

Modificación enzimática del almidón de maíz y su efecto en la viabilidad de la vitamina C

Leyva López Román., Palma R. H. M., Rodríguez H. A. I., López C. M. del R., Vargas T. A.

Instituto de Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Av. Universidad Km. 1, Rancho Universitario, Tulancingo de Bravo, Hidalgo, C.P. 43600, MÉXICO apolovt@hotmail.com

RESUMEN:

En el presente trabajo se estudió el efecto de la hidrólisis enzimática a las 16 y 20 h sobre las características morfológicas, fisicoquímicas y estructurales de almidón de maíz, y el efecto protector de este en microcápsulas de ácido ascórbico. La hidrólisis enzimática se llevó a cabo con las enzimas α -amilasa y amiloglucosidasa. El contenido de amilosa aumentó con respecto al tiempo de hidrólisis, observándose numerosas perforaciones, y una reducción en el tamaño del gránulo. Las propiedades térmicas mostraron menores valores de ΔH y el aumento en las temperaturas de gelatinización en los almidones hidrolizados. Cada almidón modificado enzimáticamente (16 y 20 h) en mezcla con goma arábiga fueron utilizados para encapsular ácido ascórbico. Las características morfológicas de las microcápsulas fueron evaluadas y se estudió la capacidad de encapsulación, así como la estabilidad mediante un envejecimiento acelerado. Presentando mayor estabilidad las microcápsulas formadas con almidón hidrolizado a 16 h, sobre las de gránulo pequeño y goma arábiga (controles)..

ABSTRACT:

In the present work the effect of the enzymatic treatment at 16 and 20 h on the morphological, physicochemical and structural characteristics of corn starch, and the protective effect of this on microcapsules of ascorbic acid was studied. Enzymatic hydrolysis was carried out with the enzymes α -amylase and amyloglucosidase. The amylose content increased with the hydrolysis time, observing numerous perforations, decreasing the size of the granule. The thermal properties show lower values of ΔH and the increase in the gelatinization temperatures in the hydrolysed starches. Each starch was modified enzymatically (16 and 20 h) in a mixture with gum arabic were used to encapsulate ascorbic acid. The morphological characteristics of the microcapsules were evaluated and the encapsulation capacity was studied. Presenting larger the microcapsules formed with hydrolyzed starch at 16 h, on those of small tree and gum arabic (controls)..

Palabras clave:

Vitamina C, almidón hidrolizado enzimáticamente, microcápsulas, propiedades térmicas.

Key words:

Vitamin C, enzymatically hydrolyzed starch, microcapsules, thermal properties.

Área: Microbiología y biotecnología

INTRODUCCIÓN

La microencapsulación constituye un enfoque prometedor para proteger compuestos bioactivos sensibles al ambiente, reducir la reactividad y mejorar la estabilidad, y/o permitir una liberación controlada del material del núcleo al ambiente exterior, entre otros (Bansode *et al.*, 2010). Los trabajos publicados informan de la incorporación de varias moléculas bioactivas, por ejemplo, enzimas, saborizantes, vitaminas, fármacos, probióticos, entre otros.

Aunque se han desarrollado muchas técnicas de encapsulación, el secado por aspersión es el método comúnmente empleado. Sin embargo, la elección del material pared puede ser crítica, ya que afecta la eficiencia de encapsulación y la estabilidad de las microcápsulas resultantes (Rosenberg *et al.*, 1990). Una buena elección para un material pared debe basarse en sus propiedades fisicoquímicas tales como solubilidad en agua, baja viscosidad, peso molecular, formación de película y propiedades emulsionantes.

En el grupo de biopolímeros, almidones son modificados por tratamientos químicos, físicos, y/o enzimáticos para obtener propiedades deseadas para una encapsulación. La goma arábiga, otro material pared, es comúnmente empleado en la microencapsulación. Los almidones modificados enzimáticamente atraen mucho la atención debido a su gran capacidad de adsorción por los poros formados. Contienen abundantes poros desde la superficie hasta el centro de los gránulos, que aumentan la superficie específica, actuando como excelentes absorbentes naturales. En

la industria alimentaria, se utilizan para retener aditivos, compuestos bioactivos, probióticos, entre otros (Belingheri *et al.*, 2015).

La vitamina C es un compuesto bioactivo conocido históricamente por sus beneficios nutricionales para la salud. Tiene amplia aplicación como antioxidante, y proporcionando protección en la calidad sensorial y nutricional de los alimentos (Desai *et al.*, 2006). Esto sugiere al almidón como material pared en la microencapsulación de ácido ascórbico mediante secado por aspersión.

El objetivo del presente trabajo de investigación es caracterizar morfológica, fisicoquímica y estructuralmente el almidón de maíz modificado enzimáticamente y evaluar la estabilidad de las microcápsulas de ácido ascórbico con almidón previamente modificado y caracterizado en mezcla con goma arábica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para la modificación del almidón se utilizaron las enzimas α -amilasa (6.65 $\mu\text{L/g}$ almidón) y amiloglucosidasa (66.5 $\mu\text{L/g}$ almidón), en buffer de acetatos, a 30 °C y 380 rpm durante 16 y 20 horas. Se determinó el contenido de amilosa aparente mediante una reacción con I_2/KI . Los almidones modificados enzimáticamente se caracterizaron morfológicamente por microscopía electrónica de barrido (SEM). Las propiedades fisicoquímicas se obtuvieron por calorimetría diferencial de barrido (DSC) y con el análisis rápido de viscosidad (RVA); y las estructurales, cristalinidad y tamaño de partícula se realizaron por Difracción de rayos X y Difracción de rayos láser respectivamente.

Se obtuvieron las microcápsulas mediante secado por aspersión, posteriormente se caracterizaron morfológicamente mediante SEM y se les realizó una prueba de estabilidad mediante un estudio de envejecimiento acelerado (52.5% humedad relativa y 55 °C) durante 9 semanas de almacenamiento. Los datos fueron analizados mediante un ANOVA con 95% de confianza, cuando existieron diferencias significativas se realizó una comparación de medias con la Prueba de Tukey, con un $\alpha \pm 0.05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Fig. 1 se muestran los almidones de maíz hidrolizados enzimáticamente en diferentes tiempos, se puede observar como el grado de hidrólisis fue aumentando conforme al tiempo de exposición de las enzimas, teniendo mayor número de poros y superficie erosionada el tratamiento de 20 horas, con distintos lugares de ataque. La hidrólisis enzimática se lleva a cabo en diferentes partes del almidón, atacando tanto enlace α -1,4 y α -1,6 de la amilosa y amilopectina, dando lugar a compuestos más pequeños glucosas, maltosas y otros oligosacáridos y dextrinas. Se observaron numerosos poros de tamaño medio, una erosión esponjosa y superficial, distintos lugares de ataque tanto en la periferia como en la parte interna formando varios canales en toda el área del almidón, como lo reportado por Spinelli *et al.*, (2013). Aggarwal & Dollimore (2000), observaron un aumento en el tamaño de los poros, cuando aumentó la concentración de la amiloglucosidasa, hasta un rompimiento, dando lugar a grandes agujeros irregulares y una estructura disrupta. La diferencia de tamaño es importante en el área superficial, ya que esta área es un parámetro que considerar durante la modificación del almidón, debido a que gránulos de almidón con tamaño medio (maíz) tienen mayor superficie de contacto que los grandes (papa), esta diferencia podría tener influencia sobre la susceptibilidad de los almidones a la hidrólisis enzimática. En este mismo sentido, Jayakody & Hoover (2002) postularon que la presencia de poros o canales en la superficie de los gránulos, como en el almidón de maíz, facilita el trabajo de las enzimas hacia el interior del gránulo, que lo hace más susceptible a la hidrólisis.

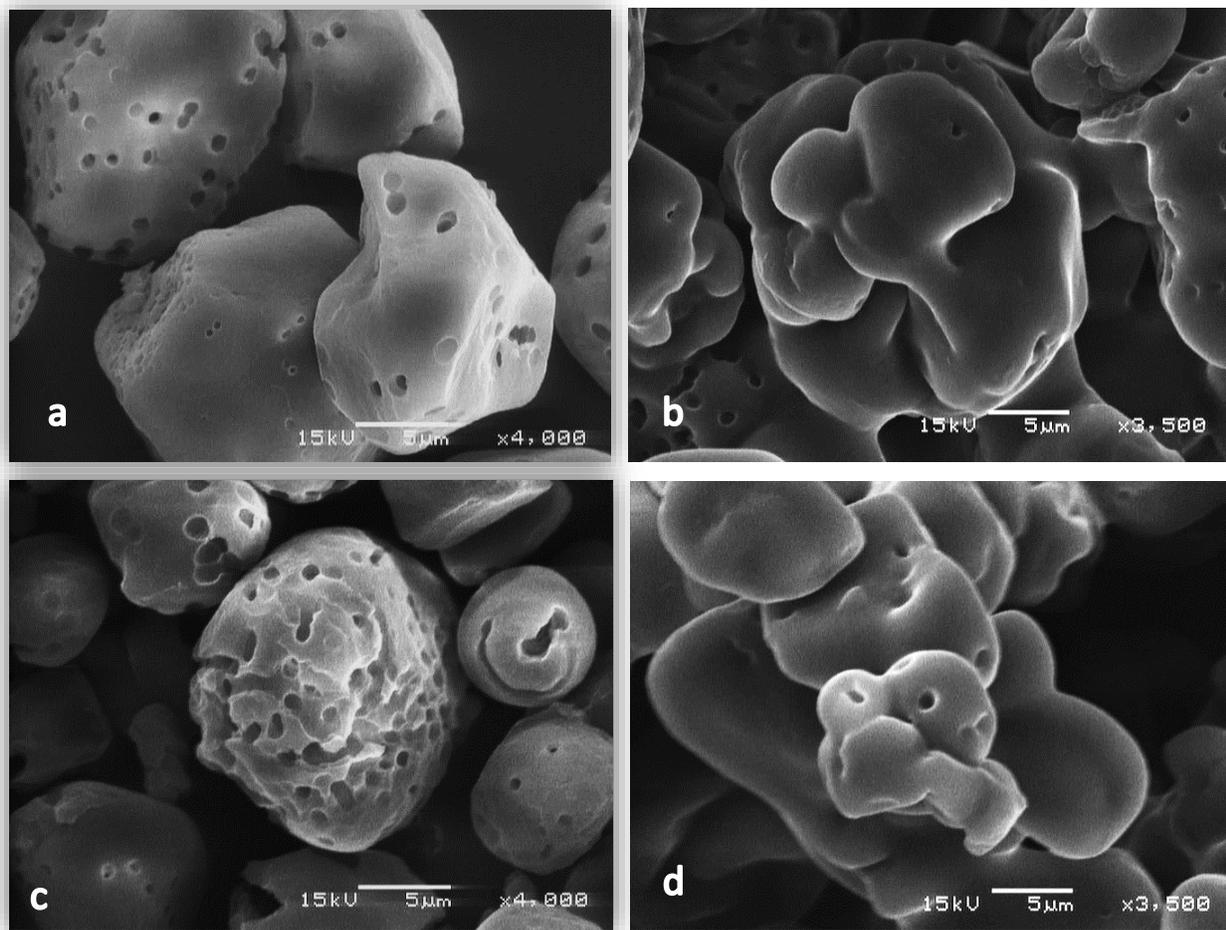


Figura 1. Micrografías por microscopía electrónica de barrido (x4000) de almidón hidrolizado enzimáticamente 16 horas (a), 20 horas (c) y (x3500) de microcápsulas de almidón hidrolizado enzimáticamente 16 horas + goma arábica (6:1 p/p) (b) y de almidón hidrolizado enzimáticamente 20 horas + goma arábica (6:1 p/p) (d).

En la determinación del contenido de amilosa se puede observar (Fig. 2) un aumento estadísticamente significativo ($p < 0.05$) conforme el tiempo de hidrólisis enzimática incrementó, dando como resultados 18.34 ± 0.77 , 58.94 ± 3.96 y 74.09 ± 2.41 para almidones nativo e hidrolizados 16 y 20 h respectivamente. Este aumento fue en gran medida por las fracciones hidrolizadas, glucosa y maltosa, que se formaron cuando las enzimas actuaron. Chung *et al.*, (2015) observaron un gran contenido de amilosa en arroz después de la hidrólisis enzimática con enzimas amilolíticas, él atribuye el incremento de este polímero a la acción de la amiloglucosidasa debido a que la amilopectina del almidón de arroz fue preferentemente hidrolizada por dicha enzima.

El tamaño de partícula del almidón de maíz nativo e hidrolizados enzimáticamente por tiempo de 16 y 20 h fueron de 15.83, 14.97 y 14.72 μm respectivamente, no presentó diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$); aunque la tendencia fue de disminución con el tiempo de hidrólisis, este cambio se debe a las erosiones internas y superficiales por el ataque enzimático de la α -amilasa y amiloglucosidasa. Este cambio fue en gran medida por las fracciones hidrolizadas, glucosa y maltosa y se correlaciona directamente con el aumento en el contenido de amilosa conforme al grado de hidrólisis. Los resultados son similares a lo reportado en la literatura (Tester & Karkalas, 2002).

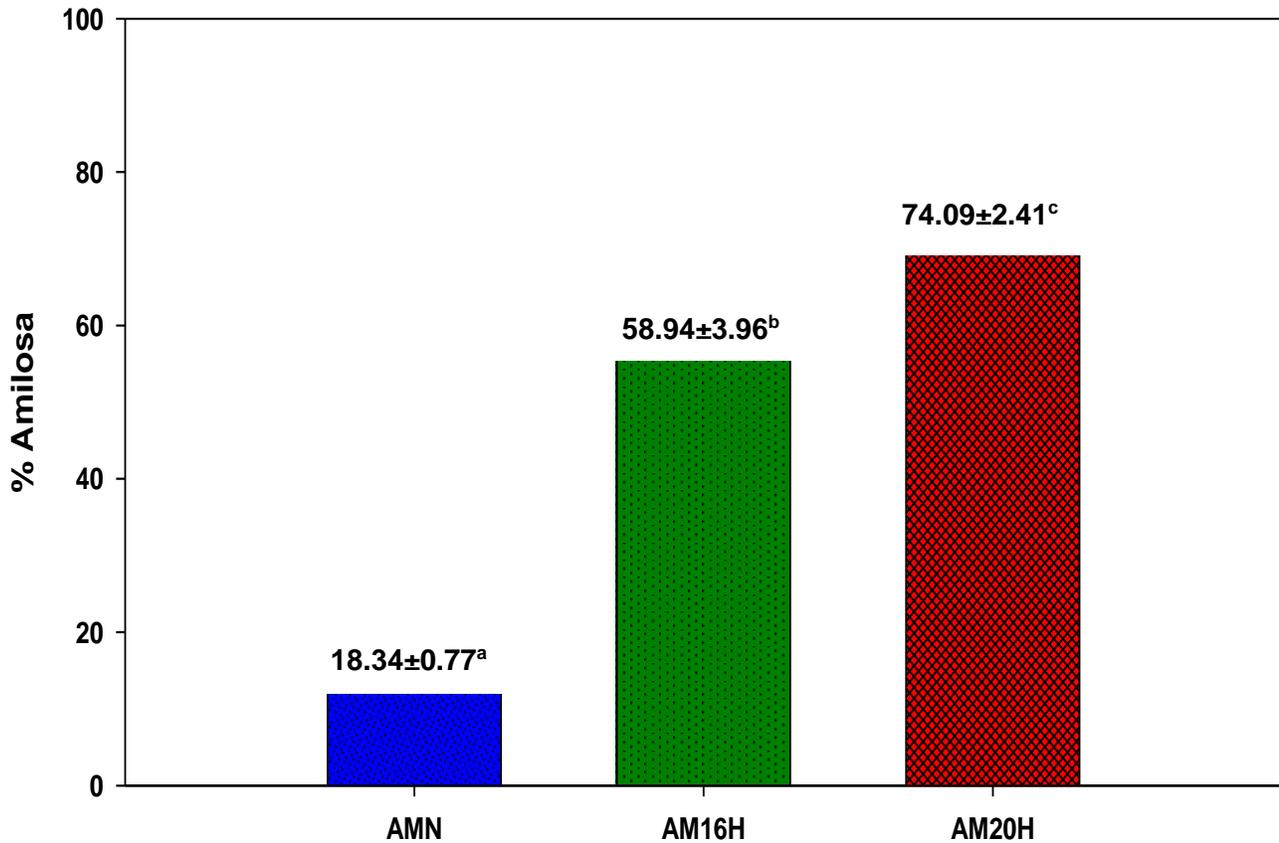


Figura 2. Contenido de amilosa en los diferentes almidones. AMN=Almidón nativo de maíz, AM16H=Almidón de maíz hidrolizado enzimáticamente por 16 horas, AM20H=Almidón de maíz hidrolizado enzimáticamente por 20 horas. Superíndices diferentes por tratamiento representan diferencias estadísticas significativas ($P < 0.05$).

Los patrones de difracción de rayos X de los almidones nativos y modificados se muestran en la Fig. 3. Los almidones nativos de maíz y los modificados mostraron un patrón de difracción tipo A, el cual es típico de los cereales, y se caracteriza por la presencia de picos de mayor intensidad de difracción para los ángulos $2\theta = 15, 17, 18$ y 23° . Se puede observar en el difractograma que el almidón que presentó mayor cristalinidad fue el hidrolizado enzimáticamente por 20 h, seguido por el hidrolizado de 16 h y con menor porcentaje de cristalinidad el nativo con valores de 60.77, 40.09 y 28.14% respectivamente; este valor aumenta principalmente por la acción de la amiloglucosidasa, una exoenzima que actúa principalmente sobre la amilopectina iniciando del extremo de la cadena. La organización interna del gránulo de almidón es un factor importante en la cristalinidad, donde el contenido de amilosa tiene una función primordial. Otros autores han postulado que el rompimiento de las cadenas del almidón en las zonas amorfas permite una hidrólisis extensiva, produciendo una estructura más cristalina (Kainuma & French, 1971).

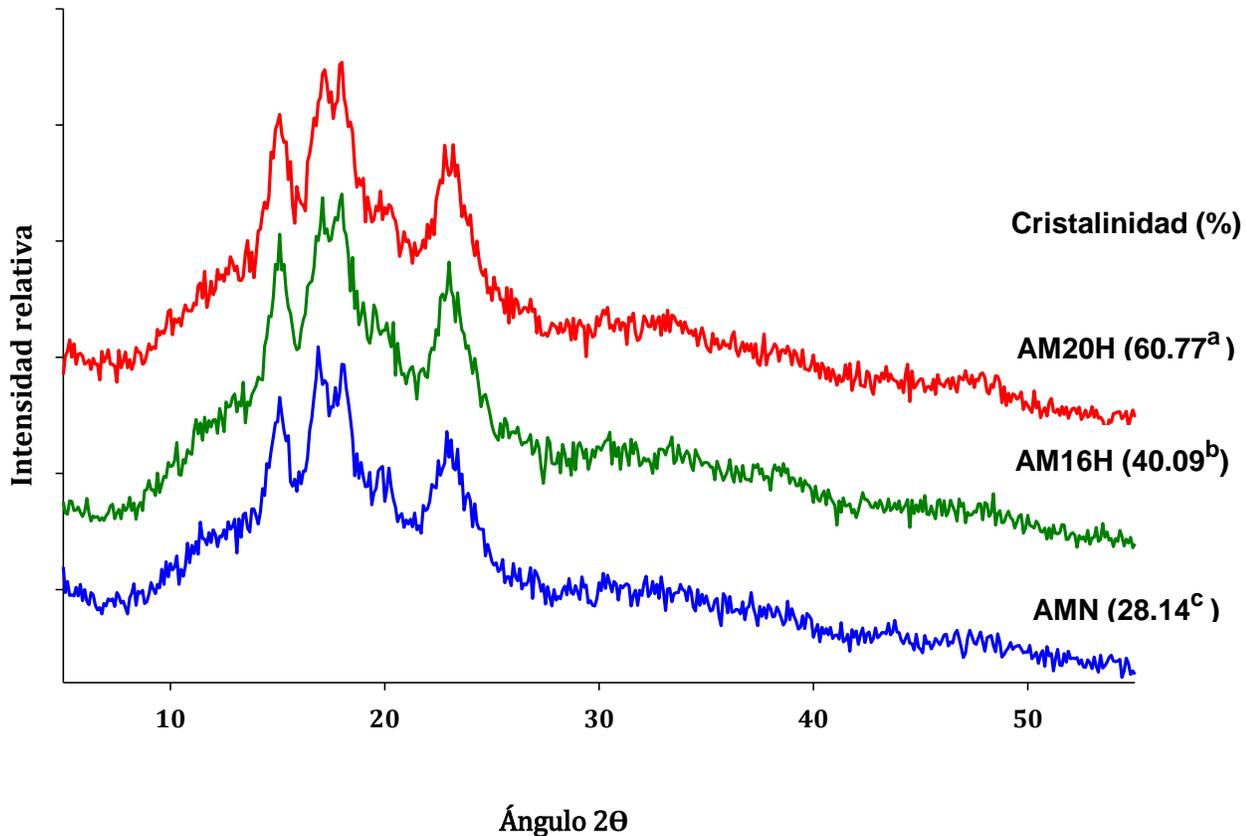


Figura 3. Patrones de difracción de rayos X de los almidones nativos y modificados por hidrólisis enzimática. AMN=Almidón nativo de maíz, AM16H=Almidón de maíz hidrolizado enzimáticamente por 16 horas, AM20H=Almidón de maíz hidrolizado enzimáticamente por 20 horas. Superíndices diferentes por tratamiento representan diferencias estadísticas significativas ($P < 0.05$).

Mediante el Análisis Rápido de Viscosidad (RVA), se observó una disminución en la viscosidad pico para los almidones modificados con valores de 2744.2 ± 14.31 y 3106.2 ± 77.46 en los tratamientos de 16 y 20 h respectivamente, en comparación con el nativo que fue de 3742 ± 28.63 (Tabla I). La α -amilasa afectó preferentemente los anillos de crecimiento amorfo (Benavent *et al.*, 2017). Existe una desintegración de gránulos susceptibles debido a su estructura porosa, lo que da como resultado suspensiones menos viscosas (Uthumporn *et al.*, 2010). La viscosidad pico se asocia principalmente con los contenidos de amilosa, la distribución de la longitud de la cadena ramificada de la amilopectina y los componentes menores (Jane, 2006).

Tabla 1. Parámetros de análisis de perfil de viscosidad, mediciones realizadas a los tratamientos de almidón, mediante uso del Analizador Rápido de Viscosidad (RVA)¹.

Almidón	Viscosidad (cP)			T paste (°C)
	Pico	Baja	Final	
AMN	3742 ± 28.63^a	1750.4 ± 39.90^a	4264.8 ± 35.70^a	77.38
AM16H	2744.2 ± 14.31^b	1213.2 ± 79.95^b	2321.2 ± 69.05^b	77.87

AM20H	3106.2±77.46°	832.6±34.72°	1670.2±12.41°	78.10
-------	---------------	--------------	---------------	-------

¹Los datos son las medias de tres repeticiones ± desviación estándar, superíndices diferentes por fila representan diferencias estadísticas significativas (P<0.05). AMN=Almidón de maíz nativo, AM16H=Almidón de maíz hidrolizado enzimáticamente por 16 horas, AM20H=Almidón de maíz hidrolizado enzimáticamente por 20 horas.

En cuanto a Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC), las propiedades térmicas de los almidones modificados presentaron menores valores de ΔH y un aumento en la temperatura de gelatinización (Tabla II) presentando diferencias estadísticas significativas (p<0.05) entre los almidones hidrolizados y el nativo. Los valores ΔH fueron de 10.5, 7.0 y 9.0 J/g y las temperaturas de gelatinización de 72.1, 73.3 y 73.2 °C para almidones nativo e hidrolizados a 16 h y 20 h respectivamente. La disminución de ΔH indica que los almidones porosos requieren menos energía para promover la gelatinización del almidón, es decir, la energía necesaria para desenrollar las dobles hélices inestables durante la gelatinización (Sandhu & Singh, 2007).

Tabla II. Parámetros de análisis de perfil térmico, mediciones realizadas a los tratamientos de almidón, mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC)¹.

¹ Los son	Almidón	To (°C)	Tp (°C)	Tc (°C)	ΔH (J/g)	Tc-To	datos las
	AMN	68.52±0.51 ^a	72.43±0.36 ^a	77.29±0.43	10.30±0.4 ^a	8.77±0.47	
	AM16H	69.42±0.25 ^b	73.08±0.16 ^b	78.36±0.33	7.83±0.44 ^b	9.10±0.47	
	AM20H	69.31±0.23 ^b	73.15±0.25 ^b	77.7±0.12	8.63±0.48 ^b	8.43±0.34	

medias de tres repeticiones ± desviación estándar, superíndices diferentes por fila representan diferencias estadísticas significativas (P<0.05). To=Temperatura inicial, Tp=Temperatura pico, Tc=Temperatura de conclusión, ΔH=Cambio de entalpía, Tc-To=Índice Tc-To. AMN=Almidón de maíz nativo, AM16H=Almidón de maíz hidrolizado enzimáticamente por 16 horas, AM20H=Almidón de maíz hidrolizado enzimáticamente por 20 horas.

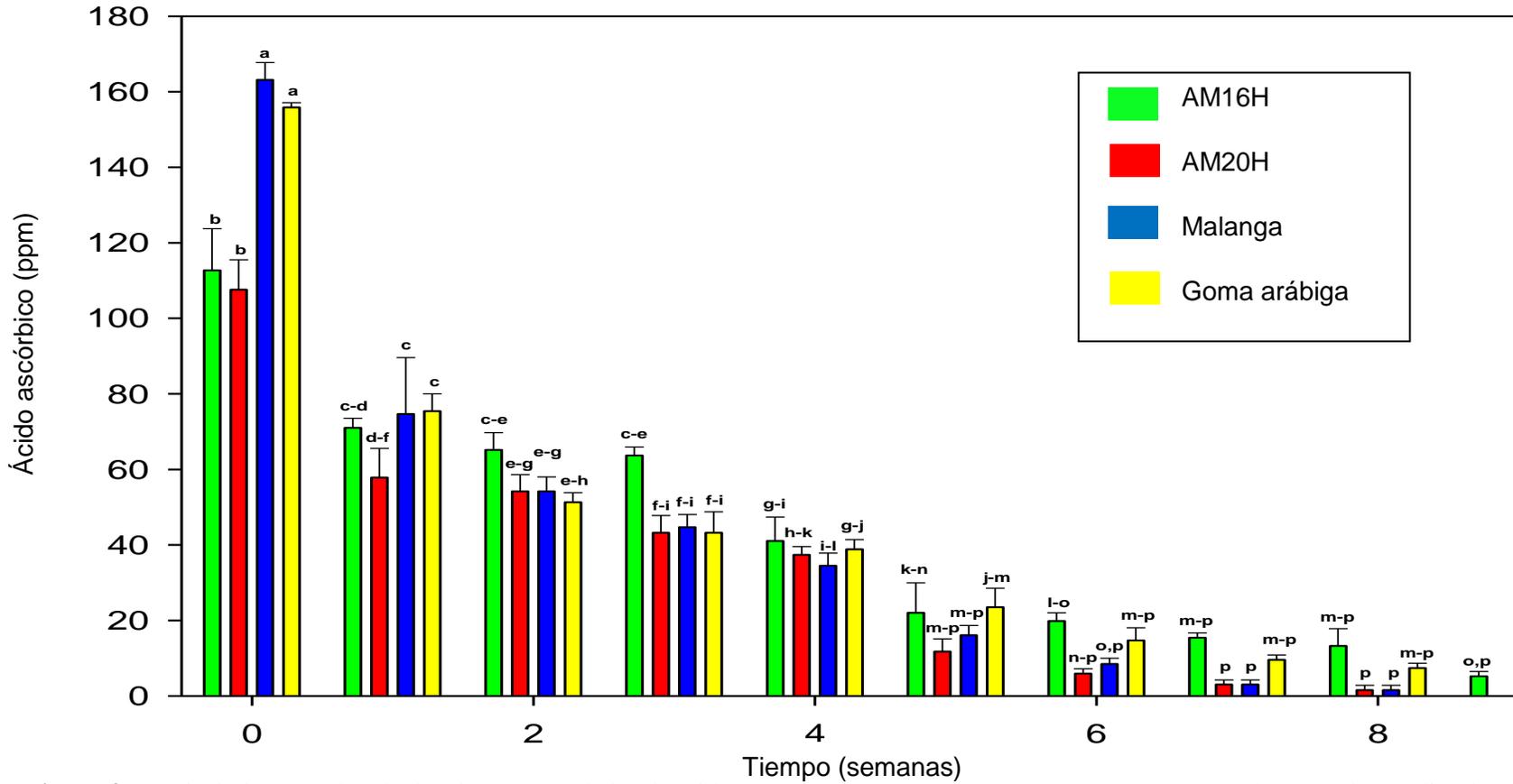


Figura 4. Envejecimiento acelerado de microencapsulados de ácido ascórbico (malanga, goma arábica) a temperatura 55°C). Los datos son las medias de tres repeticiones \pm desviación estándar, superíndices diferentes por fila representan diferencias estadísticas significativas ($P < 0.05$). AM16H=Almidón de maíz hidrolizado enzimáticamente por 16 horas, AM20H=Almidón de maíz hidrolizado enzimáticamente por 20 horas.

La gelatinización de almidón es una transición endotérmica que corresponde a la disociación de dobles hélices de amilopectina desde una estructura semicristalina a una conformación amorfa. Los valores de cambio de entalpía reflejan principalmente la pérdida del orden de doble hélice en lugar de la pérdida de registro cristalino (Cooke & Gidley, 1992). Las dos muestras hidrolizadas enzimáticamente (16 y 20 horas) mostraron temperaturas de gelatinización mayores en comparación con el almidón nativo. Las propiedades térmicas se ven afectadas en gran medida por la estructura final de la amilopectina y el contenido de amilosa de los almidones (Srichuwong & Jane, 2007). En general, los almidones que consisten en amilopectina con cadenas de ramificación más largas muestran temperaturas de gelatinización más altas, debido a una mayor conformación cristalina, presentando dobles hélices estables.

En cuanto a las microcápsulas, se puede observar que la mayoría de los poros son tapados en la superficie, con una ligera aglomeración (Fig. 1). Los gránulos de almidón presentan una estructura no definida, aunque con la misma tendencia en cuanto a la distribución.

En la Fig. 4, se puede observar como las microcápsulas de almidón hidrolizado por 16 horas presentan una mejor estabilidad durante el almacenamiento en condiciones de envejecimiento acelerado, conservando el 17.6 % y 12 % de ácido ascórbico encapsulado inicialmente en las semanas 6 y 8 respectivamente. Se calcularon las constantes de velocidad de degradación de ácido ascórbico para cada microencapsulado, siendo las microcápsulas de almidón hidrolizado enzimáticamente por 16 horas la de menor valor ($k=0.3076$). De la semana inicial a la semana 3 se puede observar un mayor porcentaje de ácido ascórbico en las cápsulas de dicho almidón modificado, a pesar de las diferencias en la concentración inicial.

CONCLUSIÓN

Se presentaron cambios en la caracterización morfológica, estructural y fisicoquímica entre los almidones nativos e hidrolizados. Las microcápsulas con almidón hidrolizado por 16 horas presentaron mayor estabilidad durante la prueba de envejecimiento acelerado en comparación con los controles. En este estudio se concluye que la perforación enzimática de los almidones podría ser una buena alternativa para encapsular compuestos bioactivos favoreciendo la estabilidad respecto al tiempo de almacenamiento.

BIBLIOGRAFÍA

- Aggarwall, P. & Dollimore, D. (1998). A thermal analysis investigation of partially hydrolyzed starch. *Thermochimica Acta*, 319, pp. 17-25.
- Bansode, S. S., Banarjee, S. K., Gaikwad, D. D., Jadhav, S. L., Thorat, R. M, Microencapsulation: a review. *International Journal of Pharmacological Sciences*. 2010, 1, 38–43.
- Belingheri, C., Giussani, B., Rodriguez-Estrada, M. T., Ferrillo, A., Vittadini, E, Oxidative stability of high-oleic sunflower oil in a porous starch carrier. *Food Chemistry*. 2015, 166, 346-351.
- Benavent, Y. & Rosell, M. (2017). Morphological and physicochemical characterization of porous starches obtained from different botanical sources and amylolytic enzymes. *International Journal of Macromolecules*, 103, pp. 587-595.
- Chung, Ch., Othman, Z. & Jau, L. (2015). Gamma irradiation of corn starches with different amylose to amylopectin ratio. *Journal Food Science Technology*, 52(10), pp. 6218–6229.
- Cooke, D. & Gidley, M. (1992). Loss of crystalline and molecular order during starch gelatinisation: origin of the enthalpic transition. *Carbohydrate Research*, 227, pp. 103-112.
- Desai, K. G., Liu, C., Park, H. J, Characteristics of vitamin C encapsulated tripolyphosphate-chitosan microspheres as affected by chitosan molecular weight. *Journal of Microencapsulation* 2006, 23, 79-90.
- Jane, J. (2006). Current understanding on starch granule structure. *Journal of Applied Glycoscience*, 53(3), pp. 205-213.

- Jayakody, L. & Hoover, R. (2002). The effect of lintinization on cereal starch granules. *Journal Food Research International*, 35, pp. 665–680.
- Kainuma, K. & French, D. (1971). Nageli amyloextrin and its relationship to starch granule structure. I. Preparation and properties of amyloextrins from various starch types. *Biopolymers*, 10, pp.1673-1680.
- Rosenberg, M., Kopelman, I. J., Talmon, Y, Factors affecting retention in spray-drying microencapsulation of volatile materials. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1990, 38, 1288–1294.
- Singh, N. & Sandhu, S. (2007). Some properties of corn starches II: Physicochemical, gelatinization, retrogradation, pasting and gel textural properties. *Food Chemistry*, 101, pp. 1499-1507.
- Spinelli, B., Guérente, C., Armand, S., Lenouvel, F., Labbé, P., & Fort, S. (2013). Functional characterization of starch degrading enzymes using quartz crystal microbalance with dissipation monitoring, *Sensors and Actuators B*, 176, pp. 1038-1043.
- Srichuwong, S. & Jane, J. (2007). Physicochemical properties of starch affected by molecular composition and structure: A review. *Food Science and Biotechnology*, 16(5), pp. 663-674.
- Tester, R. & Karkalas, J. (2002). Starch In: Steinbüchel, A. (Series Ed.), Vandamme, J., de Baets, S. & Steinbüchel, A. (Vol. Eds.), *Biopolymers*, Vol. 6, Polysaccharides. II. Polysaccharides from Eukaryotes, Wiley-VCH, Weinheim, pp. 381-438.
- Uthumporn, U., Karim, A. & Fazilah, A. (2006). Defatting improves the hydrolysis of granular starch using a mixture of fungal amyolytic enzymes. *Industrial Crops and Products*, 43, pp. 441– 449.