

300627



UNIVERSIDAD LA SALLE ³⁷
_{2e)}

ESCUELA DE QUIMICA
INCORPORADA A LA U.N.A.M.

**“OBTENCION DE MALTODEXTRINAS POR
HIDROLISIS ENZIMATICA”**

**TESIS PROFESIONAL
PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO
P R E S E N T A :**

MARIA DE LOURDES VEGA NOGUERA

**TESIS CON
MAYOR CALIDAD DE CALIDAD
DIRECTOR DE TESIS:
Q. IRENE MONTALVO**



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

I N D I C E

CAPITULO	PAGINA
I. INTRODUCCION	1
II. OBJETIVOS	2
III. GENERALIDADES	3
IV. MATERIALES Y METODOS	13
V. DESARROLLO EXPERIMENTAL	22
VI. RESULTADOS Y DISCUSION DE RESULTADOS	24
VII. CONCLUSIONES	67
VIII. BIBLIOGRAFIA	68

I. INTRODUCCION.

El almidón no siempre puede emplearse en su forma natural, sino que en muchas ocasiones se requiere de una modificación física o química para poder obtener de él las propiedades funcionales deseadas, una de estas modificaciones que se lleva a cabo es la hidrólisis, que puede hacerse con ácidos o con enzimas, esta última va siendo más utilizada debido a que presenta diversas ventajas como son: mayor flexibilidad en la composición final de los productos, condiciones de hidrólisis más suaves y mayor especificidad. Existe una gran variedad de productos obtenidos por la hidrólisis del almidón, uno de ellos son las maltodextrinas que son polímeros formados por D-glucosa unida a través de enlaces alfa 1,4 y alfa 1,6 dando cadenas lineales y ramificadas. Las maltodextrinas, en general, se van a clasificar según su equivalente de dextrosa (DE), el cual se refiere al contenido de azúcares reductores; en México podemos encontrar maltodextrinas con varios equivalentes de dextrosa como son: 5, 10, 15, 20, 25 y hasta 30, cabe mencionar que estas maltodextrinas son producidas por medio de una hidrólisis ácida utilizando ácido clorhídrico diluido, pero recientemente han comenzado a obtenerlas a través de la vía enzimática. Las maltodextrinas son utilizadas principalmente en la industria alimentaria y en ocasiones en la farmacéutica, desarrollando diversas funciones dependiendo de su equivalente de dextrosa.

II. OBJETIVOS.

1. Obtener maltodextrinas por hidrólisis enzimática y caracterizarlas por su peso molecular.
2. Encontrar las condiciones para llevar a cabo la hidrólisis enzimática, como son: pH, temperatura, concentración de la enzima y tiempo de reacción.
3. Encontrar las condiciones en las cuales se pueden obtener maltodextrinas de peso molecular específico y con un equivalente de dextrosa de 10 y 15.
4. Establecer la metodología para la determinación del peso molecular de las maltodextrinas.

III. GENERALIDADES.

Existen dos grupos principales de polisacáridos que tienen una función biológica diferente: los polisacáridos que constituyen el tejido estructural como la celulosa y pectinas que forman puentes de hidrógeno intermoleculares estables, por lo que son poco solubles en agua y la absorben en poca cantidad y los que constituyen la reserva energética como el almidón, que absorbe agua hinchándose y que es susceptible a ataques químicos. El almidón $(C_6H_{10}O_5)_n$ es el principal polisacárido que constituye la reserva energética de las plantas y constituye una porción sustancial en la dieta humana. El almidón está compuesto por dos fracciones de polisacáridos, ambas son polímeros macromoleculares de glucosa. Uno de estos componentes, la amilosa, es una molécula que consta de una sola cadena lineal y flexible de aproximadamente 500 - 2000 unidades de glucosa unidas entre sí por enlaces α -1,4. El otro componente es llamado amilopectina, que está altamente ramificada y que contiene ramificaciones lineales en las posiciones α -1,6 con un promedio de ramificaciones de 25 unidades de glucosa. La proporción de estas fracciones en los almidones de diferentes variedades de las mismas especies de plantas son constantes, mientras que ciertas variedades de cereales están compuestas principalmente de moléculas ramificadas. El tamaño y la forma del gránulo de almidón es muy característico de cada especie botánica, por lo que se han desarrollado diferentes métodos microscópicos para identificarlos. (2)(3)

El almidón puede obtenerse a partir de varias fuentes como son: maíz, sorgo, papa, tapioca, arroz, etc., aunque generalmente se obtiene del maíz por su bajo costo y su gran disponibilidad. El maíz (Zea mays) y el sorgo (Sorghum vulgare) son el artículo principal en la dieta de familias de bajos recursos que habitan en países en vía de desarrollo como India, Pakistán, China y ciertas partes de Africa y Asia. La calidad proteica del maíz y del sorgo es baja porque la proteína del maíz no tiene en cantidades suficientes lisina y triptófano mientras que el sorgo carece de lisina y de aminoácidos que contienen azufre. (1) Se ha tratado de buscar nuevas formas para corregir estas deficiencias y una de estas es la germinación de semillas. Recientemente, algunos investigadores han estudiado la influencia de la germinación al elevar el valor nutritivo de las semillas. Durante el proceso de germinación los materiales almacenados se convierten a formas más utilizables para la planta y para el hombre. (16)(17)(39)

El almidón influye en las propiedades sensoriales de muchos alimentos y esto está supeditado a las interacciones que tenga con los otros componentes que se encuentran presentes. La facilidad que tiene el almidón para reaccionar, no sólo está determinada por la fuente botánica a la que pertenezca, sino también a la relación que tenga con respecto a cada componente que lo rodea. La forma precisa y el mecanismo de dichas interacciones no es conocida completamente.

Las modificaciones que sufre un almidón en su temperatura y velocidad de gelatinización, cuando está presente en un alimento, son reflejo de la influencia de los diferentes constituyentes del medio en que se encuentra.

El almidón de diferentes fuentes y diversas modificaciones es utilizado en la industria alimentaria, en general, como:

- agente espesante
- agente formador de gel
- encapsulador
- estabilizador de emulsiones aceite en agua

El almidón no siempre se puede emplear en su forma natural, sino que en ocasiones requiere de una modificación física o química para poder obtener de él las propiedades funcionales deseadas. (13)(23)(30)

El almidón puede ser hidrolizado ya sea por ácidos (HCl) o por medio de enzimas (alfa amilasa, beta amilasa, pululanasa, dextranasas, glucoamilasa, etc.) El grado de hidrólisis puede ser controlado de tal forma que los productos obtenidos tengan las propiedades físicas deseadas. La hidrólisis enzimática ha ido reemplazando gradualmente los procesos tradicionales de catálisis ácida debido a las ventajas que presenta:

- a. Mayor especificidad
- b. Productos con determinada distribución de carbohidratos
- c. Condiciones de hidrólisis más suaves
- d. Menor cantidad de subproductos
- e. Minimización de etapas de refinamiento para remover cenizas y color. (28)

Dos tipos de enzimas intervienen en la degradación y síntesis del almidón y polisacáridos semejantes. En el primer grupo se encuentran aquellas enzimas que catalizan el rompimiento hidrolítico de los enlaces glucosídicos, ésta reacción es prácticamente irreversible. Las enzimas de este grupo, son las amilasas y amiloglicosidasas que son hidrolíticas.

Las enzimas del segundo grupo tienen una reacción diferente, ellas permiten la transferencia de los enlaces glucosídicos. En general, la reacción consiste en la formación de un enlace glucosídico y simultáneamente el rompimiento de otro enlace glucosídico, en todo esto interviene un intercambio de energía de un radical a otro y la mayoría de las reacciones son reversibles. Las enzimas de este grupo se les llama transglucosidasas, donde se incluyen fosforilasas y las no fosforolíticas como ciclodextrinasa, amilomaltasa, coenzima Q, etc., estas enzimas no son hidrolíticas. La síntesis y degradación enzimática del almidón y semejantes, depende más que nada de la reacción enzimática sobre las peculiaridades del sustrato. En general, hay dos tipos de amilasas, α y β .

ALFA AMILASA

a. Las fuentes de la alfa - amilasa son:

- 1) Organos de animales y fluidos: páncreas humano, cerdo, perro, caballo, bovino, oveja; glándulas salivales (parótidas) humanas, mono, cerdo, rata, ratón, ardilla; sangre humana y orina.
- 2) Plantas superiores: cereales no germinados y germinados: cebada, sorgo, malta, trigo, etc. Uno de los objetivos de la germinación es el de producir enzimas que no están presentes o que no están en cantidades suficientes en los granos sin germinar. En el caso del sorgo, se encontró que donde se produce la mayor cantidad de alfa amilasa es en el embrión.
- 3) Microorganismos: hongos como *Aspergillus oryzae*, bacterias como *Bacillus subtilis*, *Bacillus mesentericus*, *Clostridium acetobutylicum*. (4)(12)(20)

b. Acción de la enzima.

La α amilasa (α 1,4 glucan 4 glucanohidrolasa E.C. 3.2.1.1) es una endoenzima que hidroliza los enlaces glucosídicos α 1,4 del sustrato (amilosa, amilopectina y polisáridos semejantes) en un mecanismo al azar que se lleva a cabo en dos pasos. En la primera reacción las endoamilasas hidrolizan los enlaces localizados en las regiones más internas del sustrato, sólo los enlaces terminales no son hidrolizados, obteniéndose

como productos de reacción dextrinas, las cuales posteriormente son hidrolizadas a polisacáridos de menor peso molecular. En una segunda reacción, mucho más lenta se forma una mezcla de maltosa y maltotriosa, la cual se rompe lentamente en maltosa y glucosa después. (4)(34) Todos los azúcares reductores se producen en forma alfa. En el caso de sustratos que tienen ramificaciones alfa - 1,6, estos enlaces son resistentes a la acción de la α -amilasa y también inhiben la hidrólisis de los enlaces alfa - 1,4 vecinos. (20). El mecanismo de acción de la alfa amilasa se muestra en la Figura 1.

Independientemente de la fuente y la pureza de una preparación de alfa amilasa, la acción de la alfa amilasa es caracterizada por un cambio simultáneo en las propiedades del sustrato:

1. Aumento del poder reductor: debido a la liberación hidrolítica de grupos glucosídicos aldehído.
2. Cambio en las propiedades de formación de color con yodo: la máxima absorción de la adición de un complejo de yodo da un color violeta, luego púrpura y luego café. En forma simultánea, la intensidad de la absorción de luz disminuye y las propiedades de mantenimiento de color con yodo desaparecen. A esto se le llama dextrinización.
3. Disminución de la viscosidad.
4. Disminución de la turbidez de la solución de almidón.
5. Cambio en el poder óptico de rotación: la rotación óptica del almidón soluble es de $[\alpha] = +220$ y va disminuyendo llegar al valor de $+130$. (4)(11)(18)(34)

HIDROLIZADOS DE ALMIDON.

El diferente grado de hidrólisis (conversión) del almidón se refiere principalmente al contenido de azúcares reductores que se expresa como equivalente de dextrosa (DE). En base a esto, los hidrolizados del almidón se clasifican en dos grupos:

- a. DE menor que 20: maltodextrinas
- b. DE mayor que 20: jarabes de maíz

Las maltodextrinas son polímeros formados por D-glucosa, en los cuales, residuos individuales de alfa D-glucopiranosil están unidos por enlaces alfa 1,4 para dar cadenas lineales y que poseen también ramificaciones alfa 1,6. Las maltodextrinas se obtienen a partir de una hidrólisis controlada del almidón para conservar un equivalente de dextrosa menor que 20. La hidrólisis puede ser catalizada con ácido (ácido clorhídrico diluido), una enzima (alfa amilasa) o ambos. La composición de sacáridos de maltodextrinas obtenidas por una hidrólisis ácida es diferente a la obtenida por una enzimática, aunque en ambos casos se obtiene el mismo equivalente de dextrosa. (10)(15)(22)(26)(28) La composición de carbohidratos de las maltodextrinas se presenta en el Cuadro 1.

Tomando en cuenta que el equivalente de dextrosa de las maltodextrinas se refiere al contenido de azúcares reductores, como se mencionó anteriormente, se dice que si el equivalente de dextrosa es bajo hay menor cantidad de azúcares reductores y si el equivalente de dextrosa es alto el contenido aumenta. En base a esto, se hace notar que las maltodextrinas van a presentar diferentes propiedades de acuerdo al equivalente de dextrosa que tengan. Si el equivalente de dextrosa va aumentando (independientemente de la forma de hidrólisis realizada) la viscosidad de las maltodextrinas va a ir disminuyendo debido a que ocurre un rompimiento hidrolítico del almidón, lo cual ocasiona una disminución en el tamaño de la molécula de almidón y por lo tanto en su peso molecular, dando como resultado soluciones más claras a las originales de almidón, debido a la liberación hidrolítica de azúcares reductores, los cuales van a provocar un aumento en el dulzor de las maltodextrinas; van a producir reacciones de oscurecimiento cuando se someten a altas temperaturas; influyen en el aumento de la osmolaridad de las soluciones. La osmometría con congelación se utiliza para medir el punto de congelación de una solución comparándola con el agua. Dicho punto de congelación depende del número de moléculas en solución, entre más pequeña sea la longitud de la cadena de los oligosacáridos más alta es la depresión del punto de congelación; otra de las propiedades que es característica de los carbohidratos de bajo peso molecular es el aumento en la higroscopicidad de las maltodextrinas debido a que hay formación de puentes de hidrógeno con las moléculas de agua en la atmósfera. (2)(24)(27)

En general, las maltodextrinas se dividen en cuatro tipos de acuerdo al equivalente de dextrosa y son: 5, 10, 15 y 20 aunque en ocasiones se producen maltodextrinas que llegan a presentar un equivalente de dextrosa de 30. La descripción general de las maltodextrinas se presenta en el Cuadro 2.

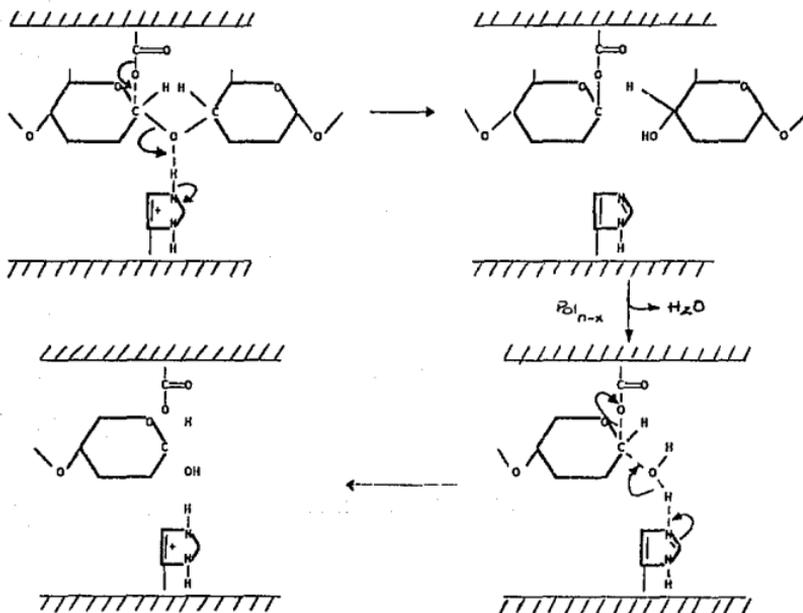
En la industria alimentaria, las maltodextrinas son utilizadas en una gran variedad de alimentos, desarrollando diferentes funciones que se muestran a continuación en el Cuadro 3. (24)

De el gran número de hidrolizados disponibles descritos en términos de su valor de equivalente de dextrosa, sólo los materiales con un equivalente de dextrosa bajo son aceptados en tratamientos posteriores de fallas crónicas renales, cirrosis de hígado, desórdenes en el metabolismo de aminoácidos y aquellas condiciones en las cuales se requiere de una gran cantidad de energía pero de una dieta con un fluido y contenido electrofítico bajos. (10)(27)

Aunque las maltodextrinas son utilizadas generalmente en la industria alimentaria, en ocasiones se utilizan en la industria farmacéutica, principalmente en la producción de tabletas, píldoras, polvos y jarabes, cumpliendo diversas funciones entre las que se encuentran:

- agente tableteador
- control de densidad
- excipiente
- proporcionar viscosidad y dulzor

FIGURA 1
MECANISMO PROPUESTO PARA
ALFA AMILASA



• Whitaker, J. (1972) Principles of enzymology for the sciences: 451.

CUADRO 1

PERFIL APROXIMADO DE COMPOSICION
DE CARBOHIDRATOS DE MALTODEXTRINAS(24)
(% EN BASE SECA)

AZUCAR	DE=10	DE=20	DE=30
Dextrosa	1.0	1.0	4.0
Disacárido	4.0	6.0	10.0
Trisacárido	6.0	8.0	14.0
Superiores	89.0	85.0	72.0

CUADRO 2

DESCRIPCION GENERAL DE LAS MALTODEXTRINAS (24)

EQUIVALENTE DE DEXTROSA	PROPIEDADES
8-12	Dulzor imperceptible, Higroscopicidad baja, Solubilidad completa hasta 30% sólidos
18-22	Dulzor extremadamente bajo, Higroscopicidad baja, Solubilidad completa hasta 60% de sólidos
28-32	Dulzor moderado, Higroscopicidad moderada, Solubilidad completa hasta 70% de sólidos

CUADRO 3

APLICACION DE LAS MALTODEXTRINAS
EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA (24)

INDUSTRIA	USO	PROPOSITO
Alimentos infantiles	leches maternizadas	fuelle de energía
	alimentos envasados	cuerpo y textura
Lácteos	helados	estabilización, inhibición de cristales, control de congelación, cuerpo
	quesos para untar	cuerpo, estabilización de emulsiones
Confitería	caramelos duros, confitados, chicles	plastificante, inhibidor de cristalización
Postres	en polvo, pudines	control del dulce, cuerpo y textura
Panificación	batidos para pastel	emulsificante, retención de humedad, formación de estructura
	pasta para pay	mejorador de hojuela, agente de coloración

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

1. MATERIALES

a. Materias primas utilizadas:

- sorgo rojo para germinar
- sorgo blanco para germinar
- sorgo perlado para hidrolizar
- almidón de maíz para hidrolizar

b. Equipo de laboratorio de uso común:

- Parrilla eléctrica, Precision Scientific
- Potenciómetro, Corning 125
- Balanza analítica, Mettler H-10
- Balanza granataria, Bainweight B 1500 D
- Termobalanza, Ohaus MB-300
- Fotocolorímetro, Klett and Summerson
- Espectrofotómetro, UV-210 A Shimadzu
- Baños Lab Line Instrument No. 310 y Grant tipo SE-15
- Estufa, Craft
- Molino de café, Moulinex
- Tamiz, número de malla 40

c. Material de vidrio:

Material de vidrio común de laboratorio

d. Reactivos:

- almidón soluble, Merck
- maltosa, Merck
- dextrosa anhidra, Merck
- ácido 3,5 dinitrosalicílico, Sigma
- α amilasa fúngica (*Aspergillus Oryzae*), Quimorgan
- reactivo de Folin-Ciocalteu, Merck
- antrona, Merck
- solución de Fehling A y B, Sigma
- almidón de maíz, Industrializadora del Maíz
- bio gel P-100 (100-200 mallas), Bio Rad
- dextran azul, Sigma
- mezcla de proteínas de altos y bajos pesos moleculares, Sigma
- ácido clorhídrico 0.1 N y 1.0 N, Sigma
- maltodextrinas:
 1. Inamalt 110, 120, 130, Industrializadora de alimentos
 2. Amidex 1 y 11, Arancia Comercial

2.- METODOS.

1) DETERMINACION DE AZUCARES REDUCTORES DIRECTOS. (9)(31)

FUNDAMENTO.

Este método es conocido como el de Lane-Eynon, el cual está basado en la acción reductora de ciertos azúcares, donde un complejo de cobre que se encuentra en una solución alcalina de tartrato, es reducido a óxido cuproso (I) y los azúcares en solución se oxidan a un gran número de productos de oxidación. La reacción se puede sintetizar de la siguiente forma:



PROCEDIMIENTO

a. Preparación del patrón.

Pesar 1 g de glucosa anhidra pura, disolverla en agua destilada y aforar a 100 ml. La concentración de esta solución es de 0.01 g de glucosa por ml.

Tomar con una pipeta volumétrica 5 ml de la solución de Fehling A y 5 ml de la B, añadir 50 ml de agua destilada, calentar a ebullición, añadir 1 ml de la solución patrón, dejar hervir, añadir 2 gotas de azul de metileno al 0.2%, dejar hervir y añadir la solución patrón, dejando que el óxido cuproso formado se asiente y observando que haya desaparecido el color azul del sobrenadante. La titulación debe completarse en un tiempo no mayor de 3 minutos.

b. Preparación de la muestra problema.

Pesar de 1 a 10 g de muestra y pasarlos a un matraz aforado de 100 ml, añadir agua destilada tibia para disolver, enfriar a temperatura ambiente, aforar y titular de la misma forma que la solución patrón.

2) DETERMINACION DEL EQUIVALENTE DE DEXTROSA. (31)

FUNDAMENTO

El equivalente de dextrosa (DE) se refiere al poder reductor calculado como la cantidad de glucosa y expresado en base seca. Se obtiene de la siguiente forma:

$$\% \text{ DE} = \frac{\text{azúcares reductores directos} \times 100}{\% \text{ sustancia seca}}$$

3) DETERMINACION DE AZUCARES REDUCTORES TOTALES. (32)

FUNDAMENTO.

Tiene el mismo fundamento que la determinación de azúcares reductores directos.

PROCEDIMIENTO.

a. Preparación de la solución patrón.

Pesar 9.5 g de sacarosa y disolverla en 100 ml de agua destilada, pasar a un matraz aforado de 1 lt, añadir 4 ml de HCl concentrado y dejar en reposo 3 días a 25°C o 7 días a 15°C. Aforar, tomar 25 ml y pasarlos a un matraz aforado de 100 ml, añadir 50 ml de agua destilada, neutralizar con NaOH 20%, aforar y titular de la misma forma que la solución patrón preparada para la determinación de azúcares reductores directos.

b. Preparación de la muestra problema.

Preparar la solución de la muestra problema de la misma forma que la determinación de azúcares reductores directos. Tomar una alícuota y pasarla a un matraz de bola y añadir HCl 1 N, de tal forma que ambos estén en una relación de 2:1 respectivamente; añadir perlas de ebullición y poner a reflujo durante 3-4 horas observando que no ocurra caramelización de la muestra. Enfriar, neutralizar y titular de la misma forma que la solución patrón.

4) DETERMINACION DE AZUCARES REDUCTORES TOTALES POR EL METODO DE LA ANTRONA. (6) (19) (21)

FUNDAMENTO.

La reacción de la antrona se basa en la habilidad que tiene un carbohidrato, en presencia de ácido y calor, a formar un derivado de furfural, seguido de la reacción con antrona para dar un color azul verdoso característico.

PROCEDIMIENTO.

A una serie de tubos se adicionan alícuotas de una solución de glucosa de 10 a 100 µg/ml diluyéndose a 1 ml con agua destilada, posteriormente, se añaden 2 ml del reactivo de antrona

(0.2 g de antrona en 100 ml de ácido sulfúrico 95%) por las paredes del tubo para que se estratifique. Después de 1 a 3 minutos, mezclar perfectamente y revelar en un baño a ebullición durante 10 minutos, enfriar y leer a 620 nm. Se construye una gráfica de absorbancia vs μg glucosa/ml.

5) DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD AMILOLITICA DE LA ENZIMA. (4)(36)

FUNDAMENTO.

La actividad enzimática se basa en la determinación de azúcares mediante el reactivo de Miller (ácido 3,5 dinitrosalicílico) formando un compuesto colorido.

PROCEDIMIENTO.

Preparar una solución de almidón soluble al 1% disuelto en regulador de fosfatos 0.02 M pH 6.9 a ebullición, agitando vigorosamente durante 3 minutos, sacar del fuego y enfriar. En una serie de tubos por triplicado y el testigo agregar 1.9 ml de la solución de almidón, ponerlos en incubación a 25°C durante 10 minutos y a cada tubo, excepto el blanco, se le adiciona 0.1 ml de la solución de enzima (origen fúngico, bacteriano, pancreático y vegetal) con una concentración de 2×10^6 g/ml, se deja actuar a la enzima en un lapso de tiempo que va de 5 minutos a una hora, al cabo de los cuales se añaden 4 ml de ácido 3,5 dinitrosalicílico. Los tubos se revelan en un baño a ebullición durante 5 minutos, se enfrían y se leen a 540 nm o con un filtro verde. Los valores de absorbancias se extrapolan en la curva tipo obteniendo la concentración de maltosa liberada.

a. ELABORACION DE LA CURVA TIPO.

Se parte de una concentración inicial de 2000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de maltosa. En una serie de tubos se adicionan de 0 a 0.9 ml de la solución inicial, llevar a 1 ml con agua destilada, agregar 4 ml del ácido 3,5 dinitrosalicílico, revelar en un baño a ebullición 5 minutos, enfriar y leer a 540 nm. Hacer una gráfica de absorbancia vs μg maltosa/ml.

6) DETERMINACION DE PROTEINAS POR EL METODO DE FOLIN-CIICALTEAU.
(29)

FUNDAMENTO.

El método de Folin-Lowry se basa en la determinación de la presencia de tirosina. La reacción se lleva a cabo en dos pasos:

- a. Reacción del cobre en medio alcalino con la proteína
- b. Reducción del reactivo Folin-Ciocalteu (ácido fosfomolibdico-ácido fosfotúngstico) por las proteínas tratadas con cobre.

El fundamento es medir la absorbancia del compuesto reducido.

PROCEDIMIENTO.

a. PREPARACION DE LA CURVA TIPO.

Preparar una solución de tripsina de 1000 ug/ml y partiendo de ésta preparar soluciones desde 100 hasta 900 ug/ml. En una serie de tubos por triplicado y su testigo, agregar 1 ml de las soluciones, 5 ml de la solución E* que se prepara a la hora de la reacción, agitar, dejar en reposo durante 10 minutos añadir 0.5 ml de la solución de Folin (1:3 con agua destilada), dejar reposar durante 30 minutos y leer a 600 nm o con filtro rojo. Con los valores obtenidos en Unidades Klett se construye una gráfica de Unidades Klett vs ug tripsina/ml.

- * NOTA: Solución A = carbonato de sodio 2% disuelto en NaOH 0.1 N
" B = tartrato de sodio 1%
" C = sulfato de cobre 5%
" D = 2.5 ml sol. B + 2.5 ml sol. C
" E = 50 ml sol. A + 1 ml sol. D

b. PREPARACION DE LA MUESTRA.

Preparar una solución de la muestra con una concentración de 1 mg/ml. Tomar 1 ml de la solución y tratarla igual que el patrón de tripsina.

7) DETERMINACION DE PESOS MOLECULARES POR CROMATOGRAFIA EN GEL.
(5)(7)(8)(14)(25)(33)(35)(37)

FUNDAMENTO.

La cromatografía en gel está basada en la disminución de la permeabilidad de la cadena tridimensional de un gel a moléculas de un tamaño mayor. Si una solución contiene una mezcla de solutos de diferentes pesos moleculares y se hace pasar a través de una columna que contiene el gel adecuado, las moléculas más pequeñas penetran en los poros del gel más fácilmente que las de mayor tamaño, por lo que van a ser retenidas más tiempo en la columna.

En una columna empacada con gel, se distinguen dos fases, una dentro del gel que es la fase estacionaria y la otra fuera del gel que es la fase móvil. El volumen del solvente fuera de las partículas del gel se denomina volumen vacío (V_0) y el volumen del solvente requerido para eluir el soluto de la columna en concentración máxima se denomina volumen de elución (V_e).

PROCEDIMIENTO.

a. PREPARACION DE LA COLUMNA.

Se utiliza una columna de 0.9 x 60 cm, la cual debe estar perfectamente vertical, con llave de control de flujo cerrada, se adiciona un poco de regulador de fosfatos 0.05 M con NaCl 0.2 M pH 7, se vierte la suspensión de BioGel P-100. Cuando se ha terminado la adición del gel se deja cerrada la llave de control de flujo durante 10 minutos. Después de éste tiempo se abre la llave poco a poco con lo que empieza a fluir el regulador por el extremo inferior de la columna, regulando el flujo a una velocidad de 0.5 ml/min, y se empieza a empacar el gel. Se adiciona el regulador de tal manera que el nivel del regulador nunca debe estar bajo la superficie del gel. Cuando ya no se modifica la altura del gel se considera terminado el empacamiento; la altura de la cama del gel fué de 52 cm con un volumen de la cama del gel de 34 ml. Este volumen se debe mantener durante todo el experimento.

b. DETERMINACION DEL VOLUMEN VACIO (V_0) DE LA COLUMNA.

Se drena el regulador hasta que el menisco quede sobre la superficie del gel. se cierra la llave y se añade poco a poco con una pipeta el dextran azul (4 mg disueltos en 1 ml de regulador) sobre la pared de la columna, se eluye y colecta en tubos previamente pesados hasta que el colorante haya

introducido hasta el nivel del gel, entonces se adiciona regulador y se empiezan a coleccionar fracciones de 1 ml por tubo, hasta que todo el dextran azul haya sido eluido. Se pesan los tubos, se leen a 280 nm. En este experimento, el volumen vacio (V₀) se considera como la sumatoria del peso de las fracciones hasta que se presente la mayor absorbancia.

c. DETERMINACION DEL VOLUMEN DE ELUCION (V_e) DE LAS PROTEINAS TIPO.

Se dreña el regulador hasta que el menisco esté sobre la superficie del gel, se cierra la llave y se añade cuidadosamente sin perturbar la superficie del gel 1 ml de la mezcla de proteínas tipo (4 mg disueltos en 1 ml de regulador de fosfatos). Se introduce la mezcla de proteínas a la columna hasta que el nivel haya bajado al tope del gel, se eluye lentamente con el regulador y se coleccionan fracciones de 1 ml en los tubos previamente pesados. Las fracciones coleccionadas de cada proteína se leen a 280 nm. El volumen de elución (V_e) será la suma del peso de los volúmenes de las fracciones hasta la que presenta la mayor absorbancia.

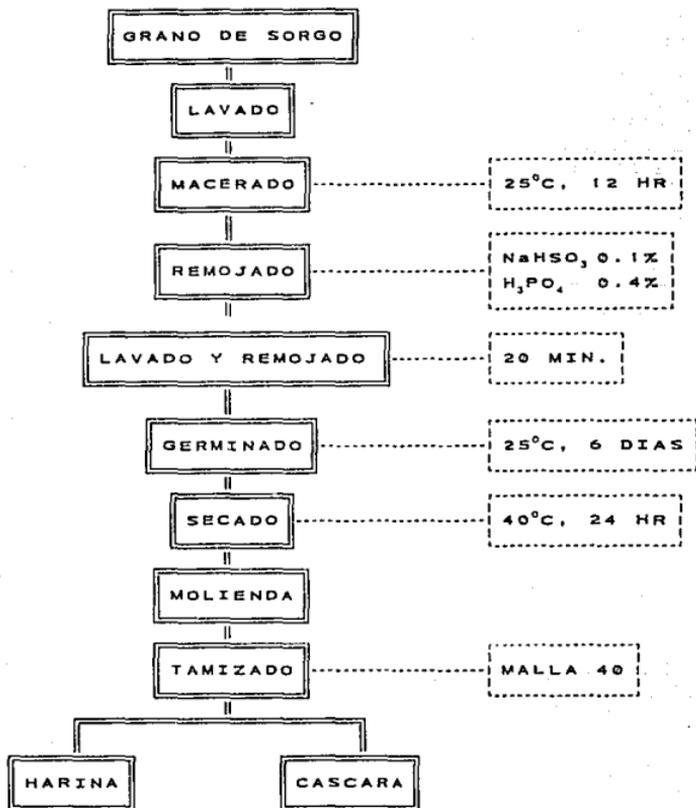
d. DETERMINACION DEL VOLUMEN DE ELUCION (V_e) DE LAS MUESTRAS PROBLEMA.

Se dreña el regulador hasta que el menisco esté sobre la superficie del gel, se cierra la llave y se añade cuidadosamente 1 ml de la solución problema (0.5 ml de la muestra + 0.5 ml de regulador). Se introduce la muestra a la columna hasta que el nivel de ésta haya bajado al tope del gel, se eluye lentamente con el regulador y se coleccionan fracciones de 1 ml en tubos previamente pesados. Las fracciones coleccionadas de cada muestra problema se pesan y se les añaden 2 ml del reactivo de antrona, se revelan en un baño a ebullición durante 10 minutos, se enfrían y se leen a 620 nm. El volumen de elución (V_e) será la suma del peso de los volúmenes de las fracciones hasta la que presente la mayor absorbancia.

8) PROCESO DE GERMINACIÓN DEL SORGO. (20)(25)

El proceso de germinación para la obtención de la enzima vegetal se llevó a cabo por el método de la jarra. Ver Diagrama 1. Al grano primeramente se le da una limpieza (pesándose antes de germinar), se lava con agua destilada hervida y se macera durante 12 horas a temperatura ambiente, para que el grano adquiera cierta humedad y la germinación se facilite. Posteriormente, el grano se sumerge en una mezcla de bisulfito de sodio al 0.1% y ácido fosfórico al 0.4% durante 40 minutos, en una relación 1:3 (p/v), actuando éstos como fungicidas para evitar el crecimiento de hongos. A continuación se lava con agua corriente y después con agua destilada hervida, poniéndose a remojar por 20 minutos con la misma agua, para la eliminación completa de los fungicidas. Inmediatamente se procede a la germinación, efectuándose ésta en charolas de plástico con una pequeña inclinación, tapándose con polietileno y encima del mismo una tela húmeda, con la finalidad de mantener una humedad adecuada, llevándose a cabo a temperatura ambiente durante 6 días. Para mantener la humedad, diariamente se gira la charola en una posición de 190 y agregándose el agua necesaria. Una vez germinado el grano se seca a 40°C durante 24 horas, hasta una humedad del 10% aproximadamente. Luego se pasa a la molienda, la cual se realizó en un molino de café, tamizándose en malla # 40; obteniéndose así la harina y la cáscara respectivamente que fueron las materias primas para la extracción de la enzima.

PROCESO DE GERMINACION DEL SORGO



V. DESARROLLO EXPERIMENTAL.

1) SELECCION DE LOS SUSTRATOS.

La primera parte del trabajo consistió en seleccionar la materia prima que servirían como sustrato en las reacciones enzimáticas, se trabajó con almidón soluble, almidón de maíz y el sorgo perlado el cual fué molido en un molino de café y posteriormente tamizado en una malla 40.

2) OBTENCION DE LA ENZIMA VEGETAL.

Fueron utilizados dos tipos de sorgo, el rojo y el blanco, a los cuales se les hizo un análisis de carbohidratos. Posteriormente, ambas muestras de sorgo fueron germinadas durante 6 días, se secaron, se molieron y se tamizaron en una malla 40 obteniendo dos fracciones: la harina y la cáscara, de las cuales, sólo la harina de ambos tipos de sorgo se utilizó en forma de suspensión y filtradas en papel Whatman 1 a las soluciones obtenidas se les determinó la actividad amilolítica por el Método de Miller (ácido 3,5 dinitrosalicílico) a diferentes concentraciones de enzima, desde 100 ug/ml hasta 3000 ug/ml y utilizando tres almidones como sustratos el almidón soluble, el almidón de maíz y el de sorgo perlado. La muestra de sorgo germinado, ya sea rojo o blanco, que presente la mayor actividad amilolítica, será utilizada como fuente de la enzima. Posteriormente, a la muestra seleccionada se le determinó la cantidad de proteína por el Método de Folin - Ciocalteu.

2) SELECCION DE LA ENZIMA INDUSTRIAL.

El propósito de utilizar otra enzima es el de comparar su actividad con la enzima vegetal, por esta razón, se determinó la actividad amilolítica a cinco enzimas de origen fúngico, cuatro de origen bacteriano y una de origen pancreático; utilizando como sustrato el almidón soluble, realizando la reacción a temperatura ambiente, a pH 6.9 y una concentración de la enzima de 10 ug/ml. De todas las enzimas se seleccionará aquella que presente la mayor actividad.

3) OBTENCION DE MALTODEXTRINAS.

a. Determinación de las condiciones de hidrólisis.

- * Sustratos: almidón de maíz y de sorgo perlado
- * Enzimas: vegetal e industrial
- * Temperatura: 25° y 35° C
- * pH: 7.0
- * tiempo de reacción: 10 min a 6 hr

b. Inactivación de las enzimas.

Se probaron tres formas de inactivación para las dos enzimas:

- 1b. Por medio de calor
- 2b. Por medio de frío
- 3b. Por medio de ácido

c. Análisis de maltodextrinas.

- 1c. Determinación de azúcares reductores directos (método de Lane Eynon)
- 2c. Determinación de azúcares reductores totales (método de Lane Eynon)
- 3c. Determinación del equivalente de dextrosa (método de Lane Eynon)
- 4c. Determinación de la cantidad de maltosa liberada (método de Miller)

d. Determinación del peso molecular aproximado.

- 1d. El gel utilizado fué el BioGel P-100 preparado en regulador de fosfatos 0.05 M y pH 7.0
- 2d. Se elaboró una curva tipo utilizando una mezcla de proteínas: beta galactosidasa, albúmina bovina, albúmina de huevo, tripsinógeno y citocromo C.
- 3d. Se utilizó dextrán azul para determinar el volúmen vacío (V_0) de la columna de gel.
- 4d. Las maltodextrinas utilizadas se pasaron através de la columna y se les determinó el perfil de elución por el método de la antrona, posteriormente se calcularon los pesos moleculares con ayuda de la curva tipo.

VI. RESULTADOS Y DISCUSION DE RESULTADOS

En la selección de la materia prima que sería utilizada como sustrato en las reacciones enzimáticas, los materiales elegidos fueron el almidón de maíz y el de sorgo perlado del cual se obtuvo una harina fina y posteriormente se le hizo un análisis de carbohidratos cuyos resultados se observan en el Cuadro 6. Las abreviaciones que serán utilizadas en los resultados posteriores se presentan en el Cuadro 5.

Después se seleccionaron dos tipos de sorgo, el sorgo rojo y el sorgo blanco, los cuales se utilizaron para obtener una amilasa de origen vegetal. A ambos tipos de sorgo se les hizo una análisis de carbohidratos cuyos resultados se presentan en el Cuadro 6.

Para poder obtener la amilasa vegetal, fueron sometidos el sorgo rojo y el blanco a una germinación, realizada de acuerdo al método de la jarra (Ver Diagrama 1), una vez transcurrida la germinación, se obtuvieron dos fracciones: la harina y la cáscara y se les hizo el análisis de carbohidratos cuyos resultados se observan en el Cuadro 6. En este mismo Cuadro, observamos que las muestras de sorgo, tanto germinado como no germinado, presentan un bajo contenido de azúcares reductores (directos y totales) con respecto a las maltodextrinas comerciales que se analizaron de la misma manera lo que refleja a su vez un equivalente de dextrosa bajo, indicando, así mismo, la presencia de almidón en todas las muestras.

Se procedió después a seleccionar la fuente de la enzima vegetal, por lo que las harinas de ambos tipos de sorgo (rojo y blanco) se usaron en forma de solución donde se suponía estaba presente la amilasa, de acuerdo a esto, se les determinó la actividad amilolítica a ambas muestras de sorgo, utilizando tres almidones como sustrato: soluble al 1%, de maíz al 1% y de sorgo perlado al 0.5%. Los resultados se muestran en el Cuadro 7.

CUADRO 5

ABREVIACIONES:

HSR: harina de sorgo rojo
CSR: cáscara de sorgo rojo
HSB: harina de sorgo blanco
CSB: cáscara de sorgo blanco
SP: sorgo perlado
g: germinado
sg: sin germinar

CUADRO 6

ANALISIS DE CONTENIDO DE CARBOHIDRATOS
DE LAS MUESTRAS DE SORGO

MUESTRA	¹ ARD %	² DE %	³ ART %	ALMIDON %	HUMEDAD %
HSRg	1.57	1.68	75.04	67.54	6.60
CSRg	1.32	1.42	38.82	34.94	7.00
HSBg	1.41	1.73	28.08	25.27	18.50
CSBg	1.09	1.23	-	-	11.30
SP	0.65	0.72	73.39	66.05	9.30
HSRsg	0.94	1.03	54.60	49.14	8.60
CSRsg	0.68	0.73	54.60	49.14	7.00
HSBsg	0.50	0.52	45.09	40.58	4.20
CSBsg	0.76	0.83	36.35	32.72	9.00

¹ARD: AZUCARES REDUCTORES DIRECTOS

²DE: EQUIVALENTE DE DEXTROSA

³ART: AZUCARES REDUCTORES TOTALES

CUADRO 7

DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD AMILOLITICA
DE SORGO GERMINADO

[E] ^a	324 ug/ml		648 ug/ml		1620 ug/ml	
[S] ^b	HSRg (ug malt/hr)	HSBg (ug malt/hr)	HSRg (ug malt/hr)	HSBg (ug malt/hr)	HSRg (ug malt/hr)	HSBg (ug malt/hr)
Almidon soluble 1%	428	296	770	392	2002	1658
Almidon de maiz 1%	196	163	630	344	1935	1719
Almidon de sorgo perlado 0,5%	245	189	519	379	792	570

CONDICIONES DE HIDROLISIS:

T: 25°C

pH 7 regulador de fosfatos 0.02 M

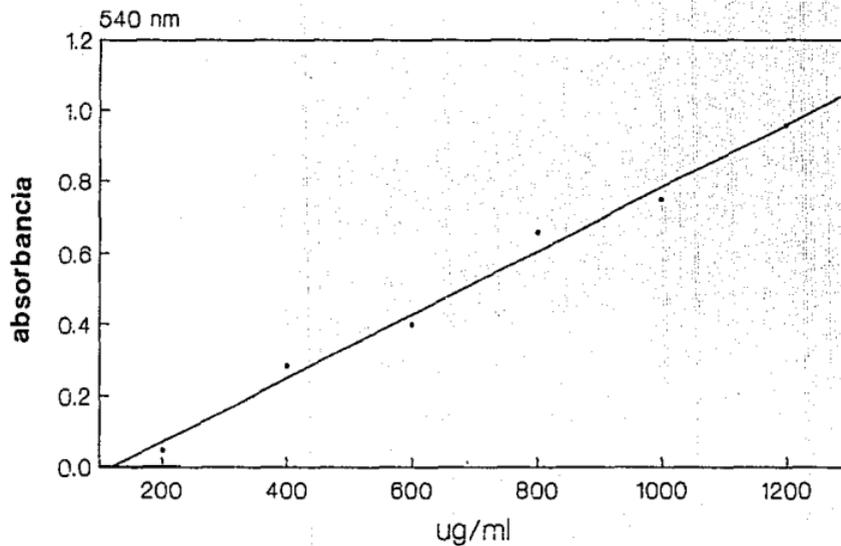
^a[E]: CONCENTRACION DE LA ENZIMA

^b[S]: CONCENTRACION DEL SUSTRATO

En el Cuadro 7 sólo se presentan tres concentraciones, porque a concentraciones menores de 300 ug/ml se presentaba una actividad muy baja y a mayores de 2000 ug/ml se inhibía la actividad enzimática. Los resultados se expresan en forma de ug de maltosa liberados/hora y se obtuvieron por el método de Miller, utilizando ácido 3.5 dinitrosalicílico, previa elaboración de la curva tipo (Figura 3). Puede observarse en el Cuadro 7 que al aumentarse la concentración de la enzima se incrementa la cantidad de maltosa liberada, en el caso de la enzima obtenida a partir del sorgo rojo es más notorio el incremento de la maltosa liberada a comparación de la enzima del sorgo blanco para los tres sustratos. En base a estos resultados, se seleccionó como fuente de la amilasa vegetal el sorgo rojo germinado a una concentración de 1620 ug/ml. A esta misma muestra de sorgo rojo, se le determinó posteriormente la cantidad de proteína presente por el método de Folin - Ciocalteau previa elaboración de la curva tipo (Figura 4), la muestra presentó 647.9 mg tripsina/ml.

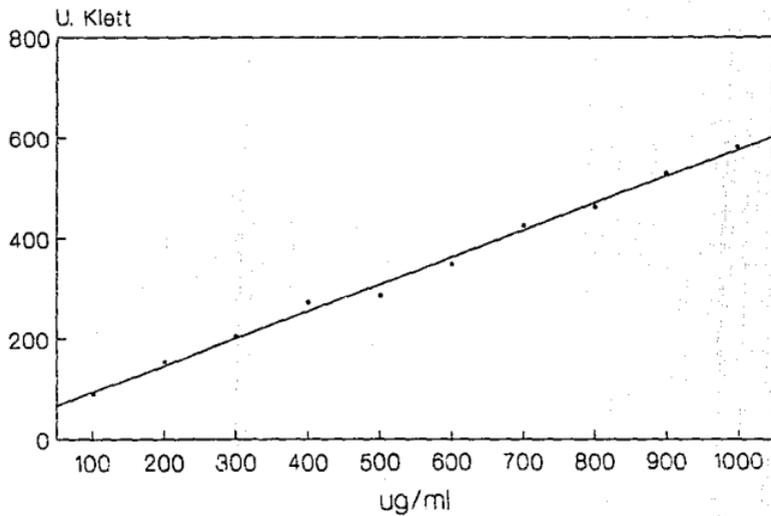
Para poder comparar la actividad de la enzima vegetal, se les determinó la actividad amilolítica a amilasas de diferente origen. Se probaron cinco amilasas de origen fúngico, cuatro de origen bacteriano y una de origen pancreático, todas ellas en una concentración de 10 ug/ml utilizando como sustrato almidón soluble al 1%. En el Cuadro 8 se presentan las actividades de estas enzimas, podemos observar que de las amilasas fúngicas, la que presentó la mayor actividad fue la H-400, liberando 200,700 ug de maltosa/hr y la que tuvo la actividad más baja fue la Panzima G, que liberó 25,600 ug de maltosa/hr. En el caso de las amilasas de origen bacteriano, la enzima con mayor actividad fue la Tenasa G que liberó 511,700 ug de maltosa/hr, mientras que otra amilasa bacteriana liberó 150,600 ug de maltosa/hr. La amilasa pancreática liberó 141,300 ug de maltosa/hr. A partir de estos datos, se decidió utilizar la enzima fúngica H-400 para comparar su actividad con la enzima vegetal porque presentó una actividad moderadamente alta. La enzima bacteriana Tenasa G no se utilizó porque su actividad era demasiado alta y se desea una hidrólisis moderada del almidón para la obtención de las maltodextrinas. A la enzima fúngica H-400 se le determinó la cantidad de proteína por el método de Folin - Ciocalteau, previa elaboración de la curva tipo (Figura 4), la enzima presentó 459.6 mg tripsina/ml.

FIGURA 3
CURVA TIPO DE MALTOSA
METODO DE MILLER



$$Y = 0.0009 x - 0.107$$

FIGURA 4
CURVA TIPO DE PROTEINA (TRIPSINA)
METODO DE FOLIN CIOCALTEAU



$$Y = 39.08 x + 0.5387$$

CUADRO B

DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD
AMILOLITICA DE ENZIMAS INDUSTRIALES

ORIGEN DE LA ENZIMA	$\frac{\mu\text{g maltosa}}{\text{mg solido/hr}}$
Amlasa fúngica	120,700
Amlasa fúngica (P-200)	121,200
Amlasa fúngica (H-400)	200,700
Panzima fúngica (GSP)	149,300
Panzima fúngica (G)	25,600
Amlasa bacteriana	150,600
Amlasa bacteriana (QM)	164,700
Amlasa bacteriana (Tenasa G)	511,700
Amlasa bacteriana (Rapidasa)	211,000
Amlasa pancreática (Sigma)	141,300

CONDICIONES DE HIDROLISIS:

CONCENTRACION DE LA ENZIMA: 10 $\mu\text{g/ml}$

ALMIDON SOLUBLE 1%

T: 25°C, regulador de fosfatos 0.02 M pH 6.9

Ya seleccionadas las enzimas que se utilizarían, alfa amilasa de sorgo rojo germinado a una concentración de 1620 ug/ml y la alfa amilasa fúngica H-400 a una concentración de 23 ug/ml y los almidones que servían de sustrato: almidón de maíz y de sorgo perlado; se procedió a determinar las condiciones de hidrólisis para obtener las maltodextrinas.

A las maltodextrinas obtenidas se les hicieron las siguientes determinaciones: azúcares reductores directos y totales, equivalente de dextrosa y almidón (por el método de Lane Eynon); cantidad de maltosa liberada (por el método de Miller). En los resultados únicamente se hace mención del equivalente de dextrosa, ya que las maltodextrinas se clasifican de acuerdo al mismo. En el Cuadro 9 se presentan los resultados de las maltodextrinas obtenidas a partir del almidón de maíz, hidrolizado por la amilasa de sorgo rojo germinado a 25 ° C, las reacciones se hicieron con diferentes tiempos de reacción que fueron desde 10 minutos hasta 6 horas. Existen en la industria varios tipos de maltodextrinas de acuerdo a su equivalente de dextrosa, en general, se manejan los siguientes: 5.0, 10.0, 15.0, 20.0 y hasta 30.0. Cabe mencionar que el equivalente de dextrosa de las maltodextrinas comerciales no es exacto, se presenta un rango generalmente de \pm 2 del valor de equivalente de dextrosa. De acuerdo a esto, con el almidón de maíz y la amilasa vegetal se obtuvieron cuatro tipos diferentes de maltodextrinas y fueron: 5.6 cercano al equivalente de dextrosa de 5.0, 9.6 cercano al de 10.0, 14.0 cercano al de 15.0 y 18.8 cercano al de 20.0.

En el Cuadro 10 se presentan los resultados obtenidos por la hidrólisis del almidón de sorgo perlado con la amilasa de sorgo germinado, la temperatura de la reacción fué de 25 ° C y los tiempos de reacción fueron desde 10 min hasta 6 hr, obteniéndose equivalentes de dextrosa desde 4.9 hasta 31.0, de esta forma, se obtuvieron cinco tipos diferentes de equivalentes de dextrosa para las maltodextrinas y fueron: 4.9 cercano al equivalente de dextrosa 5.0, 11.6 cercano al de 10.0, 13.8 cercano al de 15.0, 19.0 y 21.0 cercano al de 20.0 y 28.6 cercano al de 30.0.

CUADRO 9

OBTENCION DE MALTODEXTRINAS UTILIZANDO
ALMIDON DE MAIZ* Y AMILASA DE SORGO GERMINADO**

TIEMPO HR	ARD ¹ %	DE ² %	ART ³ %	ALMIDON %	MALTOSA ug/ml
0.16	4.90 ± 0.005	5.60 ± 0.015	25.40 ± 0.073	22.80 ± 0.070	763 ± 10.25
0.5	7.40 ± 0.028	8.40 ± 0.015	32.20 ± 0.095	28.80 ± 0.086	1103 0.0
1	8.50 ± 0.104	9.60 ± 0.115	38.60 ± 0.768	34.70 ± 0.694	3076 ± 111.70
2	12.30 ± 0.450	14.00 ± 0.050	41.30 ± 0.315	37.00 ± 0.287	5266 ± 278.01
3	16.50 ± 0.040	18.80 ± 0.062	41.80 ± 0.085	37.60 ± 0.050	7347 0.0
6	20.20 ± 0.015	23.00 ± 0.015	42.00 ± 0.104	38.00 ± 0.025	7561 ± 223.23

CONDICIONES DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA:

T: 25°C, agua destilada (pH 7.0)

*ALMIDON DE MAIZ 1%

**AMILASA DE SORGO GERMINADO: 1620 ug/ml

¹ARD: AZUCARES REDUCTORES DIRECTOS

²DE: EQUIVALENTE DE DEXTROSA

³ART: AZUCARES REDUCTORES TOTALES

CUADRO 10

OBTENCION DE MALTODEXTRINAS UTILIZANDO
ALMIDON DE SORGO PERLADO* Y AMILASA DE SORGO GERMINADO**

TIEMPO HR	ARD ¹ %	DE ² %	ART ³ %	ALMIDON %	MALTOSA ug/ml
0.16	4.50 ± 0.011	4.90 ± 0.011	20.00 ± 0.040	18.00 ± 0.037	695 ± 9.23
0.5	11.60 ± 0.070	12.70 ± 0.070	36.10 ± 0.106	33.50 ± 0.096	1456 ± 93.657
1	13.80 ± 0.014	15.00 ± 0.014	37.40 ± 0.247	33.60 ± 0.226	1987 ± 40.071
2	19.00 ± 0.010	21.00 ± 0.005	40.60 ± 0.202	36.50 ± 0.183	3231 ± 73.1329
3	21.00 ± 0.101	23.00 ± 0.110	43.00 ± 0.364	39.00 ± 0.332	4170 ± 2640.84
6	28.60 ± 0.653	31.20 ± 0.718	48.00 ± 0.887	43.30 ± 0.796	4456 ± 0.0

CONDICIONES DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA:
T: 25°C, agua destilada (pH 7.0)

* ALMIDON DE SORGO PERLADO 0.5%
** AMILASA DE SORGO GERMINADO: 1620 ug/ml

¹ARD: AZUCARES REDUCTORES DIRECTOS

²DE: EQUIVALENTE DE DEXTROSA

³ART: AZUCARES REDUCTORES TOTALES

La obtención de maltodextrinas a partir del almidón de maíz y de la amilasa fúngica H-400 a 25° C, se presenta en el Cuadro 11, se utilizaron tiempos de reacción que van desde 0.5 hasta 6 hr, obteniendo así maltodextrinas con los siguientes equivalentes de dextrosa: 6.5 parecido al de 5.0, 9.4 cercano al de 10.0, 14.4 cercano al de 15.0 y 22.0 cercano al de 20, obteniendo así cuatro diferentes tipos de maltodextrinas.

Utilizando como sustrato el almidón de sorgo perlado y la amilasa fúngica H-400 a 25° C, se utilizaron tiempos de reacción que van de 0.5 hr hasta 4 hr, obteniendo maltodextrinas con diferente equivalente de dextrosa: 7.0 cercano al de 5.0, 16.7 cercano al de 15.0, 21.2 cercano al de 20.0, 27.3 cercano al de 25.0 y 30.7 cercano al de 30.0. Los resultados se presentan en el Cuadro 12.

Tratando de hacer más eficiente la obtención de las maltodextrinas, se decidió incrementar la temperatura de la hidrólisis a 35° C, en los Cuadros 13 A y 13 B se presentan los resultados de la hidrólisis del almidón de maíz con la amilasa de sorgo rojo germinado, para lo cual se utilizaron ocho tiempos de reacción que van desde 5 min hasta 2 hr, obteniéndose maltodextrinas que tienen equivalentes de dextrosa de 5.9 a 25.0 y por lo tanto cinco diferentes tipos de maltodextrinas. Aquí observamos que el tiempo de reacción se redujo hacia una tercera parte, ya que cuando las reacciones de hidrólisis se llevaban a cabo a 25° C los tiempos de reacción se prolongaban hasta 6 hr.

Continuando con la hidrólisis del almidón de sorgo perlado con la amilasa vegetal a 35° C, en el Cuadro 14 se observa que con cinco tiempos de reacción que van desde 5 min hasta 2 hr se obtienen cuatro diferentes tipos de maltodextrinas, con un equivalente de dextrosa de 10.7, 13.7, 17.6, y 26.6; es este caso, también podemos observar la mayor eficiencia al incrementar la temperatura.

CUADRO 11

OBTENCION DE MALTODEXTRINAS UTILIZANDO
ALMIDON DE MAIZ* Y AMILASA FUNGICA H-400**

TIEMPO HR	ARD ¹ %	DE ² %	ART ³ %	ALMIDON %	MALTOSA ug/ml
0.5	5.70 ± 0.01	6.50 ± 0.425	12.30 ± 0.020	11.10 ± 0.020	1177 ± 12.8287
1	8.90 ± 0.517	9.80 ± 0.015	21.70 ± 0.190	19.50 ± 0.175	2206 ± 34.6410
2	9.40 ± 0.098	10.90 ± 0.578	22.60 ± 0.090	20.30 ± 0.424	3383 ± 68.3417
3	14.40 ± 0.025	16.40 ± 0.025	22.70 ± 0.030	20.50 ± 0.025	5538 ± 4.5710
4	17.00 ± 0.050	19.30 ± 0.061	22.90 ± 0.028	20.60 ± 0.028	5751 ± 28.7407
6	22.00 ± 0.005	24.70 ± 0.011	30.00 ± 0.109	27.00 ± 0.103	5901 0.0

CONDICIONES DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA:

T: 25°C, agua destilada (pH 7)

*ALMIDON DE MAIZ 1%

**AMILASA DE *Aspergillus oryzae* H-400: 23 ug/ml

¹ARD: AZUCARES REDUCTORES DIRECTOS

²DE: EQUIVALENTE DE DEXTROSA

³ART: AZUCARES REDUCTORES TOTALES

CUADRO 12

OBTENCION DE MALTODEXTRINAS UTILIZANDO
ALMIDON DE SORGO PERLADO* Y AMILASA FUNGICA H-400**

TIEMPO HR	ARD ¹ %	DE ² %	ART ³ %	ALMIDON %	MALTOSEA ug/ml
0.5	6.50 ±0.005	7.00 ±0.005	20.20 ± 0.05	18.20 ± 0.045	1263 ± 28.73
1	15.20 ±0.005	16.70 ±0.021	35.00 ±0.201	31.40 ± 0.181	2214 ±179.61
2	19.40 ±0.062	21.20 ±0.080	36.00 ±0.090	32.30 ± 0.080	2379 0.0
3	25.00 ±0.119	27.30 ±0.134	39.20 ±0.263	35.30 ± 0.232	2499 ±43.85
4	28.00 ±0.066	30.70 ±0.076	39.40 ±0.202	35.50 ± 43.85	2522 0.0

CONDICIONES DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA:

T: 25°C, agua destilada (pH 7.0)

*ALMIDON DE SORGO PERLADO 0.5%

**AMILASA DE *Aspergillus oryzae* H-400: 23 ug/ml

¹ARD: AZUCARES REDUCTORES DIRECTOS

²DE: EQUIVALENTE DE DEXTROSA

³ART: AZUCARES REDUCTORES TOTALES

CUADRO 13 A

OBTENCION DE MALTODEXTRINAS UTILIZANDO
ALMIDON DE MAIZ* Y AMILASA DE SORGO GERMINADO**

TIEMPO HR	ARD ¹ %	DE ² %	ART ³ %	ALMIDON %	MALTOSA ug/ml
0.08	5.20 ±0.005	5.90 0.0	-	-	857 ±12.990
0.16	6.30 ±0.011	7.20 ±0.017	-	-	1426 ±43.97
0.25	7.00 ±0.238	7.90 ±0.274	-	-	2714 ±50.038
0.5	9.40 ±0.301	10.70 ±0.337	32.16 ±0.158	29.00 ±0.137	3606 0.0

CONDICIONES DE LA HIDROLISIS ENZIMATICA:

T: 35°C, agua destilada (pH 7.0)

*ALMIDON DE MAIZ 1%

**AMILASA DE SORGO GERMINADO: 1620 ug/ml

¹ARD: AZUCARES REDUCTORES DIRECTOS

²DE: EQUIVALENTE DE DEXTROSA

³ART: AZUCARES REDUCTORES TOTALES

CUADRO 13 B

OBTENCION DE MALTODEXTRINAS UTILIZANDO
ALMIDON DE MAIZ* Y AMILASA DE SORGO GERMINADO**

TIEMPO HR	ARD ¹ %	DE ² %	ART ³ %	ALMIDON %	MALTOSA ug/ml
0.75	15.00 ± 0.057	17.00 ± 0.069	32.50 ± 0.105	29.20 ± 0.095	3962 ± 5.773
1	18.60 ± 0.081	21.00 ± 0.091	37.00 ± 0.208	33.40 ± 0.188	3970 0.0
1.5	19.30 ± 0.534	22.00 ± 0.606	38.40 ± 0.610	34.60 ± 0.552	6360 ± 580.36
2	21.60 ± 0.092	24.50 ± 0.107	39.40 ± 0.620	35.50 ± 0.555	6739 ± 40.41

CONDICIONES DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA:

TI 35°C, agua destilada (PH 7.0)

*ALMIDON DE MAIZ 1%

**AMILASA DE SORGO GERMINADO: 1620 ug/ml

¹ARD: AZUCARES REDUCTORES DIRECTOS

²DE: EQUIVALENTE DE DEXTROSA

³ART: AZUCARES REDUCTORES TOTALES

CUADRO 14

OBTENCION DE MALTODEXTRINAS UTILIZANDO
ALMIDON DE SORGO PERLADO* Y AMILASA DE SORGO GERMINADO**

TIEMPO HR	ARD ¹ %	DE ² %	ART ³ %	ALMIDON %	MALTOSA ug/ml
0.08	9.80 ± 0.170	10.70 ± 0.185	-	-	716 ± 16.11
0.16	10.70 ± 0.010	11.70 ± 0.015	-	-	1029 ± 8.980
0.5	12.60 ± 0.026	13.70 ± 0.032	30.80 ± 0.247	27.70 ± 0.223	1171 ± 50.67
1	16.10 ± 0.040	17.60 ± 0.045	32.10 ± 0.125	28.90 ± 0.110	2007 0.0
2	24.40 ± 0.344	26.60 ± 0.380	34.00 ± 1.349	30.00 ± 0.20	2214 ± 179.61

CONDICIONES DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA:

T: 35°C, agua destilada (pH 7.0)

*ALMIDON DE SORGO PERLADO 0.5%

**AMILASA DE SORGO GERMINADO: 1620 ug/ml

¹ARD: AZUCARES REDUCTORES DIRECTOS

²DE: EQUIVALENTE DE DEXTROSA

³ART: AZUCARES REDUCTORES TOTALES

En el Cuadro 15 se presentan los resultados a 35° C de la hidrólisis del almidón de maíz y la amilasa fúngica H-400 utilizando tiempos de reacción de 0.5 a 5 hr, obteniendo equivalentes de dextrosa diferentes que son: 5.8, 12.3, 14.0, 19.30 y 26.7.

La obtención de maltodextrinas con sorgo perlado y amilasa H-400 a una temperatura de 35° C, utilizando tiempos de reacción que van desde 0.5 hasta 4 hr, se obtuvieron equivalentes de dextrosa de 10.5, 17.1, 22.7, 30.0 y 31.0, por lo tanto son cuatro tipos diferentes de maltodextrinas obtenidas. Los resultados se presentan en el Cuadro 16.

Una vez que fueron determinadas las condiciones de hidrólisis para obtener las maltodextrinas con equivalentes de dextrosa específicos, se procedió a determinar la mejor forma de inactivar a ambas enzimas, la vegetal y la fúngica, por lo que se probaron tres métodos:

a. Inactivación por medio de calor.

En donde los hidrolizados se sumergían en un baño de agua a ebullición a diferentes lapsos de tiempos que fueron desde 1 hasta 5 minutos.

b. Inactivación por medio de frío

Consistió en meter los hidrolizados en cámaras de refrigeración a 0° C durante 24 horas.

c. Inactivación por medio de ácido

A los hidrolizados se les añadió 10 ml de ácido clorhídrico 0.1 N o 1 N, una vez transcurrido el tiempo de hidrólisis.

De los tres métodos, el menos efectivo fue el de la inactivación por medio del frío ya que la reacción siguió, esto se pudo observar porque se determinó el equivalente de dextrosa antes y después de la inactivación. De los 2 métodos restantes, se seleccionó la inactivación con calor siendo el más efectivo el tratamiento durante 5 minutos. A pesar de que con el ácido se inactivaron las enzimas, no se utilizó porque podría interferir en los análisis posteriores de las maltodextrinas.

CUADRO 15

OBTENCION DE MALTODEXTRINAS UTILIZANDO
ALMIDON DE MAIZ* Y AMILASA FUNGICA H-400**

TIEMPO HR	ARD ¹ %	DE ² %	ART ³ %	ALMIDON %	MALTOSA ug/ml
0.5	5.10 ± 0.035	5.80 ± 0.035	9.70 ± 0.030	8.80 ± 0.025	1103 ± 0.0346
1	10.80 ± 0.041	12.30 ± 0.051	12.50 ± 0.051	11.30 ± 0.046	1145 ± 67.359
2	12.40 ± 0.372	14.00 ± 0.421	18.30 ± 0.138	16.50 ± 0.123	1607 ± 112.90
3	16.90 ± 0.060	19.30 ± 0.190	25.20 ± 0.020	22.70 ± 0.020	1672 0.0
4	23.50 ± 0.085	26.70 ± 0.095	25.60 ± 0.193	23.00 ± 0.177	1994 0.0

CONDICIONES DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA:

T: 35°C, agua destilada (pH 7.0)

*ALMIDON DE MAIZ 1X

**AMILASA DE *Aspergillus oryzae* H-400: 23 ug/ml

¹ARD: AZUCARES REDUCTORES DIRECTOS

²DE: EQUIVALENTE DE DEXTROSA

³ART: AZUCARES REDUCTORES TOTALES

OBTENCION DE MALTODEXTRINAS UTILIZANDO
ALMIDON DE SORGO PERLADO* Y AMILASA FUNGICA H-400**

TIEMPO HR	ARD ¹ %	DE ² %	ART ³ %	ALMIDON %	MALTOSA ug/ml
0.5	9.60 ± 0.026	10.50 ± 0.030	35.00 ± 0.069	31.50 ± 0.063	1600 ± 62.22
1	15.70 ± 0.026	17.10 ± 0.036	35.20 ± 0.069	31.70 ± 0.063	1672 0.0
2	20.70 ± 0.051	22.70 ± 0.051	35.80 0.0	32.20 0.0	2007 0.0
3	27.40 ± 0.1417	30.00 ± 0.156	36.50 ± 0.075	32.80 ± 0.069	2630 ± 48.11
4	28.40 ± 0.436	31.10 ± 0.476	36.80 ± 0.075	33.00 ± 0.069	2758 ± 25.022

CONDICIONES DE LA HIDROLISIS ENZIMATICA:

T: 35°C, agua destilada (pH 7.0)

*ALMIDON DE SORGO PERLADO 0.5%

**AMILASA DE *Aspergillus oryzae* H-400: 23 ug/ml¹ARD: AZUCARES REDUCTORES DIRECTOS²DE: EQUIVALENTE DE DEXTROSA³ART: AZUCARES REDUCTORES TOTALES

Tratando de hacer un análisis del peso molecular aproximado de las maltodextrinas obtenidas, este se llevó a cabo utilizando un gel para cromatografía que no presentara interferencias con los carbohidratos y el perfil de elución fué obtenido por un método colorimétrico para azúcares, el de la antrona, previa elaboración de una curva tipo. Ver Figura 2. Como no se disponían de dextranasas de diferentes pesos moleculares como fué informado por Brooks y col. (6), los cuales llevaron a cabo la determinación por HPLC; aquí utilizamos una mezcla de protefnas con pesos moleculares similares con las que se elaboró una curva tipo. Ver Cuadro 4 y Figura 5.

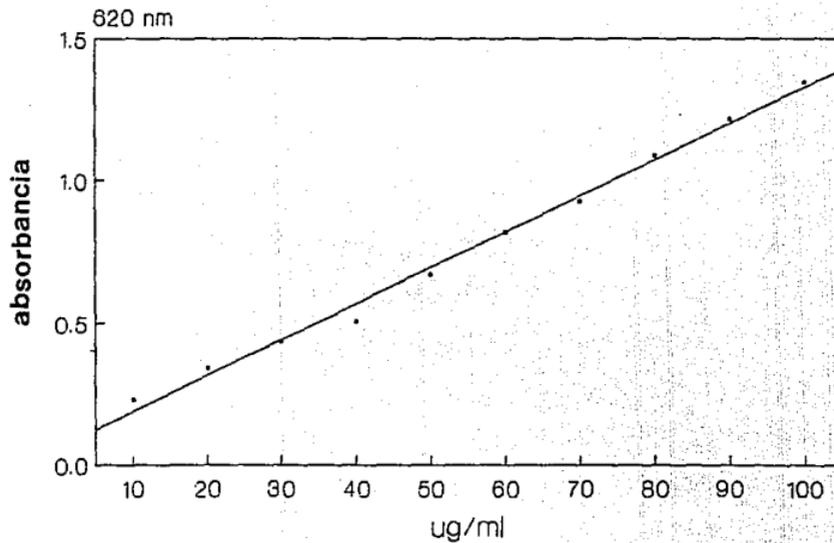
En el Cuadro 17 se presenta el equivalente de dextrosa en función de los pesos moleculares, observando que a medida que aumenta el equivalente de dextrosa el peso molecular de la primera fracción va disminuyendo. En las Figuras 6, 7, 8 y 9 se presentan los perfiles de elución de las diferentes maltodextrinas obtenidas a partir del almidón de maíz hidrolizado con la amilasa de sorgo germinado, observando que se obtienen como promedio 4 componentes.

Los pesos moleculares para las maltodextrinas obtenidas a partir del almidón de sorgo perlado y amilasa vegetal se presentan en el Cuadro 18, en donde se presentan 4 equivalentes de dextrosa en función del peso molecular de la primera fracción y teniendo como promedio 4 componentes. Los perfiles de elución de este análisis se encuentran en las Figuras 10, 11, 12 y 13.

En los Cuadros 19 A y 19 B se encuentran los resultados para la enzima fúngica H-400 utilizando almidón de maíz, la gran actividad que muestra esta enzima puede observarse ya que con el equivalente de dextrosa más bajo de 6.4 sólo se presentan 2 componentes de alto peso molecular; el equivalente de dextrosa de 10.0 presenta 7 componentes; el equivalente de 16.0 presenta 10 componentes, aquí observamos que no existe una homogeneidad en cuanto al peso molecular en la fracción de mayor peso. En cuanto a los componentes de menor peso molecular, están presentes los de menor tamaño en el equivalente de dextrosa de 16.0, cuando éste resultado nosotros suponíamos que debería estar presente en el equivalente de dextrosa de 25.0. Los perfiles de elución se encuentran en las Figuras 14, 15, 16 y 17.

Las características de las maltodextrinas usando el almidón de sorgo perlado y la amilasa fúngica H-400, se presentan en el Cuadro 20 y se observa que el promedio de componentes para esta mezcla fué de 3, no presentando una homogeneidad en cuanto al componente de alto peso molecular. Los perfiles de elución se presentan en las Figuras 18, 19 y 20. Esta heterogeneidad no se presenta en las hidrólisis del almidón a partir de la enzima vegetal, lo que hizo pensar que el patrón de acción de la enzima fúngica es menos ordenado que el de la enzima vegetal.

FIGURA 2
CURVA TIPO DE GLUCOSA
METODO DE ANTRONA



$$Y = 0.066x + 0.0126$$

CUADRO 4

CROMATOGRAFIA DE FILTRACION EN GEL
DE LAS PROTEINAS TIPO

PROTEINA TIPO*	PM	log PM	V _e (ml)	V _e /V _o (ml)
beta-Galactosidasa	116,000	5.06	15.39	1.6339
Albúmina bovina	66,000	4.82	18.40	1.9534
Albúmina de huevo	45,000	4.65	21.36	2.2677
Tripsinógeno	24,000	4.38	25.15	2.6700
Citocromo C	12,400	4.09	28.94	3.0724

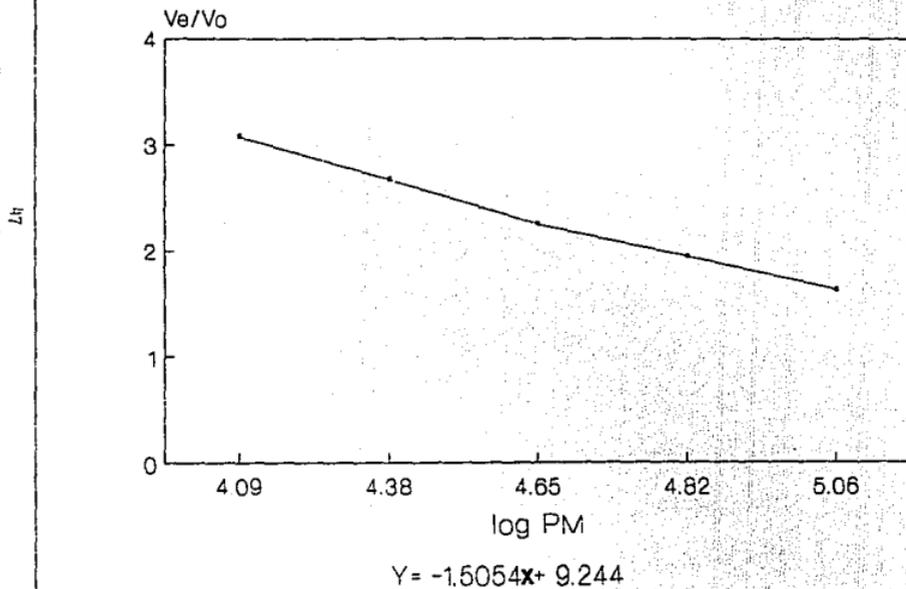
V_o = volumen vacío = 9.4193 ml

V_e = volumen de elución

PM = peso molecular

* Promedio de 2 repeticiones

FIGURA 5
CURVA TIPO DE PESOS
MOLECULARES



CUADRO 17

CARACTERIZACION POR PESOS MOLECULARES DE
MALTODEXTRINAS UTILIZANDO ALMIDON DE
MAIZ* Y AMILASA DE SORGO GERMINADO**

EQUIVALENTE DE DEXTROSA %	FRACCION	PESO MOLECULAR
5.50	I	166,533
	II	85,231
	III	43,621
	IV	18,026
	V	6,380
8.40	I	158,635
	II	84,469
	III	45,900
	IV	24,149
	V	6,862
14.00	I	103,753
	II	63,212
	III	35,237
	IV	6,296
23.00	I	51,629
	II	26,841
	III	7,943
	IV	5,099

CONDICIONES:

Columna 0.9 x 60 cm
 BioGel P-100 (100-200 mallas)
 Regulador de fosfatos 0.05 M, pH 7.0
 fuerza iónica: 0.2 mM
 Velocidad de recolección: 1ml/tubo
 Determinación del volúmen de elución: antrona 0.2%

* ALMIDON DE MAIZ 1X

** AMILASA DE SORGO GERMINADO: 1620 ug/ml

FIGURA 6
PERFIL DE ELUCION DE LAS MALTODEXTRINAS
MAIZ/HSRg

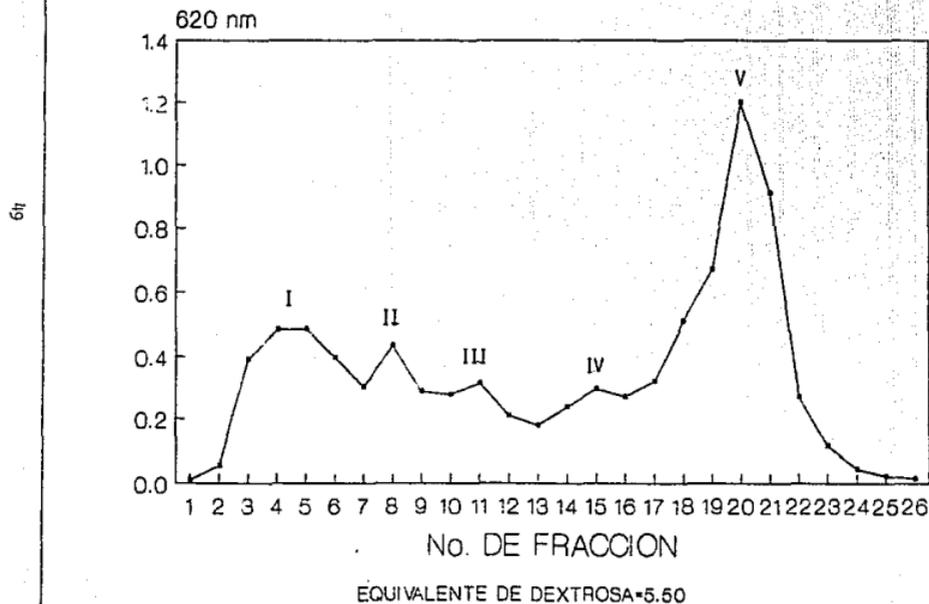


FIGURA 7
PERFIL DE ELUCION DE LAS MALTODEXTRINAS
MAIZ/HSRg

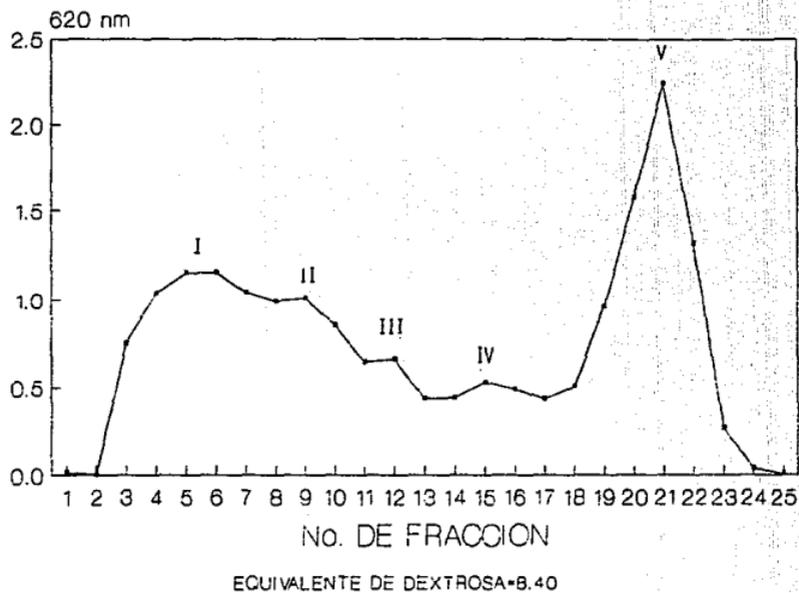


FIGURA 8
PERFIL DE ELUCION DE LAS MALTODEXTRINAS
MAIZ/HSRg

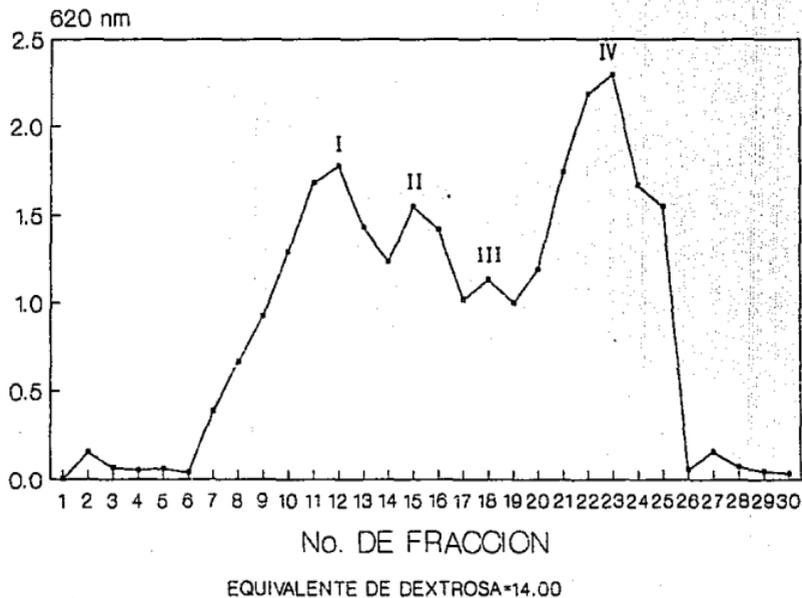
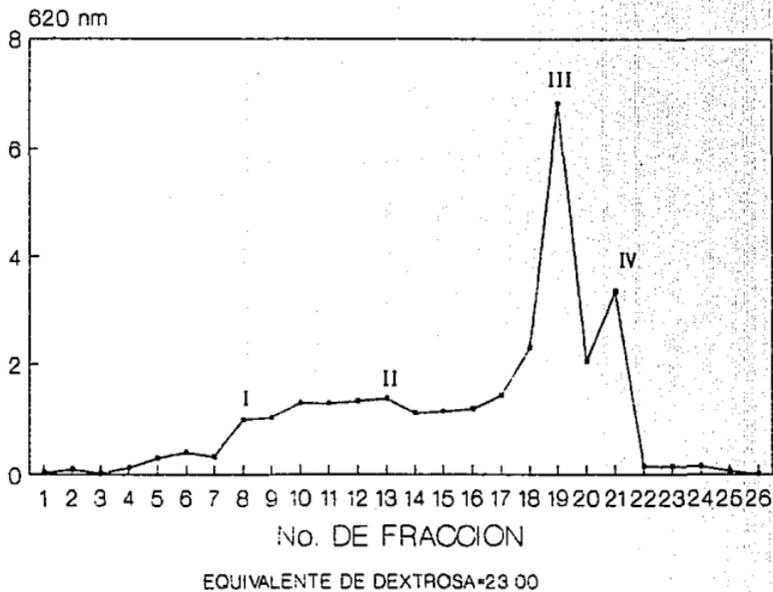


FIGURA 9
PERFIL DE ELUCION DE LAS MALTODEXTRINAS
MAIZ/HSRg



CUADRO 18

CARACTERIZACION POR PESOS MOLECULARES DE
LAS MALTODEXTRINAS UTILIZANDO ALMIDON DE
SORGO PERLADO* Y AMILASA DE SORGO GERMINADO**

EQUIVALENTE DE DEXTROSA %	FRACCION	PESO MOLECULAR
4.90	I	249,746
	II	102,376
	III	32,915
	IV	8,702
12.70	I	114,683
	II	67,876
	III	8,149
15.00	I	34,522
	II	22,136
	III	7,325
23.00	I	38,931
	II	16,390
	III	6,754
	IV	2,723
	V	1,148

CONDICIONES:

Columna 0.9 x 60 cm
 BioGel P-100 (100-200 mallas)
 Regulador de fosfatos 0.05 M, pH 7.0
 fuerza iónica: 0.20 mM
 Velocidad de recolección: 1 ml/tubo
 Determinación del volumen de elución: antrona 0.2%

* ALMIDON DE SORGO PERLADO 0.5%

** AMILASADE SORGO GERMINADO: 1620 ug/ml

FIGURA 10
PERFIL DE ELUCION DE LAS MALTODEXTRINAS
SP/HSRg

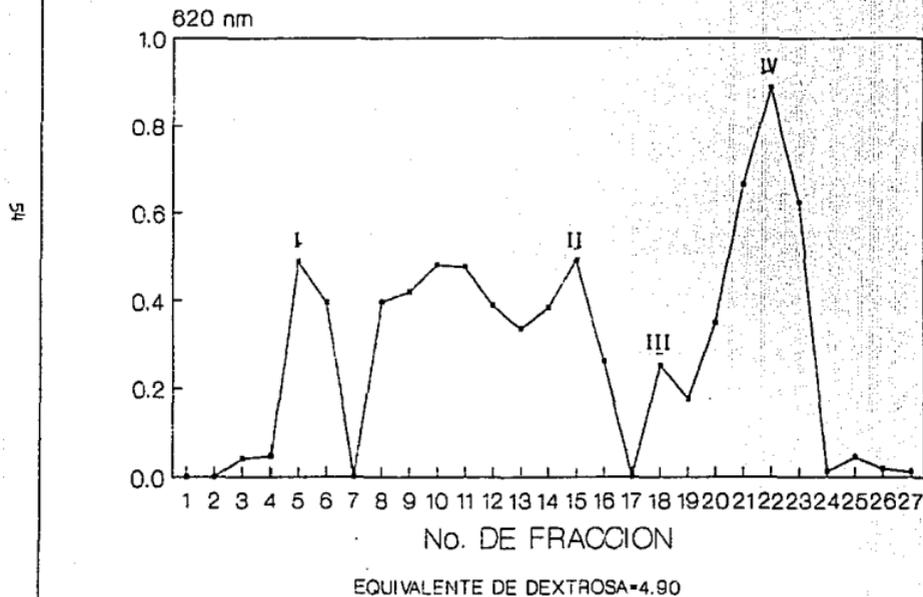
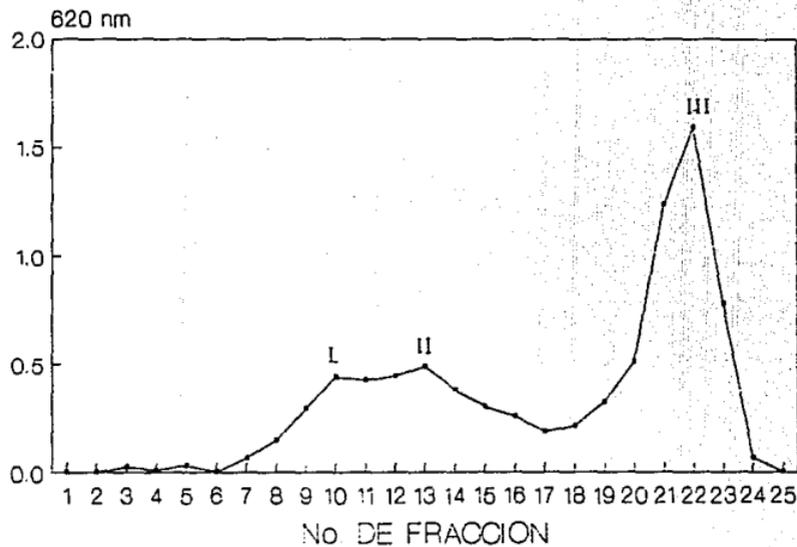
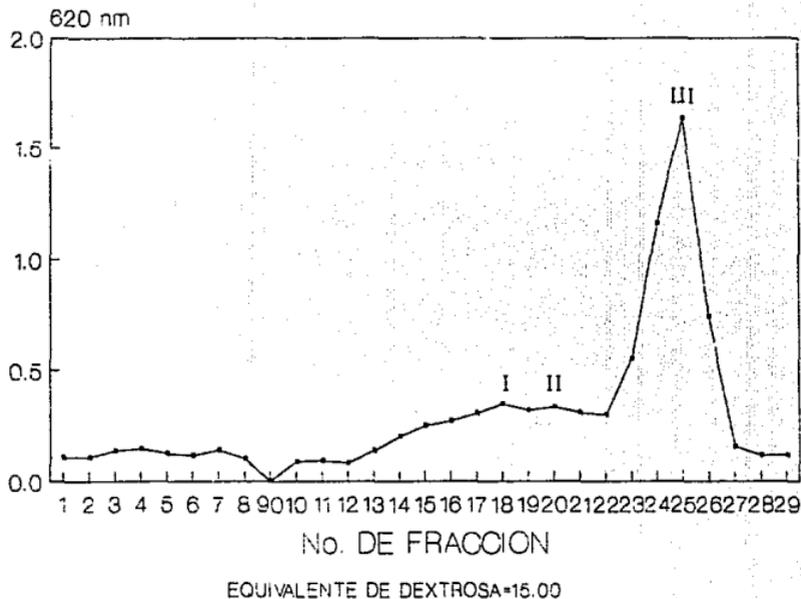


FIGURA 11:
PERFIL DE ELUCION DE LAS MALTODEXTRINAS
SP/HSRg



EQUIVALENTE DE DEXTROSA=12.70

FIGURA 12
PERFIL DE ELUCION DE LAS MALTODEXTRINAS
SP/HSRg



CUADRO 19 A

CARACTERIZACION POR PESOS MOLECULARES DE
LAS MALTODEXTRINAS UTILIZANDO ALMIDON
DE MAIZ* Y AMILASA FUNGICA H-400**

EQUIVALENTE DE DEXTROSA X	FRACCION	PESO MOLECULAR
6.50	I	366,260
	II	156,314
9.80	I	464,836
	II	242,214
	III	123,367
	IV	78,577
	V	39,856
	VI	16,065
	VII	4,215

CONDICIONES:

Columna 0.9 x 60 cm
BioGel P-100 (100 a 200 mallas)
Regulador de fosfatos 0.05 M, pH 7.0
fuerza iónica: 0.2 mM
Velocidad de recolección: 1 ml/tubo
Determinación del volumen de elución: antrona 0.2%

* ALMIDON DE MAIZ 1%

** AMILASA DE *Aspergillus oryzae* H-400: 23 ug/ml

CUADRO 19 B

CARACTERIZACION POR PESOS MOLECULARES DE LAS
MALTODEXTRINAS UTILIZANDO ALMIDON DE MAIZ*
Y AMILASA FUNGICA H-400**

EQUIVALENTE DE DEXTROSA %	FRACCION	PESO MOLECULAR
16.30	I	309,884
	II	159,882
	III	102,707
	IV	66,527
	V	34,883
	VI	19,404
	VII	8,162
	VIII	2,741
	IX	1,614
	X	1,330
24.70	I	250,841
	II	133,260
	III	55,654
	IV	28,873
	V	18,802
	VI	6,369

CONDICIONES:

Columna 0.9 x 60 cm
BioGel P-100 (100-200 mallas)
Regulador de fosfatos 0.05 M, pH 7.0
fuerza ionica: 0.2 mM
Velocidad de recolección: 1ml/tubo
Determinación del volumen de elución: antrona 0.2%

* ALMIDON DE MAIZ 1%

** AMILASA DE *Aspergillus oryzae*: 23 ug/ml

FIGURA 14
PERFIL DE ELUCION DE LAS MALTODEXTRINAS
MAIZ/H-400

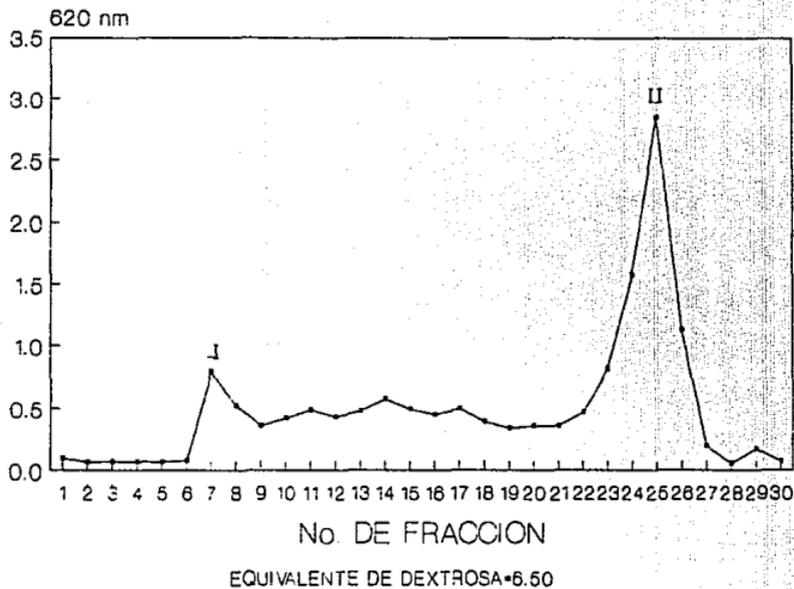


FIGURA 15
PERFIL DE ELUCION DE LAS MALTODEXTRINAS
MAIZ/H-400

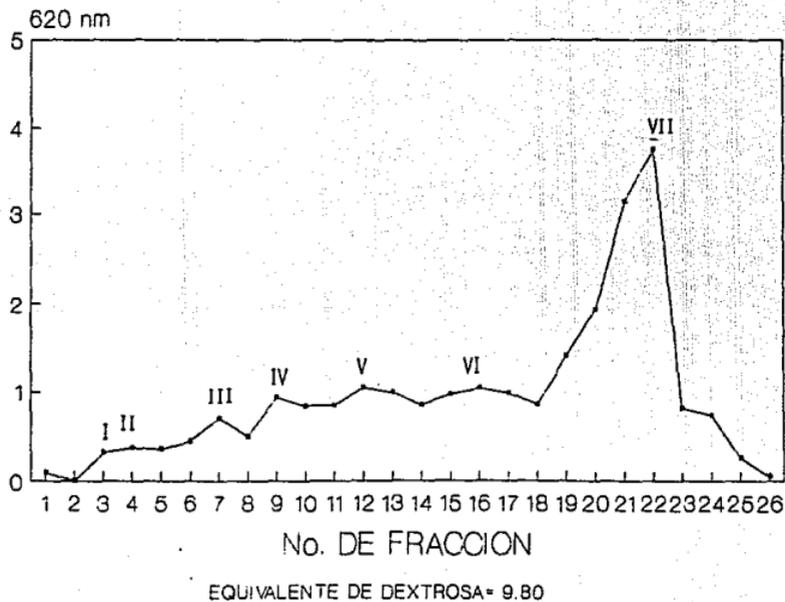


FIGURA 18:
PERFIL DE ELUCION DE LAS MALTODEXTRINAS
MAIZ/H-400

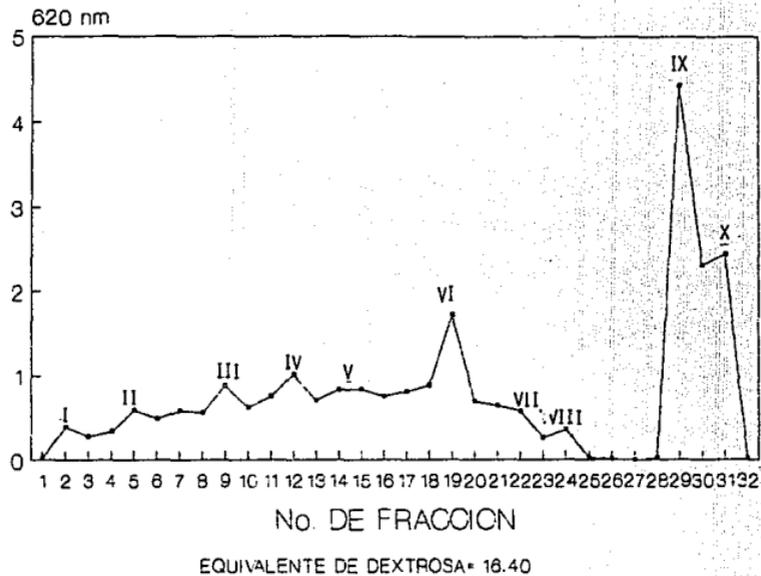
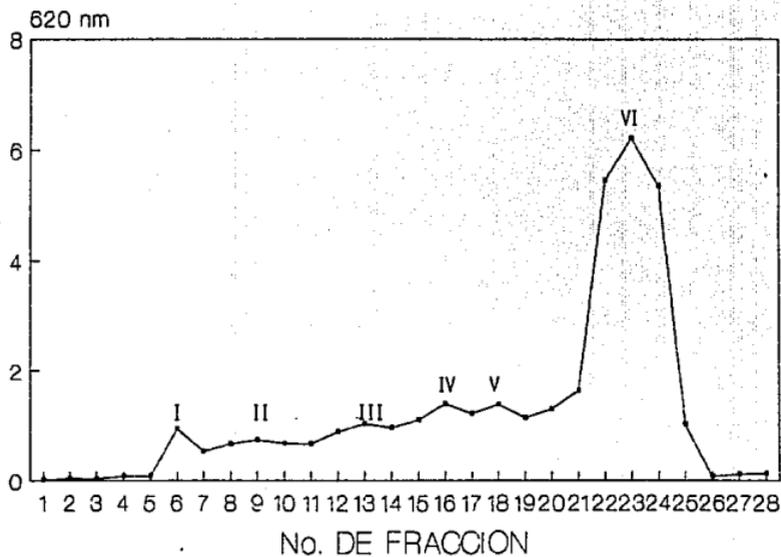


FIGURA 17
PERFIL DE ELUCION DE LAS MALTODEXTRINAS
MAIZ/H-400



EQUIVALENTE DE DEXTROSA=24.70

CUADRO 20

CARACTERIZACION POR PESOS MOLECULARES DE
LAS MALTODEXTRINAS UTILIZANDO ALMIDON DE
SORGO PERLADO* Y AMILASA FUNGICA H-400**

EQUIVALENTE DE DEXTROSA (%)	FRACCION	PESO MOLECULAR
7.00	I	245,866
	II	97,431
	III	5,753
16.70	I	56,104
	II	30,507
	III	9,103
27.30	I	272,583
	II	33,886
	III	20,511
	IV	7,006

CONDICIONES:

Columna 0.9 x 60 cm
BioGel P-100 (100-200 mallas)
Regulador de fosfatos 0.05 M, pH 7.0
fuerza ionica: 0.02 mM
Velocidad de recolección: 1 ml/tubo
Determinación del volumen de elución: antrona 0.2%

* ALMIDON DE SORGO PERLADO 0.5%

** AMILASA DE *Aspergillus oryzae*: 23 ug/ml

FIGURA 18.
PERFIL DE ELUCION DE LAS MALTODEXTRINAS
SP/H-400

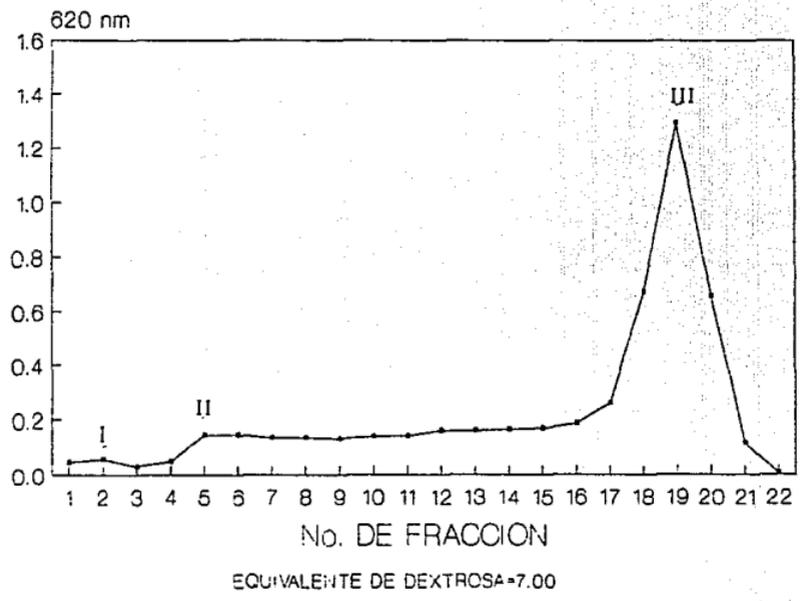


FIGURA 19.
PERFIL DE ELUCION DE LAS MALTODEXTRINAS
SP/H-400

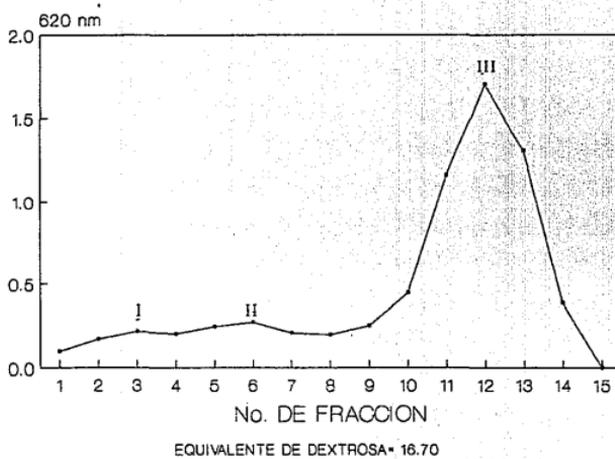
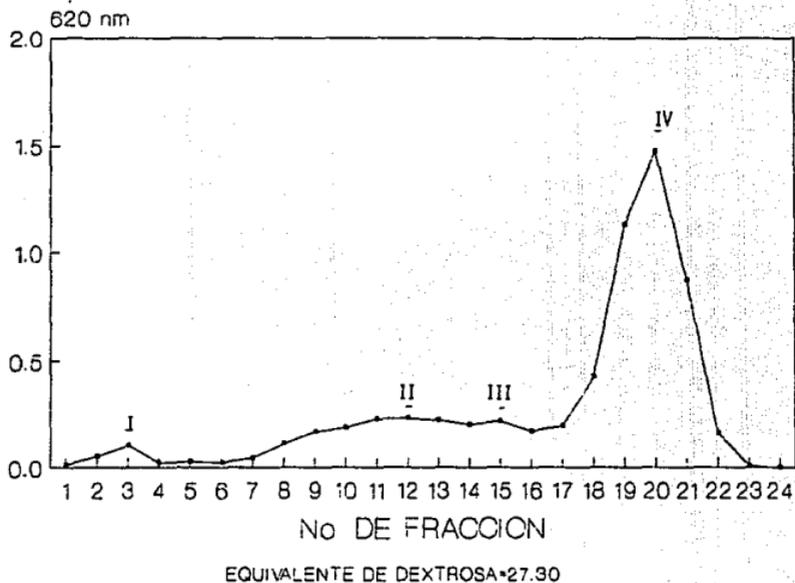


FIGURA 20
PERFIL DE ELUCION DE LAS MALTODEXTRINAS
SP/H-400



VII. CONCLUSIONES.

1. Utilizando como materia prima almidón de maíz y de sorgo perlado, se obtuvieron las condiciones para la obtención de maltodextrinas:
 - a. Utilizando una enzima de origen vegetal a partir del sorgo germinado.
 - b. Y usando una amilasa de origen fúngico.
2. Las mejores condiciones de hidrólisis se obtuvieron a 25°C con equivalente de dextrosa (DE) de 5.0 a 30.0 para ambos tipos de almidón.
3. Para incrementar la eficiencia en la obtención de las maltodextrinas, se elevó la temperatura a 35°C obteniendo una reducción de la tercera parte en tiempo para ambos sustratos.
4. De los datos obtenidos de peso molecular aparente, se deduce que hay una mayor secuencia respecto a los valores de equivalente de dextrosa vs peso molecular para ambos tipos de almidones en presencia de la amilasa de origen vegetal.

VIII. BIBLIOGRAFIA

- (1) Au P.M., Fieldes M.L., (1981). Nutritive quality of fermented sorghum, en *Journal of Food Science*, Vol. 46, No. 2, p. 652-654.
- (2) Baduf S., (1985), *Química de los alimentos*, Ed. Alhambra Universidad, p. 68, 76-77, 85-89.
- (3) Bauman J. W., (1982), *Enzymes and Food Processing Products*, London, England, p. 272-276.
- (4) Bernfeld P., (1955), Enzymes on starch degradation, en *Advances in Enzymology*, Vol. 1. XII., p. 149-150, 370-395.
- (5) Binkley W. W., (1955). Column chromatography of sugars and their derivatives, en *Advances in carbohydrates chemistry*, Academic Press, New York, U.S.A., p. 55-56.
- (6) Brook J.R., Griffin V.R., (1987), Saccharide analysis of corn syrup solids and maltodextrins using high-performance liquid chromatography, en *Cereal Chemistry*, Vol. 64, No. 4, p. 253-255.
- (7) Churn S.C., (1970), Gel chromatography of carbohydrates, en *Advances in carbohydrates chemistry*, Academic Press, New York, U.S.A., Vol. 25, p. 13-16, 31-37.
- (8) Davidson V.J., Paton D., Riosady L., (1984), Degradation of wheat starch in a single screw extruder: characteristics of extruded starch polymers, en *Journal of Food Science*, Vol. 49, No. 2, p. 453-458.
- (9) Delheye G., Moreels E., (1988), Dextrose equivalent measurements on commercial syrups, en *Starch/Stärke*, Vol. 40, No. 11, p. 430-432.
- (10) Dobe S.K., Nordin P., (1961), Isolation and properties of sorghum alfa amylase, en *Advances of biochemistry and biophysics*, Vol. 9A, p. 121-127.
- (11) Dobe S.K., Nordin P., (1962), The action pattern of sorghum alfa amylase, en *Archives of biochemistry and biophysics*, Vol. 99, p. 105-108.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

- (12) Duffus C.M., (1988), Physiological aspects of enzymes during grain development and germination, en Enzymes and their role in cereal technology, American Association of Cereal Chemist, Minnesota, U.S.A., p. 83-112.
- (13) Encyclopedia of Chemical Technology, (1984), John Wiley and Sons, New Jersey, U.S.A., Vol. 21, p. 292-296.
- (14) French D., Robyt J.F., Weintraub M., (1966), Separation of maltodextrins by charcoal chromatography, en Journal of Chromatography, Vol. 24, p. 68-75.
- (15) Fuller K.W., (1985), Plant products and the new technology, Oxford Clarendon Press, p. 103-105.
- (16) Glennie L.W., Harris J., (1983), Endosperm modification in germinating sorghum grain, en Cereal Chemistry, Vol. 60, No. 1, p. 27-31.
- (17) Glennie L.W., (1984), Endosperm cell wall modification in sorghum grain during germination, in Cereal Chemistry, Vol. 61, No. 4.
- (18) Greenwood C.T., Milne A., (1968), Starch degrading and synthesizing enzymes, en Advances in Carbohydrates Chemistry, Vol. 23, Academic Press, New York, U.S.A., p. 311-318.
- (19) Griffin V.K., Brook J.R., (1986), A modified method for total carbohydrates analysis of glucose syrups, maltodextrins and other starch hydrolysis products, en Cereal Chemistry, Vol. 63, No. 5 p. 465-466.
- (20) Hill H.D., Mac Gregor A.W., (1988), Cereal alfa amylases in grain research and technology, en Advances of Cereal Science and Technology, American Association of Cereal Chemist, Minnesota, U.S.A., p. 217-261.
- (21) Hollander L., (1952), Differentiation of carbohydrates by anthrone reaction rate color and intensity, en Analytical Chemistry, Vol. 24, No. 10, p. 1576-1579.
- (22) Hosney C.R., (1986), Principles of cereal science and technology, A.A.C.C., Minnesota, U.S.A., p. 61-66.
- (23) Inglett G.E., (1970), Corn: culture, processing, products, The AVI Publishing Co., Westport, Connecticut, p. 195-312.

- (24) Ingredientes Alimenticios Mexicanos, S.A. de C.V., (1990), Guadalajara, Jalisco.
- (25) Iturrios S.M.I., (1987), Caracterización de las amilasas de sorgo, Tesis de Maestría, IPN-CEPROBI ENCB., México D.F.
- (26) Johnson J.C., (1977), Industrial enzymes, recent advances, Noves Data Corporation, New Jersey, U.S.A., P. 18-21.
- (27) Kennedy J.F., Noy R.J., White C.A., (1987), Composition of the low temperature precipitate from commercial high dextrose equivalent and the kinetics of its formation, en Starch/Starke, Vol. 39, No. 5, p. 171-178.
- (28) Kruger J.E., Lineback D., et al. (1987), Enzymes and their role in cereal technology, A.A.C.C., Minnesota, U.S.A., p. 16-18. 359-366.
- (29) Lowry D.H., Rosenberg N.J., Far A.C., (1951), Protein measurement with the folinpheno reagent, en Journal of Biological Chemistry, Vol. 193, p. 265-275.
- (30) Matz S.A., (1959), The chemistry and technology of cereals as food and feed, The AVI Publishing Co., Westport, Connecticut, p. 378-387.
- (31) Norma Oficial Mexicana. NOM-F 217-1975, Determinación del equivalente de dextrosa.
- (32) Ranganna S.J., (1986), Handbook of analysis and quality control for fruit and vegetable products, Ed. Mac Graw Hill, p. 13-16, 26-30.
- (33) Robin J.P., Merver C., Charbonniere R., (1974), Litnerized starches: gel filtration and enzymatic studies of insoluble residues from prolonged treatment of potato starch, en Cereal Chemistry, Vol. 51, No. 3, p. 389-406.
- (34) Whitaker J.R., (1972), Principles of enzymology for the food sciences, Marcel Dekker, New York, U.S.A., p. 443-447.
- (35) Whistler R.L., Durso D.F., (1950), Chromatographic separation of sugars on charcoal, en Journal of American Chemical Society, Vol. 72, p. 677-679.

- (36) Whistler R.L., (1964), Methods in Carbohydrate Chemistry, Vol. IV, Academic Press, p. 67-71, 252-259.
- (37) Whistler R.L., Be Miller J., (1965), Charcoal chromatography, en Methods in Carbohydrates Chemistry, Academic Press, London, England, Vol. IV, p. 42-44.
- (38) Whistler R.L., Be Miller J., et al. (1980), Starch, Chemistry and Technology, Academic Press. U.S.A., p. 611-616.
- (39) Wong D., Fields M.L., (1978), Germination of corn and sorghum in the home to improve nutritive value, en Journal of Food Science, Vol. 43, No. 4, p. 113-115.