

FRACCIONAMIENTO DEL ALMIDÓN DE *Amaranthuscaudatus* LINNEO

M. R. Calixto C.¹

(Recibido: 19/05/2014 / Aceptado: 18/07/2014)

RESUMEN

El propósito de este trabajo fue realizar un análisis estructural de los componentes del almidón de *Amaranthuscaudatus* Linneo (kiwicha) de los granos opacos (tipo waxy) empleando dos fases. La desramificación enzimática y la cromatografía en columna de Sephadex.

Para el tratamiento enzimático se utilizó isoamilasa (1200 U) más almidón desengrasado y gelatinizado, los cuales fueron incubados a 40 °C durante 24 horas. El producto de la reacción fue desecado y separado por cromatografía en Sephadex G 75 a 28 °C recolectándose fracciones de 9 mL/hora.

Como resultado del fraccionamiento por cromatografía se obtuvieron tres fracciones, la fracción I que se coloreó de azul violeta con una solución de yodo, correspondiente a la amilosa, molécula de alto peso molecular, y cuyo contenido de carbohidratos fue de 5,8%. Las fracciones II y III correspondieron a la amilopeptina desramificada. La fracción II presentó cadenas largas de tipo B con 42 residuos glucosídicos y la fracción III es una mezcla de cadenas tipo A y B con 15 residuos glucosídicos. Además, se determinó la relación de la fracción III/ II cuyo valor es 3,3.

Palabras clave: almidón opa, desramificación enzimática, residuos glucosídicos, *Amaranthuscaudatus*

STARCH FRAGMENTATION OF *Amaranthuscaudatus* LINNEO

ABSTRACT

The purpose of this study was to determine the structural analysis of the components of starch grains of *Amaranthuscaudatus* (waxy type) using two techniques enzymatic debranching and the Sephadex column chromatography.

For the enzymatic reaction is used starch degreasing and gelatinized with 1200 U isoamylase, which were incubated at 40°C for 24 hours. The product of the reaction was dried and separated by chromatography to 28°C. The fractions were collected every 9 mL/hour.

The result of fractionation by chromatography was described graphically distinguishing 3 peaks. The fraction I is colored of blue violet with an iodine solution, which corresponded to the amylose, high molecular weight molecule, and whose carbohydrate content was 5,8%. Then two peaks were observed for amylopectin (Fraction II and III). The fraction II contains long chain type B with 42 glycoside residues and fraction III comes from a mixture of type A and B chains with 15 glycosides residues. Furthermore, the ratio of the fraction III / II whose value is 3,3 was determined.

Keywords: starch opa, debranching enzymatic, glycoside residues, *Amaranthuscaudatus*

¹ Departamento Química Analítica. FQIQ, UNMSM, charitocc@yahoo.com

I. INTRODUCCIÓN

En las semillas de *Amaranthuscaudatus* L. se han encontrado dos tipos de granos opacos (opa) y translucidos (trans). Posteriormente se han obtenido almidón de cada uno de ellos, denominándose almidón tipo waxy y no waxy provenientes de los granos opa y trans respectivamente.

Respecto al contenido de amilosa y amilopectina para el almidón opa fue de 6,8 y 93,2 % mientras que para el tipo trans fue de 11,3 y 88% respectivamente.^[1]

La presencia de amilosa y amilopectina es una de las propiedades que influye en la funcionabilidad de los gránulos de almidón si como en la organización física de estas macromoléculas dentro de la estructura del gránulo.^[2]

El almidón de amaranto presenta alto contenido de amilopectina; por esta razón, la polimerización y el grado de ramificación tienen efectos sustanciales sobre todo en las propiedades fisicoquímicas y funcionales.^[3] Para comprender las propiedades funcionales del almidón de amaranto es de interés conocer la variación de la estructura molecular de la amilopectina.

Esta, es un polisacárido ramificado compuesto por unidades de cadenas cortas (1→4)- α -D-glucosa (12 – 70 residuos, promedio de 20) unidas también por enlaces α -(1→6). El peso molecular es alto, entre 50-500 x 10⁶ dalton; tiene un resto de fosfato por cada 400 unidades de glucosa. Estas variaciones están influenciadas por el origen botánico del almidón y el método empleado para su fraccionamiento.^[2,4]

El modelo en racimos de la amilopectina (Fig. 1) explica la característica estructural de esta molécula.^[4] En este modelo se presenta cadenas de tipo A, B y C, que se han dado a los segmentos en la molécula de la amilopectina. Así las de tipo A están unidas al resto de la molécula mediante enlaces α -(1→6) hacia las cadenas tipo B y éstas a su vez, están unidas a través de un enlace α -(1→

6) llevando uno o más cadenas A y/o B y algunas se unen a las de tipo C mediante enlaces α -(1→6). La cadena tipo C sólo puede ser encontrada en la molécula de la amilopectina y es la que lleva el único grupo reductor.^[2,4]

Los racimos asociados de las cadenas A son principalmente responsables de la región cristalina dentro del gránulo. Además el grado de cristalinidad depende del peso molecular y de la longitud de la cadena. En la base a este dato, se señala que las cadenas de tipo A son más cortas en longitud que las de tipo B.^[2]

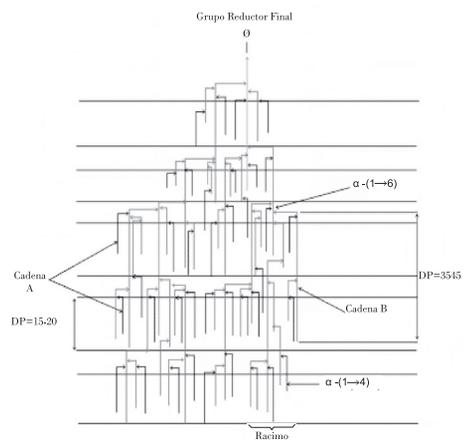


Fig. 1 Modelo en racimo de la amilopectina

La distribución de las cadenas lineales con enlaces α -(1→4) en la amilopectina fue investigada empleando la isoamilasa y fraccionando por la técnica de cromatografía gel filtración. La isoamilasa hidroliza tanto los enlaces internos y externos de tipo glucosídicos α -(1→6) de la amilopectina y del glucógeno.

Aplicando los métodos enzimáticos y cromatográfico sobre la amilopectina sin separarlo del almidón se puede determinar la distribución de las cadenas lineales con enlaces α -(1→4) y los grupos reductores libres.^[2,5]

En la presente investigación la distribución de los componentes del almidón fue investigada por cromatografía gel filtración previa desramificación enzimática del almidón opa y del almidón de maíz.

II. SECCION EXPERIMENTAL

1. Desramificación Enzimática

Se utilizó el método de Song con algunas modificaciones.^[6]

Reactivos

- Isoamilasa de *Pseudomonas amyloclavata* [EC 3.2.1.68] de Sigma Chemical. Co, con actividad enzimática de 37'000,000 UI/mgproteína.
- Almidón de amaranto (opa) y de maíz fueron obtenidos de los granos de *A. caudatus* y de *Z. mays* procedente del Instituto de Investigación Agraria. Huancaayo. Los almidones fueron previamente desengrasados con metanol al 85% por 20 minutos a 55°C 2 veces.
- Acetato de Sodio 0,05 M, pH 3,5. El almidón de maíz se usó como patrón de referencia.

Preparación de la muestra

Se pesó 60 mg de almidón en base seca finamente molido y se le adicionó 2 mL NaOH 1 M manteniéndolo a 4°C por 24 horas, después se siguió el mismo procedimiento descrito por Harada.^[5]

Ensayo enzimático

La solución anterior se preincubó a 40°C por 5 minutos y luego se añadió 1,200 UI de Isoamilasa al sustrato. (almidón opa y el almidón de referencia).

Se incubaron las muestras sustrato/enzima así como los blancos a 40°C durante 24 horas.

Luego se adicionó 0,5 mL de NaOH 0,1 M y la enzima fue inactivada en caliente. Posteriormente se siguió el método descrito por Inouchi.^[7]

2. Fraccionamiento del almidón desramificado

Se llevó a cabo según los métodos de Ikawa^[8], con ligeras modificaciones.

La cromatografía se realizó a 28 °C usando una columna (1,6 x 25 cm) de Sephadex G-75, a la cual se adicionó 0,20 mL de muestra de almidón Opa desramificado y como eluyente NaOH 0,02N conteniendo NaCl 0,2%. Se recolectaron aproximadamente 50 fracciones a una velocidad de 9 mL/hora y luego fueron neutralizadas con HCl 1 N.

3. Análisis estructural de las fracciones obtenidas.

Las fracciones recolectadas fueron separadas y agrupadas en tres fracciones I, II y III en base a sus propiedades de máxima absorción espectral (λ_{max}), debido a la formación del complejo yodo-carbohidrato en cada fracción.^[2]

La cantidad de carbohidratos de cada fracción fue determinada por el método de Antrona-Ácido Sulfúrico^[9], y los residuos reductores terminales empleando el método de Park-Jhonsom modificado por Hizukuri.^[10]

El promedio de Número de Residuos (N° R) glucosídicos equivalente a la longitud de cadena fue determinada dividiendo los carbohidratos totales entre la cantidad de azúcares reductores.^[7]

$$N^{\circ} R = \frac{\text{Carbohidratos totales}}{\text{Azúcares reductores}}$$

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El fraccionamiento del almidón se llevó a cabo mediante 2 etapas: 1) desramificación enzimática y 2) cromatografía en columna de Sephadex G-75.

La Fig.2 muestra el perfil cromatográfico en Sephadex G-75 de los almidones desramificados de Opa y de maíz. Nuestros resultados exhibieron tres picos correspondientes a las fracciones I, II y III; el primer pico aparece cercano al volumen de exclusión de la columna y representa a la fracción I, un segundo pico en la parte media, correspondiente a la fracción II y un tercer pico

designado como la fracción III al final. Este tipo de perfil cromatográfico, también se presentó para el almidón de *A. hypochondriacus* estudiado por Sugimoto^[11], el cual realiza una comparación con los almidones de maíz y de arroz.

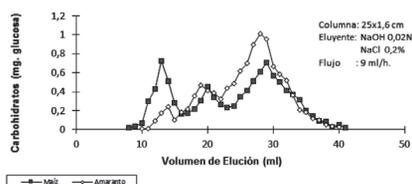


Fig.2 Perfil de elución por Sephadex G-75 de los almidones amarantho Opa y de Maíz desramificados por Isoamilasa

La fracción I comprende material de alto peso molecular, siendo más abundante y prominente en el maíz que en el almidón Opa. Esta fracción forma un complejo con el yodo de color azul violeta (max 590-600 nm.), el cual indicaría la existencia de moléculas de alto peso molecular considerado como amilosa. Las fracciones II y III dieron una coloración parda rojiza con la solución de iodo, correspondiente a la amilopectina desramificada, se hidrolizaron todos los enlaces α -(1 \rightarrow 6) tanto internos como externos.

La fracción II contiene cadenas lineales glucosídicas con enlaces α -(1 \rightarrow 4) la cual consiste de cadenas largas tipo B y la fracción III proviene de una mezcla de cadenas tipo A y cadenas cortas tipo B. Estos hallazgos son similares a lo reportado por Inouchi,^[7] quienes analizaron almidón de *A. caudatus*, pero además obtienen una pequeña fracción intermedia (1-2 %) que puede ser cadenas cortas de amilosa y/o cadenas muy largas de tipo B de amilopectina.

En la tabla 1 se resume el contenido de carbohidratos totales de las fracciones y el promedio de número de residuos reductores en el pico el cual corresponde a la longitud de las cadenas glucosídicas de la amilopectina desramificada. Se aprecia que la fracción I contiene 5,8% y 22,7% de amilosa en el almidón opa y maíz respectivamente. Asimismo, se observa un mayor porcentaje de carbohidratos totales en la fracción II y III en

el almidón opa a diferencia del almidón de maíz. Evidenciando que el almidón opa tiene un mayor contenido de amilopectina siendo considerado como almidón tipo waxy^[6,12].

Tabla 1. Contenido de carbohidratos totales en almidones desramificados por Isoamilasa.

ALMIDÓN	Frac- ción I (%)	Frac- ción II (%)	Fracción III (%)	Fr. III Fr. II	Nº R. en el pico	
					Fr. II	Fr. III
Opaco	5,8	22,0	72,2	3,3	41,8	15,1
Maíz	22,7	18,9	58,4	3,1	45,1	15,3

Nº R. Número de Residuos

En el opa, el promedio de número de residuos de la fracción II (cadenas largas tipo B) y la fracción III (cadenas de tipo A y B) es de 42 y 15 residuos glucosídicos respectivamente. El número de residuos (45) de la fracción II del almidón de maíz es ligeramente superior que el Opa, indicando que la longitud de la cadenas tipo B es mayor en el almidón de maíz. Mientras que en la fracción III los valores son cercanos en ambas muestras, indicando que la longitud de cadenas tipo A y B es similar entre estos almidones. Estos resultados concuerdan con los trabajos de Ikawa^[8] e Inouchi,^[7] quienes determinaron que la amilopectina desramificada de maíz presentaba la fracción II constituidas por cadenas tipo A y B con 16 residuos, siendo estos resultados similares con la amilopectina de amaranto.

También en la tabla 1 se observa la razón entre la fracción II/fracción III y el promedio de número de residuos de la cadena (Nº R) del almidón opa y del maíz indicando valores cercanos. Similares resultados reportaron Inouchi,^[7] trabajando con almidón de amaranto establecen que la razón de las cadenas cortas y las cadenas largas con enlace α -(1 \rightarrow 4) de la amilopectina presentaban un rango de 2,2 - 3,3.

Otro informe señala que la razón entre las fracciones es característica del análisis estructural de la amilopectina y puede usarse como un grado de mayor o menor desramificación.^[2,12]

La tabla 2 muestra la distribución del número de unidades reductoras de la desramificación del almidón opa y maíz, en ella se aprecia que la fracción I no contiene unidades reductoras, debido a que se conserva su cadena lineal con enlaces α -(1 \rightarrow 4). La fracción II es ligeramente superior y se observa una mayor presencia de azúcares reductores en la fracción III.

Tabla 2. Contenido de azúcares reductores de los almidones desramificados por isoamilasa.

ALMIDÓN	Fracción I (%)	Fracción II (%)	Fracción III (%)
Opaco	0,0	8,9	91,1
Maíz	0,0	10,1	90,0

IV. CONCLUSIONES

El almidón tipo opa fue desramificado enzimáticamente, y por cromatografía de filtración en gel se obtuvieron tres fracciones; la I se coloreó de azul violeta con una solución de yodo, el cual correspondió a la amilosa y las dos últimas II y III dieron un color pardo rojizo representado a la amilopectina desramificada.

El contenido de carbohidratos totales de las fracciones I, II y III del almidón opa fue de 5,8; 22,0 y 72,2 % respectivamente indicando un alto contenido de amilopectina.

El promedio de número de residuos glucosídicos el cual representa a la longitud de las cadenas con enlaces α -(1 \rightarrow 4) de la amilopectina, de la fracción II es de 42 siendo de mayor longitud a diferencia que la fracción III que presenta cadenas cortas con 15 residuos.

V. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] Calixto, C. R., Arnao, S. Aislamiento y Caracterización parcial (I) del almidón nativo de *Amaranthus caudatus* L. Rev. Soc. Quím. Perú. 2004; 1(40), 48-54.

[2] Bello-Pérez, L., Méndez Montealvo, M., Acevedo, E. Almidón: definición, estructura y propiedades. Carbohidratos en Alimentos Regionales Iberoameri-

canos. Sao Paulo. Editora da Universidade de São Paulo. 2006;25-30.

[3] Kong, X., Bao, J., Corke, H. Physical properties of *Amaranthus* starch. Food Chem. 2009; 113,371-376.

[4] Jane Jan-lin, Structural features of starch granules II. Starch chemistry and technology. Edit. James Be Miller Roy Whistler. USA. 2009; 213-215.

[5] Harada T., Misaki, A, Akai, H., Yokobayashi, K., Sugimoto K. Characterization of P. isoamylase by its actions on amylopectin and glycogen. Comparison with A. pullulanase. Biochim. Biophys. Acta. 1972; 268, 497-505.

[6] Song, Y.J. Characterization of barley starch of waxy, normal and high amylose varieties. Carbohydr. Polym. 2000; 41(4),365-377.

[7] Inouchi, N., Nishi, K., Tanaka, N., Asai, M., Kawase, Y., Hata, Y., Konishi, Y., Yue SH., Fuwa, H. Characterization of Amaranth and Quinoa Starches. J. Appl. Glycosci. 1999;46 (3) 233 - 240.

[8] Ikawa, Y., Glover, D.V., Sugimoto, Y., Fuwa, H., Some Structural Characteristics of Starches of Maize Having a Specific Genetic Background. Starch/Stärke 1981; 33(1), 9-13.

[9] Kong, X. Corke, H., Bertoft E. Fine structure characterization of amylopectins from grain amaranth starch. Carbohydr. Res. 2009; 344, 1701-1708.

[10] Hizukuri, S., Takeda, Y., Yasuda, M. Multi-branched Nature of Amylose and the Action of Debranching Enzymes. Carbohydr. Res., 1981; 97, 205-213.

[11] Sugimoto, Y., Yamada, K., Sakamoto, S., Fuwa, H. Some Properties of Normal and Waxy Type Starch of *Amaranthus hypochondriacus* L. Starch/Stärke., 1981;33(4), 112-116.

[12] Bertoft, E., Piyachomkwan, K., Chatakanonda, P., Sriroth, K. Internal unit chain composition in amylopectins. Carbohydr. Res., 2008; 527-543.

