 510 nm. Se utilizaron controles de glucosa y una solución blanca que consistía de agua. El contenido de almidón total fue calculado mediante la siguiente ecuación: $Almidon (\%) = \Delta A \times \frac{F}{W} \times FV \times 0.9$ Donde: A= absorbancia del blanco, F= [100 (µg de D-glucosa)/absorbancia de los 100 µg de glucosa], W= peso en µg de muestra analizada, FV = volumen final.

5.2.4 Amilosa total

La determinación de la amilosa total se llevó acabo utilizando el kit K-AMYL de la empresa Megazyme International Ireland Ltd. (Wicklow, Ireland). El cual utiliza la formación de complejos amilopectina - lectina concavalina A (Con A), los cuales precipitan y son separados de la amilosa, la cual es hidrolizada y cuantificada. Este método ofrece una alternativa para la determinación de amilosa en almidones, la cual no está sujeta a incertidumbre como en las técnicas de formación de complejos con yodo, donde se lleva a cabo una sobre valoración del contenido de amilosa debido a que la amilopectina llega a formar complejos con la molécula del yodo.

Se pesaron 20-25 mg de almidón en tubos con rosca y tapón de 10 mL, se incluyó una muestra de referencia en cada medida hecha. Se agregó 1 mL de DMSO y se agitó a baja velocidad en un vortex, se tapó el tubo y se colocó en un baño en ebullición hasta por 15 min (se aseguró que no hubiera la formación de agregados de almidón), y se aplicó agitación intermitente en un vortex a alta velocidad. Se almacenaron los tubos a temperatura ambiente por 5 min y se agregaron 2 mL de etanol al 95 % (v/v), esto con agitación continua, se agregaron 4 mL de etanol, se taparon los tubos y se invirtieron para mezclar. Los tubos reposaron por toda una noche para precipitar las moléculas de almidón. Se centrifugaron los tubos a 2000 x g, por 5 min, se descartó el sobrenadante y se drenaron los tubos en papel absorbente por 10 min para asegurarse que todo el etanol había sido removido. El precipitado se utilizó en los procedimientos posteriores. Dos mL de DMSO se agregaron al precipitado, se colocó en un baño de agua hirviendo por 15 min y se mezcló ocasionalmente utilizando un vortex. Inmediatamente después se agregaron 4 mL de la solución Con A, se mezcló completamente y se transfirió cuantitativamente a un matraz volumétrico de 25 mL, utilizando disolvente Con A (regular incluido en el kit) y se aforó con éste mismo solvente. Esta fracción se denominó solución A. Se utilizó 1.0 mL de solución A en un micro tubo Eppendorf de 2 mL, se agregaron 0.50 mL de solución Con A (botella 1 del kit), y se mezcló el tubo con repetidas inversiones del mismo. Se permitió que el tubo reposara por 1 h a temperatura ambiente y se centrifugó a 14000 x g por 10 min en una micro centrífuga a temperatura ambiente. Se transfirió 1 mL del sobrenadante a un tubo de centrifugación de 15 mL se agregaron 3 mL de regulador de acetato de sodio 100 mM, pH 4.5, para reducir el pH a 5. Se mezclaron los tubos y se colocaron en un baño de agua con ebullición para desnaturalizar a la molécula de Con A.

Se colocaron los tubos en un baño de agua a 40 °C y se permitió equilibrar por 5 min. se agregó 0.1 mL de la mezcla de enzimas amiloglucosidasa/ α -amilasa (botella 2) y se incubó por 30 min al término del cual se centrifugó a 2000 x g por 5 min, se tomó 1.0 mL del sobrenante y 4 ml de solución GOPOD (reactivo B), se incubaron a 40 °C por 20 min, se incubó un blanco y controles de glucosa. Se leyó la absorbancia de cada muestra a 510 nm.

Se determinó el almidón total mezclando 0.5 mL de la solución A con 4 mL de regulador de acetato de sodio 100 mM, pH 4.5. Se agregó 0.1 mL de la mezcla de enzimas amiloglucosidasa/ α -amilasa (botella 2) y se incubó la mezcla a 40 °C por 10 min. Se transfirieron alícuotas de 1.0 mL un tubo de vidrio y se mezclaron con 4 mL de solución GOPOD (reactivo B, del kit). Finalmente los tubos se incubaron a 40 °C por 20 min. El cálculo de la amilosa total (p/p) fue realizado utilizando la siguiente formula.

$$\text{amilosa \%} = \frac{\text{absorbancia (Con A sobrenadante)}}{\text{Absorbancia (alícuota de almidon total)}} \times \frac{6.15}{9.2} \times \frac{100}{1}$$

Los factores 6.15 y 9.2 son factores de dilución para los factores de Con A y almidón total, respectivamente.

5.2.5 Análisis rápido de la viscosidad

Las propiedades de formación de pasta se obtuvieron usando un analizador rápido de la viscosidad (ARV) (RVA-4, Newport Scientific, Sydney, Australia). Se preparó una

suspensión de almidón, pesando 2.8 g de almidón en un bote de ARV y se agregó agua destilada hasta un peso final de 28 g. La suspensión de almidón fue equilibrada a 30 °C por 1 min y calentada a una velocidad de 6 °C/min hasta 95 °C, posteriormente se mantuvo a esa temperatura por 5.5 min, y se enfrió hasta 50 °C a una velocidad de 6 °C/min. Se utilizó una velocidad de rotación de pala de 160 rpm durante todo el análisis; el análisis tuvo una duración de 13 min. La prueba fue realizada por triplicado.

5.2.6 Modificación de los gránulos de almidón mediante hidrólisis ácida

Los almidones de plátano y mango fueron tratados mediante hidrólisis ácida siguiendo el procedimiento utilizado por Robin *et al.* (1974). En el cual, una dispersión de almidón al 1.67 % p/p, se incubó en HCl 2.2 N, 35 °C por diferentes periodos de tiempo (3, 7, 15 días) para obtener muestras con diferentes grados de hidrólisis. Posteriormente las muestras se filtraron a través de un filtro de 6 µm para remover el sobrenadante de HCl, y el almidón precipitado fue lavado con agua desionizada, y posteriormente neutralizado con una solución 0.01N de NaOH. Las muestras fueron secadas en un horno de convección a 35 °C por 24 horas, las muestras se tamizaron a través de un tamiz de malla 100 U.S. (0.149 mm), y almacenadas para su posterior uso.

El grado de hidrólisis se determinó a partir de una alícuota del sobrenadante obtenida a los 3, 7 y 15 días de reacción, se determinó el contenido de carbohidratos totales mediante el método fenol - ácido sulfúrico propuesto por Dubois *et al.* (1956). El cálculo

del porcentaje de hidrólisis se determinó con base en el peso inicial de muestra. La velocidad de hidrólisis de las muestras fue determinada mediante la siguiente formula:

$$Velocidad\ de\ hidrólisis = \frac{[X2 - X1]}{[Y2 - Y1]}$$

Dónde: X1 = tiempo de hidrólisis 1.

X2 = tiempo de hidrólisis 2.

Y1 = porcentaje de hidrólisis 1

Y2 = porcentaje de hidrólisis 2.

5.2.7 Modificación de los gránulos de almidón mediante hidrólisis enzimática

La modificación de los almidones de plátano y mango mediante hidrólisis enzimática fue llevada a cabo mediante el uso de la enzima pululanasa, la cual lleva a cabo una hidrólisis de los enlaces α -(1 \rightarrow 6), pertenecientes a las ramificaciones del almidón. Para lo cual una mezcla al 10 % (p/p) de almidón de mango y una mezcla de 6.6 % (p/p) de almidón de plátano fueron preparados utilizando amortiguador de acetatos (pH 5.2) y cocido por 20 min en una baño de agua hirviendo con agitación cada 2 min, seguido de un calentamiento a 121 °C a 2 atm por 30 min. Posteriormente se llevó a 50 °C y se agregó la enzima Pululanasa en una relación substrato/enzima 20:1 (Lehmann *et al.*, 2002).

Las muestras fueron desramificadas por diferentes periodos de tiempo (0, 4, 8, 12 y 24 h). Para detener la reacción de desramificación se utilizó un tratamiento de calentamiento a 121 °C a 2 atm por 30 min. Las muestras fueron almacenadas a 4 °C por 3

días, posteriormente congeladas a -40 °C por 12 h y secados mediante un proceso de liofilización, para obtener un polvo que fue almacenado hasta su posterior uso. Para conocer el efecto de la temperatura de almacenamiento sobre la digestibilidad de las muestras desramificadas. Las muestras desramificadas con el anterior procedimiento fueron almacenadas por 3 días a -40 °C a 4 °C y a 40 °C, al término del cual. Las muestras fueron congeladas y secadas al vacío. Se obtuvo el grado de hidrólisis de las muestras obtenidas a diferentes tiempos de reacción determinando el contenido de azúcares reductores mediante el método del DNS; el grado de hidrólisis se obtuvo utilizando la fórmula propuesta por Shin *et al.* (2004).

$$\text{Porcentaje de hidrólisis} = \left(\frac{Rx - Rnativo}{Rmáximo - Rnativo} \right) \times 100$$

Donde: Rx = valor reductor al tiempo X

Rnativo = valor reductor del almidón sin desramificar

Rmáximo = valor reductor del almidón con 24 horas de desramificación.

5.2.8 Propiedades de digestión ADR, ADL y AR

Las propiedades de digestión de los almidones nativos y modificados fueron analizados utilizando la prueba de Englyst *et al.* (1992), con algunas modificaciones. Para lo cual se preparó una mezcla enzimática con: pancreatina, amilogucosidasa e invertasa, inmediatamente antes de ser utilizada. 200 mg de almidón fueron mezclados con 2 mL de agua desionizada en un tubo con tapón y rosca. Las muestras se analizaron dependiendo de la forma en que son consumidas, mediante gelatinización = ebullición durante 20 min.

Retrogradación = gelatinización seguida de un almacenamiento por 15 horas a 4 °C, o sin ningún tratamiento térmico. Posteriormente las muestras se colocaron a 37 °C y 4 mL de una solución de pepsina/ goma guar/ ácido clorhídrico fueron adicionados a los tubos y dejados reaccionar por 30 min. Posteriormente 2 mL de una solución de acetato de sodio junto con 6 perlas de ebullición fueron agregadas a los tubos, esto para poder regular el pH, para que las siguientes enzimas pudieran actuar, estos tubos fueron colocados en posición inclinada en un baño de agua a 37 °C, con agitación a 160 rpm por 20 min, con la finalidad de simular los movimientos peristálticos del intestino. Finalmente 2 mL del cocktail de enzimas fueron agregados en intervalos de 1 min por muestra. Después de 20 min 50 µL fueron removidos de los tubos y colocados en tubos de microcentrifuga, los cuales contenían 950 µL de etanol al 80 %, este mismo paso fue repetido después de 100 min de reacción. Los microtubos fueron centrifugados a 14857 x g por 5 min, 50 µL del sobrenadante fueron analizados para conocer el contenido de glucosa mediante el método glucosa oxidasa-peroxidasa. Cada muestra fue analizada por triplicado.

El contenido ADR fue la relación entre el contenido de almidón hidrolizado a los 20 min entre la muestra inicial, el contenido de ADL fue la relación entre el contenido de almidón hidrolizado a los 120 min entre la muestra inicial, y el contenido de AR fue el contenido de almidón total menos el contenido de almidón a los 120 min de hidrólisis.

5.2.9 Microscopia electrónica de barrido

La morfología de los gránulos de almidón fue analizada mediante microscopia electrónica de barrido. Para ello, los gránulos de almidón se esparcieron sobre una cinta conductora de plata, la cual se montó sobre un disco de latón. Posteriormente los gránulos fueron recubiertos con oro y paladio, en una proporción 60/40, usando el equipo Polaron E5100 (Polaron equipment Ltd., Watford, UK). Las imágenes de los gránulos de almidón se capturaron a una magnificación de 1000X y 2000X utilizando un microscopio electrónico de barrido modelo JSM-5800LV (JEOL, Tokio, Japón).

4.2.10 Distribución de tamaño molecular (intervalo de exclusión $1 \times 10^3 - 1 \times 10^5$)

La distribución de peso molecular de los almidones nativos y lintnerizados fue determinada utilizando el equipo de cromatografía de exclusión por tamaño acoplado a un detector de índice de refracción (CLARET-IR). Los almidones nativos fueron desramificados para conocer la distribución de sus ramificaciones, siguiendo la metodología propuesta por Ao *et al.* (2007) con pequeñas modificaciones. La muestra (13 mg) fueron humectadas con 0.1 mL de agua desionizada seguido de la adición de 0.9 mL de dimetil sulfoxido. Las muestras fueron calentadas en un baño de agua por 60 min con agitación. Posteriormente fueron precipitados con 3 volúmenes de alcohol, centrifugados a 6750 x g por 20 min y secadas mediante centrifugación al vacío. Posteriormente 0.1 mL de amortiguador de acetato de sodio (pH 3.5 y 0.1M) fue adicionado a la muestra. La suspensión fue mezclada y mantenida en un baño de agua a 45 °C por 10 min. 3 µL de isoamilasa (3U) fueron adicionados e incubados por 3 h a 45 °C, la enzima fue desactivada

en un baño de agua en ebullición, posteriormente la solución fue filtrada en un filtro de nylon de 0.45 μm . y fueron inyectado en el sistema CLARET-IR. Los lintners fueron inyectados al mismo sistema sin llevar a cabo el procedimiento de desramificación. El sistema estaba equipado con una bomba Varian 9010 (Varian Associates Inc, Sugarland, TX), un detector de índice de refracción Varian Star 9040, dos columnas de la serie HR 10/30 la primera contenía gel Superdex 200 (intervalo de fraccionamiento $M_r 1 \times 10^3 - 1 \times 10^5$, Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) y la segunda contenía gel Superdex 30 (intervalo de fraccionamiento $M_r \leq 1 \times 10^4$). Las muestras fueron inyectados y corridos a una velocidad de flujo de 0.4 mL/min usando acetato de sodio como fase móvil para las muestras desramificadas y agua como fase móvil para los lintners. Estándares de peso molecular (pululanos) fueron usados para calibrar la columna y determinar el GP de las muestras. Cada muestra fue analizada por duplicado.

5.2.11 Distribución de tamaño molecular (intervalo de exclusión $4 \times 10^4 - 2 \times 10^7$)

La distribución de tamaño molecular se analizó mediante cromatografía de alta resolución por exclusión de tamaño acoplada a un detector de índice de refracción (CLARET-IR). Para la preparación de las muestras, estas se disolvieron usando un tratamiento con dimetilsulfóxido (DMSO) siguiendo la metodología de Yoo y Jane (2002). Para lo cual el almidón fue humectado para posteriormente dispersarse en DMSO al 90%. La suspensión se agitó mecánicamente mientras era calentada en un baño de agua hirviendo durante 1 h, después se mantuvo en agitación durante 12 h a temperatura ambiente. Una

alícuota de la dispersión se mezcló con 4 volúmenes de etanol para precipitar el almidón. El almidón se separó mediante centrifugación. Las muestras se disolvieron en agua caliente (obteniendo una concentración de 4 mg/ml) y se agitaron en un baño de agua hirviendo.

La muestra se filtró a través de una membrana de nylon de 5.0 μm de tamaño de poro antes de inyectarse al sistema de cromatografía. El sistema consistió de una bomba (modelo LC-10ATvp, Shimadzu, Columbia, MD), una válvula de inyección con un loop de 200 μl (Rheodyne, Cotati, CA), columna de permeación en gel (1.6 x 50 cm, Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) empacadas con Sefacril S-500 HR (GE Healthcare, Piscataway, NJ), un detector de índice de refracción (RI, Optilab® rEX, Wyatt Technology, Santa Barbara, CA, USA). Las muestras (200 μl) se inyectaron dentro del sistema y se analizaron a una velocidad de flujo de 1.3 mL/min. La fase móvil usada fue agua desionizada con 0.02% de azida de sodio, filtrada y desgasificada. Cada muestra se analizó por duplicado.

5.2.12 Difracción de rayos X

El patrón de cristalinidad del almidón fue estudiado mediante difracción de rayos X, las muestras se equilibraron en una cámara de humedad relativa al 100 %, a temperatura ambiente durante 24 horas. Los patrones de difracción de rayos X de los almidones fueron obtenidos mediante un difractómetro (Kristalloflex Siemens Corp Munich, Alemania). El difractómetro fue operado a 40 kV. La región de búsqueda o barrido con ángulo dos teta (2θ) fue de 10° a 35° con un tamaño de paso de 0.05° , con un tiempo de conteo de 2

segundos. El porcentaje de cristalinidad se calculó utilizando la siguiente ecuación:

$$Cristalinidad(\%) = \left(\frac{Ac}{Ac+Aa} \right) \times 100 \text{ Donde: } Ac = \text{área cristalina bajo el difractograma de rayos X y } Aa = \text{área amorfa bajo el difractograma de rayos X.}$$

5.2.13 Calorimetría de barrido diferencial

Para evaluar las características térmicas de las muestras analizadas se utilizó un calorímetro de barrido diferencial (modelo Q2000, TA Instruments, Newcastle, DE) y se utilizó el procedimiento descrito por Hickman *et al.* (2009). Con mínimas modificaciones. En charolas de aluminio, 3.0 mg de almidón y agua desionizada fueron agregado para generar una dispersión del 33%. Las charolas se sellaron herméticamente y se equilibraron por 1 hora a temperatura ambiente, antes de ser introducidas al calorímetro. Los escaneos fueron realizados de 20 a 140 °C a una velocidad de calentamiento de 10 °C/min. Las muestras fueron analizadas por triplicado.

5.2.14 Análisis estadístico

Los resultados fueron expresados como medias \pm desviación estándar. Los datos fueron analizados mediante un análisis de varianza (ANDEVA) de una vía, cuando se encontraron diferencias estadísticas significativas ($p = 0.05$) las medias se compararon utilizando la prueba de Tukey-Kramer. El análisis estadístico fue hecho utilizando el programa JMP (SAS Institute Inc. version 7.0).

6. RESULTADOS Y DISCUSIONES

6.1 Propiedades de digestión de los almidones nativos de plátano y mango

6.1.1 Contenido de almidón total y amilosa total

Para conocer la pureza de los almidones aislados se determinó el contenido de almidón total de las muestras obtenidas. En el Cuadro 1 se observan valores de alrededor del 95 % para ambos almidones de mango y plátano, lo cual refleja pureza de los gránulos de almidón aislados para este estudio. El 5 % restante se debe a la presencia materiales traza como cenizas, proteínas y lípidos, los cuales han sido encontrados en este tipo de almidones. Gonzales-Soto *et al.* (2007b) reportaron contenidos de 2.3 % de lípidos, 1.7 % de proteínas y 0.4 % de cenizas para el almidón de plátano macho. Bello-Pérez *et al.* (2005b) reportaron valores de 0.8 % de lípidos, 2.6 % proteína y 0.3 % de cenizas para almidón de mango manila. Se determinó el contenido de amilosa debido a que esta molécula tiene influencia en las propiedades fisicoquímicas y de digestión del almidón. En el Cuadro 1 se muestran los porcentajes de amilosa obtenidos para los almidones nativos de plátano y mango. El contenido de amilosa del mango encontrado para este almidón fue menor al reportado por Espinosa-Solis *et al.* (2009), quienes reportaron un contenido de amilosa aparente de 31.1 %, para mango variedad Tommy Atkins, la diferencia radica en el método de cuantificación de dicho parámetro, ya que la cuantificación del amilosa total bajo el método utilizado en este estudio implica la precipitación de las moléculas de amilopectina debido a la formación del complejo amilopectina – concavalina A, lo que excluye la cuantificación de la cadenas largas de la amilopectina. En el caso de las técnicas de acomplejamiento yodo-amilosa, se presentan interacciones de las cadenas largas de la amilopec -

Cuadro 1. Contenido de almidón total y amilosa de los almidones nativos de mango y plátano.

Muestras	Almidón total ¹ (g/100g)	Amilosa total ¹ (g/100g)
Almidón de mango (<i>Mangifera indica</i> . Var Tommy Atkins)	94.82 ± 0.10 ^a	19.76 ± 0.19 ^a
Almidón de plátano (<i>Musa Cavendish</i>)	95.73 ± 0.85 ^b	18.80 ± 0.16 ^b

1. Media de 3 réplicas ± desviación estándar. Valores con letras iguales en cada columna no son estadísticamente diferentes (p = 0.05)

tina con el yodo lo cual genera una sobre valoración de este parámetro. El contenido de amilosa encontrada en el almidón de mango variedad “tommy Atkins” es mayor al reportado por Kaur *et al.* (2004), para almidones de la semilla de mangos de 5 variedades cuyo intervalo de valores varió de los 9.1 – 16.3 %. Por su parte el almidón de plátano presentó un contenido de amilosa de 18.80 % el cual es mayor al reportado por Eggleston *et al.* (1992), quienes reportaron contenidos de amilosa en el intervalo de 12.9 – 17.2 % en el caso de plátanos para cocer.

6.1.2 Características morfológicas de los almidones nativos

Las características morfológicas de los almidones nativos de plátano y mango se presentan en la Figura 9. La forma y tamaño de los gránulos de almidón dependen de la fuente botánica. Se puede observar que los gránulos de almidón de mango presentan formas esféricas, formas de campana y algunos gránulos están divididos y presentaron dimensiones de 5 – 10 μm de diámetro (Figura 9A), sus características morfológicas (forma y tamaño) son similares a los encontrados en gránulos de almidones de otras frutas como el kiwi y la manzana (Stevensson *et al.*, 2006a; 2006b). Por su parte, los gránulos de almidón de plátano presentaron forma ovalada y lenticular ovalada con una longitud promedio de 50 μm y un radio promedio de 20 μm . (Figura 9B). Estos gránulos son característicos de los almidones de plátano, dichas morfologías se han reportado para otras variedades de almidón de plátano (Espinosa-Solis *et al.*, 2009; Bello-Pérez *et al.*, 2000).

El tamaño de gránulo es un parámetro importante que afecta las propiedades funcionales, fisicoquímicas y de digestibilidad de los almidones. Se ha reportado que los gránulos muy pequeños pueden absorber una mayor cantidad de agua, en comparación con gránulos grandes,

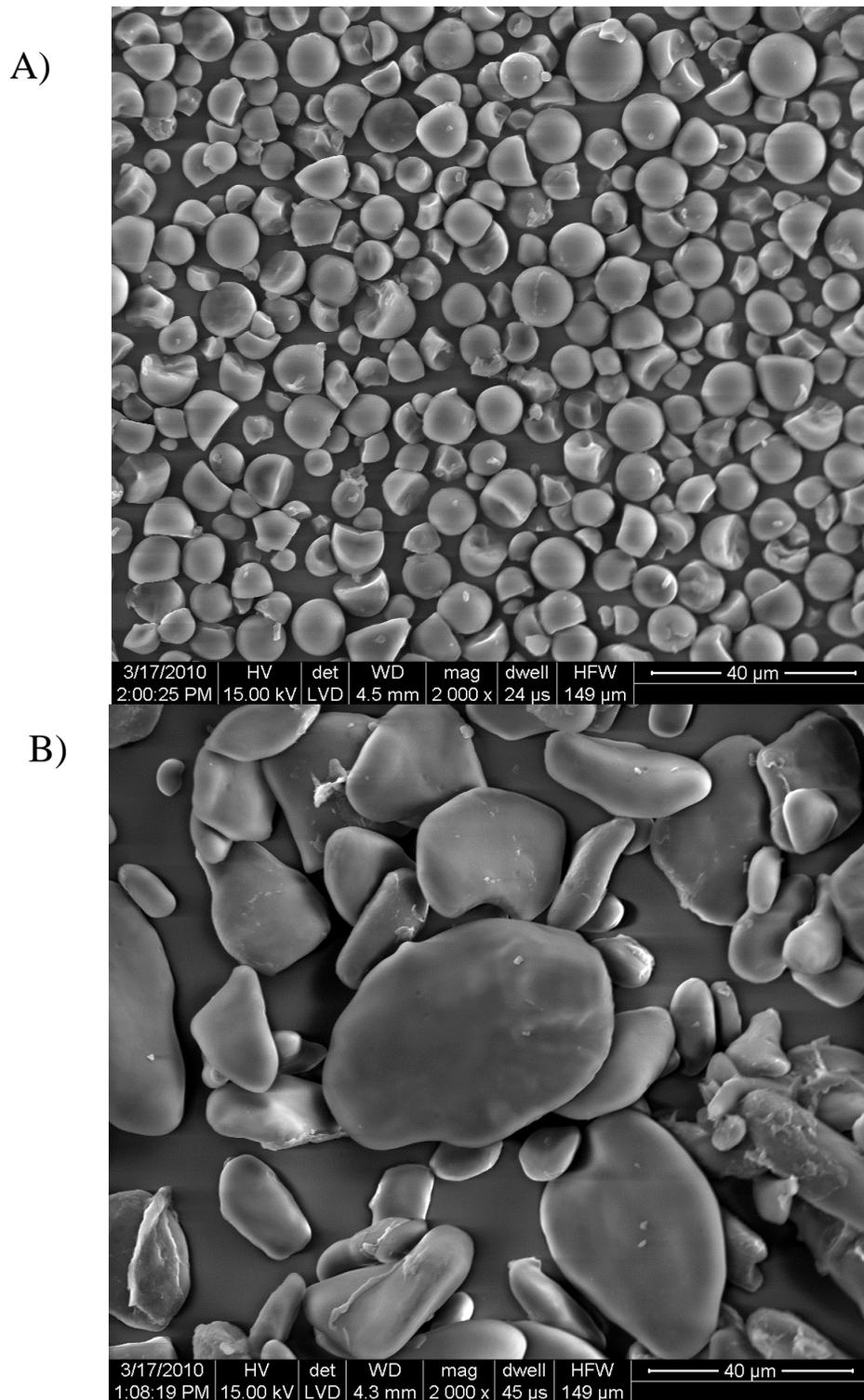


Figura 9. Micrografías de los gránulos de almidón nativo de mango (A) y plátano (B) a una magnificación de 2000 X.

debido a una mayor área de contacto (Paredes-López *et al.*, 1989). La diferencia en tamaño le confiere una mayor superficie de contacto a los gránulos de almidón de mango en comparación con el almidón de plátano, esta diferencia podría tener influencia sobre la susceptibilidad de los almidones ante la hidrólisis química y la digestión.

6.1.3 Características estructurales de los almidones nativos

En la Figura 10 se presentan los perfiles de elusión de los almidones desramificados de mango y plátano. Los perfiles de elusión presentan tres fracciones. La fracción I (tiempo de elusión 39 – 59 min), corresponde a las moléculas de mayor tamaño molecular (amilosa). La fracción II (tiempo de elusión 59 – 76 min), corresponden a las cadenas largas de la molécula de amilopectina (B₃), y la fracción III (tiempo de elusión de 76 – 93 min) corresponde a la cadenas intermedias (B₂) y cortas (B₁ y A₁) de la molécula de amilopectina.

En el Cuadro 2 se presenta la distribución de tamaño molecular de los almidones nativos. El almidón de mango presentó un mayor contenido de cadenas cortas tipo A1 (GP = 5-12) y menor contenido de cadenas tipo B1 (GP=12-23), B2 (GP=24-37) y B3 (GP 37-205) en comparación al almidón de plátano. Esta diferencia en la distribución de longitud de cadenas de ambos almidones le confiere características específicas. Se ha reportado que las cadenas tipo (B2-B3) tiene una correlación negativa con la digestibilidad (Zhang *et al.*, 2008b; Ovando-Martinez *et al.*, 2011). El almidón de mango presentó un mayor contenido de moléculas con GP > 205, estas moléculas en su mayoría ha sido asociado a moléculas de amilosa (Vilaplana *et al.*, 2012)

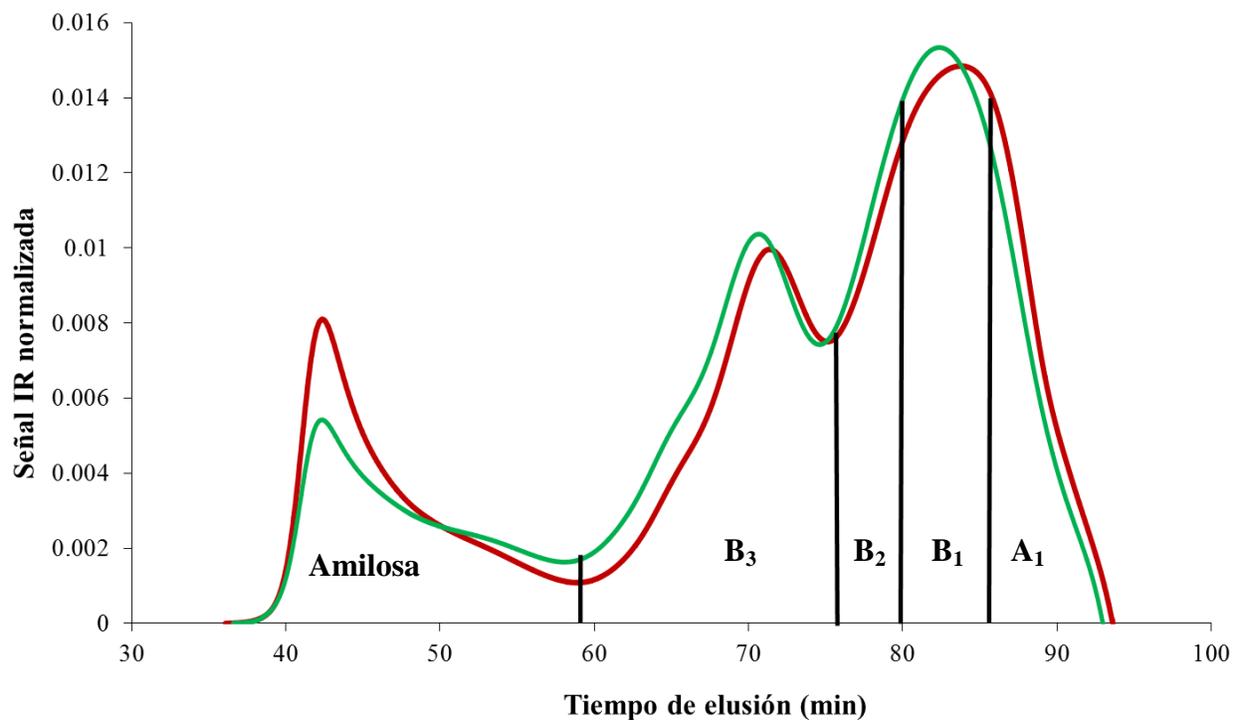


Figura 10. Perfiles de elución de los almidones de plátano (—) y mango (—) desramificados y analizados mediante cromatografía de alta resolución por exclusión de tamaño (CLARET) acoplado a un detector de índice de refracción (IR).

Cuadro 2. Distribución de longitud de cadena de almidones de mango y plátano desramificados y analizados mediante cromatografía de alta resolución por exclusión de tamaño (CLARET) acoplado a un detector de índice de refracción (IR)

almidón	Grado de polimerización (%)				
	A (5-12)	B1 (13-24)	B2 (25-37)	B3 (37-205)	Amilosa (GP > 205)
Mango	16.42 ± 0.40	26.61 ± 0.47	10.57 ± 0.08	27.12 ± 0.46	19.26 ± 0.62
plátano	13.27 ± 0.84	27.41 ± 0.24	11.48 ± 0.27	31.24 ± 0.28	16.61 ± 0.54

A = cadenas cortas de la molécula de amilopectina (Hizukuri,1986)

B₁ = cadenas cortas de la molécula de amilopectina, que conforman 1 racimo o “cluster”

B₂ = cadenas intermedia de la molécula de amilopectina que conforman 2 racimos o “cluster”

B₃ = cadenas largas de la molécula de amilopectina, que conforman 3 racimos o “cluster”

6.1.4 Características de digestibilidad de los almidones nativos

En el Cuadro 3 se presentan los resultados de la prueba Englyst, los cuales expresan las propiedades de digestión: ADR, ADL y AR, para los almidones de mango y plátano en su estado: sin gelatinizar, gelatinizado y retrogradado por una noche a 4 °C.

Los almidones de mango y plátano, sin gelatinizar, presentan un contenido de AR mayor en comparación con los almidones gelatinizados y retrogradados. El almidón nativo de plátano presenta un contenido de AR 20 % mayor que el almidón de mango, lo cual indica una mayor resistencia a la hidrólisis enzimática por parte del almidón de plátano, debido principalmente a diferencias en la estructura granular. El almidón de plátano presenta gránulos de mayor tamaño en comparación con el almidón de mango (Figura 9), los gránulos pequeños del almidón de mango hacen que se presente una mayor superficie de contacto que los del almidón de plátano, lo cual facilita el ataque por las enzimas α -amilasa y amiloglucosidasa, por lo cual, el contenido de AR del almidón de mango fue menor. El mayor contenido de AR puede deberse a que estos almidones presentan una superficie lisa, lo cual provoca que la digestión de los almidones de mango y plátano se lleve a cabo por exocorrosión, lo cual es una digestión de la parte exterior hacia el centro del gránulo. En el caso del contenido de ADL ambos almidones de frutos tienen contenidos inferiores a lo reportado para almidones de cereales (Zhang *et al.*, 2006a), esto se debe a que los almidones de mango y plátano no presentan poros o canales, los cuales son responsables de la propiedad de digestión lenta en los almidones nativos de cereales.

Cuadro 3. Propiedades de digestión de los almidones nativos de mango y plátano, analizados mediante la prueba de Englyst.

Muestras	ADR³ (%)	ADL³(%)	AR³(%)
Almidón de mango			
Sin Gelatinizar	13.39 ± 0.46 ^d	18.00 ± 1.41 ^a	63.42 ± 1.85 ^b
Gelatinizado ¹	81.27 ± 0.17 ^a	10.60 ± 0.65 ^c	2.94 ± 0.82 ^d
Retrogradado ²	77.17 ± 2.11 ^b	7.05 ± 0.83 ^d	10.59 ± 1.51 ^c
Almidón de plátano			
Sin gelatinizar	4.25 ± 0.41 ^e	5.06 ± 0.55 ^d	86.40 ± 0.83 ^a
Gelatinizado ¹	76.83 ± 1.30 ^b	15.50 ± 2.05 ^b	3.40 ± 0.86 ^d
Retrogradado ²	69.85 ± 1.95 ^c	13.88 ± 1.39 ^b	11.99 ± 0.67 ^c

1. Muestras cocidas por 20 min en un baño de agua hirviendo, con agitación continua, enfriadas a 37 °C y posteriormente analizadas.
2. Muestras cocidas por 20 min en un baño de agua hirviendo, con agitación continua, almacenadas a 4 °C por toda una noche y posteriormente analizadas.
3. Media de 3 réplicas ± desviación estándar. Valores con letras iguales en cada columna no son estadísticamente diferente (p = 0.05).

ADR = almidón de digestión rápida, ADL = almidón de digestión lenta, AR = almidón resistente

El proceso de gelatinización aumentó la digestibilidad de los almidones de mango y plátano expresado como una pérdida de la cantidad de AR (Cuadro 3), esta disminución se debe a la desaparición de la estructura granular debido al proceso de cocción; cuando los almidones son gelatinizados sus propiedades nativas desaparecen y la estructura fina de sus componentes (amilosa y amilopectina) son los responsables de las propiedades de digestión (Zhang *et al.*, 2008a).

Para poder amplificar las diferencias en la velocidad y grado de digestión, se llevó a cabo el almacenamiento de los almidones gelatinizados a una temperatura de 4 °C, por toda una noche. Hay estudios que han demostrado que la amilopectina es la responsable de la propiedad ADL (Benmoussa *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2008b), llevando a cabo la retrogradación de la amilosa (almacenamiento a 4 °C), se llega a conocer la aportación de la molécula de amilopectina sobre la propiedad ADL. En los almidones nativos de mango y plátano retrogradados se observó, un aumento del contenido de AR en comparación con los almidones gelatinizados, este comportamiento se debe a la retrogradación de la molécula de amilosa. Debido a que ambos almidones nativos de mango y plátano presentan un contenido de amilosa similar (Cuadro 1), se puede atribuir que el contenido de AR para los almidones retrogradados no presentaron diferencias estadísticas significativas ($p = 0.05$) (Cuadro 3). Después de la gelatinización del almidón y con el enfriamiento, las moléculas lixiviadas de amilosa se reasocian rápidamente para formar estructuras cristalinas (7 – 10 h), las cuales son resistentes a la digestión, en un proceso llamado retrogradación a corto plazo (Miles *et al.*, 1985). El almacenamiento de los almidones gelatinizados, por una noche (15 h), fue suficiente para que la amilosa completara el proceso de retrogradación.

Existen estudios que han relacionado la estructura de la amilopectina para poder explicar el comportamiento del almidón de digestión lenta. Benmoussa *et al.* (2007) llevaron a cabo estudios de digestibilidad y distribución de longitud de cadena en almidones de arroz de diferentes variedades, logrando establecer una correlación entre la distribución de longitud de cadena y el contenido de ADR y ADL. Los almidones con mayor contenido de ADL presentan mayor cantidad de cadenas largas ($GP > 33$) y cadenas de longitud intermedia ($GP = 13 - 33$), y menor cantidad de cadenas cortas ($GP = 5-12$) en comparación con almidones que presentan contenidos de ADL menores.

Los resultados de distribución de tamaño para los almidones desramificados de plátano y mango, muestran que el almidón de mango presentó un mayor contenido de cadenas cortas (A_1) y menor contenido de cadenas [B_1 , B_2 y B_3 , las cuales según la clasificación de Benmoussa *et al.* (2007) corresponden a cadenas de longitud intermedia y larga], esto en comparación con almidón de plátano. Debido a esta diferencia en la estructura de la amilopectina, es que el almidón de mango presentó un menor contenido de ADL, en comparación con el almidón de plátano. Estos resultados concuerda con lo reportado en almidones de arroz (Benmoussa *et al.*, 2007) y maíz (Zhang *et al.*, 2008b), en donde se reportó la relación de la estructura fina de la amilopectina y la propiedad ADL.

Las propiedades de digestión de los almidones de frutos en su estructura nativa se ven limitadas, lo que actualmente se busca es el incremento de las fracciones ADL y AR, para lograr dichos propósitos los almidones nativos de mango y plátano fueron modificados química y enzimáticamente.

6.2 Propiedades de digestión de almidones de mango y plátano modificados mediante hidrólisis ácida (lintnerización)

6.2.1 Parámetros de la hidrólisis ácida de los almidones de mango y plátano

Los almidones nativos de mango y plátano fueron tratados mediante hidrólisis ácida (HCl 2.2 N), alcanzando diferentes grados de hidrólisis conforme transcurrían los días de reacción. En la Figura 11 se muestran los perfiles de hidrólisis de los almidones de plátano y mango. Se puede observar, en ambos almidones, un patrón de hidrólisis en 2 etapas. La primera etapa, 0 – 7 días de hidrólisis, presenta una velocidad de hidrólisis mayor en comparación con la segunda etapa, 7 – 15 días de hidrólisis (Cuadro 4). Durante la primera etapa de hidrólisis, el almidón de plátano presentó una menor velocidad de hidrólisis en comparación con la velocidad de hidrólisis del almidón de mango. Por otra parte, durante la segunda etapa de hidrólisis, el almidón de plátano presentó una mayor velocidad de hidrólisis en comparación al almidón de mango. La velocidad a la cual los gránulos de almidón son hidrolizados varía dependiendo de la estructura del gránulo de almidón que es atacada por los iones hidronio (H_3O^+). Durante la primera etapa de hidrólisis los iones H_3O^+ atacaron las zonas amorfas de los gránulos de almidón de mango y plátano, es en estas zonas donde se localizan las moléculas de amilosa, las cadenas largas de amilopectina (B_2 , B_3), las cuales conectan diferentes racimos o “clusters”, y los puntos de ramificación de la molécula de amilopectina. Durante la segunda fase de hidrólisis, las partes cristalinas del gránulo de almidón son hidrolizadas, estas zonas están conformadas de las cadenas cortas tipo A_1 y B_1 , de la molécula de amilopectina, estas zonas cristalinas tienen mayor resistencia a la hidrólisis ácida debido a que presentan un empaquetamiento compacto (Robin *et al.*, 1974).

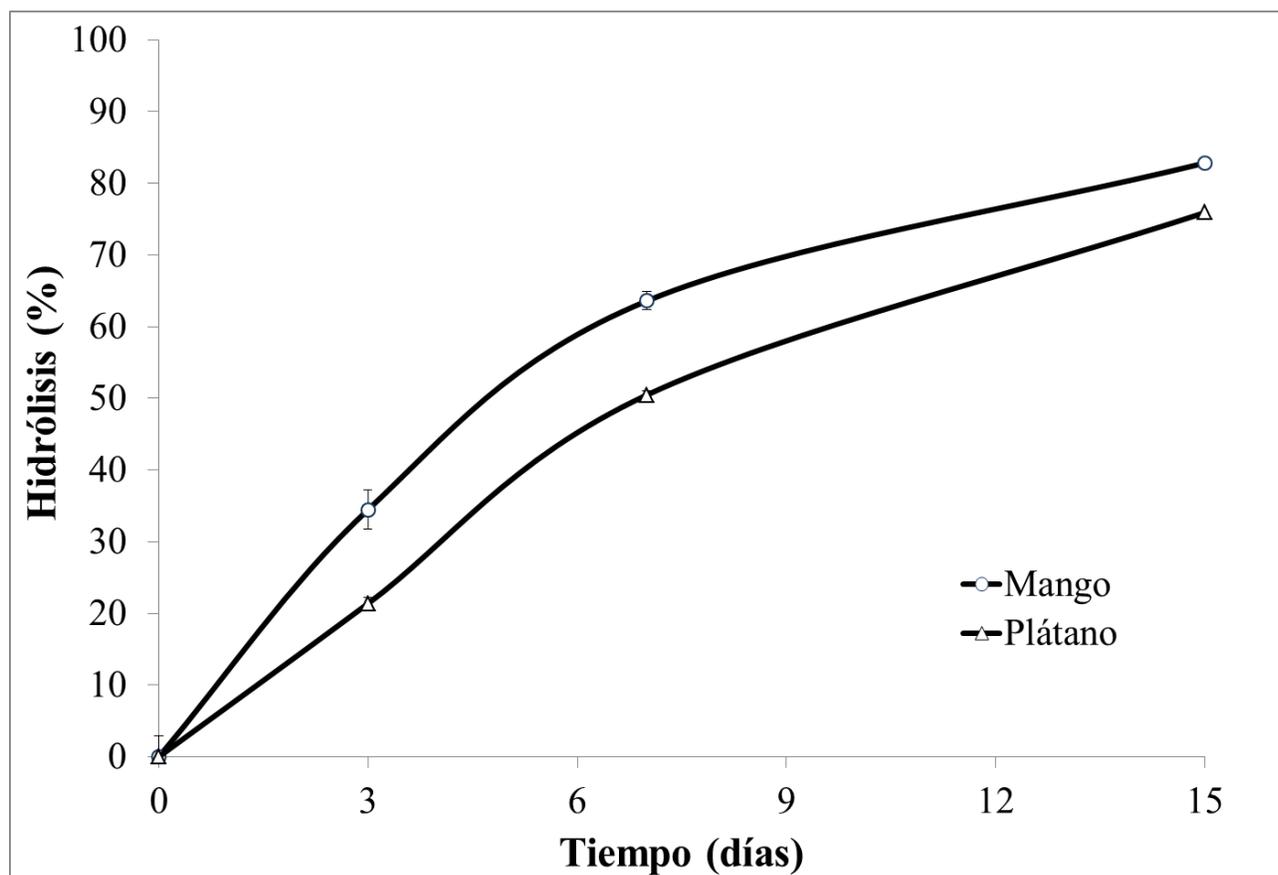


Figura 11. Hidrólisis ácida de los gránulos de almidón de mango (O) y plátano (Δ) tratados mediante ácido clorhídrico (2.2N, 35 °C).

Cuadro 4. Parámetros de velocidad y grado de hidrólisis ácida de los gránulos de almidón de mango y plátano.

Fuente	Velocidad de hidrólisis (% / día)		Grado de hidrólisis (%) a 15 días
	Primera etapa 0 - 7	Segunda etapa 7 - 15	
Mango	9.0	2.4	82.8
Plátano	7.2	3.2	75.9

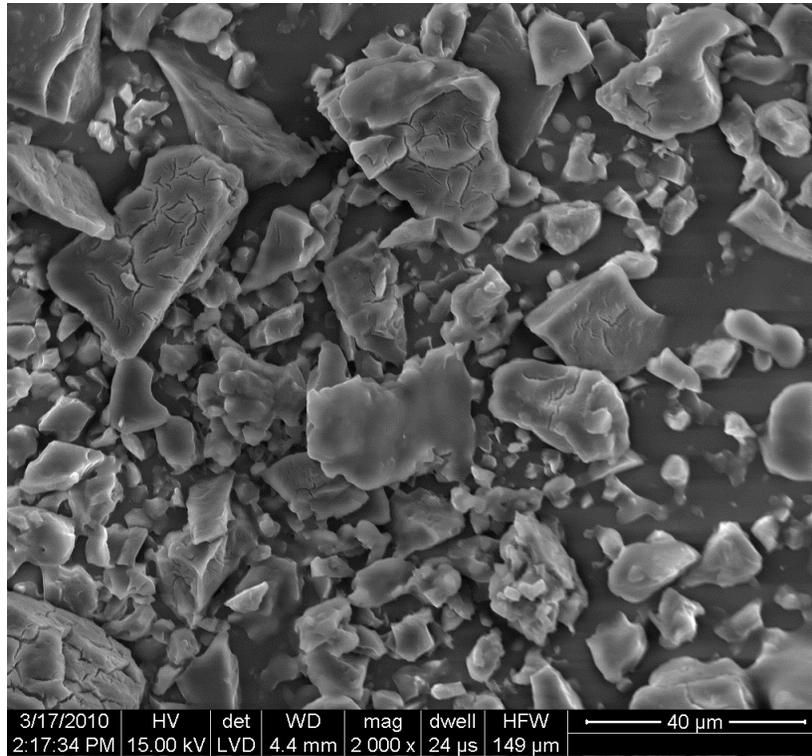
El almidón de mango presentó un mayor porcentaje de hidrólisis a los 3, 7 y 15 días, en comparación al almidón de plátano, estos resultados indicaron que el almidón de plátano es más resistente no tan solo a la digestión (Cuadro 3), sino también a la hidrólisis ácida, en comparación al almidón de mango.

6.2.2 Características morfológicas de los almidones modificados mediante hidrólisis ácida (lintnerización)

Las características morfológicas de los almidones modificados mediante hidrólisis ácida se muestran en la Figura 12. Para comparar ambas características morfológicas se obtuvo el mismo nivel de hidrólisis en ambos almidones, el almidón de plátano alcanzó el 80% hidrólisis a los 21 días de reacción mientras que el almidón de mango alcanzó el 80% de hidrólisis a los 15 días. Como se mencionó, los gránulos de almidón de mango presentaron una mayor superficie de contacto en comparación a los gránulos de almidón de plátano. El tamaño y forma de los gránulos nativos pueden influenciar el patrón de hidrólisis ácida, lo cual fue evidente en los diferentes patrones de hidrólisis presentados por los almidones de mango y plátano (Figura 11). Se ha reportado que la presencia de poros o canales en la superficie de los gránulos así como el tipo de agente químico influyen el patrón de reacción en los almidones nativos (Fannon *et al.*, 2004).

El tratamiento mediante hidrólisis ácida destruyó la estructura granular en los almidones de mango (Figura 12A) y plátano (Figura 12B); con un 80% de hidrólisis se visualizaron pequeños fragmentos y agregados de gran tamaño. Estos agregados son partículas altamente cristalinas, las cuales se generaron por la ruptura de la estructura granular.

A)



B)

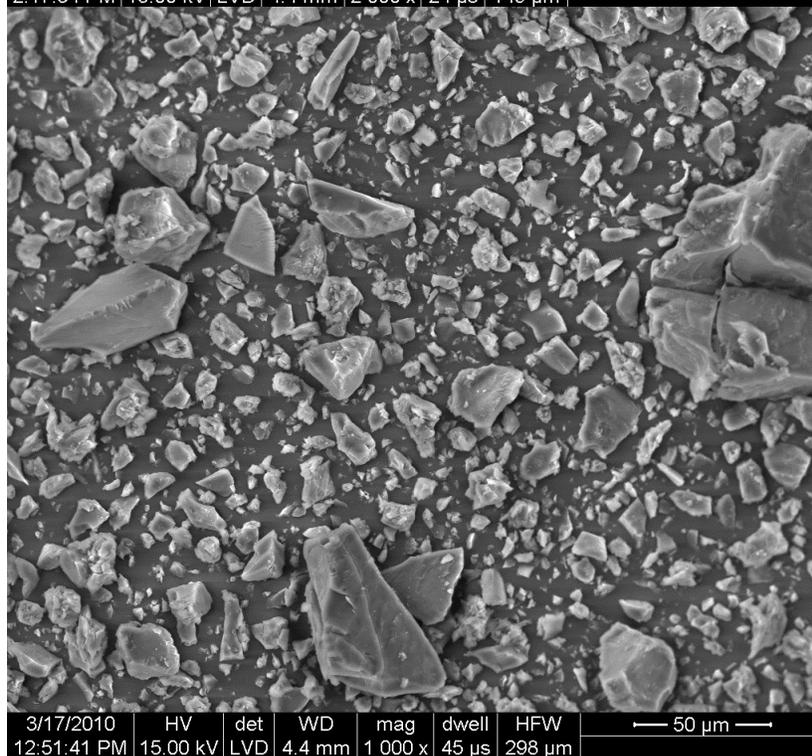


Figura 12. Micrografías electrónicas de barrido de almidones modificados mediante hidrólisis ácida a 80 %: lintner de mango (A) y lintner de plátano (B).

6.2.3 Características estructurales de los almidones de mango y plátano modificados mediante hidrólisis ácida

6.2.3.1 Distribución de tamaño molecular (CLARET-IR)

Los perfiles de distribución de tamaño molecular de los productos de la hidrólisis ácida (lintners) del almidón de mango y plátano se muestran en la Figura 13. En general, el tratamiento ácido remueve las moléculas de amilosa. La amilosa se encuentra en mayor proporción hacia la periferia del gránulo (Jane, 2007) y esta es sensible a la hidrólisis ácida (Zhang *et al.*, 2006a).

Una hidrólisis ácida moderada (3 días de hidrólisis), de los almidones nativos de mango y plátano, llevó a la formación de diferentes fracciones, las cuales probablemente estén constituidas por polímeros de alto peso molecular, cuya estructura se caracterice por la presencia de ramificaciones múltiples. Este tipo de polímeros fueron encontrados en lintners de almidón de maíz ceroso y lintners de almidón de papa (Watanabe y French, 1980). En el caso del lintner de plátano a 3 días de hidrólisis [LP3-(20)] se ve la presencia de residuos a los 40 min de elusión, los cuales han sido asociados a moléculas de amilosa (Figura 13), esto indica que al 20 % de hidrólisis aún se conservan pequeñas trazas de amilosa, y no así para los lintners de mango a 3 días de hidrólisis [LM3-(30)]. A los 7 días de hidrólisis, este material de alto peso molecular fue removido, producto de un mayor porcentaje de hidrólisis alcanzado, con ello se produjo una sola fracción cuyo pico presentaba un $GP = 28$ para LM7-(60) y $GP = 31$ para LP7-(50); conforme la hidrólisis progresó a los 15 días, un segundo pico apareció, presentando un $GP = 16$ para LM15-(80) y un $GP=17$ para LP15-(75), la aparición de este segundo pico indicó que las moléculas de amilopectina fueron partidas en moléculas pequeñas, debido principalmente a que

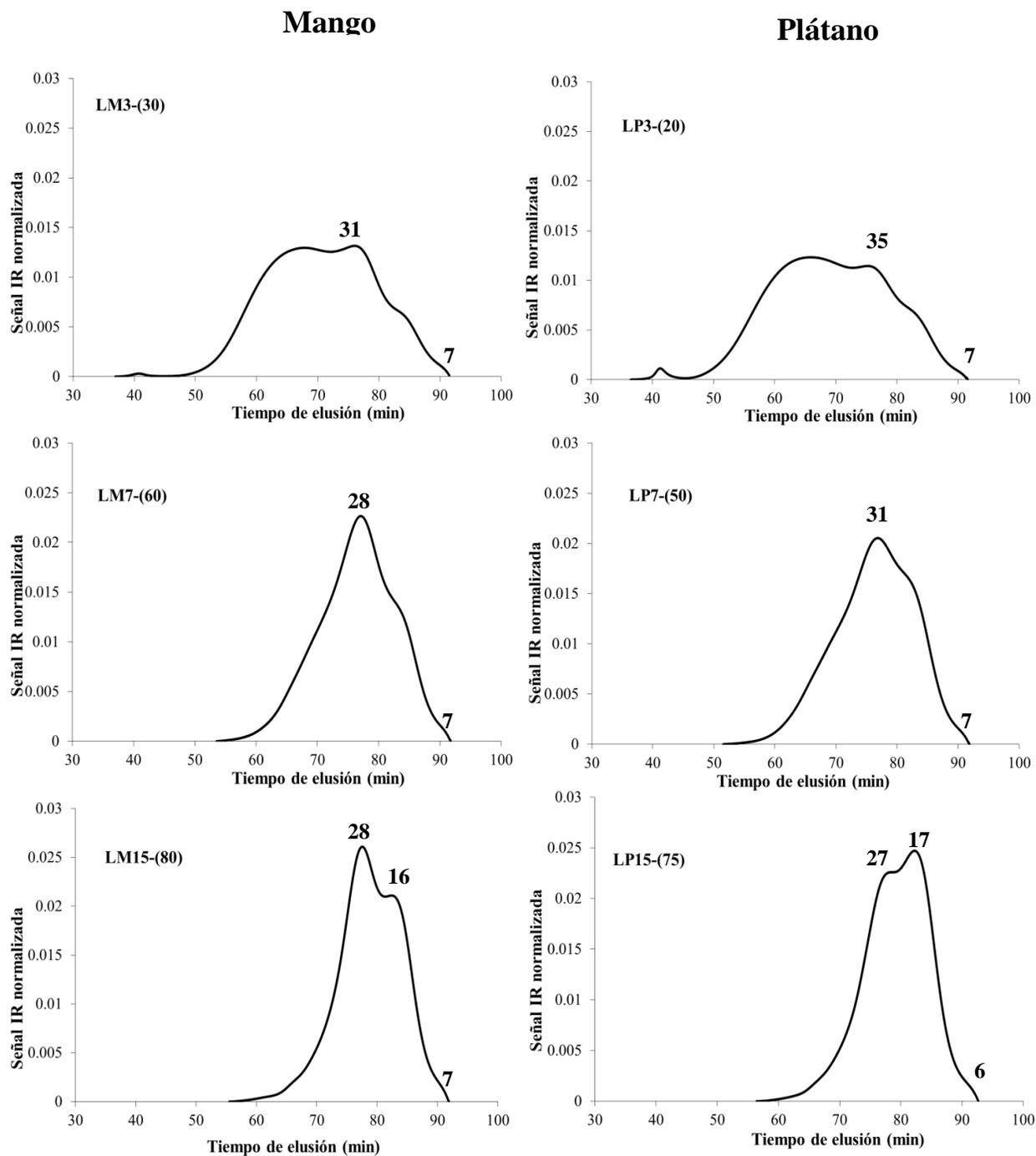


Figura 13. Cromatogramas de CLARET-IR normalizados de lintners de almidón de frutos con 3, 7 y 15 días de hidrólisis. El número en paréntesis representa el grado de hidrólisis alcanzado. LM = lintner de mango, LP = lintner de plátano.

las cadenas largas tipo B2, B3 y B4 de la amilopectina son susceptibles a la hidrólisis ácida (Jane *et al.*, 1997), ya que se sitúan en las zonas amorfas del gránulo.

En la Figura 14 se presenta la distribución de tamaño molecular para los lintners de mango y plátano obtenida a los 15 días de hidrólisis ácida, así también se presenta la distribución de tamaño molecular de los lintners de mango y plátano a los 15 días de hidrólisis ácida desramificados con la enzima isoamilasa. Se puede observar diferencias en la distribución de tamaño molecular de los lintners desramificados y sin desramificar. Para el caso de los lintners sin desramificación, se observaron dos fracciones de diferente GP, la primera fracción se presentó entre el GP=16-17 y la segunda fracción se presentó entre un GP=27-28. Los lintners de mango presentaron mayor cantidad de la fracción 2 en comparación con los lintners de plátano, en este sentido, los lintners de mango presentaron una menor cantidad de la fracción 1 en comparación con los lintners de plátano.

Los perfiles de elusión obtenidos mediante CLARET-IR de los lintner de mango y plátanos tratados por 15 días fueron diferentes cuando se hidrolizaron sus enlaces α -(1 \rightarrow 6). Al llevar a cabo la desramificación de los lintners desapareció la fracción 2, lo cual indicó que los lintners a los 15 días de hidrólisis estaban constituidos de moléculas con una sola ramificación (fracción 2), las cuales fueron hidrolizadas en su totalidad por la enzima isoamilasa, por lo cual, estos lintners estaban constituidos por moléculas lineales (fracción 1) y moléculas con una simple ramificación (fracción 2). La diferencia en la proporción de las dos fracciones indicó que el almidón de mango presenta mayor cantidad de ramificaciones esparcidas en la lámina cristalina, debido a que estas ramificaciones fueron protegidas por el alto empaquetamiento de la lámina cristalina y así escaparon a la hidrólisis ácida. Por su parte el almidón de plátano al presentar un menor contenido de la fracción 2, indicó que la mayoría de sus ramificaciones se

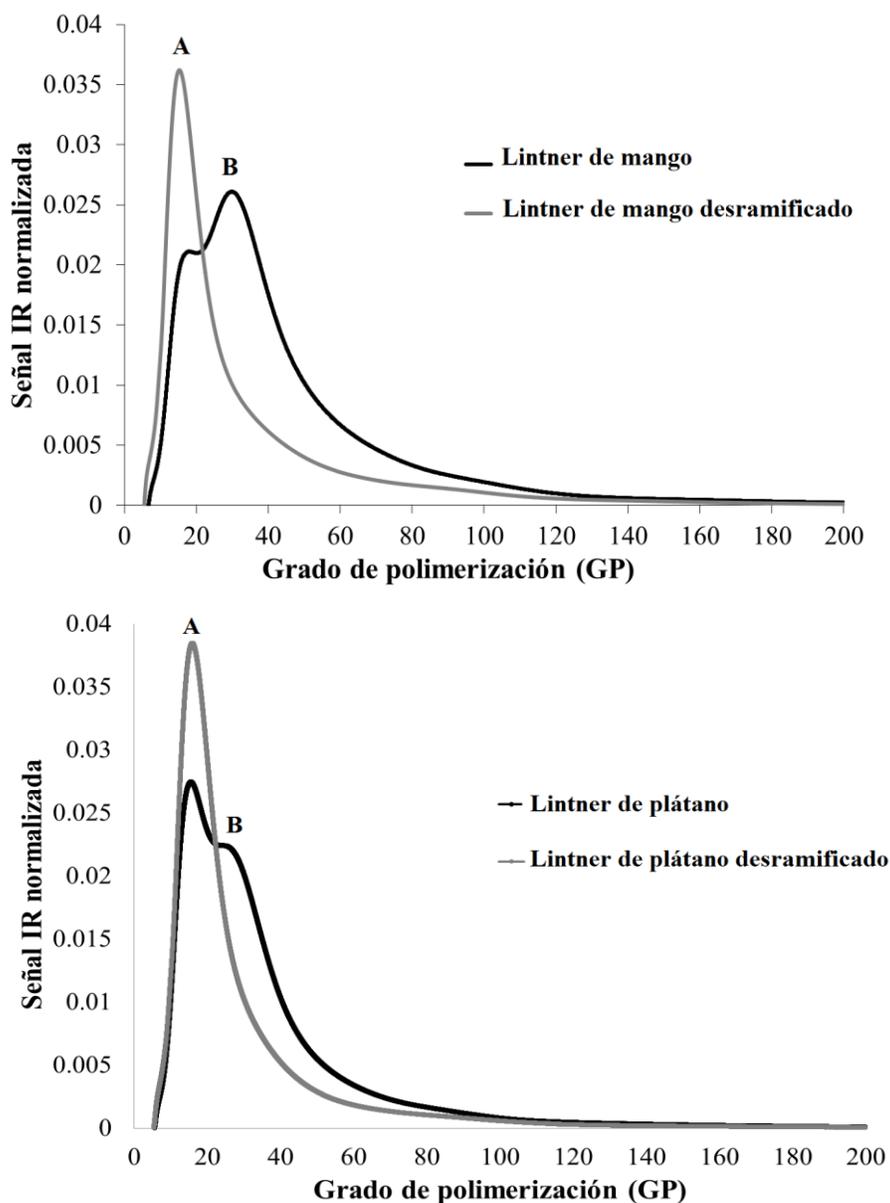


Figura 14. Perfiles normalizados de CLARET-IR de lintners desramificados con isoamilasa y sin desramificar. Los lintners fueron preparados de la hidrólisis de los almidones de mango y plátano a 35 °C. A= Fracción 1 con un GP (16-17), B = Fraccion 2 con un GP (27-28).

encontraban localizadas en la zona amorfa, estas fueron hidrolizadas junto con ella. Este tipo de comportamiento ha sido reportado para algunos almidones de cereales (Jane *et al.*, 1997).

6.2.3.2 Patrón de difracción de rayos X

Los patrones de difracción de rayos X de los almidones de mango y plátano modificados mediante hidrólisis ácida y sus contrapartes nativas se muestran en la Figura 15. Los patrones de difracción de rayos X del almidón nativo de plátano representa un patrón tipo C_B- debido a la presencia de picos de mayor intensidad para el ángulo $2\theta = 17^\circ$ y 23° , los cuales son característicos de un almidón tipo A-, pero la carencia de picos definidos para el ángulo $2\theta = 18^\circ$, hace que este almidón sea similar a un almidón con polimorfismo tipo B-, debido a esto, el almidón de plátano presenta una mayor similitud con los almidones tipo B. Por su parte, el almidón nativo de mango es un almidón tipo C_A-, debido principalmente a que mostro picos de mayor intensidad para el ángulo $2\theta = 17^\circ$ y 23° , sin embargo la presencia del pico, no tan desarrollado para el ángulo $2\theta = 18^\circ$, los cuales son característicos de los almidones con polimorfismo A-. esto hace que este almidón tenga mayor presencia de cristales tipo A- y menor presencia de cristales tipo B.

El tratamiento ácido en los almidones de mango y plátano causó el desarrollo del pico al ángulo $2\theta = 18^\circ$, conforme se aumentaba el tiempo de reacción, a los 15 días de hidrólisis ácida, se notó un cambio completo hacia la morfología tipo A-, este resultado demuestra que los cristales tipo B- presentes en los almidones de mango y plátano fueron hidrolizados en mayor proporción, en comparación con los cristales tipo A-, este comportamiento ha sido reportado

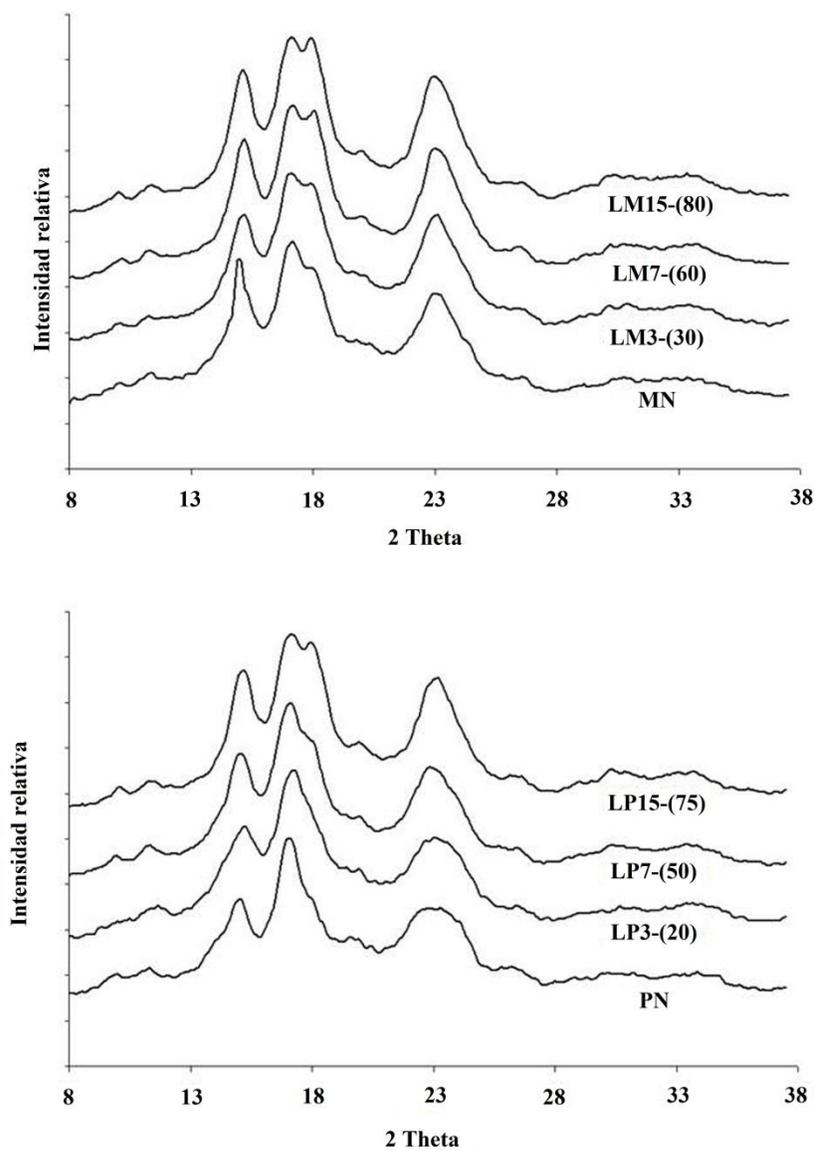


Figura 15. Patrones de difracción de rayos X de almidón nativo de mango (MN) y plátano (PN) y almidón tratados mediante hidrólisis ácida: lintner de mango (LM) y lintner de plátano (LP). El número en paréntesis representa el grado de hidrólisis.

para almidón de tubérculos y leguminosas, los cuales presentan un patrón tipo C- (Wang *et al.*, 2007; 2008).

En el Cuadro 5 se muestra los resultados del porcentaje de cristalinidad obtenido para los almidones nativos y lintners de mango y plátano a diferentes niveles de hidrólisis. El almidón de plátano presentó un mayor porcentaje de cristalinidad en comparación con el almidón de mango. Las características estructurales de dichos almidones son las responsables de las diferencias en la cristalinidad. Una mayor cristalinidad en los almidones nativos representa un mayor contenido de la molécula de amilopectina, la cual es la responsable de la formación de las zonas cristalinas dentro del gránulo de almidón.

Para el caso de los lintners de mango y plátano, el porcentaje de cristalinidad incrementó conforme aumentaba el tiempo de la hidrólisis ácida. El incremento del porcentaje de cristalinidad es causado por la remoción de las zonas amorfas durante la hidrólisis ácida. Algunos autores han postulado que el rompimiento de las cadenas de almidón en las zonas amorfas permite un extenso anillado “annealing”, lo que produce una estructura con mayor cristalinidad (Kainuma y French, 1971). El incremento del arreglo cristalino dentro de los lintners de mango y plátano puede ser el responsable de la parcial o total resistencia al ataque por las enzimas digestivas.

6.2.4 Características de digestibilidad de los almidones de mango y plátano modificados mediante hidrólisis ácida

Cuadro 5. Porcentaje de cristalinidad de almidones nativos y almidones lintnerizados de mango y plátano con diferente grados de hidrolisis.

Muestra^a	Cristalinidad (%)
NM	26.12
LM3-(30)	32.05
LM7-(60)	33.99
LM15-(80)	35.89
NP	27.22
LP3-(20)	30.20
LP7-(50)	31.82
LP15-(75)	36.23

a) NM = almidón nativo de mango, NP= almidón nativo de plátano, LM = lintner de mango, LP = lintner de plátano, número entre paréntesis representa el porcentaje de hidrólisis.

Las propiedades de digestión de los almidones de mango y plátano tratados mediante hidrólisis ácida, analizados sin cocción y mediante el método de Englyst se presentan en el Cuadro 6. El tratamiento ácido incrementó el contenido de ADR (Cuadro 6), en ambos almidones y en todos los niveles de hidrólisis ácida, esto comparado con su contraparte nativa sin gelatinizar (Cuadro 3). Para el caso del almidón de mango, aunque se encontraron diferencias estadísticas significativas ($p = 0.05$) en el contenido de ADL a los 7 días de hidrólisis, esta diferencia no fue muy marcada comparado lo con su contraparte nativa (Cuadro 3). Por lo cual el tratamiento de hidrólisis ácida no cambió el contenido de ADL conforme aumentaron los días de reacción. Este tipo de comportamiento ha sido reportado para lintners de almidón de papa (Zhang *et al.*, 2006b).

Los lintners de almidón de plátano presentaron el mayor contenido de ADL a los 7 días de hidrólisis y esta muestra LP7-(50) presentó el mayor contenido de ADL en comparación con el almidón de mango [LM7-(60)] tratado durante el mismo tiempo de hidrólisis. Así también LP7-(50) presentó un mayor contenido de ADL en comparación con lintners de almidón de papa, los cuales presentaron 16.5 % de ADL (Zhang *et al.*, 2006b), pero menor contenido de ADL en comparación con lintners de maíz, los cuales presentaron 40.1 % (Zhang *et al.*, 2006b). Los lintners de maíz a los 7 días de hidrólisis presentaron 9.1 % de AR, este contenido es menor al obtenido para LP7-(50). A mayores tiempos de hidrólisis una mayor perfección de los residuos cristalinos es alcanzada, lo cual fue acompañado de un incremento del contenido de AR.

La organización del gránulo de almidón tiene diferentes niveles de estructura relacionados a la hidrólisis enzimática: estructura granular, estructura supramolecular y estructura molecular. El tratamiento de hidrólisis ácida del almidón de plátano por 3 días generó

Cuadro 6. Resultados de la prueba de Englyst para lintners de mango y plátano sin cocción y con diferente porcentaje de hidrólisis ácida.

Muestra^b	ADR^a (%)	ADL^a (%)	AR^a (%)
Lintners de mango			
LM3-(30)	64.0 ± 0.7 ^a	17.9 ± 0.9 ^c	18.0 ± 0.6 ^{c,d}
LM7-(60)	64.3 ± 2.3 ^a	15.1 ± 1.6 ^d	20.6 ± 2.9 ^c
LM15-(80)	56.4 ± 3.9 ^b	18.9 ± 1.2 ^c	24.6 ± 3.6 ^b
Lintner de plátano			
LP3-(20)	15.1 ± 0.4 ^d	14.6 ± 0.2 ^d	70.4 ± 0.4 ^a
LP7-(50)	48.4 ± 3.6 ^c	35.4 ± 1.3 ^a	16.2 ± 2.4 ^d
LP15-(75)	51.0 ± 0.7 ^c	27.0 ± 1.0 ^b	21.9 ± 1.0 ^{b,c}

a) Los resultados son medias ± desviación estándar de 3 réplicas. Diferencias estadísticas significativas en cada columna son expresadas con diferente letra (p = 0.05). ADR=almidón de digestión rápida, ADL= almidón de digestión lenta, AR=almidón resistente.

b) LM= lintner de mango, LP= lintner de plátano. Numero en paréntesis representa el grado de hidrólisis en la muestra.

residuos con alto contenido de AR (70.4 %), sólo un poco menor que su contraparte nativa. En este punto de la hidrólisis, el alto contenido de AR es aún una característica de la estructura granular la cual incluye en la forma y tamaño de los gránulos, la estructura granular del almidón de plátano demostró una alta resistencia a la hidrólisis ácida (20 % de hidrólisis en 3 días de reacción). Existen estudios de microscopia en almidones de chícharo donde la hidrólisis ácida (bajo las mismas condiciones de este estudio) durante 2 días, aún conservó la estructura granular (Wang *et al.*, 2008). Los gránulos de almidón nativo de plátano presentaron características morfológicas parecidas a la de los gránulos de chícharo (Wang *et al.*, 2008).

A los 7 días de hidrólisis ácida, el almidón de plátano alcanzó 50 % hidrólisis, se observó un incremento del contenido de ADL (Cuadro 6), conforme el tiempo de reacción alcanzó los 15 días de reacción, un incremento en la cristalinidad relativa fue observado (Cuadro 5), dicho incremento (de 7 a 15 días) está en relación con el aumento del contenido de AR, la estructura supramolecular es la responsable de este comportamiento. En este punto de la hidrólisis (7 días), existe un pérdida total de la estructura granular, expresado como una disminución notable del contenido de AR, en comparación con los lintners de plátano a los 3 días de hidrólisis; sin embargo, los residuos formados aún pueden tener material parcialmente amorfo, el cual es más fácil de hidrolizar por las enzimas digestivas y podrían generar el incremento observado en la fracción ADL. A los 15 días de hidrólisis, la cristalinidad relativa incrementó (debido a la remoción de las zonas amorfas), y el contenido de ADL disminuyó en proporción a este incremento en la cristalinidad, acompañado de un incremento en el contenido de AR.

Los lintners proveen información de la influencia de la estructura cristalina sobre la hidrólisis enzimática, en ausencia de lámina amorfa, obtenido con la hidrólisis de los puntos de ramificación α -(1 \rightarrow 6) y las cadenas tipo B2, B3, B4 de la molécula de amilopectina, se ve

disminuida la accesibilidad de las enzimas α -amilasa y amiloglucosidasa hacia los residuos cristalinos, estas zonas amorfas permitían a las enzimas digestivas penetrar hacia las estructuras internas más fácilmente. Esta diferencia en la estructura se puede relacionar con la digestión, La muestra de mango LM15-(80) a los 15 días de hidrólisis presentó una menor cantidad de ADL en comparación con LP15-(75) (Cuadro 6), mientras que el LM15-(80) presentó una mayor proporción de polímeros con una sola ramificación en comparación con LP15-(75) (Figura 14), la digestibilidad fue menor en el lintner de mango debido a la presencia de una mayor cantidad de cadenas con una sola ramificación, esto debido a la dificultad para las enzimas digestivas de hidrolizar los enlaces α -(1 \rightarrow 6).

6.2.5 Características térmicas de los almidones de mango y plátano modificados mediante hidrólisis ácida

Las características térmicas de los almidones nativos y almidones lintnerizados de mango y plátano se muestran en el Cuadro 7. El almidón de mango no presentó diferencias estadísticas significativas ($p = 0.05$) en la entalpia (ΔH) de gelatinización, comparándolo con los lintners de 3, 7 y 15 días de hidrólisis ácida, mientras que el almidón de plátano mostró una disminución en la primera etapa de hidrólisis (0-7 días) seguida por un incremento en la segunda etapa de hidrólisis (7-15 días). Ambos almidones de frutas presentaron una temperatura pico (T_p) de gelatinización menor durante la primera etapa de hidrólisis en comparación con su contraparte nativa ($p = 0.05$).

Jacobs *et al.* (1998) propusieron que la separación del material amorfo del material cristalino causa un incremento en la T_p de gelatinización de los almidones lintnerizados de

Cuadro 7. Características térmicas de almidones nativos y lintnerizados con diferente porcentaje de hidrólisis. T_p = temperatura pico; ΔH = cambio de entalpia y T_f-T_i = intervalo de temperatura.

Muestra^{a,b}	T_p (°C)	ΔH (J/g)	T_f-T_i (°C)
NM	69.73 ± 0.34^g	11.72 ± 0.52^b	15.40 ± 0.55^f
LM3-(30)	67.60 ± 1.33^h	$10.39 \pm 0.57^{c,d}$	49.35 ± 1.59^a
LM7-(60)	82.48 ± 0.23^d	$10.03 \pm 0.88^{c,d}$	45.92 ± 0.69^b
LM15-(80)	85.16 ± 0.21^c	$11.01 \pm 0.62^{b,c}$	43.09 ± 0.20^d
NP	74.98 ± 0.001^e	13.08 ± 0.31^a	16.14 ± 0.69^f
LP3-(20)	71.13 ± 0.23^f	8.64 ± 0.66^e	30.12 ± 0.22^e
LP7-(50)	87.31 ± 0.37^b	9.82 ± 0.33^d	50.11 ± 0.44^a
LP15-(75)	89.46 ± 0.29^a	13.34 ± 0.52^a	44.46 ± 0.55^c

a) Los resultados son la media \pm desviación estándar de 3 réplicas. Letras diferentes en cada columna representan diferencias estadísticas significativas. ($p = 0.05$).

b) NM = Almidón nativo de mango, NP = almidón nativo de plátano. LM = lintner de mango, LP= lintner de plátano. El número entre paréntesis representa el grado de hidrólisis en la muestra.

almidón de maíz. Cuando los materiales amorfos y cristalinos se encuentran organizados, como es el caso de los almidones nativos, esto causa un efecto desestabilizador sobre la lámina cristalina y una fusión cooperativa entre el material amorfo y cristalino. El tratamiento ácido causa la remoción del material amorfo y es por ello que los residuos resistentes funden a una T_p de gelatinización mayor. Sin embargo, para los almidones de mango y plátano a 3 días de hidrólisis, algunos remanentes de material amorfo (fragmentos de amilosa) podrían estar presentes, y para el caso del almidón de plátano, la estructura granular aun es preservada hasta cierto grado, esto podría estar causando la disminución de T_p de gelatinización.

Después de 7 días de hidrólisis de las zonas amorfas, la amilosa y los puntos de ramificación de la amilopectina son hidrolizados, por lo cual los cristales son separados y ya no son destabilizados por las zonas amorfas (Hoover, 2000), como consecuencia los lintners de los frutos de mango y plátano, a los 7 días hidrólisis, funden a una T_p de gelatinización mayor.

El ΔH de gelatinización está asociado con la disociación de las dobles hélices (Cook y Gidley, 1992). El almidón de plátano, a los 3 días de hidrólisis ácida presentó una disminución de la ΔH de gelatinización, esto comparándolo con su contraparte nativa, lo cual indicó un menor contenido de dobles hélices. A los 7 y 15 días de hidrólisis, la ΔH de gelatinización incrementó, lo que significa una mayor cantidad dobles hélices son producidas, o que estas mismas alcanzaron una mayor perfección, esto debido a la hidrólisis de la molécula de amilosa y a las cadenas de longitud larga parcialmente hidrolizadas de la molécula de amilopectina.

Existe un incremento en el intervalo de la temperatura ($T_f - T_i$) de gelatinización conforme aumenta el tiempo de hidrólisis, esto en comparación con sus contrapartes nativas. Jenkins y

Donald (1997) reportaron resultados similares. Este incremento resulta de la reducción de la fracción amorfa, lo que lleva a un incremento en la cristalinidad relativa del almidón residual.

Los parámetros térmicos de retrogradación obtenidos para los almidones nativos y lintners de mango y plátano se muestran en el Cuadro 8. La temperatura pico (T_p) de retrogradación de todos los lintners de mango y plátano incrementaron conforme los días de hidrólisis aumentaron. La endoterma de un gel retrogradado es la endoterma de recristalización de la amilopectina (Eerlingen *et al.*, 1994).

El incremento de entalpia (ΔH) de retrogradación de un gel formado a partir de almidón de mango y plátano modificados mediante hidrólisis ácida incrementó en comparación con su contraparte nativa. Sin embargo, el grado de hidrólisis afectó la retrogradación del almidón en una forma diferente dependiendo de la fuente botánica. Se ha sugerido que el incremento en la retrogradación de almidones tratados mediante hidrólisis ácida se debe a un incremento en la movilidad de las cadenas pequeñas y a una disminución en los puntos de ramificación de la amilopectina (Atichokudomchai *et al.*, 2002).

En los lintners de mango y plátano, una alta concentración de residuos de cadenas cortas, debido a la hidrólisis de las moléculas de amilosa y cadenas largas de la molécula de amilopectina, generó una retrogradación con la formación de dobles hélices con mayor perfección y estabilidad. Por lo cual, un incremento en el tiempo de hidrólisis de los almidones de mango y plátano modificados mediante hidrólisis ácida, incrementó la proporción de cadenas de longitud corta, las cuales son capaces de formar dobles hélices, resultando en los incrementos de T_p de retrogradación.

Cuadro 8. Características térmicas de almidones nativos y lintnerizados retrogradados por 7 días con diferente porcentaje de hidrólisis. T_p = temperatura pico y ΔH = incremento de la entalpia.

Muestra ^{a,b}	T_p (°C)	ΔH (J/g)
NM	53.87 ± 0.57^d	5.81 ± 0.77^e
LM3-(30)	56.57 ± 0.30^c	9.28 ± 0.48^b
LM7-(60)	58.24 ± 0.16^b	9.62 ± 0.62^b
LM15-(80)	60.66 ± 0.36^a	11.25 ± 0.70^a
NP	53.84 ± 0.60^d	8.00 ± 0.53^d
LP3-(20)	55.77 ± 0.31^c	$8.23 \pm 0.21^{c,d}$
LP7-(50)	60.09 ± 0.40^a	$9.16 \pm 0.73^{b,c}$
LP15-(75)	60.91 ± 0.90^a	$9.16 \pm 0.04^{b,c}$

a) Los resultados son la media \pm desviación estándar de 3 réplicas. Letras diferentes en cada columna representan diferencias estadísticas significativas. ($p = 0.05$).

b) NM = Almidón nativo de mango, NP = almidón nativo de plátano., LM = lintner de mango, LP= lintner de plátano. El número entre paréntesis representa el grado de hidrólisis.

Los lintners de mango y plátano no presentaron T_p de gelatinización mayores a 100 °C, lo cual significa que los lintners podrían ser utilizados en productos que no son cocidos durante la preparación y/o con una ligera cocción antes de ser consumidos, para que pueda conservar las propiedades de digestión. Para conocer el efecto sobre la digestibilidad de estos lintner sobre algún alimento, la sustitución en productos alimenticios debería ser investigada.

6.3 Propiedades de digestión de almidones modificados mediante hidrólisis enzimática (desramificación)

6.3.1 Viscosidad de los almidones nativos de mango y plátano

En la Figura 16 se muestran los perfiles de viscosidad de los almidones nativos de mango y plátano, obtenidos mediante un analizador rápido de la viscosidad (ARV). Para el caso de los almidones de mango y plátano al 10% (bs), se pueden observar diferentes patrones característicos de este tipo de análisis. Se muestra una viscosidad pico (VP) durante los primeros 3 a 5 min de análisis, este incremento en la viscosidad se alcanza cuando todos los gránulos de almidón han hinchado por completo debido al desdoblamiento de las dobles hélices de la amilopectina, provocado por el aumento de la temperatura. Posteriormente se observó una disminución de la viscosidad de recuperación (VR), consecuencia de la desintegración de los gránulos hinchados, ocasionado por el cizallamiento de la propela del ARV, finalmente durante la disminución de la temperatura del análisis (50 °C), se observó un aumento de la viscosidad (VF) como consecuencia de la reasociación de las cadenas de amilosa lixiviada.

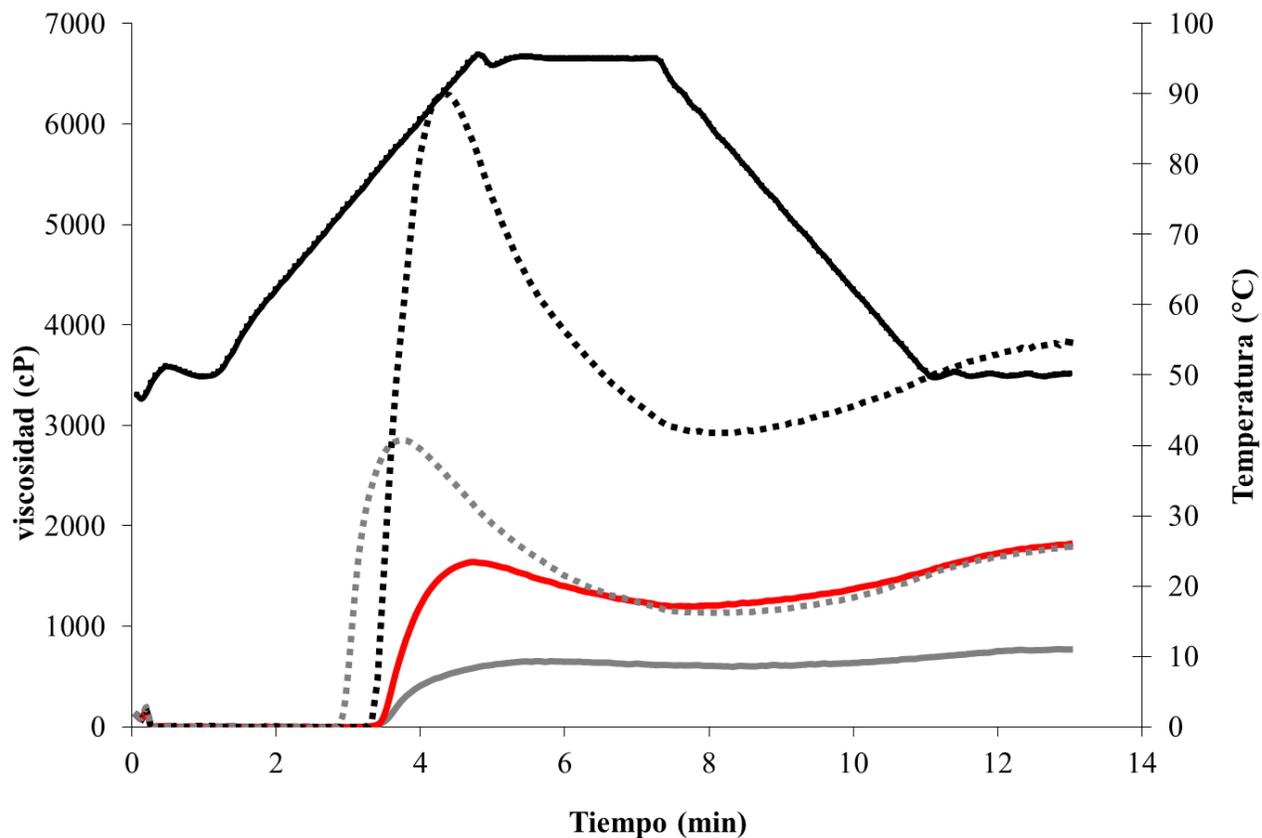


Figura 16. Perfiles de viscosidad de los almidones de mango y plátano: prueba y error para obtener viscosidades similares en ambos almidones. (.....) Almidón de plátano 10% bs, (.....) almidón de mango 10 % bs, (—) almidón de plátano 5% bs, (—) almidón de plátano 6.6 % bs.

En la Figura 16 se pueden observar los perfiles de viscosidad para el almidón de plátano a diferente concentración de sólidos. Debido a que el almidón de plátano presentó valores de viscosidad (VP, VR y VF) mayores en comparación con el almidón de mango, y para evitar que la hidrólisis de los enlaces α -(1 \rightarrow 6) se viera afectada por un efecto de barrera debido a esta alta viscosidad del almidón de plátano, se decidió establecer una misma viscosidad en ambos almidones, para esto se utilizó un análisis de prueba y error. La concentración a la cual el almidón de plátano alcanzó la misma viscosidad final en comparación con el almidón de mango (10% bs) fue a 6.6 % bs.

6.3.2 Porcentaje de desramificación de los almidones de mango y plátano

Los almidones de mango y plátano fueron hidrolizados con la enzima pululanasa a diferentes tiempos de hidrólisis para poder modificar su digestibilidad. En la Figura 17 se muestran los resultados del valor reductor obtenido a 0, 4, 8, 12 y 24 h de hidrólisis enzimática. El valor reductor obtenido se relaciona con el número de grupos reductores formados en los almidones por la hidrólisis de los enlaces α -(1 \rightarrow 6).

Para ambos almidones, se observó un patrón de desramificación en 3 etapas (Figura 17). La primera etapa se encontró entre las 0 y 4 h, donde un rápido incremento del valor reductor fue calculado. La segunda etapa se encontró entre las 4 y 12 h, donde se observó un cambio lento en el valor reductor. El valor reductor presentó una platea después de las 12 h de hidrólisis. Con el valor reductor no se encontraron diferencias estadísticas significativas ($p=0.05$) durante las primeras 4 horas de desramificación, se presentaron diferencias a las 8 h de desramificación, lo

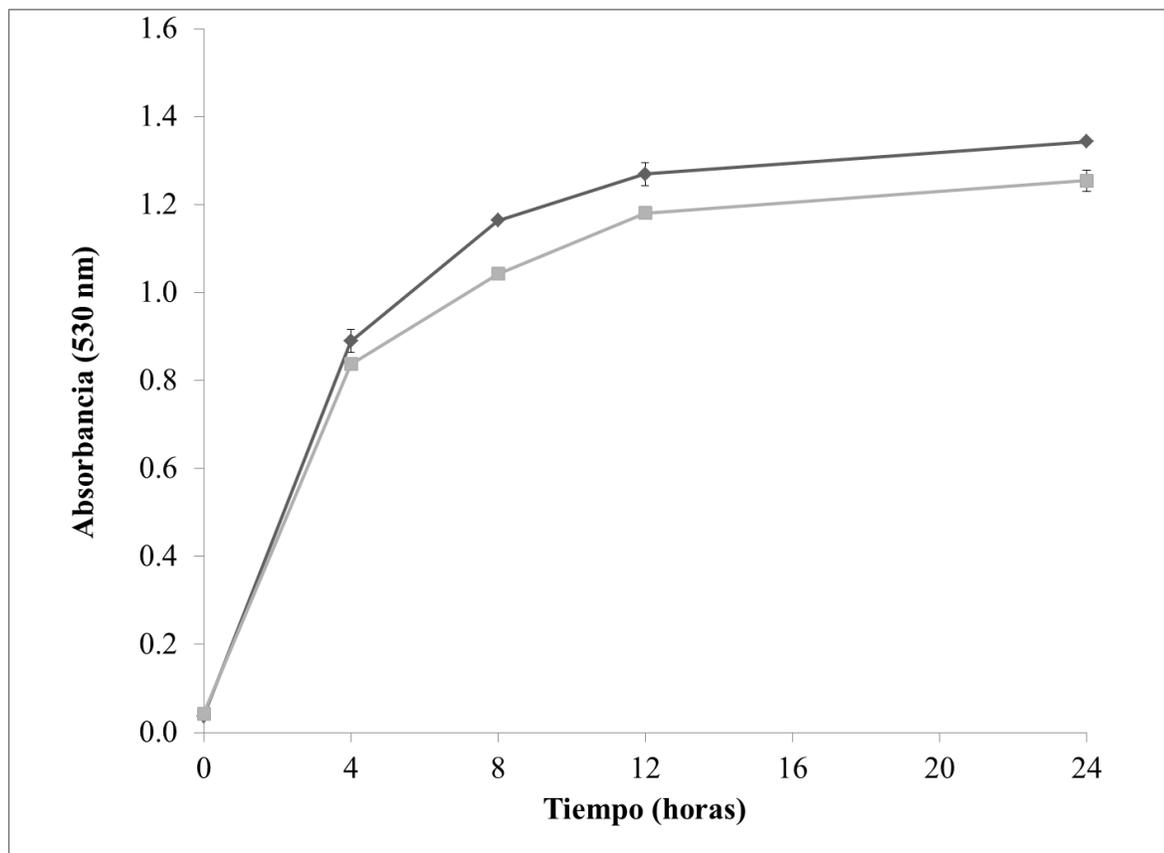


Figura 17. Valor reductor de los almidones de mango y plátano desramificados con la enzima pululanasa a diferentes tiempos de reacción: (◆) almidón de mango, (■) almidón de plátano

cual indica diferencias estructurales en la molécula de amilopectina, las muestras podrían estar conformadas de diferente contenido de grupos reductores y en consecuencia una cantidad diferente de cadenas lineales. La cantidad y tamaño de dichas ramificaciones son importantes para la formación de interacciones, las cuales afectan la digestibilidad del almidón. El porcentaje de hidrólisis (Cuadro 9) para ambos almidones fue similar después de las 8 horas de hidrólisis.

6.3.3 Efecto del tiempo de desramificación sobre la digestibilidad de los almidones de mango y plátano

En el Cuadro 10 se muestran los resultados de la prueba de Englyst para la determinación de las propiedades de digestión de los almidones de mango y plátano hidrolizados por la enzima pululanasa durante 0, 4, 8, 12 y 24 h. En general, se observó en ambos almidones que las muestras sin desramificar (0 h de desramificación) son hidrolizadas rápidamente por las enzimas α -amilasa y amiloglicosidasa, lo cual cambia cuando se aumenta el tiempo de desramificación, esto genera una disminución de la digestibilidad, expresado como un decremento del contenido de ADR.

El contenido de ADL incrementó cuando el tiempo de desramificación aumentó, alcanzando un máximo a las 8 h (83% grado de desramificación) para el almidón de mango, y 4 h (67% grado de desramificación) para el almidón de plátano. Posteriormente, el contenido de ADL disminuyó, mientras que el contenido de AR incrementó conforme el almidón quedaba totalmente desramificado (24 h de desramificación), esta tendencia es similar a lo reportado por Shin *et al.* (2004) y Guraya *et al.* (2001).

Cuadro 9. Porcentaje de desramificación de los almidones de mango y plátano.

Tiempo de desramificación (h)	Almidón de mango		Almidón de plátano	
	Valor reductor (Absorbancia) ¹	Desramificación (%) ²	Valor reductor (Absorbancia) ¹	Desramificación (%) ²
0	0.037 ± 0.002 ^f	0	0.043 ± 0.002 ^f	0
4	0.889 ± 0.044 ^e	65	0.837 ± 0.014 ^e	66
8	1.164 ± 0.001 ^{c,d}	86	1.021 ± 0.039 ^d	81
12	1.269 ± 0.045 ^{a,b}	94	1.180 ± 0.019 ^{c,d}	94
24	1.342 ± 0.008 ^a	100	1.254 ± 0.042 ^{b,c}	100

1.- Valores medios de 3 réplicas ± error estándar. Letras diferentes representan diferencias estadísticas significativas (p = 0.05).

2.- Calculado de la formula $(R_x - R_{nativo}) / (R_{máximo} - R_{nativo}) \times 100$, donde R_x es el valor reductor de a un tiempo de desramificación específico, R_{nativo} es el valor reductor del almidón nativo y $R_{máximo}$ es el valor reductor de la muestra desramificada por 24 h.

Cuadro 10. Efecto del tiempo de desramificación sobre las propiedades de digestión¹ de los almidones de mango y plátano.

Tiempo de desramificación (h)	ADR² (%)	ADL² (%)	AR² (%)
Almidón de mango			
0	78.1 ± 1.9 ^a	8.3 ± 2.0 ^f	13.7 ± 1.5 ^f
4	68.1 ± 1.9 ^b	21.3 ± 0.7 ^b	10.6 ± 2.6 ^g
8	58.0 ± 1.5 ^{c,d}	26.5 ± 1.3 ^a	15.5 ± 0.7 ^f
12	59.5 ± 1.5 ^c	19.7 ± 0.6 ^{b,c}	20.8 ± 1.8 ^e
24	59.6 ± 0.5 ^c	17.0 ± 1.8 ^d	22.7 ± 2.5 ^{d,e}
Almidón de plátano			
0	69.26 ± 1.25 ^b	14.54 ± 1.22 ^e	16.19 ± 2.05 ^f
4	55.87 ± 2.07 ^d	19.15 ± 0.51 ^c	24.98 ± 1.56 ^d
8	51.42 ± 0.88 ^e	16.33 ± 0.60 ^{d,e}	32.25 ± 0.65 ^c
12	47.61 ± 1.54 ^f	14.62 ± 0.87 ^e	37.78 ± 0.75 ^b
24	45.88 ± 0.86 ^f	10.09 ± 0.65 ^f	44.03 ± 1.47 ^a

1. Muestras cocidas por 20 min en un baño de agua hirviendo con agitación continua, enfriadas a 37 °C y posteriormente analizadas.
2. Media de 3 réplicas ± desviación estándar. Letras diferentes entre columnas significan diferencias estadísticas significativas. ADR = almidón de digestión rápida, ADL = almidón de digestión lenta, AR= almidón resistente.

Entre ambos almidones de frutos, el almidón de mango presentó el mayor contenido de ADL (26.5 %) mientras que el almidón de plátano presentó el mayor contenido de AR (44.03%). Estas diferencias en su digestibilidad se deben principalmente a las diferencias estructurales alcanzadas a los diferentes tiempos de hidrólisis, la estructura fina de los constituyentes del almidón (distribución de longitud de cadena de la amilopectina y contenido de amilosa). Estas características afectan el proceso de retrogradación durante el almacenamiento de las muestras. (Yao *et al.*, 2002; Hoover, 1995).

Gidley y Bulpin, (1989), estudiaron la recristalización de amilosa sintética en un sistema acuoso llegando a establecer que existen dos procesos llevados a cabo, el primero de ellos la precipitación de las moléculas favorecido por cadenas de longitud corta (GP= 40 - 110) y el segundo, la gelificación favorecido por cadenas de longitud larga (GP = 1100) y una combinación de ambos procesos se da con cadenas intermedias (GP = 250 -660). Cuando se enfría una solución que presenta polímeros de cadenas de longitud larga, se lleva a cabo un mayor entrecruzamiento el cual genera una red macromolecular que eventualmente resulta en gelificación; si por el contrario los polímeros en solución, en su mayoría son cadenas de longitud corta, no se llevará a cabo el entrecruzamiento y predominará la alineación de cadenas, un proceso seguido de agregación lateral, el cual eventualmente lleva a la generación de precipitados; la agregación lateral se debe principalmente a la formación de dobles hélices. Estas dobles hélices posteriormente se agregan para formar arreglos cristalinos, los cuales son resistentes a la digestión (Jane y Robyt, 1984).

Para el caso del almidón de plátano con 24 h de desramificación (100% de desramificación, Cuadro 9), al tener menor contenido de polímeros lineales de longitud larga (16.61 %), obtenido a partir de la distribución de tamaño molecular analizado mediante

CLARET-RI (Cuadro 2), se llevó a la formación de precipitados, los cuales generaron una mayor cantidad de AR en comparación con el almidón de mango desramificado por 24 h, el cual tiene mayor contenido de polímeros de tamaño molecular mayor (19.26%, Cuadro 2). El contenido de AR obtenido mediante la desramificación de los almidones de mango y plátano, utilizando la enzima pululanasa, fue inferior a lo reportado para almidones cerosos (Cai *et al.*, 2010; Shin *et al.*, 2004), la presencia de la red entrecruzada de amilosa en los almidones desramificados de mango y plátano dificulta a las cadenas lineales obtenidas mediante la desramificación, llevar a cabo la formación de precipitados, debido a esto aumentó la digestibilidad en comparación con los almidones que carecen de amilosa, donde los precipitados son generados en su totalidad. La ausencia de amilosa lleva a la formación de precipitados que son resistentes a la hidrólisis enzimática.

En cuanto a la propiedad de digestión lenta, cuando los almidones de mango y plátano desramificados son sometidos a cocción, estos materiales retrogradan fácilmente. La retrogradación de las cadenas de almidón (empaquetamiento en dobles hélices) se dificulta debido a la presencia de material que no ha sido desramificado, lo cual lleva a la formación de dobles hélices imperfectas. Esta particularidad da como resultado estructuras menos densas las cuales poseen regiones amorfas y que sólo puedan ser digeridas lentamente. Por lo cual, a 8 h de desramificación para el caso del almidón de mango y 4 h de desramificación para el caso del almidón de plátano, se forma mayor contenido de ADL y menor contenido de AR en comparación con los almidones completamente desramificados.

6.3.4 Efecto de la temperatura de almacenamiento sobre la digestibilidad de los almidones de mango y plátano desramificados

En el Cuadro 11 se muestra el efecto de la temperatura de almacenamiento sobre la digestibilidad de los almidones de mango y plátano desramificados por 8 y 4 h, respectivamente. El almacenamiento de los almidones desramificados a diferentes temperaturas dio como resultado diferentes propiedades de digestión. Para el caso del almidón de mango desramificado por 8 h, almacenado por 3 días a -40 °C generó un alto contenido de ADR en comparación con los almidones de mango desramificado por 8 h y almacenados a 4 °C y a 40 °C, los cuales tuvieron un menor contenido de ADR. Esta misma tendencia se presentó para el almidón de plátano desramificado por 4 h, conforme aumentaba la temperatura de almacenamiento, el contenido de ADR disminuyó.

En cuanto a la propiedad ADL, el almidón de mango almacenado a -40 °C presentó un contenido de 13.7 %, el cual aumentó, teniendo un máximo a los 4 °C y posteriormente se presentó una disminución a los 40 °C. Este comportamiento fue similar al encontrado en el almidón de plátano desramificado por 4 h y almacenado por -40 °C, 4 °C y 40 °C. El almidón de mango presentó el mayor contenido de ADL.

El contenido de AR, en el almidón de plátano incrementó con el aumento de la temperatura de almacenamiento. El máximo contenido de AR fue alcanzado a los 40 °C, para ambos almidones desramificados y estos no presentaron diferencias estadísticas significativas ($p = 0.05$).

Cuadro 11. Efecto de la temperatura de almacenamiento sobre las propiedades de digestión de los almidones de mango y plátano desramificados por 8 y 4 h, respectivamente.

Temperatura de almacenamiento (°C)	ADR ² (%)	ADL ² (%)	AR ² (%)
Almidón desramificado de mango¹			
-40	61.7 ± 0.4 ^b	13.7 ± 3.3 ^c	24.5 ± 3.5 ^b
4	58.0 ± 1.5 ^{c,d}	26.5 ± 1.3 ^a	15.5 ± 0.7 ^c
40	53.8 ± 1.3 ^e	8.6 ± 0.2 ^d	37.7 ± 1.5 ^a
Almidón desramificado de plátano¹			
-40	65.2 ± 2.0 ^a	12.3 ± 2.0 ^{c,d}	22.4 ± 2.1 ^b
4	55.9 ± 2.1 ^{d,e}	19.2 ± 0.5 ^b	25.0 ± 1.6 ^b
40	58.8 ± 1.5 ^c	8.4 ± 1.1 ^d	32.8 ± 1.4 ^a

1. Muestras cocidas por 20 min en un baño de agua hirviendo con agitación continua, enfriadas a 37 °C y posteriormente analizadas.
2. Media de 3 réplicas ± desviación estándar. Letras diferentes entre columnas significan diferencias estadísticas significativas (p = 0.05). ADR = almidón de digestión rápida, ADL = almidón de digestión lenta, AR = almidón resistente

Estos resultados pueden ser explicados a través de los pasos de cristalización. La cristalización de las sustancias que pueden formar cristales involucra 3 pasos secuenciales: 1) nucleación: formación de núcleos críticos, 2) propagación: crecimiento del cristal a partir del núcleo, mediante asociaciones intermoleculares y 3) maduración: perfeccionamiento del cristal. La nucleación se ve favorecida a bajas temperaturas, mientras que la propagación y maduración se ve favorecida a altas temperaturas. (Guraya *et al.*, 2001). La velocidad de nucleación de un cristal se ve favorecida cuando se acerca a la temperatura de transición vítrea (T_g) y disminuye a 0 cuando se acerca la temperatura de fusión (T_m), por el contrario la velocidad a la cual los cristales crecen se ve favorecida a temperaturas cercanas a T_m y tiende a 0 cuando se aproxima a T_g (Morris, 1990).

El almacenamiento de los almidones desramificados a 40 °C dio como resultado un mayor contenido de AR, en comparación con los almidones almacenados a -40 y 4 °C, debido a que en esta temperatura se favorece la propagación y maduración, en otras palabras se desarrolla la formación de cristales a partir de las cadenas lineales desramificadas de la amilopectina y cadenas de amilosa. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Farhat *et al.* (2001), quienes estudiaron extrudidos de almidón de papa, encontraron una dependencia en forma de campana, sobre la temperatura de almacenamiento y la digestibilidad (medida como el porcentaje de hidrólisis durante 6 h de reacción con α -amilasa pancreática porcina).

Por otra parte, a 4 °C (temperatura de refrigeración) se favoreció el desarrollo de ADL, a esta temperatura se lleva a cabo la nucleación de los almidones desramificados, lo cual generó formas polimórficas menos simétricas en comparación con los almidones almacenados a temperatura 40 °C. Estos cristales menos simétricos pueden ser los responsable de digestión

lenta presente en ambos almidones desramificados. Los almidones desramificados almacenados a temperatura de congelación (-40 °C), presentaron un aumento en su digestibilidad (aumento de ADR). Wang y Jane. (1994), estudiaron la T_g y porcentaje de retrogradación del almidón de maíz y mezclas de almidón de maíz con disacáridos, llegando a establecer que las muestras almacenadas en condiciones de congelación (-20 °C) presentaron un porcentaje menor de retrogradación en comparación con muestras almacenadas en condiciones de refrigeración (2 °C). Por lo que en las muestras de almidón de mango y plátano desramificadas por 8 y 4 h y almacenadas a -40 °C presentaron una menor retrogradación de las cadenas lineales, lo cual posiblemente ocasionó que no se formaran los cristales que son parcialmente resistentes a la digestión.

6.3.5 Características estructurales de los almidones nativos de mango y plátano y sus contrapartes desramificadas (mayor contenido de ADL)

En la Figura 18 se observa los perfiles de elusión de los almidones nativos y desramificados de mango y plátano, solubilizados con DMSO e inyectados al sistema CLARET-IR. Los almidones nativos de mango y plátano presentaron dos picos de elusión, el primer pico localizado entre los 25 – 35 min, este pico corresponde a la elusión de las moléculas de amilopectina, las cuales debido a su gran tamaño eluyen del sistema CLARET en primer lugar, posteriormente el siguiente pico localizado de los 35 – 70 min de elusión, corresponde a las moléculas de menor tamaño molecular (moléculas de amilosa).

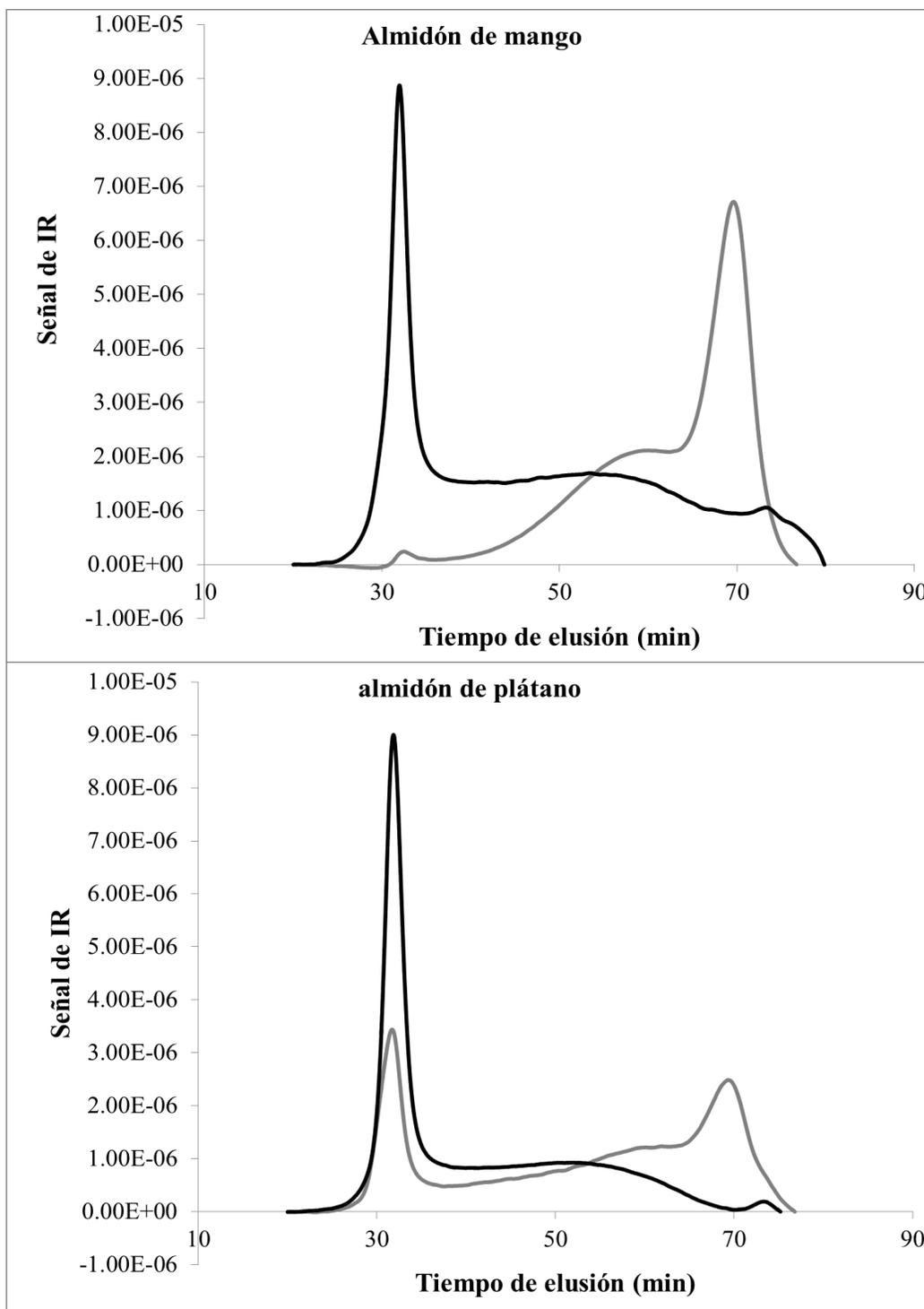


Figura 18. Perfiles de elusión de almidones nativos (—) y desramificados (—). Almidón de mango desramificado por 8 h y almidón de plátano desramificado por 4 h. IR = índice de refracción.

Los perfiles de elusión de los almidones desramificados (Figura 18) presentan 3 picos de elusión. El almidón de mango desramificado por 8 h presentó el primer pico a los 30 – 35 min de elusión, el cual es de menor tamaño en comparación con su contraparte nativa, lo que indica que a 8 h de desramificación las moléculas de amilopectina del almidón de mango ha sido desramificadas casi en su totalidad, manteniendo una cantidad mínima de moléculas de amilopectina intacta o con menor hidrolisis, presentó un segundo pico a los 35 - 62 min de elusión, este pico podría estar conformado por las moléculas lineales de amilosa y de algún material con ramificaciones, esto debido a que el porcentaje de desramificación alcanzado para estas muestra fue de 83 % (Cuadro 9), lo cual indica que existen cadenas con ramificaciones que aún falta que sean hidrolizadas para alcanzar el 100 % de desramificación, el almidon de mango desramificado presentó un tercer pico a los 62 – 75 min de elusión, el cual esta constituido por cadenas lineales derivadas de la desramificación de la molécula de amilopectina.

El almidón de plátano desramificado por 4 h, también presentó estos 3 picos de elusión, sin embargo el primer pico es más notorio, en comparación con el almidón de mango desramificado por 8 h, lo cual significa que a 4 h de desramificación no todas las moléculas de amilopectina han sido hidrolizadas, ya que a este tiempo se alcanzó el 67 % de hidrólisis de los enlaces α -(1→6).

6.3.6 Características térmicas de los almidones nativos de mango y plátano y sus contrapartes desramificadas (mayor contenido de ADL)

En el Cuadro 12 se muestran las características térmicas de los almidones nativos de mango y plátano, así también las características térmicas de las muestras desramificadas que

Cuadro 12. Propiedades térmicas de los almidones de mango y plátano, desramificados por 8 h y 4 h

Muestra*	T_P (°C)	ΔH (J/g)	(T_f – T_i)
NM	71.18 ± 0.39 ^d	11.06 ± 0.46 ^b	13.57 ± 0.56 ^d
NM-8h	86.34 ± 1.47 ^a	11.89 ± 0.73 ^b	63.57 ± 0.24 ^b
NP	75.84 ± 0.14 ^c	13.59 ± 0.43 ^a	15.03 ± 0.23 ^c
NP-4h	79.56 ± 0.90 ^b	13.02 ± 0.46 ^a	69.39 ± 0.43 ^a

* Media de 3 réplicas ± desviación estándar. Letras diferentes en una misma columna significan diferencias estadísticas significativas (p =0.05).

NM = almidón nativo de mango, NM-8h = Almidón desramificado de mango por 8 horas, NP= almidón nativo de plátano, NP-4h = almidón desramificado de plátano por 4 horas.

presentaron el mayor porcentaje de ADL, para el almidón de mango fueron 8 h de desramificación y para el caso del almidón de plátano fueron 4 h. El almidón de plátano presentó una mayor T_p y ΔH de gelatinización en comparación con el almidón de mango. Existen estudios que han relacionado la T_p de gelatinización con la longitud de las dobles hélices de la amilopectina, mientras que la ΔH de gelatinización está relacionada con la cantidad de dobles hélices presentes en ese almidón. La mayor T_p de gelatinización del almidón nativo de plátano confirma los resultados de longitud de cadena, ya que se encontró una mayor cantidad de cadenas de amilopectina de longitud larga (Cuadro 2), las cuales requieren de una mayor T_p de gelatinización para poder ser desorganizadas.

Los almidones desramificados de mango y plátano presentaron valores de T_p de gelatinización e intervalo de temperatura ($T_f - T_i$) mayores a la de sus contrapartes nativos, esto debido principalmente a la producción de cadenas lineales durante la hidrólisis con pululanasa. No se presentaron diferencias estadística significativas entre ΔH de los almidones nativos comparados con sus contrapartes nativas. En general, la T_p de gelatinización de los almidones nativos fue menor a la T_p de gelatinización de los almidones desramificados. Karin *et al.* (2000) establecieron que la temperatura de fusión (T_m) de cristales de amilopectina es menor a la T_m de los cristales de amilosa, lo que significa que, los cristales ramificados son menos estables que los cristales formados por cadenas lineales.

En este estudio las muestras desramificadas por 8 h presentaron un porcentaje de desramificación del 86 % y una cantidad mínima de moléculas de amilopectina (Figura 18), mientras que el almidón de plátano desramificado por 4 h presentó un porcentaje de desramificación de 66 % y un contenido de moléculas de amilopectina mayor en comparación al

almidón de mango desramificado por 8 h (Figura 18), esta diferencia en la estructura molecular se ve reflejado en los cristales analizados mediante CDB. Los cristales ramificados presentes en NP-4h hicieron que la diferencia entre la Tp de gelatinización del NP y la Tp de fusión de NP-4h no fuera tan marcada como en el caso del NM y NM-8h donde hubo una mayor diferencia entre la Tp de gelatinización del almidón nativo y la Tp de gelatinización del almidón desramificado. Debido a que este último presentó una mayor cantidad de cristales formado por cadenas lineales de la molécula de amilopectina y las cadenas lineales de la molécula de amilosa.

7. CONCLUSIONES

- El almidón de plátano sin gelatinizar presentó un contenido de AR mayor en comparación con el almidón de mango, el cual disminuyó notablemente tras el proceso de gelatinización.
- El almidón de plátano gelatinizado presentó un contenido de ADL mayor en comparación con el almidón de mango, esto debido a diferencias en la estructura de la amilopectina.
- El tratamiento mediante hidrólisis ácida no tuvo efecto sobre el ADL del almidón de mango, pero el contenido de AR incrementó conforme aumentaron los días de hidrólisis.
- En el almidón de plátano se generó un contenido máximo de ADL al alcanzar 50 % de hidrólisis ácida, después del cual disminuyó, mientras que el contenido de AR incrementó a partir del 50 % de hidrólisis.
- A los 15 días de hidrólisis, los lintners de almidón de plátano presentaron mayor contenido de cadenas con un GP =16-17 en comparación con los lintners de mango, y los primeros presentaron mayor contenido de ADL.
- La hidrólisis ácida de los almidones de mango y plátano causó una disminución de T_p de gelatinización a 3 días de reacción y un aumento de los 3 a los 15 días y no tuvo efecto sobre la ΔH de gelatinización.
- El tratamiento mediante hidrólisis enzimática (desramificación) generó una disminución de la digestibilidad en los almidones cocidos.
- El mayor contenido de ADL para el almidón de mango se obtuvo a las 8 h de desramificación y para el almidón de plátano a las 4 h.

- El almidón de plátano presentó un contenido de AR máximo a las 24 h de desramificación, y este valor fue mayor comparado con el almidón de mango desramificado al mismo tiempo.
- Las diferencias estructurales tales como el contenido de amilosa, el porcentaje de desramificación de la amilopectina, y la distribución de longitud de cadenas en ambos almidones de frutos, causaron las diferencias en las propiedades de digestión.
- La hidrólisis enzimática durante 8 y 4 h, para mango y plátano, respectivamente, aumentó la Tp de gelatinización y no tuvo efecto sobre la ΔH de gelatinización.

8. BIBLIOGRAFIA

- Agustiniano-Osornio, J.C., González-Soto, R.A., Flores-Huicochea, E., Manrique-Quevedo, N., Sanchez-Hernandez, L., and Bello-Perez, L.A. (2005). Resistant starch production from mango starch using a single-screw struder. *Journal of the science of food and agriculture*, 85, 2105-2110.
- American Association of Cereal Chemists. (1976) "Approved Methods of the AACC". Method 76-11.
- Andoh, A., Tsujikawa, T., and Fujiyama, Y. (2003). Role of dietary fibre and short-chain fatty acids in the colon. *Current pharmaceutical design*, 9, 347-358.
- Ao, Z., Simsek, S., Zhang, G., Venkatachalam, M., Reuhs, B.L., and Hamaker, B.R. (2007). Starch with slow digestion property produced by altering its chain length, branch density, and crystalline structure. *Journal of agricultural and food chemistry*, 55, 4540-4547.
- Aparicio-Saguilán, A., Flores-Huicochea, E., Tovar, J., Garcia-Suárez, F., Gutiérrez-Meraz, F., and Bello-Pérez, L.A. (2005). Resistant starch-rich powders prepared by autoclaving of native and lintnerized banana starch: partial characterization. *Starch/stärke*, 57, 405-412.
- Atichokudomchai, N., Varavinit, S., Chinachoti, P. (2002). A study of annealing and freeze-thaw stability of acid-modified tapioca starches by differential scanning calorimetry (DSC). *Starch/stärke*, 54, 296–302.
- Atwell, W.A., Hood, L.F., Lineback, D.R., Varriano-Marston, E., and Zobel, H.F. (1988). The terminology and methodology associated with basic starch phenomena. *Cereal foods world*, 33, 306-311.
- Axelsen, M., Arvidsson, L.R., Lonhroth, P., and Smith, U. (1999). Breakfast glycaemic response in patients with type 2 diabetes: effects on bedtime dietary carbohydrates. *European journal of clinical nutrition*, 53, 706-710.
- Bello-Pérez, L.A., González-Soto, R. A., Sanchez-Rivero, M.M., Gutiérrez-Meraz, F., and Vargas-Torres, A. (2006). Extrusion of starches from non-conventional sources of resistant starch production. *Agrociencia*, 40, 441-448.

- Bello-Pérez, L.A., Méndez-Montevalvo, G., y Solorza-Feria, J. (2002). Estructura molecular de almidones. Memorias de Investigación. *CeProBi-IPN*, México.
- Bello-Pérez, L.A., Ottenhof, M.A., Agama-Acevedo, E., and Farhat, I.A. (2005a). Effect of storage time on the retrogradation of banana starch extrudate. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53, 1081-1086.
- Bello-Pérez, L.A., y Paredes-López, O. (1999). El almidón: lo comemos pero no lo conocemos. *Ciencia*, 50, 29-33.
- Bello-Pérez, L.A., Agama-Acevedo, E., Sayago-Ayerdi, S.G., Moreno-Damian, E., and Figueroa, J.D.C. (2000). Some structural, physicochemical and functional studies of banana starches isolated from two varieties growing in Guerrero, México. *Starch/stärke*, 50, 68-73.
- Bello-Pérez, L.A., Aparicio-Saguilan, A., Montevalvo-Mendez, G., Solorza-Feria, and J., Flores-Huicochea, E. (2005b). Isolation and partial characterization of mango (*Magnifera indica* L.) starch: morphological, phosicochemical and functional studies. *Plant foods for human nutrition*, 60, 7-12.
- Benmoussa, M., Moldenhauer, K.A.K., and Hamaker B.R. (2007). Rice amylopectin fine structure variability affects starch digestion properties. *Journal of agricultural and food chemistry*, 55, 1475-1479.
- Berry, C.S. (1986). Resistant starch: formation and measurement of starch that survives exhaustive digestion with amyolytic enzymes during the determination of dietary fibre. *Journal of cereal science*, 4, 301-314.
- Brownlee, M. (2005). The pathobiology of diabetic complications: A unifying mechanism. *Diabetes*, 54, 1615–1625.
- Brumovsky, J.O., and Thompson, D.B. (2001). Production of boiling-stable granular resistant starch by partial acid hydrolysis and hydrothermal treatments of high-amylose maize starch. *Cereal chemistry*, 78, 680-689.
- Buléon, A., Colonna, P., Planchot, V., and Ball, S. (1998). Starch granules: structure and biosynthesis. *International journal of biological macromolecules*, 23, 85-112.
- Buleon, A., Véronese, G., and Putaux, J-L. (2007). Self-association and crystallization of amylose. *Australian journal of chemistry*, 60, 706-718.

- Cai, L., Shi, Y-C., Rong, L., and Hsiao, B.S. (2010). Debranching and crystallization of waxy maize starch in relation to enzyme digestibility. *Carbohydrate polymers*, 81, 385-393.
- Chung, H.-J., Shin, D.-H., and Lim, S.-T. (2008). *In vitro* starch digestibility and estimated glycemic index of chemically modified corn starches. *Food research international*, 41, 579-585.
- Colonna, P., Leloup, V., and Buléon, A. (1992). Limiting factors of starch hydrolysis. *European journal of clinical nutrition*, 46, S17-S32.
- Cook, D., and Gidley, M.J. (1992). Loss of crystalline and molecular order during starch gelatinization: Origin of the enthalpic transition. *Carbohydrate research*, 227, 103–112.
- Correa, C.E.S., Shaver, R.D., Pereira, M.N., Lauer, J.G., and Kohn, K. (2002). Relationship between corn vitreousness and ruminal in situ starch degradability. *Journal of dairy science*, 85, 3008- 3012.
- Cunin, C., Handschin, S., Walther, P., and Escher, F. (1995). Structural changes of starch during cooking of durum wheat pasta. *LWT - Food Science and Technology*, 28, 323-328.
- Dombrink-Kurtzman, M.A., and Knutson, C.A. (1997). A study of maize endosperm hardness in relation to amylose content and susceptibility to damage. *Cereal chemistry*, 74, 776-780.
- Dubois, M., Giles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., and Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Journal of analytical chemistry*, 28, 350–356.
- Eggleston, G., Swennen, R., and Akoni, S. (1992). Physicochemical studies on starches isolated from plantain cultivars, plantain hybrids and cooking bananas. *Starch/stärke*, 44, 121–128.
- Eerlingen, R.C., and Jacobs, H., Delcour, J.A. (1994). Enzyme-resistant starch. V. Effect of retrogradation of waxy maize starch on enzyme susceptibility. *Cereal chemistry*, 71, 351–355.
- Ells, L.J., Seal, C.J., Kettlitz, B., Bal, W., and Mathers, J.C. (2005). Postprandial glycaemic, lipaemic and haemostatic responses to ingestion of rapidly and slowly digested starches in healthy young women. *British journal of nutrition*, 94, 948-955.
- Englyst, H.N., and Cummings, J.H. (1985). Digestion of the polysaccharides of some cereal food in the human small intestine. *American journal of clinical nutrition*, 42, 778-87.

- Englyst, H.N., Kingman, S.M., and Cummings, J.H. (1992). Classification and measurement of nutritional important starch fractions. *European Journal of Clinical Nutrition*, 46, S33-S50.
- Englyst, K.N., Vinoy, S., Englyst, H.N., and Lang, V. (2003). Glycaemic index of cereal products explained by their content of rapidly and slowly available glucose. *British journal of nutrition*, 89, 329-339.
- Espinosa-Solis, V., Jane, J.-L., and Bello-Pérez, L.A. (2009). Physicochemical characteristics of starches from unripe fruits of mango and banana. *Starch/stärke*, 61, 291-299.
- Faisant, N., Buléon, A., Colonna, P., Molis, C., Lartigue, S., Galmiche, J.P., and Champ, M. (2007). Digestion of raw banana starch in the small intestine of healthy humans: structural features of resistant starch. *British journal of nutrition*, 73, 111-123.
- Fannon, E., Gray, J.A., Gunawan, N., Huber, K. C., and BeMiller, J.N. (2004). Heterogeneity of starch granules and the effect of granule channelization on starch modification. *Cellulose*, 11, 247-254.
- Farhat, I.A., Protzmann, J., Becker, A., Vallés-Pámies, B., Neale, R., and Hill, S.E. (2001). Effect of the extent of conversion and retrogradation on digestibility of potato starch. *Starch/Stärke*, 53, 431-436.
- Flores-Gorosquera, E., Garcia-Suárez, F. J., Flores-Huicochea, E., Nuñez-Santiago, M.C., González-Soto, R.A., y Bello-Pérez, L.A. (2004). Rendimiento del proceso de extracción de almidón a partir de frutos de plátano (*Musa paradisiaca*). Estudio en planta piloto. *Acta científica venezolana*, 55, 86-90.
- French, D. (1972). Fine structure of starch and its relationship to the organization of starch granules. *Denpun Kagaku*. 19: 8-25.
- Fuwa, H., Nakajima, M., Hamada, A., and Glover, D.V. (1977). Comparative susceptibility to amylases of starches from different plant species and several single endosperm mutants and their double-mutant combinations with *opaque-2* inbred Oh43 maize. *Cereal chemistry*, 54, 230-237.
- Gallant, D.J., Bouchet, B., and Baldwin, P.M. (1997). Microscopy of starch: evidence of a new level of granule organization. *Carbohydrate polymers*, 32, 177-191.

- Gallant, D.J., Bouchet, B., Buleon, A., and Perez, S. (1992). **Physical characteristics of starch granules and susceptibility to enzymatic degradation.** *European journal of clinical nutrition*, **46**, S3-S16.
- Gidley, M.J., and Bulpin, P.V. (1989). Aggregation of amylose in aqueous systems: the effect of chain length on the phase behavior and aggregation kinetics. *Macromolecules*, **22**, 341–346.
- González-Soto, R.A., Mora-Escobedo, R., Hernández-Sánchez, H., Sanchez-Rivera, M., Bello-Perez, L.A. (2007b). Extrusion of banana starch: characterization of extrudates. *Journal of the science of food and agriculture*, **87**, 348-356.
- González-Soto, R.A., Mora-Escobedo, R., Hernández-Sánchez, H., Sánchez-Rivera, M., and Bello-Pérez, L.A. (2007a). The influence of time and storage temperature on resistant starch formation from autoclaved debranched banana starch. *Food research international*, **40**, 304-310.
- Guraya, H.S., James, C., and Champagne, E.T. (2001). Effect of enzyme concentration and storage temperature on the formation of slowly digestible starch from cooked debranched rice starch. *Starch/ Stärke*, **53**, 131-139.
- Han, J.-A., and BeMiller, J.N. (2007). Preparation and physical characteristics of slowly digesting modified food starches. *Carbohydrate polymers*, **67**, 366-374.
- Hanashiro, I., Abe, J.I., and Hizukuri, S. (1996). A periodic distribution of the chain length of amylopectin as revealed by highperformance anion-exchange chromatography. *Carbohydrate research*, **283**, 151-159.
- Haralampu, S.G. (2000). Resistant starch - a review of the physical properties and biological impact of RS3. *Carbohydrate polymers*, **41**, 285-292.
- He, J., Liu, J., and Zhang, G. (2008). Slowly digestible waxy maize starch prepared by octenyl succinic anhydride esterification and heat-moisture treatment: glycemic response and mechanism. *Biomacromolecules*, **9**, 175-184.
- Hickman, B.E., Janaswamy, S., and Yao, Y. (2009). Autoclave and β -amylolysis lead to reduced *in vitro* digestibility of starch. *Journal of agricultural and food chemistry*, **57**, 7005–7012.
- Hizukuri, S. (1985). Relationship between the distribution of the chain length of amylopectin and the crystalline structure of starch granules. *Carbohydrate research*, **141**, 295-306.

- Hizukuri, S. (1986). Polymodal distribution of the chain lengths of amylopectins, and its significance. *Carbohydrate research*, 147, 342-347.
- Hoover, R. (1995). Starch retrogradation. *Food reviews international*, 11, 331-346.
- Hoover, R. (2000). Acid-treated starches. *Food reviews international*, 16, 369–392.
- Jacobs, H., Eerlingen, R.C., Rouseu, N., Colonna, P., and Delcour, J.A. (1998). Avid hydrolysis of native and annealed wheat, potato and pea starches – DSC melting features and chain length distributions of lintnerised starches. *Carbohydrate research*, 308, 359–371.
- Jane, J. (2007). Structure of starch granules. *Journal of applied glycoscience*, 54, 31-36.
- Jane, J., and Robyt, J.F. (1984). Structure studies of amylose-V complexes and retrograded amylose by action of alpha amylases, and a new method for preparing amyloextrins. *Carbohydrate research*, 132, 105-18.
- Jane, J., Chen, Y.Y., McPherson, A.E., Wong, K.S., Radosavljevic, M., and Kasemsuwan, T. (1999). Effects of amylopectin branch chain length and amylose content on the gelatinization and pasting properties of starch. *Cereal chemistry*, 76, 629-637.
- Jane, J., Wong, K., and McPherson, A.E. (1997). Branch-structure difference in starches of A- and B-type X-ray patterns revealed by their Naegeli dextrins. *Carbohydrate research*, 300, 219-227.
- Jane, J., Xu, A., Radosavljevic, M., and Seib, P.A. (1992). Location of amylose in normal starch granules. I. Susceptibility of amylose and amylopectin to cross-linking reagents. *Cereal chemistry*, 69, 405-409.
- Jenkins, D.J.A., Kendall, C.W.C., Augustin, L.S.A., Franceschi, S., Hamidi, M., and Marchie, A. (2002). Glycemic index: overview of implications in health and disease. *American journal of clinical nutrition*, 76, 266S-273S.
- Jenkins, P.J. and Donald, A.M. (1997). The effect of acid hydrolysis on native starch granule structure. *Starch/stärke*, 49, 262– 267.
- Kainuma, K., and French, D. (1971). Naegeli amyloextrin and its relationship to starch granule structure. II. Preparation and properties of amyloextrins from various starch types. *Biopolymers*, 10, 1673–1680.
- Kaplan, N.M. (1989). The deadly quartet. Upper-body obesity, glucose intolerance, hypertriglyceridemia, and hypertension. *Archives of internal medicine*, 149, 1514–20.

- Karim, A.A., Norziah, M.H., and Seow, C.C. (2000). Methods for the study of starch retrogradation. *Food chemistry*, 71, 9-36.
- Kaur, M., Singh, N., Sandhu, K.S., and Guraya, H.S. (2004). Physicochemical, morphological, thermal and rheological properties of starches separated from kernels of some Indian mango cultivars (*Mangifera indica* L.). *Food chemistry*, 85, 131-140.
- Klucinec, J.D., and Thompson, D.B. (1999). Amylose and amylopectin interact in retrogradation of dispersed high-amylose starches. *Cereal chemistry*, 76, 282-291.
- Knutson, C.A., Khoo, U., Cluskey, J.E., and Inglett, G.E. (1982). Variation in enzyme digestibility and gelatinization behavior of corn starch granule fractions. *Cereal chemistry*, 59, 512-515.
- Lehmann, U., and Robin, F. (2007). Slowly digestible starch – its structure and health implications: a review. *Food science and technology*, 18, 346-355.
- Lehmann, U., Jacobasch, G., and Schmiedl, D. (2002) Characterization of Resistant Starch type III from banana (*Musa acuminata*). *Journal of agricultural and food chemistry*, 50, 5238-5240.
- Li, L., Jiang, H., Campbell, M., Blanco, M., and Jane, J. (2008). Characterization of maize amylose-extender (*ae*) mutant starches. Part I: Relationship between resistant starch contents and molecular structures. *Carbohydrate polymers*, 74,396-404.
- Ludwing, D.S. (2002). The glycemic index: physiological mechanism relating to obesity, diabetes and cardiovascular disease. *Journal of the american medical association*, 287, 2414-2423.
- MacFarlane, S., and MacFarlane, G.T. (2003). Regulation of short-chain fatty acids production. *Proceedings of nutrition society*, 62, 67-72.
- Marshall, S. (2006). Role of insulin, adipocyte hormones, and nutrient-sensing pathways in regulating fuel metabolism and energy homeostasis: a nutrient perspective of diabetes, obesity and cancer. *Science's STKE*, 346.
- Miles, M.J., Morris, V.J., Orford, P.D., Ring, S.G. (1985). The role of amylose and amylopectin in the gelation and retrogradation of starch. *Carbohydrate research*, 135, 271–281.
- Morris, V. J. (1990). Starch gelation and retrogradation. *Trends in food science and technology*, 1, 2-6.

- Ovando-Martínez, M., Bello-Pérez, L.A., Whitney, K., Osorio-Díaz, P., and Simsek, S. (2011). Starch characteristics of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) grown in different localities. *Carbohydrate polymers*, 85, 54-64.
- Pan, D.D., and Jane, J.L. (2000). Internal structure of normal maize starch granules revealed by chemical surface gelatinization. *Biomacromolecules*, 1, 126-132.
- Paredes-López, O., Schevenin, M.L., Hernández-López, D., and Cárabez-Trejo, A. (1989). Amaranth starch isolation and partial characterization. *Starch/Stärke*, 41, 205-207.
- Perez, S., and Bertoft, E. (2010). The molecular structures of starch components and their contribution to the architecture of starch granules: a comprehensive review. *Starch/starke*, 62, 389-420.
- Peters, A., Schweiger, U., Pellerin, L., Hubold, C., Oltmanns, K.M., Conrad, M., Schultes, B., Born, J., and Fehm, H.L. (2004). The selfish brain: Competition for energy resources. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, 28, 143–180.
- Robin, J.P., Mercier, C., Charbonniere, R., and Guilbot, A. (1974). Lintnerized starches. Gel filtration and enzymatic studies of insoluble residues from prolonged acid treatment of potato starch. *Cereal chemistry*, 51, 389–406.
- Sandhu, K.S., and Lim, S.T. (2008). Structural characteristics and in vitro digestibility of mango kernel starches (*Mangifera indica* L.). *Food chemistry*, 107, 92-97.
- Schwiertz, A., Lehmann, U., and Jacobasch, G. (2002). Influence of resistant starch on the SCFA production and cell counts of butyrate-producing eubacterium spp. In the human intestine. *Journal of applied microbiology*, 93, 157-162.
- Scribner, K.B., Pawlak, D.B., and Ludwig, D.S. (2007). Hepatic steatosis and increased adiposity in mice consuming rapidly vs. slowly absorbed carbohydrate. *Obesity*, 15, 2190–2199.
- Shin, S.I., Choi, H.J., Chung, K.M., Hamaker, B.R., Park, K.H., and Moon, T.W. (2004). Slowly digestible starch from debranched waxy sorghum starch: preparation and properties. *Cereal chemistry*, 81, 404-408.
- Sievert, D., and Pomeranz, Y. (1989). Enzyme-resistant starch. I. Characterization and valuation by enzymic, thermoanalytical, and microscopic methods. *Cereal chemistry*, 66, 342-7.
- Sievert, D., and Wusch, P. (1993). Amylose chain association based on differential scanning calorimetry. *Journal of food science*, 58, 1332-1335.

- Slade, L., and Levine, H. (1987). Recent advances in starch retrogradation. Pages 387-430 in: Industrial polysaccharides. The impact of biotechnology and advanced methodologies. Stivala, S. S., Crescenzi, V., and Dea, I. C. M. Eds. Gordon & Breach Science Pub, New York.
- Srichuwong, S., and Jane, J. (2007). Physicochemical properties of starch affected by molecular composition and structures: a review. *Food science and biotechnology*, 16, 663-674.
- Srichuwong, S., Isono, N., Mishima, T., and Hisamatsu, M. (2005). Structure of lintnerized starch is related to X-ray diffraction pattern and susceptibility to acid and enzyme hydrolysis of starch granules. *International journal of biological macromolecules*, 37, 115-121.
- Stevenson, D.G., Johnson, S.R., Jane, J., and Inglett, G.E. (2006b). Chemical and physical properties of kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) starch. *Starch/stärke*, 58, 323-329.
- Stevenson, D.G., Domoto, P.A., and Jane, J. (2006a). Structures and functional properties of apple (*Malus domestica* Borkh) fruit starch. *Carbohydrate polymers*, 63, 432-441.
- Tester, R.F., Karkalas, J., and Qi, X. (2004). Starch structure and digestibility Enzyme- Substrate relationship. *World's poultry science journal*, 60,186-195.
- Topping, D.L., and Clifton, P.M. (2001). Short-chain fatty acids and human colonic function: roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides. *Physiological reviews*, 81, 1031- 1064.
- Vasanthan, T., and Bhatta, R.S. (1998). Enhancement of resistant starch (RS3) in amylomaize, barley, field pea, and lentil starches. *Starch/stärke*, 50, 286-291.
- Venkatachalam, M., Zhang, G., and Hamaker, B.R. (2006). Use of polymer encapsulated starches as a novel method to make low glycemic foods. World Grain Summit: Foods and Beverages (AACCC International), Abstract P-285, Sept.17-20, San Francisco, CA.
- Vilaplana, F., Hasjim, J., and Gilbert, R.G. (2012) Amylose content in starches: towards optimal definition and validating experimental methods. *Carbohydrate polymers*, doi:10.1016/j.carbpol.2011.11.072.
- Wang, S., Jingling, Y., and Jingao, Y. (2008). The semi-crystalline growth rings of C-type pea starch granule revealed by SEM and HR-TEM during acid hydrolysis. *Carbohydrate polymers*, 74, 731-739.

- Wang, S., Yu, J., Gao, W., Pang, J., Liu, H., and Yu, J. (2007). Granule structural changes in native Chinese Yam (*Dioscorea opposita* Thunb var. *Anguo*) starch during acid hydrolysis. *Carbohydrate polymers*, 69, 286–292.
- Wang, Y-J., and Jane, J. (1994). Correlation between glass transition temperature and starch retrogradation in presence of sugars and maltodextrins. *Cereal chemistry*, 71, 527-531.
- Watanabe, T., and French, D. (1980). Structural features of naegeli amylopectin as indicated by enzymic degradation. *Carbohydrate research*, 84, 115–123.
- Whistler, R. L. (1998). Banana starch production. *US Patent 5797985*.
- Wolever, T.M.S. (2003). Carbohydrate and regulation of blood glucose and metabolism. *Nutrition reviews*, 61, S40-S48.
- Wolf, B.W., Bauer, L.L., and Fahey, G.C. (1999). Effects of chemical modification on *in vitro* rate and extent of food starch digestion: an attempt to discover a slowly digested starch. *Journal of agricultural and food chemistry*. 47: 4178-4183.
- Wongsagonsup, R., Varavinit, S., and BeMiller, J.N. (2008). Increasing slowly digestible starch content of normal and waxy maize starches and properties of starch products. *Cereal chemistry*, 85, 738-745.
- Yao, Y., Zhang, J., and Ding, X. (2002). Structure-retrogradation relationship of rice starch in purified starches and cooked rice grains: a statistical investigation. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50, 7420-7425.
- Yoo, S.H., and Jane, J. (2002). Structural and physical characteristics of waxy and other wheat starches. *Carbohydrate polymers*, 49, 297–305.
- Zhang, G., and Hamaker, B.R. (1998). Low α -amylase starch digestibility of cooked sorghum flours and the effect of protein. *Cereal chemistry*, 75, 710-713.
- Zhang, G., and Hamaker, B.R. (2009). Slowly digestible starch: concept, mechanism, and proposed extended glycemic index. *Critical reviews in food science and nutrition*, 49, 852-867.
- Zhang, G., Ao, Z., and Hamaker, B.R. (2008a). Nutritional property of endosperm starches from maize mutants: A parabolic relationship between slowly digestible starch and amylopectin fine structure. *Journal of agricultural and food chemistry*, 56, 4686–4694.

- Zhang, G., Ao, Z., Hamaker, B. R. (2006a). Slowly digestion property of native cereal starches. *Biomacromolecules*, 7, 3252-3258.
- Zhang, G., Sofyan, M., and Hamaker, B.R. (2008b). Slowly digestible state of starch: mechanism of slow digestion property of gelatinized maize starch. *Journal of agricultural and food chemistry*, 56, 4695–4702.
- Zhang, G., Venkatachalam, M., and Hamaker, B. (2006b). Structural basis for the slow digestion property of native cereal starches. *Biomacromolecules*, 7, 3259-3266.
- Zhang, P., Whistler, R.L., BeMiller, J.N., and Hamaker, B.R. (2005). Banana starch: production, physicochemical properties and digestibility- a review. *Carbohydrate polymers*, 59, 443-458.
- Zobel, H. F. (1988). Molecules to granule: a comprehensive starch review. *Starch/starke*, 40, 44–50.

RESEARCH ARTICLE

Fine structural characteristics related to digestion properties of acid-treated fruit starches

Vicente Espinosa-Solis¹, Sandra L. Sanchez-Ambriz¹, Bruce R. Hamaker² and Luis Arturo Bello-Pérez¹

¹ Centro de Desarrollo de Productos Bióticos del IPN, colonia San Isidro, Yauatepec, Morelos, México

² Whistler Center for Carbohydrate Research and Department of Food Science, Purdue University, West Lafayette, IN, USA

Starches from unripe fruits (mango, banana, and plantain) were acid modified to form different degrees of lintners with the objective to increase the slowly digestible starch (SDS) and RS contents. Molecular, thermal, and structural characteristics were evaluated. Mango starch showed higher susceptibility to acid hydrolysis than banana and plantain starches. The peak temperature of gelatinization (T_p) showed a decrease at low hydrolysis percentage, but at higher hydrolysis percentage the T_p increased. However, the enthalpy of gelatinization presented an increase with the hydrolysis percentage, but was not higher than its native counterpart. In general, the peak temperature and enthalpy of retrogradation increased with hydrolysis percentage due to formation of linear chains during the modification that promoted retrogradation. High performance size exclusion chromatography (HPSEC) analysis demonstrated the presence of multiple-branches (DP = 96–109), single branched (DP = 28–31), and linear (DP = 16–18) polymers in the fruit starch lintners. The acid treatment (lintnerization) of mango starch had no effect on the SDS fraction, while for plantain and banana starches, the SDS content increased (6.14–35.4%) at low hydrolysis percentage (0–50%) followed by a decrease at higher days of hydrolysis. At higher hydrolysis percentage (70–80%) the RS content increased for the three fruit lintners.

Received: April 4, 2011

Revised: May 23, 2011

Accepted: May 27, 2011

Keywords:

Lintnerization / Resistant starch / Slowly digestible starch

1 Introduction

Starch has been classified on the basis of digestibility as rapidly digestible starch (RDS), slowly digestible starch (SDS), and RS [1]. RDS is digested very quickly and

causes a rapid rise in the blood glucose levels immediately after consumption. RS is not digested in the small intestine at all, and is fermented by micro-organisms in colon to give SCFAs such as acetate, propionate, and butyrate. SDS is digested completely in the small intestine, and can provide a sustained and prolonged glucose release. The nutritional properties of SDS hold potential for a dietary approach to and prevention of various diseases, like diabetes and cardiovascular diseases. Due to proposed beneficial physiological effects, SDS [2] and RS [3] have gained much attention in recent times. SDS and RS can be produced from native starches using different methods such as chemical [4, 5], physical [6], and enzymatic [7, 8] treatments.

Banana starch, which is one of the main constituents of unripe bananas, is known for its resistance to hydrolysis and high RS content. The ungelatinized native banana

Correspondence: Professor Luis Arturo Bello-Pérez, Centro de Desarrollo de Productos Bióticos del IPN. Km 8.5 carr. Yauatepec-Jojutla, colonia San Isidro, apartado postal 24, 62731 Yauatepec, Morelos, México

E-mail: labellop@ipn.mx

Fax: +52-735-3941896

Abbreviations: BSL, banana starch lintner; MSL, mango starch lintner; NBS, native banana starch; NMS, native mango starch; NPS, native plantain starch; PSL, plantain starch lintner; RDS, rapidly digestible starch; SDS, slowly digestible starch