



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

**INSTITUTO DE CIENCIAS DE LA SALUD
ÁREA ACADÉMICA DE NUTRICIÓN**

**Almidón retrogradado resistente a la hidrólisis
enzimática a partir de almidón nativo de *Vicia
faba* L. tratado térmico-enzimáticamente:
Preparación y propiedades**

T E S I S

Que para obtener el título de Licenciado en Nutrición

P R E S E N T A

P.L.Nutric. José Antonio Estefes Duarte
No. cuenta: 215302

Bajo la Dirección de:

M. en C. Teodoro Suarez Diéguez

Co-Dirección:

Dr. Marcos Marcelo Galván García

Profesores Investigadores del Área Académica de Nutrición
en el ICSa



Pachuca, Hgo., a 12 de Septiembre de 2017



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO
INSTITUTO DE CIENCIAS DE LA SALUD
ÁREA ACADÉMICA DE NUTRICIÓN**



De acuerdo con el artículo 134 del Reglamento de Control Escolar vigente, el jurado de examen recepcional designado, autoriza para su impresión la Tesis titulada

"Almidón retrogradado resistente a la hidrólisis enzimática a partir de almidón nativo de *Vicia faba* L. tratado térmico-enzimáticamente: Preparación y propiedades"

Que para obtener el Título de Licenciado de Nutrición sustenta el Pasante

C. José Antonio Estefes Duarte

ATENTAMENTE
Pachuca, Hidalgo, 12 de septiembre del 2017
"Amor, Orden y Progreso"

PRESIDENTE:	DR. GUADALUPE LÓPEZ RODRÍGUEZ
SECRETARIO:	DRA. DIANA PATRICIA OLIVO RAMÍREZ
PRIMER VOCAL:	DR. MARCOS MARCELO GALVÁN GARCÍA
SEGUNDO VOCAL:	M. EN C. MARCO AURELIO GONZÁLEZ UNZAGA
TERCER VOCAL:	M. EN C. TEODORO SUÁREZ DIEGÉZ
PRIMER SUPLENTE:	DR. JOSÉ DE JESÚS MANRÍQUEZ TORRES
SEGUNDO SUPLENTE:	DR. LUIS DELGADO OLIVARES



J. Jesús Manríquez T.

RECONOCIMIENTOS

Para la realización del proyecto de investigación de esta tesis se recibió financiamiento de SEP-PRODEP de la Convocatoria Fortalecimiento de Cuerpos Académicos 2016 clave UAEH-CA-86.

Durante el desarrollo de esta tesis, se contó con una beca SEP-PRODEP de la Convocatoria Fortalecimiento de Cuerpos Académicos 2016 clave UAEH-CA-86.

DEDICATORIAS

A **DANY**,

por ser especial

A mis hermanas

MERARI Y LUCY, por ser el motivo

A la familia Riveros Duarte

VERO, LUIS, OSCAR Y LUISITO, por ser la razón

A mis amigos

JOSUÉ, PEPE Y CARLOS, por estar ahí, conmigo

A mi padre

JOSÉ, por su apoyo incondicional y confianza ciega

Pero muy especialmente

A mi madre

LUCÍA, porque me hubiera encantado que presenciara esto

AGRADECIMIENTOS

Un especial agradecimiento al **M. en C. Teodoro Suarez Diéguez**, por su dirección en el proyecto de tesis.

Al **Dr. Marcos Marcel Galván García**, por su co-dirección en el proyecto.

A la **M.C. Gloria Angélica Téllez Téllez** y a la **I.Q.P. Alejandra Islas Ortega**, por su apoyo con material y reactivos de laboratorio durante el desarrollo del proyecto.

A los revisores, **Dra. Guadalupe López Rodríguez**, **Dra. Diana Patricia Olivo Ramírez**, **M. en C. Marco Aurelio González Unzaga**, **Dr. José de Jesús Manríquez Torres** y **Dr. Luis Delgado Olivares**, por sus aportes al manuscrito.

A **Fernanda Daniela Peralta Olvera**, **José Guadalupe Contreras Soto** y **Juan Carlos García Villafuerte**, por su contribución en la elaboración de esta tesis.

A mi amigo, **Dr. Gabriel Betanzos Cabrera**, por sus consejos.

Y, por último, a la **Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo**, por mi formación profesional como Licenciado en Nutrición.

“En algún lugar, algo increíble está esperando ser descubierto”

Carl Sagan

“La ciencia es una empresa cooperativa, que se extiende de generación en generación. Es el paso de la antorcha del maestro, al estudiante, al maestro. Una comunidad de mentes que se remonta a la antigüedad y hacia adelante a las estrellas”

Neil deGrasse Tyson

“Si logramos ver más lejos, será por estar parados sobre los hombros de gigantes”

Isaac Newton

“No tengo talentos especiales, pero sí soy profundamente curioso”

Albert Einstein

CONTENIDO

LISTA DE FIGURAS.....	I
LISTA DE TABLAS	II
LISTA DE ABREVIATURAS.....	III
RESUMEN	VI
SUMMARY.....	VIII
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MARCO TEÓRICO.....	3
2.1. PROPIEDADES MORFOLÓGICAS Y QUÍMICAS DEL HABA.....	3
2.1.1. <i>Morfología</i>	3
2.1.2. <i>Composición química</i>	4
2.2. PROPIEDADES FISCOQUÍMICAS DEL ALMIDÓN	5
2.2.1. <i>Gránulos de almidón</i>	5
2.2.2. <i>Composición química del almidón</i>	6
2.2.3. <i>Propiedades tecnofuncionales del almidón</i>	7
2.2.3.1. <i>Gelatinización</i>	8
2.2.3.2. <i>Retrogradación</i>	8
2.3. PROPIEDADES NUTRIMENTALES DE LOS ALMIDONES DE LEGUMINOSAS	9
2.3.1. <i>Factores que modifican su biodisponibilidad</i>	9
2.3.1.1. <i>Factores intrínsecos (propios de la estructura del alimento)</i>	9
2.3.1.2. <i>Factores extrínsecos (externos al alimento)</i>	10
2.4. CLASIFICACIÓN DEL ALMIDÓN CON BASE EN SU DIGESTIBILIDAD	10
2.4.1. <i>Almidón de rápida digestibilidad (ARD)</i>	10
2.4.2. <i>Almidón de baja digestibilidad (ABD)</i>	11
2.4.3. <i>Almidón Resistente (AR)</i>	11
2.5. PROCESOS DE OBTENCIÓN DE AR	13
2.6. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE AR Y OTRAS FRACCIONES DEL ALMIDÓN EN LOS ALIMENTOS.....	14
2.7. EFECTOS BENÉFICOS DEL AR.....	15
2.8. INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA EN TORNO AL AR.....	17
3. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	18
4. JUSTIFICACIÓN	19
5. OBJETIVOS	20
5.1. OBJETIVO GENERAL.....	20
5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	20
6. HIPÓTESIS.....	21
7. DISEÑO METODOLÓGICO	22
7.1. DESARROLLO EXPERIMENTAL	22

7.2. MÉTODOS	24
7.2.1. Extracción y aislamiento del almidón nativo (AN)	24
7.2.2. Preparación de AR por tratamiento térmico-enzimático.....	24
7.2.3. Propiedades fisicoquímicas del almidón.....	25
7.2.3.1. <i>Morfología</i>	25
7.2.3.2. <i>Propiedades químicas</i>	25
7.2.3.3. <i>Propiedades moleculares</i>	26
7.2.4. Propiedades nutrimentales.....	26
7.2.4.1. <i>Determinación de las fracciones de almidón en las muestras nativas y tratadas</i>	26
7.2.4.1.1. <i>Almidón resistente (AR)</i>	26
7.2.4.1.2. <i>Almidón total (AT) y almidón digerible (AD)</i>	27
7.2.4.2. <i>Digestibilidad in vitro de los almidones nativos y tratados</i>	28
7.2.4.2.1. <i>Porcentaje de hidrólisis (PH)</i>	28
7.2.4.2.2. <i>Cinética de digestión</i>	29
7.2.4.2.3. <i>Área bajo la curva de hidrólisis (ABC)</i>	29
7.2.4.2.4. <i>Índice de hidrólisis (IH)</i>	30
7.2.4.2.5. <i>Estimación del índice glucémico (IG_e)</i>	30
7.2.5. Análisis Estadístico.....	31
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	32
8.1. COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LOS ALMIDONES NATIVOS.....	32
8.1.1. <i>Análisis químico proximal</i>	32
8.1.2. <i>Contenido de amilosa y amilopectina</i>	33
8.2. RENDIMIENTO Y CONTENIDO DE AR.....	36
8.2.1. <i>Tiempo de incubación y concentración enzimática</i>	36
8.2.2. <i>Tiempo de almacenamiento</i>	39
8.2.3. <i>Temperatura de almacenamiento</i>	40
8.2.4. <i>Almidón resistente de haba, frijol y maíz</i>	42
8.3. PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE LOS ALMIDONES.....	43
8.3.1. <i>Morfología (MEB)</i>	43
8.3.2. <i>Molecular (Grado de desramificación)</i>	48
8.4. PROPIEDADES NUTRIMENTALES DE LOS ALMIDONES	50
8.4.1. <i>Almidón digerible, almidón resistente y almidón total</i>	50
8.4.2. <i>Digestibilidad in vitro</i>	52
8.4.2.1. <i>Porcentaje de hidrólisis</i>	52
8.4.2.2. <i>Índice de hidrólisis y estimación del Índice Glucémico</i>	54
9. CONCLUSIONES	58
10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Vaina y semillas de <i>Vicia faba</i> L	3
Figura 2.	Diagrama de la estructura laminar del gránulo de almidón	6
Figura 3.	Moléculas de amilosa y amilopectina	7
Figura 4.	Captación de yodo por la molécula de amilosa	7
Figura 5.	Representación esquemática de los cambios que ocurren en el almidón durante el calentamiento, enfriado y almacenamiento	9
Figura 6.	Reacción entre el ácido 3, 5-dinitrosalicílico y azúcares reductores	14
Figura 7.	Diagrama metodológico	23
Figura 8.	Modelo esquemático del cálculo del área bajo la curva de hidrólisis	30
Figura 9.	Almidón nativo y almidón retrogradado	36
Figura 10.	Microscopía electrónica de barrido de almidones nativos de haba, frijol y maíz	44
Figura 11.	Microscopía electrónica de barrido de almidones retrogradados de haba, frijol y maíz	47
Figura 12.	Porcentaje de desramificación del almidón de haba	48
Figura 13.	Correlación entre el contenido de AR y el grado de desramificación con diferentes concentraciones enzimáticas	49
Figura 14.	Porcentaje de hidrólisis y área bajo la curva de almidones nativos y retrogradados de haba, frijol, maíz y pan blanco	53

LISTA DE TABLAS

Tabla 1.	Composición química de las semillas de haba crudas	5
Tabla 2.	Clasificación del almidón resistente	12
Tabla 3.	Efectos fisiológicos del consumo de almidón resistente	16
Tabla 4.	Composición química promedio de los almidones nativos de haba, frijol y maíz	32
Tabla 5.	Contenido de amilosa y amilopectina en almidones nativos de haba, frijol y maíz	34
Tabla 6.	Rendimiento y contenido de AR de haba a diferentes tiempos de incubación y concentraciones enzimáticas	37
Tabla 7.	Rendimiento y contenido de AR de haba a diferentes tiempos de almacenamiento	40
Tabla 8.	Rendimiento y contenido de AR de haba a diferentes temperaturas de almacenamiento	41
Tabla 9.	Rendimiento y contenido de AR de muestras preparadas a partir de haba, frijol y maíz	42
Tabla 10.	Grado de desramificación del almidón de haba por pululanasa I a diferentes tiempos y concentraciones enzimáticas	48
Tabla 11.	Contenido de almidón digerible, almidón resistente y almidón total en muestras de haba, frijol y maíz	51
Tabla 12.	Concentración de equilibrio, constante cinética, área bajo la curva, índice de hidrólisis y estimación del índice glucémico de almidones nativos y retrogradados de haba, frijol y maíz	55

LISTA DE ABREVIATURAS

A	Vitamina A (Retinol)
ABC	Área Bajo la Curva de Hidrólisis
ABD	Almidón de Baja Digestibilidad
AD	Almidón Digerible
AN	Almidón Nativo
ANOVA	Análisis de la Varianza (<i>Analysis Of Variance</i>)
AOAC	Asociación de Químicos Analíticos Oficiales (<i>Association Of Official Analytical Chemists</i>)
AQP	Análisis Químico Proximal
AR	Almidón Resistente
AR I	Almidón Resistente tipo 1 (Físicamente Inaccesible)
AR II	Almidón Resistente tipo 2 (Granular, Cristalino)
AR III	Almidón Resistente tipo 3 (Retrogradado)
AR IV	Almidón Resistente tipo 4 (Modificado Químicamente)
AR V	Almidón Resistente tipo 5 (Complejo Amilosa-Lípido)
ARD	Almidón de Rápida Digestibilidad
AT	Almidón Total
B6	Vitamina B6 (Piridoxina)
B12	Vitamina B12 (Cobalamina)
cm	Centímetro, Centímetros
Cu	Cobre
D	Vitamina D (Calciferol)
D2	Vitamina D2 (Ergocalciferol)
D3	Vitamina D3 (Colecalciferol)
Da	Dalton
DM	Diabetes Mellitus
DMRT	Prueba de Rango Múltiple de Duncan
DNS	Ácido 3, 5 Dinitrosalicílico
E	Vitamina E (Tocoferol)

EC	Comisión de Enzima
ELN	Extracto Libre de Nitrógeno
Fe	Hierro
FN	Frijol Nativo
FR	Frijol Retrogradado
g	Gramo, Gramos
GOD-POD	Reactivo Químico Glucosa Oxidasa-Peroxidasa
h	Hora, Horas
HN	Haba Nativa
HR	Haba Retrogradada
IG	Índice Glicémico
IG _e	Estimación del Índice Glicémico
IH	Índice de Hidrólisis
INIFAP	Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias
<i>k</i>	Constante cinética
K	Vitamina K (Quinona)
Kcal	Kilocaloría, Kilocalorías
kg	Kilogramo, Kilogramos
KV	Kilovoltio, Kilovoltios
M	Molar
mA	Miliamperio, Miliamperios
MEB	Microscopía Electrónica de Barrido
mg	Miligramo, Miligramos
min	Minuto, Minutos
mL	Mililitro, Mililitros
MN	Maíz Nativo
MR	Maíz Retrogradado
N	Normal
nm	Nanómetro, Nanómetros
OMS	Organización Mundial de la Salud

OPS	Organización Panamericana de la Salud
p	Valor p (probabilidad)
PB	Pan Blanco
pH	Potencial de Hidrógeno
PH	Porcentaje de Hidrólisis
P/V	Relación Peso/Volumen
r	Coefficiente de correlación
rpm	Revoluciones Por Minuto
SPSS	Paquete Estadístico para las Ciencias Sociales (<i>Statistical Package For The Social Sciences</i>)
t	Tiempo
T_g	Temperatura de Transición Vítrea
T_m	Temperatura de Fusión
U	Unidad, Unidades
U/g	Relación Unidades/Gramo
UI	Unidades Internacionales
U/mL	Unidades/Mililitro
USDA	Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (<i>The United States Department Of Agriculture</i>)
UV	Ultravioleta
Zn	Zinc
α	Alfa
C_∞	Concentración de equilibrio
°C	Grado Centígrado, Grados Centígrados
=	Igual a
\pm	Más menos
<	Menor que
μg	Microgramo, Microgramos
μm	Micrómetro, Micrómetros
%	Porcentaje
Σ	Sumatoria

RESUMEN

El almidón es una fuente esencial de energía para muchos organismos incluido el ser humano. Una fracción del almidón, denominada almidón resistente (AR), ha recibido atención especial debido a sus efectos benéficos a la salud parecidos a los de la fibra dietética. El objetivo de este estudio fue establecer las condiciones óptimas de preparación de almidón resistente retrogradado (AR III) a partir de almidón nativo de *Vicia faba* L. mediante la aplicación de tratamientos térmico-enzimáticos a fin de evaluar sus propiedades fisicoquímicas y nutrimentales. Se determinó la composición química de los almidones nativos (AN) mediante análisis químico proximal (AQP) y el contenido de amilosa se calculó mediante la absorción de yodo. Se desramificaron almidones de haba (*Vicia faba* L.) con 6, 12 y 18 unidades de pululanasa (EC 3.2.1.41) por gramo de almidón (U/g) durante 0-27 horas y se evaluó su rendimiento y contenido de AR. Para evaluar el efecto de la temperatura y el tiempo de almacenamiento en la cantidad de AR se almacenaron las muestras (desramificadas con 12 U/g durante 12 horas) a -30, 2 y 20 °C durante 1-6 días. Después de obtener las condiciones óptimas de preparación de AR, se trataron almidones de haba, frijol y maíz y se compararon tanto su contenido de AR como sus propiedades. La morfología de las muestras obtenidas se analizó por microscopía electrónica de barrido (MEB) y el grado de desramificación (GD) mediante reacción con el ácido dinitrosalicílico (DNS). Se determinó el contenido de AR, almidón digerible (AD) y almidón total (AT) en las muestras nativas y tratadas, así como su digestibilidad *in vitro*. El análisis estadístico incluyó análisis de la varianza (ANOVA) y prueba de rango múltiple de Duncan. Se consideró un valor de $p < 0.05$ para establecer diferencias significativas. Para evaluar la relación entre el GD y el contenido de AR se calculó el coeficiente de correlación de Pearson (se consideró un nivel de relación significativo cuando el valor de $r > 0.7$). La evaluación química del AN de haba arrojó valores del $93.03 \pm 0.07\%$, $29.20 \pm 0.38\%$ y $70.78 \pm 0.00\%$ para carbohidratos, amilosa y amilopectina, respectivamente. Se obtuvieron las mayores cantidades de AR de haba empleando: 18 U/g de pululanasa durante 27 horas de desramificación ($77.12 \pm 0.51\%$) y 6 días de almacenamiento ($60.26 \pm 0.04\%$) a 20 °C ($53.77 \pm 0.13\%$). Los porcentajes de AR fueron mayores en el

haba (64.88 ± 0.02) y el frijol (64.84 ± 0.13) y estadísticamente menores ($p < 0.05$) en el maíz (58.44 ± 0.27). Mediante MEB se pudieron observar cambios en la estructura granular después de hidrolizar y almacenar (retrogradar) los almidones de los tres especímenes. Se encontró una correlación lineal positiva entre el GD y el AR de las muestras de haba, la cual fue mayor al emplear 18 U/g de pululanasa ($r = 0.949$, $p = 0.001$). Después de los tratamientos, el AD y el AR de haba se modificaron significativamente ($p < 0.05$) de $77.42 \pm 0.05\%$ y $22.67 \pm 0.29\%$ a $35.21 \pm 0.26\%$ y $64.88 \pm 0.02\%$, respectivamente. En las muestras de frijol y maíz se observaron tendencias similares. En el haba, la digestibilidad *in vitro* mostró diferencias significativas ($p < 0.05$) entre AN y AR en la concentración de equilibrio (C_{∞}) ($92.66 \pm 2.00\%$ y $84.91 \pm 0.92\%$, respectivamente), pero no así en el índice de hidrolisis (IH) y la estimación del índice glicémico (IG_e). Las mayores diferencias en el IH y en el IG_e de las muestras nativas y tratadas se observaron en el maíz. Las condiciones óptimas de preparación de AR de haba fueron 18 U/g, 27 horas de incubación y 3 días de almacenamiento a temperatura de refrigeración (2°C), obteniendo un producto óptimo con el $77.12 \pm 0.51\%$ de AR.

Palabras clave: haba, almidón resistente, retrogradación, tratamiento térmico-enzimático, pululanasa I.

SUMMARY

Starch is an essential source of energy for many organisms including humans. A fraction of starch, called resistant starch (RS), has received special attention because of its like-dietary fiber beneficial health effects. The aim of this study was to establish optimum conditions for retrograded resistant starch (RS III) preparation from native *Vicia faba* L. starch by the application of thermal and enzymatic treatments to evaluate their physicochemical and nutritional properties. The chemical composition of native starches (NS) was determined by proximate chemical analysis (PCA) and the amylose content was calculated by iodine uptake. Fava bean (*Vicia faba* L.) starches were debranched with 6, 12 and 18 units of pullulanase (EC 3.2.1.41) per gram of starch (U/g) for 0-27 hours and their yield and RS content were assessed. To evaluate the effect of temperature and storage time on RS amount, samples (debranched with 12 U/g for 12 hours) were stored at -30, 2 y 20° C for 1-6 days. After obtaining the optimum conditions of RS III preparation, fava bean, kidney bean and maize starches were treated and both RS content and properties were compared. Morphology of samples obtained was analyzed by scanning electron microscopy (SEM) and debranching degree (DD) was calculated by reaction with dinitrosalicylic acid (DNS). Fractions RS, digestible starch (DS) and total starch (TS) contents were determined in native and treated samples, as well as their *in vitro* digestibility. Statistical analysis included analysis of variance (ANOVA) and Duncan's multiple range test. A p value < 0.05 was considered to establish significant differences. To evaluate the relation between DD and RS content, a Pearson's correlation coefficient was calculated (a degree of significant correlation was considered when r value > 0.7). Chemical evaluation of fava bean native starch yielded percentages of $93.03 \pm 0.07\%$, $29.20 \pm 0.38\%$ and $70.78 \pm 0.00\%$ for carbohydrates, amylose, and amylopectin, respectively. The highest amounts of fava bean RS were obtained using 18 U/g of pullulanase for 27 hours of debranching ($77.12 \pm 0.51\%$) and 6 days of storage ($60.26 \pm 0.04\%$) at 20 ° C ($53.77 \pm 0.13\%$). Percentages of RS were higher in fava bean (64.88 ± 0.02) and kidney bean (64.84 ± 0.13) and statistically lower ($p < 0.05$) in maize samples (58.44 ± 0.27). By SEM, changes in granular structure were observed after hydrolyzing and storing (retrograding) starches of three specimens. A positive linear correlation was found

between DD and RS fava bean content, which was stronger when using 18 U/g of pullulanase ($r = 0.949$, $p = 0.001$). After treatments, fava bean DS and RS were significantly ($p < 0.05$) modified from $77.42 \pm 0.05\%$ and $22.67 \pm 0.29\%$ to $35.21 \pm 0.26\%$ and $64.88 \pm 0.02\%$, respectively. Kidney bean and maize starches showed similar trends. Fava bean samples *in vitro* digestibility showed significant differences in equilibrium concentration (C_{∞}) (92.66 ± 2.00 and 84.91 ± 0.92 , respectively) between native and resistant starches but hydrolysis index (HI) and glycemic index estimation (GI_e) showed no changes. The greatest differences in HI and GI_e between native and treated samples were observed in maize starches. Optimal conditions for fava bean RS preparation were pululanasa treatment with 18 U/g for 27 hours and 3 days storage at refrigeration temperature (2°C), resulting in RS content of $77.12 \pm 0.51\%$ in the optimum product.

Key words: fava bean, resistant starch, retrogradation, thermo-enzymatic treatment, pullulanase I.

1. INTRODUCCIÓN

Las leguminosas como el haba (*Vicia faba* L.) ocupan un lugar importante en las dietas de los países tercermundistas (Sandhu y Lim, 2008). En México, varias han sido las investigaciones científicas en torno al estudio del haba y la caracterización morfológica de las especies endémicas de la región, entre las cuales destaca la realizada por el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). Desde el punto de vista botánico y nutrimental, el haba presenta características similares a la familia de las leguminosas. Morfológicamente, el haba es un fruto dicotiledóneo y dehiscente constituido por una vaina que contiene de 4 a 5 semillas. Nutrimentalmente, el haba contiene alrededor del 20% de proteínas y presenta un perfil de aminoácidos esenciales mejor balanceado en comparación con los cereales, aunque se encuentra limitada en aminoácidos azufrados; sin embargo, presenta una menor biodisponibilidad de sus proteínas. Además, contiene en promedio el 50% de carbohidratos, siendo el principal componente de estos el almidón, con un 99%. El aporte de vitaminas hidrosolubles también es significativo sobre todo el de ácido fólico. Asimismo, en cuanto al aporte de micronutrientes destacan el zinc y el hierro. (Guillon y Champ, 2002; Rebello, Greenway y Finley, 2014)

El almidón, el principal componente del haba, se encuentra en forma de gránulos los cuales se caracterizan por tener un tamaño que oscila entre 1-100 μm . Dichos gránulos, poseen una geometría elíptica, ovalada o poligonal, y presentan buena capacidad de absorción de agua y estabilidad a la retrogradación. Una fracción del almidón presente en los alimentos, denominada almidón resistente (AR), ha recibido particular interés en los últimos años. Este tipo de almidón se caracteriza por ser indigerible para los humanos, es decir, no es hidrolizado por las enzimas digestivas, por lo que su bioaccesibilidad es baja o nula. Debido a esta característica, se le han atribuido ciertos efectos benéficos a la salud tales como atenuar la hiperglicemia en pacientes diabéticos, tener cierta incidencia en el metabolismo lipídico, mejorar la salud del epitelio intestinal debido a la fermentación del AR por la microbiota en el intestino grueso, además de incrementar la absorción de algunos minerales esenciales como el Zinc (Zn), Hierro (Fe) y Cobre (Cu) (Klosterbuer, Thomas y Slavin, 2012; Maki

et al., 2012). Por otro lado, al ser considerado parte de la fibra dietética (Guo et al., 2017), el AR también tiene acción prebiótica (promueve el crecimiento de las bifidobacterias presentes en el colon) (Nugent, 2005), con lo cual podría disminuir los síntomas de la enfermedad inflamatoria intestinal (Fabbri, Schacht y Crosby, 2016). Debido a estos efectos fisiológicos, la utilización de este componente como ingrediente funcional en la industria alimentaria ha llamado la atención de los investigadores (Miranda-Villa, Marrugo-Ligardo y Montero-Castillo, 2013).

El AR especialmente puede ofrecer ventajas a consumidores que presentan trastornos metabólicos como la diabetes mellitus (DM). Este estado patológico se caracteriza por mantener elevadas concentraciones de glucosa en el torrente sanguíneo por tiempos prolongados (Hussain, Claussen, Ramachandran y Williams, 2007). No obstante, debido a la compleja patogénesis de la enfermedad, los mecanismos específicos que la causan no han sido del todo esclarecidos (Hussain et al., 2007). A pesar de esto, los reportes científicos sugieren que las complicaciones de la diabetes pudieran producirse debido al desequilibrio entre la formación de radicales libres y la capacidad antioxidante endógena del organismo (Chun-Kuang, Shi-Hong, Wen-Chi y Hsing-Hsien, 2007; Cuerda et al., 2011). Por otro lado, aunque el número de fármacos disponibles para el tratamiento de la DM ha ido en aumento, el control de esta enfermedad a nivel poblacional no ha mejorado (Zhou, Wang, Ren, Wang y Blanchard, 2015). Puesto que los alimentos ricos en almidón son la principal fuente de energía en nuestra dieta, la producción de alimentos amiláceos más saludables que proporcionen efectos funcionales al consumidor parece ser una opción viable al tratamiento de la DM y otras enfermedades (Lilia-Baby, Suman, Krishnan e Indira, 2016). En este contexto, el diseño de estrategias alternativas a los fármacos actuales se ha vuelto de gran interés para organismos internacionales como la Organización Panamericana de salud (OPS), la Organización Mundial de la Salud (OMS) y algunas compañías farmacéuticas y alimentarias que buscan mejorar la calidad de vida de las personas con DM. Por ello, la investigación de las condiciones óptimas de preparación de AR a partir de haba y el estudio de sus propiedades físicas, químicas y nutrimentales puede contribuir al desarrollo de productos no farmacológicos con implicaciones terapéuticas en la diabetes y otras enfermedades metabólicas relacionadas.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Propiedades morfológicas y químicas del haba

2.1.1. Morfología

Vicia faba L. es una planta trepadora herbácea, anual, de tallos semi-erectos, que se cultiva en muchas partes del mundo y es consumida popularmente en Sudamérica. Debe su nombre a la familia de las fabáceas, de la cual es la especie tipo. Tiene porte recto y erguido, con tallos fuertes y angulosos de hasta 1.6 metros de altura. Muestra hojas alternas, paripinnadas y compuestas, con folíolos anchos de forma oval-redondeada, color verde oscuro y sin zarcillos (Duc, 1997; Giménez et al., 2013).

Su fruto es una legumbre, posee consistencia carnosa y una vaina alargada de longitud variable entre 10 y 30 cm; tiene un tabique esponjoso con una especie de pelo afelpado o falso tabique entre las semillas. Dentro de esta vaina se ubican las semillas puestas en fila. La vaina, de color verde en estado inmaduro, se oscurece y se vuelve pubescente al secarse. El número de granos en el interior de la misma varían entre 2 y 9 (figura 1). Las semillas son oblongas, de tamaño más o menos grande, dependiendo de la variedad, y de color verde amarillento, que luego, al sobremadurar, se vuelve bronceado. También hay variedades de grano negruzco y morado. El peso de una semilla es de uno a dos gramos. En *Vicia faba var. equina*, las semillas son de tamaño mediano y chatas, pesando entre 0,7 y 1,1 g. Las vainas por lo general son moderadamente dehiscentes.

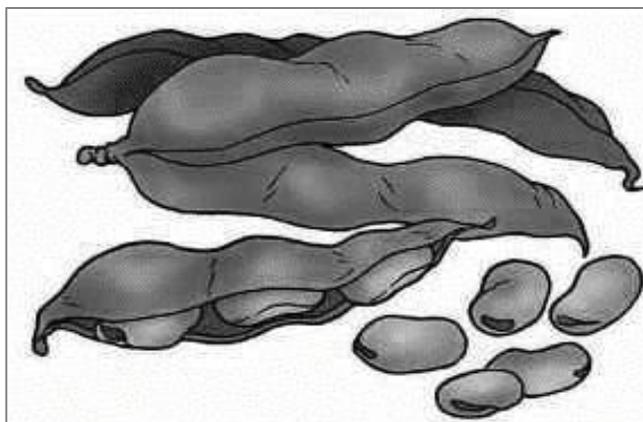


Figura 1. Vaina y semillas de *Vicia faba L.*

2.1.2. Composición química

Las leguminosas suscitan un gran interés desde el punto de vista nutricional debido a la presencia simultánea de proteína y almidón en proporciones adecuadas, así como por su riqueza en vitaminas y microelementos. Su composición química varía en función del método de cultivo, la localización geográfica y las condiciones de desarrollo. El par de cotiledones que forman a cada semilla posee más del 90% de las proteínas, carbohidratos, lípidos y minerales, mientras que la testa contiene la mayoría de la fibra (10%) y de los taninos (Goyoaga, 2005). La composición química del haba ha sido analizada tanto en la semilla completa como en cada una de sus partes constituyentes.

El haba presenta alrededor de un 25-30% de proteína bruta y las principales fracciones proteicas son las albuminas y globulinas. Las globulinas están constituidas por dos fracciones: legumina y vicilina; estas proteínas de reserva se encuentran dentro de los cuerpos proteicos en una proporción de aproximadamente un 60%. Otra fracción proteica de reserva son las albúminas (20%), que tienen un elevado número de aminoácidos azufrados, y en esta fracción se incluyen la mayoría de los enzimas de la semilla. En menor proporción se encuentran las glutelinas (15%), localizadas principalmente en la testa, y las prolaminas, que apenas representan un 5% (Goyoaga, 2005).

En el caso de los hidratos de carbono, su contenido puede variar de 50 a 60%, y en los granos inmaduros puede ubicarse en un rango del 4 al 12%, dependiendo de su grado de madurez y manejo del cultivo. En el grano seco, el principal tipo de carbohidrato presente es el almidón (55%), seguido por la xilosa (4.7%), la celulosa (5%) y los azúcares parcialmente solubles en etanol (monosacáridos como la glucosa y disacáridos). El haba tiene el 10% de sacarosa, 0.3% de rafinosa, 1.7% de estaquinosa, 2.5% de verbascosa y únicamente el 0.1% de ajugosa (López, 2011). La composición química promedio de las semillas de haba secas y crudas se describe más detalladamente en la tabla 1.

Tabla 1. Composición química de las semillas de haba crudas

Nutrientes^a	Contenido^b	Minerales	Contenido	Vitaminas	Contenido
Agua	10.98 g	Calcio	103 mg	C	1.4 mg
Energía	341 Kcal	Hierro	6.70 mg	Tiamina	0.555 mg
Proteína	26.12 g	Magnesio	192 mg	Riboflavina	0.333 mg
Lípidos	1.53 g	Fósforo	421 mg	Niacina	2.832 mg
Carbohidratos*	58.29 g	Potasio	1062 mg	B6	0.366 mg
Fibra total	25 g	Sodio	13 mg	Folato	423 µg
Azúcares	5.70 g	Zinc	3.14 mg	B12	0.00 µg
		Cobre	0.824 mg	Retinol	0 µg
		Manganeso	1.626 mg	β-Caroteno	32 µg
		Selenio	8.2 µg	A	53 UI
				E	0.05 mg
				D (D2+D3)	0.0 µg
				K	9.0 µg

Fuente: United States Department of Agriculture (USDA), 2016.

^a Los valores nutrimentales y los pesos corresponden a la porción comestible de semillas maduras de haba crudas.

^b Contenido promedio por cada 100 g.

*Obtenidos por diferencia.

2.2. Propiedades fisicoquímicas del almidón

2.2.1. Gránulos de almidón

El almidón se encuentra contenido en forma de gránulos al interior de la estructura morfológica de los granos incluyendo al haba, cuya forma, tamaño y composición química son característicos de cada especie. Es el principal polisacárido de almacenamiento de plantas y constituye una fuente de energía esencial para muchos organismos, especialmente el hombre (Miranda-Villa et al., 2013). El tamaño de los gránulos está comprendido entre 1 y 100 µm (Zia, Zia, Zuber, Kamal y Aslam, 2015). El tamaño de partícula y las características estructurales del gránulo en cada especie son factores que afectan las propiedades funcionales del almidón. Los gránulos de almidón extraídos de los granos presentan una apariencia blanquizca y son insolubles en agua fría. El gránulo de almidón está constituido físicamente por un material heterogéneo de láminas amorfas y cristalinas distribuidas de manera radial y alterna (figura 2). Mientras que las regiones cristalinas están constituidas primordialmente por amilopectina y dichas regiones se encuentran plegadas como dobles hélices, las moléculas de amilosa constituyen primordialmente las zonas o laminas amorfas. La cristalinidad presente en los gránulos es producida por el ordenamiento y ramificación

de las cadenas de amilopectina. Los gránulos de almidón céreo, es decir, los que no poseen amilosa, presentan un grado de cristalinidad parecido al de los almidones normales. La disposición radial y ordenada de las láminas que constituyen al almidón resulta evidente al producirse un fenómeno óptico denominado cruz de malta (o cruz de polarización), como resultado de la observación de los gránulos bajo un microscopio de luz polarizada colocando los polarizadores a 90° entre sí. El centro de la cruz que se forma corresponde al hilum, el centro de crecimiento del gránulo (Karkalas y Qi, 2004; Lindeboom, Chang y Tyler, 2004; Tester, Wang y White, 1994).

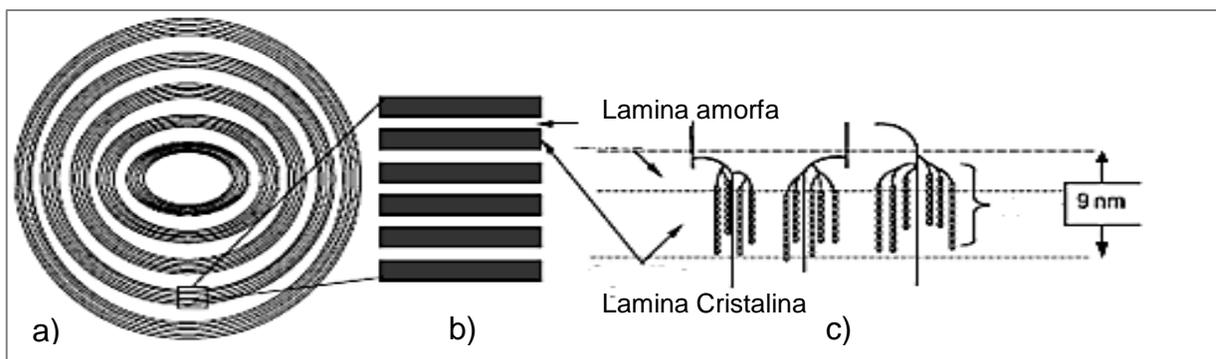


Figura 2. Diagrama de la estructura laminar del gránulo de almidón. a) Láminas concéntricas de anillos microcristalinos separadas por anillos amorfos; b) Esquema de las regiones amorfas y cristalinas; c) Estructuras de dobles hélices adyacentes formadas por cadenas de amilopectina que dan lugar a laminas cristalinas. Los puntos de ramificación constituyen las regiones amorfas. Fuente: Tester et al., 2004.

2.2.2. Composición química del almidón

El almidón está constituido por dos homopolímeros, amilosa y amilopectina (Ahmed y Urooj, 2008; Hoover, Hughes, Chung y Liu, 2010). Aunque dichos polímeros están formados por la unión de un solo monómero (glucosa), su organización estructural es diferente. La amilosa es un polímero predominantemente lineal, unido por enlaces α -1,4 (figura 3a), el cual se puede cuantificar mediante un reactivo stock de yodo. Esta técnica se basa en la capacidad que tiene la molécula de amilosa para atrapar en su interior al yodo, dando como resultado un color azul intenso que es cuantificable espectrofotométricamente (figura 4). La amilopectina, por su parte, es un polímero ramificado con uniones α -1,4 y α -1,6 (figura 3b) (Zhu, 2014). De estos dos componentes, el principal constituyente del almidón es la amilopectina, y el contenido

de estos dos polímeros en el gránulo depende, por supuesto, del origen botánico (Raigond, Ezekiel y Raigond, 2014; Sharma, Sing-Yadav y Rikita, 2008).

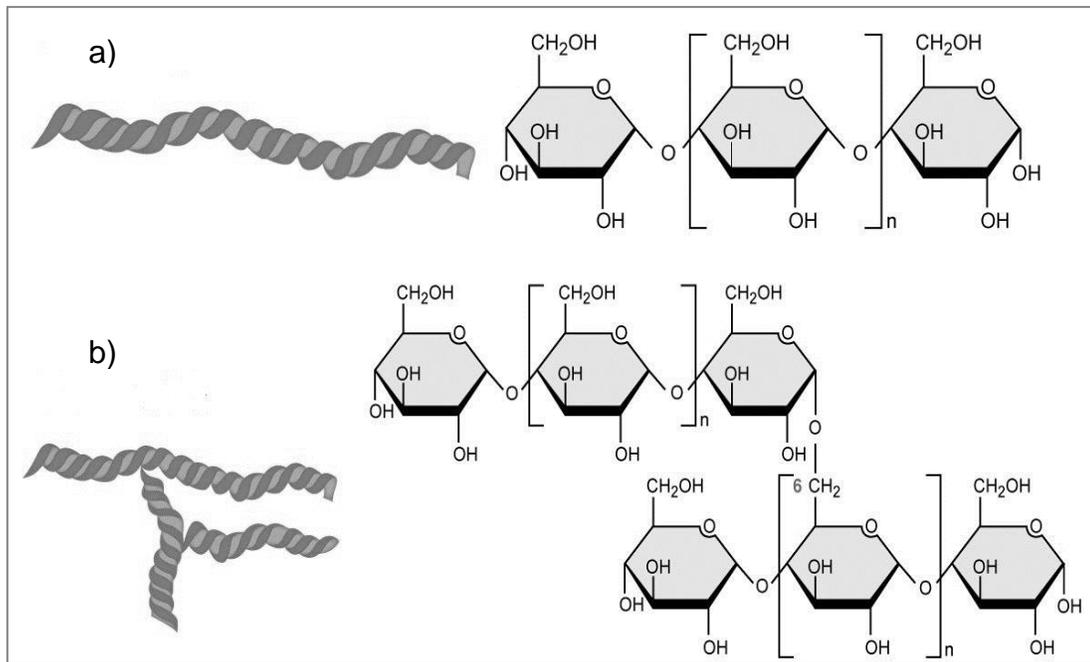


Figura 3. a) Molécula lineal de amilosa, unida por enlaces O-glucosídicos α -1,4; b) Molécula ramificada de amilopectina, unida por enlaces O-glucosídicos α -1,4 y α -1,6. Fuente: Zia et al., 2015.

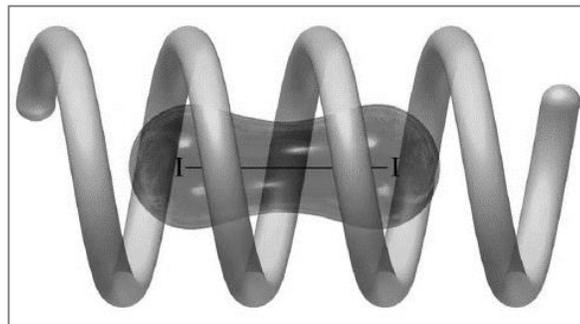


Figura 4. Captación de yodo por la molécula de amilosa. Fuente: Zemedelec 21, 2017.

2.2.3. Propiedades tecnofuncionales del almidón

Las propiedades tecnofuncionales del almidón están en parte condicionadas por las características físicas y estructurales del almidón. Estudios relacionados con las propiedades funcionales de almidones de fuentes alternativas muestran que los almidones presentan características tales como: claridad, capacidad de retención de

agua, viscosidad, gelatinización, retrogradación y estabilidad al congelamiento y deshielo; propiedades importantes para la industria alimentaria. La relación amilosa/amilopectina es un aspecto importante de considerar con respecto a la funcionalidad del almidón, ya que estos biopolímeros tienen la capacidad de modificar la textura y consistencia de los alimentos (Bello-Pérez y Paredes-López, 1996; Wang y White, 1994).

2.2.3.1. Gelatinización

Cuando se calientan en presencia de agua, los gránulos de almidón se hidratan, se hinchan y se transforman en una pasta. La estructura del gránulo colapsa debido a la fusión de cristales y a la ruptura de enlaces de hidrógeno. Estos cambios se denominan colectivamente gelatinización del almidón y se acompañan de la pérdida de birrefringencia característica de los gránulos intactos (figura 5) (Wang, Copeland, Niu y Wang, 2015).

2.2.3.2. Retrogradación

Cuando se calienta el almidón en presencia de agua y subsecuentemente se enfría, las cadenas de amilosa y amilopectina se pueden reasociar en una estructura ordenada diferente a la original, a este proceso se le conoce como retrogradación o recristalización. La retrogradación del almidón eventualmente se acompaña de una serie de cambios físicos como incremento de la viscosidad, formación de geles, exudación de agua etc. Esta retrogradación no se ve favorecida cuando las cadenas de los polisacáridos que conforman al gránulo de almidón son demasiado largas o demasiado cortas. La retrogradación es un proceso continuo, que inicialmente implica una recristalización rápida de moléculas de amilosa seguido por una lenta recristalización de moléculas de amilopectina. La retrogradación de la amilosa determina la dureza inicial de un gel de almidón y la viscosidad y digestibilidad de los alimentos procesados. El desarrollo a largo plazo de la estructura del gel y la cristalinidad del almidón procesado, que están implicados en el endurecimiento del pan y los pasteles, se atribuyen a la retrogradación de la amilopectina. En la retrogradación, el almidón recupera la estructura ordenada que perdió al gelatinizarse, pero esta nueva

estructura reordenada es más resistente a la digestión enzimática (Eerlingen, Jacobs y Delcour, 1994). Para propósitos industriales, la retrogradación del almidón se ha investigado ampliamente (Wang et al., 2015). En la figura 5 se observa una representación esquemática de los cambios que ocurren en el almidón cuando es calentado, enfriado y almacenado.

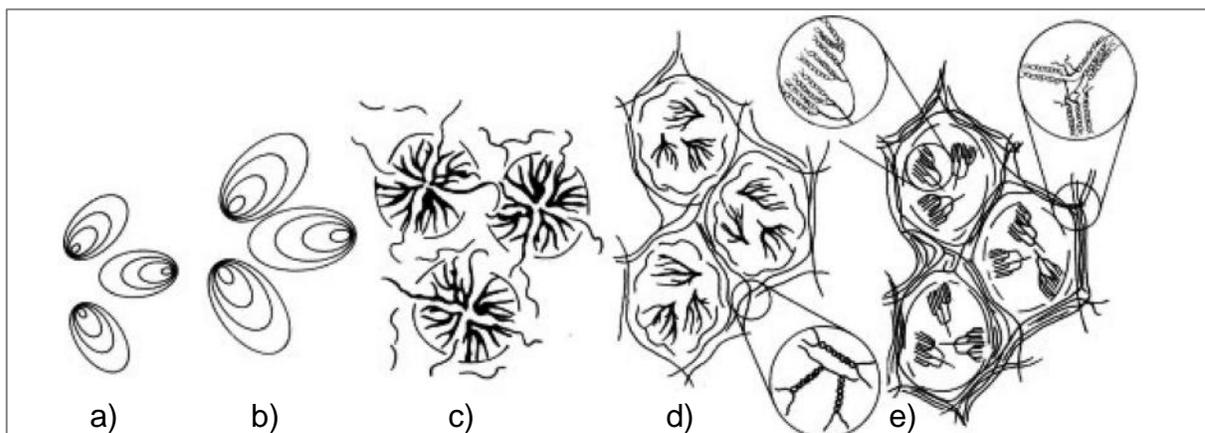


Figura 5. Representación esquemática de los cambios que ocurren en una suspensión de almidón durante el calentamiento, enfriado y almacenamiento. a) Gránulos de almidón nativo; b) Gelatinización, asociada con el hinchamiento; c) Lixiviación de la amilosa y ruptura parcial de los gránulos durante la gelatinización, dando como resultado la formación de una pasta de almidón; d) Formación de una red de amilosa (gelificación/retrogradación de la amilosa) durante el enfriamiento de la pasta de almidón; e) Formación de moléculas ordenadas o cristalinas de amilopectina (retrogradación de la amilopectina) durante el almacenamiento. Fuente Wang et al., 2015.

2.3. Propiedades nutrimentales de los almidones de leguminosas

Las leguminosas se caracterizan por ser fuente de almidones de baja digestibilidad, los cuales proveen diversos efectos fisiológicos benéficos. Debido a su baja digestibilidad en comparación con la de los cereales, las leguminosas promueven bajas y moderadas respuestas glucémicas e insulinémicas (Sandhu y Lim, 2008).

2.3.1. Factores que modifican su biodisponibilidad

2.3.1.1. Factores intrínsecos (propios de la estructura del alimento)

Son las características físicas propias del alimento que influyen en el nivel de asimilación del almidón en el intestino delgado (Bello-Pérez y Paredes-López, 2009; Dona, Pages, Gilbert y Kuchel, 2010). El distinto grado de empaquetamiento que tiene

el almidón en cada alimento ocasiona cambios estructurales que modifican su digestión. Estos cambios son consecuencia de los procesos a los cuales el alimento es sometido para su elaboración. Por ejemplo, existen diferencias al consumir cereales o leguminosas molidos y enteros. La trituración y molienda de los granos al ser procesados determinan la bioaccesibilidad que las enzimas tendrán para hidrolizar el almidón contenido en el alimento.

2.3.1.2. Factores extrínsecos (externos al alimento)

Son aquellos factores que no tienen que ver con la estructura del alimento natural o procesado. La masticación, por ejemplo, modifica la bioaccesibilidad física de las enzimas hacia el almidón contenido dentro de las estructuras rígidas del alimento, además, la concentración de enzimas digestivas como la α -amilasa del consumidor, determina la extensión de la hidrólisis (Englyst, Veenstra y Hudson, 1996). La cantidad de almidón consumido y la presencia de ciertos estados patológicos, entre otras cosas, son ejemplos de factores extrínsecos que favorecen o limitan la digestibilidad del almidón (Englyst, Kingman y Cummings, 1992; Tharanathan y Mahadevamma, 2003).

2.4. Clasificación del almidón con base en su digestibilidad

La clasificación propuesta de los carbohidratos en la dieta, que se creó con base en estudios en seres humanos, caracteriza los carbohidratos con respecto tanto a la composición química como al sitio, tasa y extensión de la digestión (Englyst, Englyst, Hudson, Cole y Cummings, 1999).

2.4.1. Almidón de rápida digestibilidad (ARD)

La digestión y absorción de esta fracción en el intestino delgado es completa y en poco tiempo, y se tienen como ejemplos a los alimentos amiláceos como las harinas de maíz o arroz para la preparación de atoles, harinas de trigo para preparar pan, frituras, etc. Esto se debe al alto grado de refinación de los granos, los cuales tienen como característica que su almidón es fácilmente hidrolizable por las enzimas (Suarez-Diéguez, Palma-Orozco y Nájera-Peña, 2009).

2.4.2. Almidón de baja digestibilidad (ABD)

El almidón de baja digestibilidad (ABD), como una fracción de almidón intermedia entre el ARD y el AR, se digiere lentamente a través de todo el intestino delgado para proporcionar una liberación sostenida de glucosa, con una glucemia inicial baja y posteriormente una liberación lenta y prolongada (Zhang y Hamaker, 2009). Esto sucede al consumir granos enteros como las leguminosas (Suarez-Diéguez, Palma-Orozco et al., 2009).

2.4.3. Almidón Resistente (AR)

Durante la elaboración y el procesamiento de los alimentos se forma una fracción del almidón cuya hidrólisis por las enzimas digestivas es inhibida. A esta fracción de almidón que escapa de la hidrólisis en los procesos digestivos se le conoce como almidón resistente (AR) (Shin, Byun, Park y Moon, 2004). Esta parte del almidón no es hidrolizada a glucosa dentro de un tiempo máximo de 120 minutos a partir de que se consume el alimento. Al no ser digerido en el intestino delgado, el AR pasa al intestino grueso en el cual es fermentado por los microorganismos del colon, o, en su defecto, puede ser eliminado en las heces sin ser asimilado. (Birt et al., 2013; Nugent, 2005; Sajilata, Singhal y Kulkarni, 2006). El almidón resistente es definido por European Research Project on Resistant Starch (EURESTA) como: la suma de almidón y los productos de almidón degradados que no pueden ser absorbidos en el intestino delgado por individuos sanos (García-Alonso, Goñi y Saura-Calixto, 1998; Nugent, 2005; Sajilata et al., 2006; Tovar, Melito, Herrera, Rascón y Pérez, 2002). El AR posee propiedades funcionales y nutricionales en común con la fibra dietética (Sandhu y Lim, 2008) y dependiendo de su naturaleza, se ha clasificado en cinco subtipos, a saber, AR I, AR II, AR III, AR IV y AR V. La clasificación anterior del AR incluía los tipos AR I, AR II y AR III, mientras que los tipos AR IV y AR V se incluyeron en los años subsiguientes (Raigond et al., 2014). La formación de AR específicamente de tipo III se debe a la reestructuración de la amilosa y la amilopectina, con una tendencia a formar un material compacto semicristalino, producto primordialmente de la retrogradación de estos dos polímeros, y cuyo peso molecular aproximado es de 1.2

X 10⁵ Da (Fuentes-Zaragoza, Riquelme-Navarrete, Sánchez-Zapata y Pérez-Álvarez, 2010). Ejemplos de alimentos con AR son aquellos en los que el almidón se encuentra protegido por las estructuras celulares del propio alimento y las enzimas digestivas se ven limitadas en su acción, como es el caso de las semillas para botana, o los alimentos que por su procesamiento son sometidos a calor seco, como la tortilla y el pan. En la tabla 2 se resumen las características de los distintos tipos de AR que hasta la actualidad se han identificado (Birt et al., 2013; Nugent, 2005).

Tabla 2. Clasificación del almidón resistente (AR)

Tipo de almidón resistente	Fuente	Digestibilidad
AR I. Almidón físicamente inaccesible, encapsulado dentro de las estructuras morfológicas de los granos	Granos enteros y/o parcialmente molidos	Grado y velocidad de asimilación pobre
AR II. Gránulos de almidón nativo altamente cristalinos	Papa cruda y plátano, leguminosas en botana	Baja digestibilidad
AR III. Almidón retrogradado/cristalizado	Pan y tortilla tostada	Lentamente digerible
AR IV. Almidón modificado por procesos químicos	Ingrediente para productos alimenticios	Parcialmente digerible
AR V. Complejos amilosa-lípido	Papas fritas	Resistente a la digestión

Fuente: Birt, et al., 2013; Raigond et al., 2014.

La formación de almidón resistente (AR) ocurre rápidamente en alimentos que contienen almidón rico en amilosa, debido a que las cadenas largas de α -glucano son necesarias para formar las estructuras cristalinas. Por otro lado, la retrogradación y la formación de almidón resistente pueden ocurrir en almidones cerosos cuando son sometidos a procesos de calentamiento y enfriado. Los cambios que ocurren en la estructura de los almidones durante estos ciclos de temperatura se han estudiado por su influencia sobre las propiedades funcionales en los alimentos (Haralampu, 2000; Perera, Meda y Tyler, 2010; Sievert y Pomeranz, 1989).

2.5. Procesos de obtención de AR

Por su importancia como ingrediente desde el punto de vista nutricional y por los beneficios a la salud que puede generar, distintos investigadores, así como los profesionales de la industria, han desarrollado estrategias que permitan la preparación u obtención de materiales ricos en AR, las cuales, a su vez, puedan ser empleadas en la producción de alimentos. Se han aislado almidones resistentes tipo II a partir de fuentes naturales como el plátano verde, pero son sensibles a los diferentes procesos durante la elaboración de productos. La estrategia que en los últimos años se ha empleado para la producción de AR, se basa en el fenómeno de retrogradación del almidón nativo (AN), proceso que se ha correlacionado con la obtención de mayores contenidos de fracciones indigeribles (AR III). Sin embargo, la cantidad de AR obtenido depende de la fuente biológica, por lo que esta variable debe ser considerada para la producción de este material (Perera et al., 2010; Shin, Byun et al., 2004; Tovar et al., 2002; Zhang, y Jin, 2011a). Productos como Novelose® (AR II) (Raigond et al., 2013), fabricado por la empresa estadounidense National Starch, y Crystalean® (AR III) (Guraya, James y Champagne, 2001), manufacturado por la empresa Opta Food Ingredients, son ejemplos de materiales resistentes a la hidrólisis disponibles comercialmente.

En general, en los procesos de preparación de AR III se aplican tratamientos térmicos y almacenamiento bajo condiciones específicas. En otros, se recurre a la desramificación enzimática previa de la amilopectina del almidón, con lo cual presentan mayor tendencia a la retrogradación y la obtención de AR aumenta (Bello-Pérez y Paredes-López, 2009). Sin embargo, se debe controlar el grado de desramificación para obtener un producto final con el mayor rendimiento posible, ya que se ha reportado que el grado de polimerización de las cadenas obtenidas por desramificación de los polímeros influye en las características estructurales y contenido del producto (Homayouni et al., 2014; Raigond et al., 2014). El nivel de desramificación enzimática se puede evaluar con base en un método enzimático-colorimétrico, que mide la cantidad de oligosacáridos (azúcares reductores) liberados por acción de las enzimas desramificantes (como la pululanasa y la isoamilasa) (Hii,

Tan, Ling y Ariff, 2012), mediante una reacción con el ácido 3, 5 dinitrosalicílico (DNS) (figura 6).

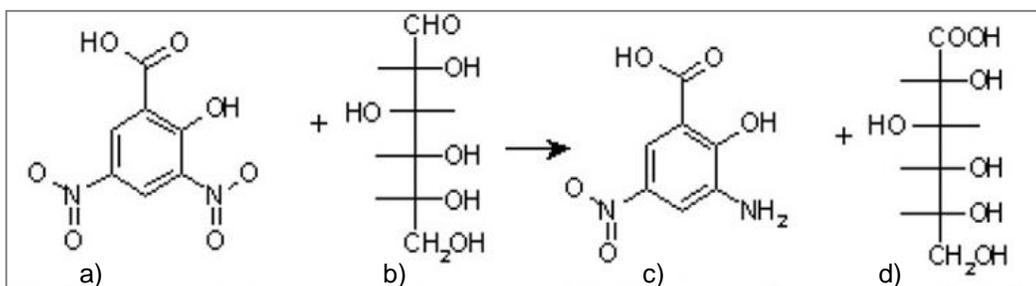


Figura 6. Reducción del ácido 3, 5-dinitrosalicílico por un azúcar reductor a ácido-3-amino-5-salicílico.
a) Ácido 3-5 dinitrosalicílico; b) D-glucosa; c) Ácido 3-amino-5-salicílico; d) Ácido D-glucónico.

Otras alternativas que recientemente se han explorado en la producción de almidón resistente son las modificaciones químicas, que consisten en hacer reaccionar los grupos funcionales del almidón nativo (AN) en un medio acuoso con reactivos químicos bajo condiciones controladas de agitación, temperatura y pH. Los tratamientos químicos permitidos para la producción de almidones químicamente modificados para uso alimenticio incluyen la esterificación, eterificación, modificación ácida, oxidación y entrecruzamiento. Las diferentes modificaciones químicas del almidón se utilizan para producir almidones resistentes tipo IV con aplicaciones específicas dentro de la industria alimentaria (Perera, et al., 2010; Raigond, et al., 2014; Tharanathan, 2005; Zhu, 2014).

2.6. Determinación del contenido de AR y otras fracciones del almidón en los alimentos

La caracterización nutrimental del AR comprende ensayos enzimáticos que hidrolizan una muestra del alimento en condiciones controladas *in vitro*, y simulan los procesos digestivos fisiológicos *in vivo*. Estos métodos permiten determinar las distintas fracciones nutrimentales del almidón que se encuentran en los alimentos tal y como se consumen. El procedimiento en estos ensayos se inicia con la acción de la pancreatina (pepsina, amilasa, amiloglucosidasa e invertasa) que hidroliza todo el material proteico que el almidón tenga adherido para facilitar la acción hidrolítica de las enzimas

digestivas hasta que ocurra la hidrólisis completa del almidón en la muestra, liberando la glucosa contenida. La glucosa se cuantifica espectrofotométricamente por medio de un método enzimático-colorimétrico utilizando el reactivo glucosa oxidasa-peroxidasa (GOD-POD), que funciona bajo el siguiente principio: la glucosa se oxida a ácido glucónico y peróxido de hidrógeno por acción de la enzima glucosa oxidasa. El peróxido de hidrógeno a su vez reacciona con la O-dianisidina en presencia de la enzima peroxidasa para formar un producto coloreado. La O-dianisidina oxidada reacciona con el ácido sulfúrico para formar un producto coloreado más estable. La intensidad del color rosa medida a 540 nm es proporcional a la concentración original de glucosa. De esta manera se pueden determinar las diferentes fracciones nutrimentales que presenta el almidón de la muestra a evaluar (almidón de rápida digestibilidad, almidón de baja digestibilidad, almidón resistente, almidón total, glucosa rápidamente disponible, glucosa de lenta disponibilidad y glucosa total) (Englyst et al., 1999).

2.7. Efectos benéficos del AR

En los últimos años, el AR ha recibido atención por sus efectos fisiológicos benéficos (Lehmann, Rössler, Schmiedl y Jacobasch, 2003). Estudios recientes muestran que una dieta rica en AR puede tener repercusiones importantes en la salud humana, algunas de las cuales se resumen en la tabla 3. Sus propiedades funcionales (beneficios a la salud) pueden variar dependiendo del diseño y tipo de estudio, de la fuente botánica y del tipo y dosis de AR consumido (Fuentes-Zaragoza et al., 2010; Nugent, 2005). Dentro de los efectos fisiológicos más sobresalientes se encuentran la prevención contra la aterosclerosis, el mantenimiento de los niveles de glucosa postprandial en sangre (Kim, Chung, Kang, Kim y Park, 2003), el aumento de saciedad en el consumidor, por lo que esta fracción del almidón es una alternativa más para el tratamiento nutricional en pacientes obesos; además, la fermentación del almidón resistente por la microbiota en el intestino grueso produce ácidos grasos de cadena corta como el ácido propiónico y el butírico que han mostrado poseer acciones benéficas en la protección del epitelio intestinal contra el cáncer colorrectal (Birt et al.,

2013; Keenan et al., 2015; Nugent, 2005; Suarez-Diéguez, Palma-Orozco, Güemes-Vera y Mendoza-Pérez, 2009; Zhang y Hamaker, 2009).

Tabla 3. Efectos fisiológicos del consumo de almidón resistente (AR)

Efecto	Descripción	Útil en
Disminuye la glucemia	La escasa o nula digestibilidad limita la absorción de glucosa en sangre	Diabetes, respuesta a la insulina, síndrome metabólico
Mejora la salud intestinal	Ayuda a revertir los cambios neoplásicos sobre el epitelio del colon, al disminuir compuestos tóxicos por la producción de ácidos orgánicos (butírico, propiónico y acético) como producto de la fermentación del almidón resistente	Cáncer colorrectal, colitis ulcerativa, inflamación del intestino, diverticulosis, constipación
Mejora el perfil de lípidos	Se ha reportado que puede disminuir la concentración de colesterol y triglicéridos en sangre	Desorden cardiovascular, metabolismo de lípidos, síndrome metabólico
Aumenta la saciedad y reduce el consumo de energía	Al no ser metabolizado, su aporte energético es bajo o nulo	Obesidad, Diabetes
Incrementa la absorción de micronutrientes	Mejora y/o induce la absorción intestinal de minerales como hierro y calcio	Osteoporosis
Prebiótico	Favorece el crecimiento de microorganismos probióticos (bifidobacterias)	Patologías del colon
Componente de fibra dietaria	Disminuye la atrofia del epitelio del colon, contribuye a la reducción de los lípidos en sangre	Ciertos problemas intestinales

Fuente: Fuentes-Zaragoza et al., 2010; Nugent, 2005; Suarez-Diéguez, Palma-Orozco et al., 2009.

El AR también tiene un comportamiento fisiológico favorable en pacientes con trastornos de intolerancia a la glucosa o resistencia a la insulina. En individuos sanos, la insulina es una hormona que permite la captación de glucosa por las células, con lo cual se reducen los niveles de glucosa en sangre, además, puede inhibir la utilización de glucosa corporal almacenada, y, en combinación con otras señales fisiológicas, es

capaz de modular los mecanismos de apetito y saciedad. La poca glucosa liberada a partir del AR permitiría la utilización de la grasa almacenada como energía y potencialmente, atenuaría las señales de hambre. Esta respuesta fisiológica es de utilidad en el tratamiento de las condiciones clínicas de la diabetes al mejorar la tolerancia a la glucosa. Por último, su utilización es posible en el tratamiento de la obesidad y el control de peso debido a su intervención en el ciclo hambre-saciedad (Nugent, 2005).

2.8. Investigación científica en torno al AR

El estudio de los almidones resistentes a lo largo del tiempo se ha centrado en sus métodos de aislamiento o preparación, y en la evaluación de sus propiedades funcionales a partir de distintas fuentes. Algunos autores, por ejemplo, han investigado los efectos de la temperatura de gelatinización y el enfriado en la formación de AR a partir de arroz (Lilia-Baby et al., 2016). Surendra y Parimalavalli (2016) evaluaron el efecto de la desramificación con pululanasa y la temperatura de almacenamiento sobre la digestibilidad del almidón de papa. Algunos años atrás, Zhang y Jin (2011a) prepararon productos ricos en AR a partir de maíz mediante un método enzimático y evaluaron sus propiedades. Estudios como los anteriores, basados en la producción y caracterización del sustrato (AR), han dado pie a las investigaciones en seres humanos, en las cuales se ha informado que el consumo de productos con alto contenido de AR dio lugar a concentraciones postprandiales de glucosa y respuestas insulinémicas concomitantes más bajas comparadas con las obtenidas al consumir alimentos con almidones ordinarios (Birt et al., 2013). Los modelos animales también han demostrado efectos positivos del almidón resistente de fuentes como el plátano, como un mayor control glucémico en ratas con diabetes tipo 2 y efectos positivos en la hiperlipidemia (Reddy, Suriya, Vidya y Haripriya, 2017). Sin embargo, existe poca información sobre el AR de leguminosas y ninguna acerca de la preparación y las propiedades del AR tipo III de haba que sirva como base para la evaluación de sus beneficios en ensayos clínicos.

3. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

Los estudios del almidón resistente sobre los procesos de la enfermedad, incluyendo el cáncer de colon, la diabetes y la obesidad, son prometedores y se han desarrollado hipótesis interesantes acerca de sus beneficios. Estudios previos han evaluado los efectos del suministro de alimentos ricos en AR en pacientes con enfermedades crónicas y los resultados observados han sido diversos. También se han realizado algunas investigaciones en torno a la preparación/obtención y propiedades de distintos almidones resistentes a la hidrólisis de tipo I, II, e incluso de tipo III a partir de fuentes no convencionales como el plátano y la papa, y de cereales como el maíz. No obstante, teniendo en cuenta la enorme diversidad de almidones resistentes a la digestión, es pertinente señalar que muy pocos de estos almidones han sido investigados en relación con sus efectos *in vitro*, en animales o seres humanos.

Algunas fuentes de carbohidratos como el haba no han sido objeto frecuente de estudio científico hasta ahora, por lo cual no se ha desarrollado conocimiento en torno a sus propiedades y su potencial uso en la preparación de almidones resistentes a partir de ella, volviendo necesario el estudio de su preparación y su caracterización *in vitro* como base para la evaluación de sus propiedades en modelos animales y humanos que contribuya a la creación de productos alimenticios ricos en AR que ofrezcan beneficios a la salud de la población, principalmente a aquella que padece enfermedades crónicas relacionadas con el metabolismo de los carbohidratos. Con base en este planteamiento, se han formulado las siguientes preguntas de investigación: ¿Cuáles son las condiciones óptimas para la preparación de almidón resistente tipo III a partir de almidón nativo de *Vicia faba* L.? y ¿Cuáles son las propiedades fisicoquímicas y nutrimentales de ese material?

4. JUSTIFICACIÓN

Aunque las leguminosas ocupan un lugar importante en la dieta habitual de los países tercermundistas, la atención hacia este grupo de alimentos en materia de investigación ha sido escasa; sin embargo, debido a sus características nutricionales y físicas naturales, podrían ser una opción viable para la preparación de almidones indigeribles con futuras aplicaciones en la elaboración de productos comestibles saludables. No obstante, la poca información acerca de las propiedades de los almidones de leguminosas, específicamente del haba, hace necesario, entre otras cosas, el estudio de sus propiedades fisicoquímicas y nutrimentales, así como la determinación de las condiciones óptimas de preparación de AR III a partir de ella. Por ello, con la presente investigación se pretende otorgar base científica para la preparación de almidones indigeribles a partir de haba y generar conocimiento en torno a sus propiedades, con la finalidad de ampliar el panorama acerca de los usos potenciales de los almidones resistentes en el cuidado de la salud y promover su utilización en la preparación de productos terapéuticos diferentes a los fármacos, que prevengan, controlen o coadyuven al tratamiento de enfermedades metabólicas como la diabetes y mejoren la calidad de vida en las personas.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

- Establecer las condiciones óptimas de preparación de almidón resistente tipo III a partir de *Vicia faba* L. mediante la aplicación de tratamientos térmico-enzimáticos a fin de evaluar sus propiedades fisicoquímicas y nutrimentales.

5.2. Objetivos específicos

- Determinar las condiciones óptimas de producción de AR a partir de *Vicia faba* L. mediante tratamiento enzimático con pululanasa I y almacenamiento.
- Comparar la cantidad de AR y las propiedades del almidón de haba con AR de frijol y maíz preparado con las condiciones óptimas del haba.
- Determinar las propiedades fisicoquímicas de los almidones nativos y tratados mediante la evaluación de su morfología, composición química y grado de desramificación.
- Determinar las propiedades nutrimentales de las muestras nativas y tratadas mediante la valoración de su contenido de almidón digerible, almidón resistente y almidón total, así como su digestibilidad *in vitro*.

6. HIPÓTESIS

Las condiciones óptimas de preparación de AR tipo III a partir de *Vicia faba* L. corresponden a concentraciones enzimáticas elevadas y tiempos de desramificación y almacenamiento prolongados, esto modifica sus propiedades fisicoquímicas y nutrimentales, disminuyendo su digestibilidad *in vitro*.

7. DISEÑO METODOLÓGICO

7.1. Desarrollo Experimental

El haba que se estudió fue una variedad criolla que se cultiva en una zona geográfica denominada Eje Volcánico Transmexicano del centro de la República Mexicana. La extracción del almidón nativo (AN) se realizó por molienda húmeda de acuerdo con lo reportado por Suarez-Diéguéz, Soriano-García, Anaya-Sosa y Cruz y Victoria (2009). Posteriormente se evaluó la composición química del almidón nativo (AN) conforme a la Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 2005), y el contenido de amilosa por la técnica reportada por Hoover y Ratnayake (2002). Para la preparación de AR III a partir del AN de haba se emplearon tratamientos térmicos y enzimáticos con pululanasa tipo I (EC 3.2.1.41), que hidroliza enlaces glucosídicos α -1,6 de polisacáridos ramificados (Hii et al., 2012), con base en los métodos reportados por Morales-Medina, Muñío, Guadix y Guadix (2014), Suarez-Diéguéz, Palma-Orozco, Güemes-Vera et al. (2009); Zhang y Jin (2011b) y Zhou, Meng, Chen, Zhu y Yuan (2014). El estudio de la morfología del almidón se realizó mediante microscopía electrónica de barrido (MEB) de acuerdo con Singh, Kaur, Sandhu y Guraya (2004). El grado de desramificación del almidón se determinó por el método descrito por Shin Choi et al. (2004). Por último, para la evaluación de las propiedades nutrimentales de los almidones nativos y retrogradados, se evaluó el contenido de almidón resistente (AR) y almidón total (AT) con base en las técnicas de Englyst et al. (1992) y Goñi, García-Diz, Mañas y Saura-Calixto (1996); mientras que el contenido de almidón digerible (AD) se obtuvo por diferencia. La digestibilidad *in vitro* se evaluó con las técnicas de Goñi, García-Alonso y Sauro-Calixto (1997) y Granfeldt, Björck, Drews y Tovar (1992), e incluyó la determinación del porcentaje de hidrólisis (PH), el cálculo del área bajo la curva de hidrólisis (ABC), el índice de hidrólisis (IH) y la estimación del índice glucémico (IG_e). En la figura 7 se muestra el diagrama metodológico.

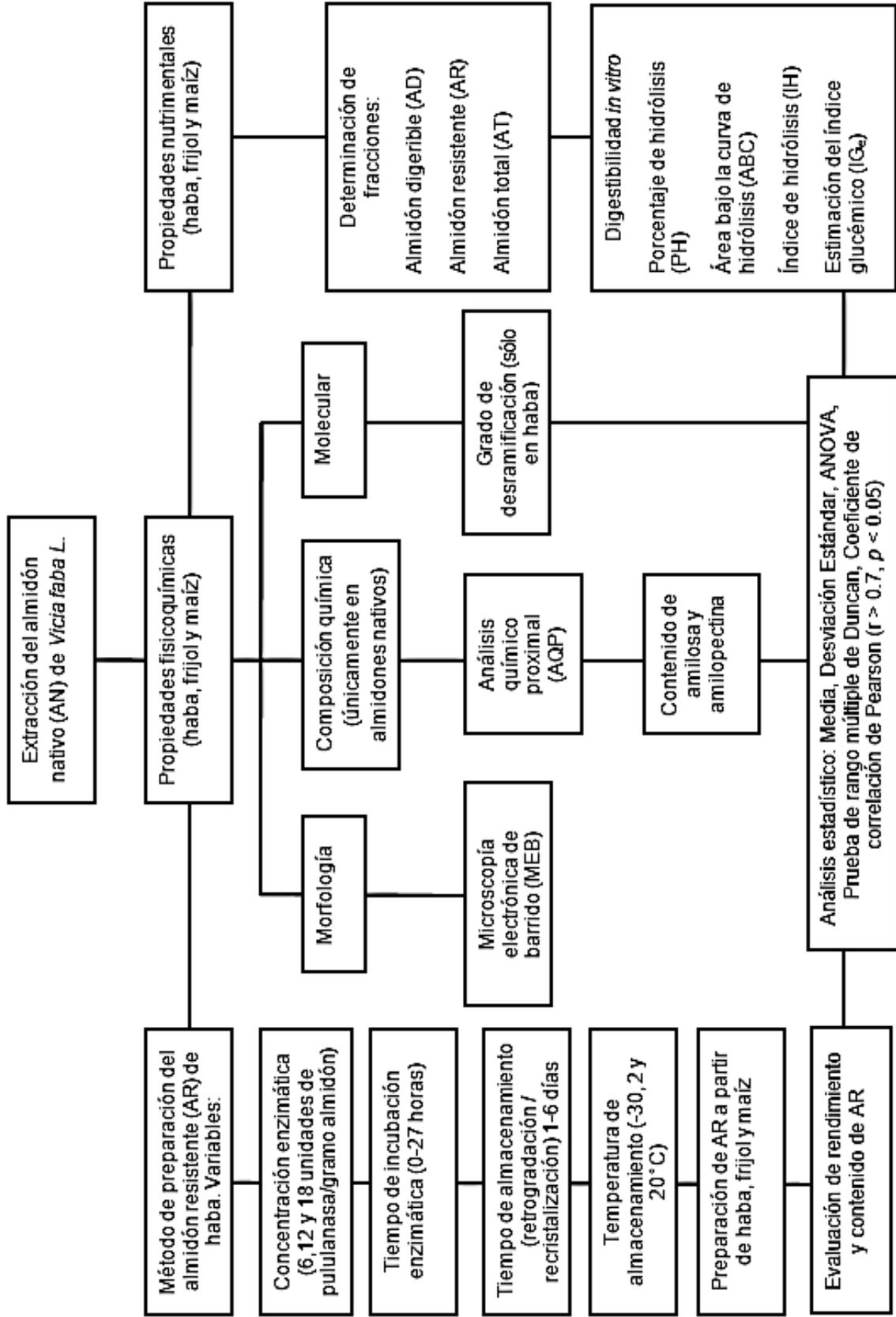


Figura 7. Diagrama metodológico

7.2. Métodos

7.2.1. Extracción y aislamiento del almidón nativo (AN)

El almidón se aisló del haba mediante el método reportado por Suarez-Diéguez, Soriano-García et al. (2009). Aproximadamente 1.5 kg de haba, libres de impurezas, se remojaron en una solución de metabisulfito de sodio al 0.1%, con una relación 1:3 peso/volumen (P/V) por 16 h a temperatura ambiente. La extracción se realizó por molienda húmeda a través del principio de lixiviación con lienzos de nailon. El extracto se almacenó en refrigeración por una noche y al día siguiente se lavó el sedimento con una solución de hidróxido de sodio al 0.5% hasta obtener un material limpio. El residuo (AN), se secó en horno convencional a una temperatura de 40°C por 24 h.

7.2.2. Preparación de AR por tratamiento térmico-enzimático

Los tratamientos se diseñaron de acuerdo con las metodologías reportadas por Morales-Medina et al. (2014), Zhang y Jin (2011b) y Zhou et al. (2014). Primeramente, se realizó un perfil de solubilidad del AN en proporciones (P/V) del 1-12%. Después, se prepararon suspensiones de AN al 10%, solubilizadas en buffer de acetato de sodio al 0.1 M y reajustadas a pH 5.0 con ácido acético concentrado. Se llevó a cabo la gelatinización de las muestras a 95°C durante 15 minutos con agitación moderada en parrilla convencional. Las muestras se temperaron a 46°C en baño María y se sometieron a los siguientes tratamientos: hidrólisis enzimática con pululanasa microbiana I (EC 3.2.1.41), que escinde enlaces O-glucosídicos α -1,6, con una relación enzima-sustrato de 6, 12 y 18 unidades enzimáticas por gramo de almidón (U/g), durante 0, 3, 6, 9, 12, 24 y 27 horas (h), con agitación (aprox. 1000 rpm). Al término de la incubación se inactivó la enzima sometiendo las muestras a ebullición durante 15 minutos para posteriormente ser almacenadas durante 3 días a 2°C. Para evaluar el efecto del tiempo de almacenamiento en el contenido de AR se desramificaron muestras con 12 U/g de enzima durante 12 horas y se almacenaron a 2°C durante 1-6 días. El efecto de la temperatura de almacenamiento en el contenido de AR se evaluó en muestras desramificadas durante 12 h con 12 U/g de pululanasa y almacenadas a temperatura ambiente, de refrigeración y congelación (20, 2 y -35°C respectivamente),

durante 3 días. Finalmente se centrifugaron las muestras a 10,000 rpm durante 15 minutos a 4°C y fueron secadas en horno convencional a 35°C durante 36 horas. Se seleccionaron las condiciones óptimas de cada variable evaluada y se realizó la preparación de AR a partir de haba, maíz y frijol con fines comparativos. Las muestras se almacenaron en bolsas herméticas para su posterior valoración de rendimiento (peso inicial/peso final x 100) y cuantificación de AR.

7.2.3. Propiedades fisicoquímicas del almidón

7.2.3.1. Morfología

La morfología del almidón nativo (AN) y el AR se evaluó mediante microscopía electrónica de barrido (MEB). Las muestras de almidón se pulverizaron y espolvorearon sobre una cinta conductora de oro de doble adhesión fijada en un soporte de aluminio al microscopio. Las condiciones para la observación de las muestras fueron: 5 y 10 KV y 30 mA (Shin, Choi et al., 2004; Singh et al., 2004).

7.2.3.2. Propiedades químicas

Para la caracterización química de los almidones nativos se realizó un análisis químico proximal (AQP), de acuerdo con las técnicas reportadas por la Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 2005), que incluyó las siguientes valoraciones: humedad (925,09); proteínas (920,87); lípidos totales (920,85); fibra total, (991,43) y minerales como cenizas (923,03); los carbohidratos se estimaron por diferencia como extracto libre de nitrógeno (ELN). El contenido de amilosa se determinó por el método reportado por Hoover y Ratnayake (2002), cuyo principio es la formación de un complejo amilosa-yodo de color azul. La intensidad del color azul resultante, medido por espectrofotometría UV-visible a una longitud de onda aproximada de 620 nm, es proporcional a la cantidad de amilosa contenida en el almidón. La cuantificación de amilosa aparente se calculó por interpolación en una curva estándar de amilosa de papa (Sigma, A0512), y el contenido de amilopectina se estimó por diferencia al 100% del contenido de amilosa en el almidón.

7.2.3.3. Propiedades moleculares

Para la valoración molecular se realizó la determinación del grado de desramificación de la amilopectina mediante el método enzimático-colorimétrico descrito por Shin, Choi et al. (2004) con modificaciones menores, utilizando el ácido 3, 5 dinitrosalicílico (DNS). Brevemente, se solubilizó y gelatinizó una muestra al 1% (P/V); se tomaron alícuotas de 0.5 mL a las 0, 3, 6, 9, 12, 24 y 27 horas y se depositaron en tubos de ensayo. Inmediatamente después, se agregaron 2 mL de solución DNS. Se realizó un revelado térmico que consistió en someter las muestras a ebullición primero, y en hielo después. La absorbancia en el espectrofotómetro se leyó a 540 nm. Se empleó una curva patrón de maltosa como estándar para cuantificar el contenido de azúcares reductores liberados y el grado de desramificación se determinó mediante la siguiente ecuación:

$$\left[\frac{R \text{ de la muestra} - R \text{ almidón nativo}}{R \text{ desramificada} - R \text{ nativo}} \right] (100)$$

Donde *R de la muestra* es la cantidad de azúcares reductores en una muestra desramificada por un tiempo específico (0, 3, 6, 9, 12, 24 y 27 horas),

R desramificada es la cantidad de azúcares reductores del almidón desramificado a las 27 horas.

R almidón nativo es la cantidad de azúcares reductores presentes en el AN sin desramificar.

7.2.4. Propiedades nutrimentales

7.2.4.1. Determinación de las fracciones de almidón en las muestras nativas y tratadas

7.2.4.1.1. Almidón resistente (AR)

La determinación de almidón resistente (AR) se realizó por el método descrito por Englyst et al. (1992) con modificaciones. Se colocaron 100 mg de muestra en tubos de centrifuga de 50 mL (los almidones nativos se gelatinizaron previamente con 5 mL de agua destilada en baño maría a ebullición) y se añadieron 10 mL de buffer HCl-KCl

(pH 1.5). Se agregó 1 mL de solución de pepsina (1mg/mL) y se incubaron en baño María con agitación a 40°C. Al término de la incubación, se agregaron 9 mL de buffer de fosfatos 0.1 M, 1.9 mL de KOH 4 M y se ajustó el pH a 6.9 para incubar con 1 mL de solución de α -amilasa (40 mg/mL buffer) a 37°C durante 17 horas. Se centrifugaron las muestras y se separó el sobrenadante. Después, se agregaron 3 mL de HCl 2 M y 5.5 mL de buffer de acetato 0.5 M para ajustar el pH a 4.9. Se incubaron las muestras con 100 μ L de amilogucosidasa (*Aspergillus niger* \geq 300 U/mL) durante 1 h a 60°C. Posteriormente, se centrifugaron las muestras y se lavaron con agua destilada. El sobrenadante se colocó en un matraz volumétrico y se aforó a 100 mL. Se tomaron 0.5 mL y se incubaron con 1 mL de GOD-POD a 37°C durante 30 minutos. Por último, se adicionaron 2 mL de H₂SO₄ 12 N a cada tubo y las absorbancias se leyeron a 540 nm en espectrofotómetro AGILENT UV-Visible, las cuales, se interpolaron en una curva patrón de glucosa y el resultado fue expresado como porcentaje de AR.

7.2.4.1.2. Almidón total (AT) y almidón digerible (AD)

De acuerdo con el método de Goñi et al. (1997) con algunas modificaciones, se pesaron muestras de 50 mg de almidón, se agregaron 6 mL de KOH 2M y se agitaron vigorosamente a temperatura ambiente durante 15 minutos. Posteriormente se dispersaron 100 μ L de amilogucosidasa (*Aspergillus niger* \geq 300 U/mL) en 3 mL de buffer de acetato de sodio 0.4 M (pH=4.75) y se agregaron a la muestra. Se preparó un baño María a 60°C y se incubaron las muestras durante 60 min. Por último, se centrifugaron las muestras a 10,000 durante 15 min a 4°C; se aforaron y diluyeron de acuerdo con el valor esperado. Se tomaron 0.5 mL de muestra y se incubaron con 1 mL del reactivo GOD-POD durante 30 minutos. Al término del periodo de incubación, se realizó una inactivación de la reacción agregando 2 mL de H₂SO₄ 12N. Las muestras se leyeron a 540 nm frente a un blanco de reactivos y las absorbancias se interpolaron en una curva patrón para obtener los mg de glucosa liberados. Se empleó el valor de 0.9 como factor de conversión de glucosa a almidón y el resultado se consideró como porcentaje de AT. El almidón digerible (AD) se obtuvo por diferencia de AT-AR.

7.2.4.2. *Digestibilidad in vitro* de los almidones nativos y tratados

7.2.4.2.1. Porcentaje de hidrólisis (PH)

Con base en la metodología de Goñi et al. (1997) con ciertas modificaciones, se pesaron 30 mg de almidón y se depositaron en tubos de centrifuga de 50 mL. Se agregaron 5 mL de agua y se pusieron a baño María en ebullición durante 15 minutos (sólo las muestras nativas). Posteriormente se añadieron 10 mL de buffer KCl-HCl (pH=1.5) y 0.2 mL de solución de pepsina (1g enzima/10 mL de buffer KCl-HC) a las muestras y se incubaron durante 60 minutos en baño María a 40°C. Después, se agregaron 10 ml de buffer de fosfatos 0.1 M y 5 mL de solución de α -amilasa (2.6 UI) y se incubaron a 37°C. Se tomaron alícuotas de 1 mL a los 30, 60, 90, 120 y 150 minutos y se depositaron en tubos de ensayo para posteriormente ser sometidos a ebullición durante 5 minutos. Se les agregaron 3 mL de acetato de sodio 0.4 M y 10 U de amiloglucosidasa y se incubaron a 60°C durante 45 minutos. Todas las muestras se aforaron a 10 mL y se sometieron a ensayo GOD-POD. La absorbancia se leyó en un espectrofotómetro a 540 nm y el porcentaje de hidrólisis se calculó de la siguiente manera:

$$\text{Porcentaje de hidrolisis (\%)} = (\mu\text{g de glucosa/mL})(300)(0.9)(100)/(1000)(\text{peso de la muestra seca en mg})(0.5)$$

Donde 300 es el volumen de reacción final (mL)

0.9 es el factor de conversión de glucosa a glucano

100 es la conversión del cociente a porcentaje

1000 es la conversión de los μg de glucosa a miligramos

0.5 es el tamaño de la alícuota tomada para la lectura espectrofotométrica (mL)

7.2.4.2.2. Cinética de digestión

Para describir la cinética de la hidrólisis del almidón se empleó la ecuación de Goñi et al. (1997):

$$C=C_{\infty}(1-e^{-kt})$$

Donde C es la concentración de almidón hidrolizado en el tiempo

t es el intervalo de tiempo entre cada punto de la cinética (30 min)

C_{∞} es la concentración de equilibrio

k la constante cinética.

7.2.4.2.3. Área bajo la curva de hidrólisis (ABC)

El área bajo la curva de hidrólisis se determinó de acuerdo con el modelo de la figura 8. La ecuación para el cálculo de cada fracción de la curva fue la siguiente:

$$ABC_{0^t}=C_{\infty}(t-t_0)-C_{\infty}/k(1-e^{-kt})$$

Donde nuevamente C_{∞} es la concentración de equilibrio

k es la constante cinética

t es el intervalo de tiempo entre cada punto de la curva (30 min)

t_0 es el tiempo cero (equivalente a cero).

Por último, el área bajo la curva total se calculó como:

$$ABC_{0^{\infty}}=\sum ABC_{0^{30}}+ABC_{30^{60}}+ABC_{60^{90}}+ABC_{90^{120}}+ABC_{120^{150}}$$

que equivale a la sumatoria de cada parte de la curva, correspondiente a los minutos 30, 60, 90, 120 y 150.

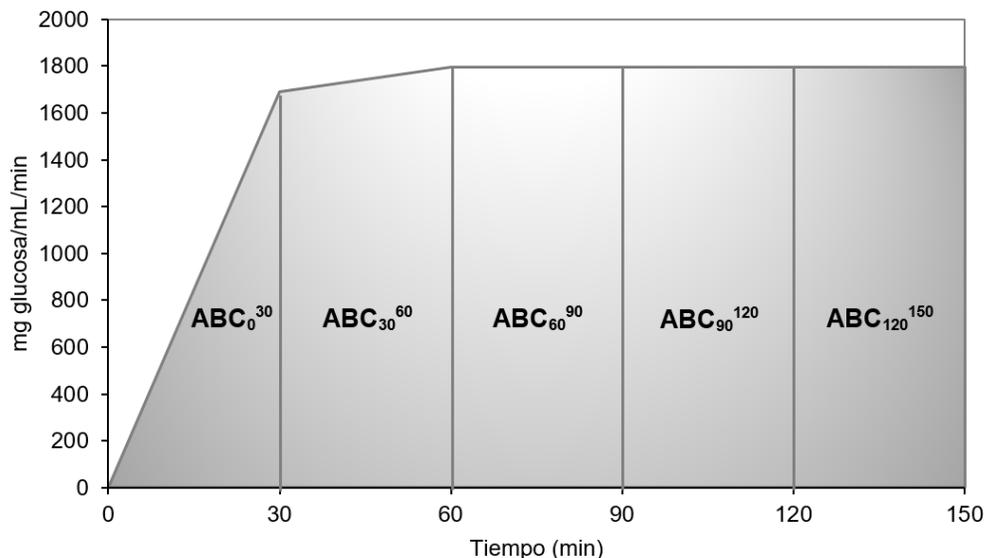


Figura 8. Modelo esquemático de la determinación del área bajo la curva de hidrólisis *in vitro* del almidón para la estimación del índice glucémico.

7.2.4.2.4. Índice de hidrólisis (IH)

Empleando los resultados del área bajo la curva, se calculó el índice de hidrólisis como el porcentaje de glucosa total liberada de cada muestra con respecto a la glucosa liberada del pan blanco (referencia). La ecuación fue la siguiente:

$$IH = \frac{ABC \text{ muestra}}{ABC \text{ pan blanco}} (100)$$

Donde *ABC muestra* es el área total bajo la curva de las muestras de almidón nativo y retrogradado de haba, frijol y maíz

ABC pan blanco es el área total bajo la curva de la referencia.

7.2.4.2.5. Estimación del índice glucémico (IG_e)

El índice glucémico de las muestras nativas y retrogradadas se estimó usando la ecuación de Goñi et al. (1997):

$$IG_e = 39.71 + 0.549 (IH)$$

Donde 39.71 y 0.549 son constantes de la ecuación

IH es el Índice de Hidrólisis obtenido previamente

7.2.5. Análisis Estadístico

Se realizó un análisis de la varianza de una vía (ANOVA) y una prueba de rango múltiple de Duncan (DMRT) para analizar las diferencias significativas entre las medias de las muestras sometidas a los distintos tratamientos. Para evaluar la relación entre el contenido de AR de las muestras y el grado de desramificación con pululanasa se empleó el coeficiente de correlación de Pearson, asumiendo una relación lineal positiva cuando el valor de $r > 0.7$. El análisis estadístico se realizó utilizando el software estadístico IBM SPSS® Statistics versión 24 y las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas cuando el valor de $p < 0.05$. Los resultados se presentan como la media \pm la desviación estándar de ensayos realizados por triplicado.

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1. Composición química de los almidones nativos

8.1.1. Análisis químico proximal

La composición química del almidón de haba y su comparación con las muestras de frijol y maíz se encuentran en la tabla 4. Se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las muestras, y en el caso del haba, es evidente una disminución con respecto a los componentes proximales de la semilla de haba entera (tabla 1), lo que se debe a la eliminación de componentes como el agua y la proteína a lo largo del proceso de aislamiento. Otra fuente de variación entre la composición de la semilla y el almidón aislado puede deberse a la eliminación de la testa de la semilla estudiada. Esta fracción está compuesta por almidón, celulosa y hemicelulosa, carbohidratos de bajo grado de polimerización conocidos como oligosacáridos y que son abundantes en las leguminosas (Silva-Cristóbal, Osorio-Díaz y Bello-Pérez, 2007). El análisis químico nos indica un alto grado de pureza del almidón y denota la eficiencia del método de extracción. Estos resultados son comparables con los de Dundar y Gocmen (2013) quienes encontraron porcentajes del 90%, 8.5%, 1.3%, 0.5% y 0.7%, para almidón, humedad, proteína, lípidos y cenizas en almidón de frijol rojo. Los porcentajes de humedad, cenizas, proteína, lípidos y fibra también fueron mínimos en las muestras de frijol y maíz. Los carbohidratos se mostraron como los mayores componentes entre los almidones de las tres muestras.

Tabla 4. Composición química promedio de los almidones nativos de haba, frijol y maíz

Componente	Haba	Frijol	Maíz
Humedad (%)	4.14 ± 0.04 ^c	9.05 ± 0.22 ^a	7.25 ± 0.38 ^b
Cenizas (%)	1.27 ± 0.05 ^b	2.41 ± 0.08 ^a	0.11 ± 0.04 ^c
Proteína (%)	0.51 ± 0.01 ^a	0.46 ± 0.03 ^c	0.49 ± 0.06 ^b
Lípidos (%)	0.30 ± 0.03 ^b	0.38 ± 0.02 ^a	0.32 ± 0.01 ^b
Carbohidratos (%) [*]	93.03 ± 0.07 ^a	86.98 ± 0.29 ^c	90.86 ± 0.34 ^b
Fibra total (%)	0.72 ± 0.03 ^b	0.70 ± 0.03 ^b	0.94 ± 0.02 ^a

^{*}Obtenidos por diferencia.

Medias con letras iguales en la misma fila no son estadísticamente diferentes (Prueba de Duncan, $p < 0.05$).

No se ha reportado extensamente la influencia o correlación directa de los componentes proximales con la cantidad de AR en los alimentos, no obstante, se sabe

que la digestibilidad de los almidones se ve influenciada por factores como la temperatura de cocción y almacenamiento y por interacciones del almidón con proteínas, lípidos, e incluso otros carbohidratos (Raigond et al., 2014). Por ejemplo, en el almidón de algunas especies de plantas, las cadenas de amilosa son penetradas por lípidos, y, por consiguiente, éstas no participan en la retrogradación, dando como resultado una menor producción de AR III (Eerlingen, Van den Broeck, Delcour y Levine, 1994). Asimismo, en los alimentos con alto contenido de lípidos y almidón se pueden formar complejos de amilosa-lípido que recientemente se han considerado como almidón resistente tipo cinco (AR V) (Raigond et al., 2014), sin embargo, debido al aislamiento, la cantidad de lípidos no sobrepasó el 0.4% en nuestras muestras. La mayor cantidad de proteína se observó en el haba ($0.51 \pm 0.01\%$) aunque su contenido fue muy bajo. Zhang y Hamaker (1998) no encontraron relación de la proteína con la digestibilidad en harinas de sorgo con hasta 11.9% de proteína y de maíz con hasta 11.3%, aunque se ha sugerido que podría afectar la gelatinización. En contraste, Sajilata et al. (2006), sostuvieron que las interacciones almidón-proteína reducen el contenido de AR, por lo menos en almidones de papa. El porcentaje de fibra fue igualmente bajo en el haba (0.72%) y en el frijol (0.70%), y un poco mayor en el maíz (0.94%). La fibra ha mostrado tener mínimos efectos en la cantidad de AR (Sajilata et al., 2006). En este estudio, los contenidos de todos los componentes químicos diferentes a los carbohidratos fueron tan bajos (tabla 4), que su influencia en la preparación de AR parece mínima.

8.1.2. Contenido de amilosa y amilopectina

Los resultados descritos en la tabla 5 muestran los contenidos de amilosa y amilopectina del haba y su comparación con el frijol y maíz. Las medias de todas las muestras fueron estadísticamente diferentes ($p < 0.05$). Los almidones de haba y frijol, al pertenecer al grupo de las leguminosas, tuvieron resultados similares y mayores en el contenido de amilosa que el maíz ($24.52 \pm 0.25\%$). La cantidad de amilosa en el haba fue de $29.20 \pm 0.38\%$, lo cual difiere un poco del valor observado por Morales-Medina et al, 2014 (23.73%), siendo este más parecido al de nuestros almidones de

maíz ($24.52 \pm 0.25\%$). Sin embargo, otros autores afirman que el contenido de amilosa en leguminosas va del 30-65% (Reddy et al., 2013).

Tabla 5. Contenido de amilosa y amilopectina en almidones nativos de haba, frijol y maíz

Muestras	Contenido amilosa (%)	Contenido amilopectina (%)*
Haba	29.20 ± 0.38^b	70.78 ± 0.00^b
Frijol	30.93 ± 0.21^a	69.06 ± 0.00^c
Maíz	24.52 ± 0.25^c	75.47 ± 0.00^a

*Obtenido por diferencia al 100% del contenido de amilosa

Medias con letras iguales en la misma columna no son estadísticamente diferentes (Prueba de Duncan, $p < 0.05$).

Se ha informado que el contenido de amilosa se modifica al someter los almidones a tratamientos de desramificación. Por ejemplo, Li, He, Dhital, Zhang y Huang (2017) observaron contenidos iniciales de amilosa de $34.3 \pm 0.3\%$ en maíz, y de $37.3 \pm 0.5\%$ en almidón de papa, sin embargo, al tratar las muestras con pululanasa, el contenido de amilosa en el almidón de maíz no sufrió cambios mientras que, en el almidón de papa, la cantidad de amilosa aumentó gradualmente hasta $40.6 \pm 0.3\%$ a las 24 horas de tratamiento. En otro estudio realizado por Reddy et al. (2017), también se observó que el contenido de amilosa en almidón de plátano aumentó significativamente ($p \leq 0.05$) de 23.10% a 31.11% en muestras crudas y a 40.46% en muestras gelatinizadas después de ser hidrolizados enzimáticamente. Además, el contenido de AR incrementó proporcionalmente al contenido de amilosa, lo cual pudo deberse a la ruptura de los enlaces α -1,6 de la amilopectina por la pululanasa, transformando al polímero ramificado en polisacáridos lineales de cadena corta parecidos a moléculas de amilosa, los cuales formaron un gel fuerte gracias a la retrogradación (Polesi y Sarmiento, 2011). De igual manera, es probable que el contenido de amilosa en nuestras muestras de haba haya aumentado después de la desramificación con pululanasa, lo cual, a su vez, promovió una formación de AR considerable, puesto que el AR es una molécula lineal de α -1,4-D-glucano que se deriva principalmente de la amilosa retrogradada (Raigond et al., 2014). Por lo anterior, la cantidad de amilosa de los almidones ha sido positivamente correlacionado con el contenido de AR que presentan (Raigond et al., 2014). Por ejemplo, Morales-Medina et al. (2014) obtuvieron una correlación lineal ($r = 0.905$) entre el contenido de amilosa en harinas de

leguminosas y el incremento relativo de AR durante la hidrólisis con pululanasa, observando el mayor incremento relativo (101%) en la lenteja, y un incremento del 75% en la harina de haba (con un contenido de amilosa de $23.73 \pm 0.4\%$). En nuestro estudio, el contenido de AR también fue mayor en las muestras con mayor contenido de amilosa (tablas 5 y 9). Con base en estos resultados, se puede pensar que los beneficios a la salud de los ABD, incluido el AR de los alimentos, podrían obtenerse agregando almidones ricos en amilosa (Giuberti, Gallo, Fortunati y Rossi, 2015) o modificados molecularmente como es el caso de nuestro almidón de haba desramificado enzimáticamente con pululanasa.

En este estudio el contenido de amilopectina fue menor en el haba ($70.78 \pm 0.00\%$) y el frijol y mayor en el almidón de maíz. Dicho contenido probablemente se modificó después de someter a hidrólisis los almidones. Esto, a su vez, afectó el fenómeno de retrogradación y por ende la formación de AR. La retrogradación del almidón incluye principalmente la retrogradación a corto plazo de la amilosa y la retrogradación a largo plazo de la molécula de amilopectina (Haralampu, 2000). Durante este fenómeno, las moléculas de almidón son re-asociadas y pueden formar estructuras herméticas estabilizadas mediante enlaces de hidrógeno. La formación de AR entonces está influenciada por la proporción de estos dos polímeros en el gránulo, pero también por otros factores como la longitud de la cadena de estas moléculas (Dundar y Gocmen, 2013). Se ha demostrado que las cadenas de α -poliglucanos con un grado de polimerización (GP) de alrededor de 20 son óptimas para elevar el contenido de AR III hasta el 94% (Lehmann et al., 2003). La amilopectina presente en el gránulo de almidón ($70.78 \pm 0.00\%$ en el haba) influyó en la formación de AR de una forma distinta a la amilosa. Mientras que la amilosa es lentamente digerida, la digestión de la amilopectina es rápida después de la retrogradación. Aun así, la amilopectina también tiene la capacidad de formar geles parcialmente cristalizados, aunque la cristalización de esta fracción procede muy lentamente y sus estructuras son menos estables que las estructuras cristalinas de la amilosa. Estas estructuras cristalinas procedentes de la amilopectina, formadas durante el almacenamiento, también son resistentes a la actividad de las enzimas amilolíticas (Raigond et al., 2014). Debido a estas propiedades, la transformación enzimática de la amilopectina en moléculas lineales ha

contribuido a la formación de cantidades importantes de AR en nuestro estudio, puesto que la amilopectina es el componente mayoritario de los gránulos (resultados descritos más adelante, tabla 6), y al modificarla, se aumentó el contenido de amilosa, lo que a su vez favoreció enormemente la retrogradación.

8.2. Rendimiento y contenido de AR

8.2.1. Tiempo de incubación y concentración enzimática

En la figura 9 se puede observar el almidón nativo (AN) de haba, extraído mediante molienda húmeda, y el producto modificado enzimáticamente con pululanasa (AR). Es evidente el aspecto cristalino del AR con respecto al AN. En la tabla 6 se presenta el contenido de AR III en cada muestra, así como su rendimiento promedio en porcentaje.

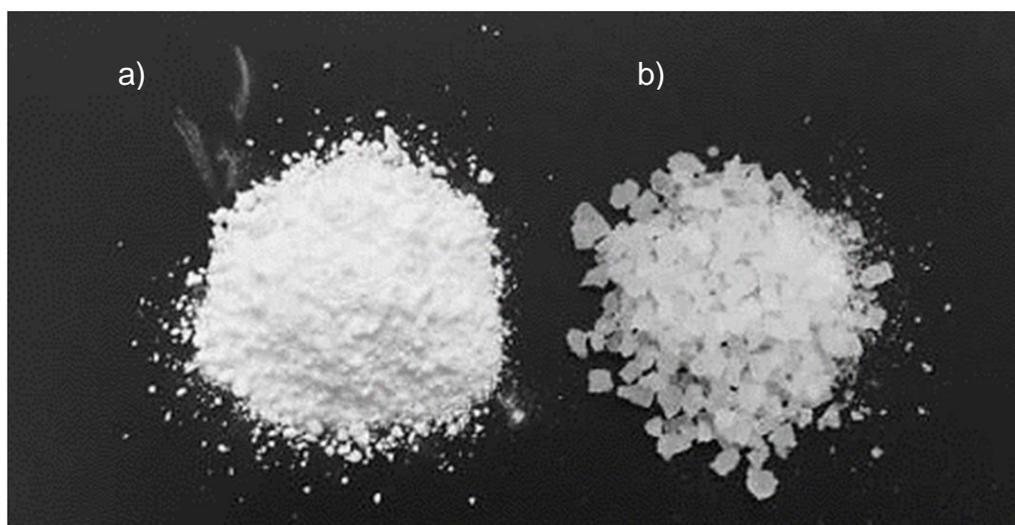


Figura 9. a) Muestra de almidón nativo (AN) de haba; b) Muestra de almidón retrogradado (AR), después del tratamiento enzimático con pululanasa I (EC 3.2.1.41).

El rendimiento del almidón tratado (calculado como peso de la muestra inicial/peso de la muestra final x 100), mostró diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las muestras. El mayor se obtuvo de muestras desramificadas con 6 unidades de pululanasa por gramo de almidón (U/g) durante 9 h ($98.70 \pm 1.47\%$), y fue estadísticamente diferente al resto, excepto al de las muestras tratadas con 12 U/g durante 6 h ($94.03 \pm 1.25\%$). El menor rendimiento se obtuvo de muestras desramificadas con 6 U/g, durante 27 h ($85.56 \pm 2.04\%$). En general, los rendimientos obtenidos oscilaron entre el 85 y el

100%, y no se observaron resultados muy diferentes para las muestras descritas más adelante. El rendimiento del almidón es un indicador de la cantidad de muestra que se pierde durante el tratamiento, debido a factores como la solubilización de los oligosacáridos obtenidos por la desramificación con pululanasa en el líquido de preparación (buffer de acetato). Esta solubilización ocasionaría que los componentes de cadena corta solubles en agua se desecharan al momento de separar el almidón del sobrenadante en la centrifugación. Sin embargo, de acuerdo con el desarrollo metodológico, se puede deducir que la disminución en los pesos de las muestras finales con respecto a las iniciales, en general, se debe a pérdidas de almidón durante el proceso de aislamiento y secado, más que a pérdidas por hidrolisis, puesto que transferir cuantitativamente una muestra a otro recipiente resulta en pérdidas del material, y más cuando se evalúan cantidades pequeñas de un componente.

Tabla 6. Rendimiento y contenido de almidón resistente (AR) de haba a diferentes tiempos de incubación y concentraciones enzimáticas

Muestras*	Rendimiento AR (%)	Contenido AR (%)
0U-0h	92.76 ± 3.63 ^{bc}	22.32 ± 0.02 ⁿ
6U-3h	87.73 ± 3.00 ^{cd}	46.51 ± 0.79 ^j
6U-6h	92.26 ± 1.01 ^{bc}	42.36 ± 0.33 ^m
6U-9h	98.70 ± 1.47 ^a	58.22 ± 0.34 ^f
6U-12h	92.66 ± 1.94 ^{bc}	44.20 ± 0.00 ^l
6U-24h	87.43 ± 1.93 ^{cd}	52.43 ± 0.07 ^h
6U-27h	85.56 ± 2.04 ^d	54.31 ± 0.06 ^g
12U-3h	90.80 ± 1.41 ^{bcd}	43.72 ± 0.19 ^l
12U-6h	94.03 ± 1.25 ^{ab}	45.47 ± 0.04 ^k
12U-9h	88.93 ± 3.69 ^{bcd}	44.46 ± 0.16 ^l
12U-12h	87.10 ± 5.72 ^{cd}	54.34 ± 0.45 ^g
12U-24h	90.56 ± 5.45 ^{bcd}	64.05 ± 0.01 ^c
12U-27h	87.06 ± 4.80 ^{cd}	63.38 ± 0.62 ^{cd}
18U-3h	94.80 ± 1.67 ^{ab}	43.80 ± 0.02 ^l
18U-6h	92.20 ± 2.40 ^{bc}	50.17 ± 0.01 ⁱ
18U-9h	90.83 ± 1.96 ^{bcd}	59.75 ± 0.00 ^e
18U-12h	90.80 ± 3.92 ^{bcd}	62.86 ± 0.00 ^d
18U-24h	91.40 ± 1.22 ^{bcd}	70.40 ± 0.50 ^b
18U-27h	87.43 ± 3.06 ^{cd}	77.12 ± 0.51 ^a

*0U-0h almidón no desramificado; 6U-3h a 18U-27h almidón desramificado con 6, 12 y 18 unidades (U) de pululanasa I por gramo de almidón durante 3, 6, 9, 12, 24 y 27 horas (h). Todas las muestras fueron almacenadas a 2°C, 3 días.

Medias con letras iguales en la misma columna no son estadísticamente diferentes (Prueba de Duncan, $p < 0.05$).

El tratamiento con enzimas desramificantes incrementa, aunque en diferentes proporciones, la cantidad de AR de los alimentos debido a que, entre otras cosas, la desramificación de la amilopectina puede producir más estructuras lineales similares a las cadenas de amilosa, y/o crear cadenas libres de amilopectina en forma de doble hélice y segmentos de cristalito. Estas estructuras desramificadas se empaquetan estrechamente en la formación del cristal y se transforman en AR III durante la retrogradación (Lertwanawatana, Fraizer y Niranjana, 2015). Por otra parte, el término retrogradación (recristalización) se usa para describir los cambios que ocurren al enfriar y almacenar el almidón gelatinizado. A través de este proceso, el almidón gelatinizado se transforma de un estado amorfo a un estado más ordenado o cristalino. La recristalización del almidón se produce fácilmente durante el almacenamiento de los alimentos amiláceos procesados térmicamente, como un proceso espontáneo (Miao, Jiang y Zhang, 2009).

Por ejemplo, Lertwanawatana et al. (2015) estudiaron el efecto de la desramificación enzimática con pululanasa I y la temperatura de gelatinización en autoclave en la formación de AR III en almidón de yuca y encontraron que, después de la desramificación, la cantidad de AR incrementó drásticamente de un $2.4 \pm 0.2\%$ en el almidón nativo, a $17.4 \pm 0.5\%$ en el almidón desramificado. Estos resultados son consistentes con muchas otras investigaciones donde emplearon desramificación con pululanasa en, por citar algunos, maíz (Milasinovic, Radosavljevic y Dokic, 2010), y maicena (Gao, Li, Jian y Liang, 2011). La investigación de la preparación de AR a partir de haba, y en general de leguminosas, es muy escasa, por lo que la discusión de resultados se realizará de acuerdo con la información disponible sobre distintas fuentes botánicas.

En la tabla 6 se observa que las muestras tratadas con 18 unidades enzimáticas durante un tiempo de incubación de 27 h presentaron el mayor contenido de AR ($77.12 \pm 0.51\%$), seguidas por las muestras desramificadas con 18 U durante 24 h ($70.40 \pm 0.50\%$). El menor contenido de AR se observó en muestras no desramificadas ($22.32 \pm 0.02\%$). Zhang, y Jin, 2011b, también obtuvieron las mayores cantidades de AR a las 24 h de incubación con pululanasa ($32.1 \text{ g}/100 \text{ g}$) en almidón de maíz, y aunque el

porcentaje de AR no aumentó drásticamente a partir de las 16 horas de tratamiento, establecieron el tiempo óptimo de preparación en 24 h.

El porcentaje de AR fue mayor en las muestras hidrolizadas durante 24 y 27 h con las tres concentraciones enzimáticas evaluadas (6, 12 y 18 U); y el contenido de AR, específicamente en estas muestras, aumentó proporcionalmente a la concentración enzimática. Sin embargo, no se observaron diferencias ($p < 0.05$) en la cantidad de AR obtenido en las muestras 6U-12h, 12U-3h y 18U-3h. Estos hallazgos sugieren que para almidones desramificados enzimáticamente, el contenido de AR incrementa en función del tiempo de incubación, aunque, concentraciones enzimáticas bajas (6 U), requieren mayor tiempo de desramificación que concentraciones altas (18 U), para obtener porcentajes de AR elevados. Comportamientos similares fueron observados por Pongjantal, Utaipatanacheep, Naivikul y Piyachomkwan (2008) al estudiar almidón de arroz, donde el mayor contenido de AR (12.33%) se obtuvo a las 48 h de desramificación con pululanasa (EC 232-983-9P; ≥ 400 UI/mL), y el menor en muestras sin desramificar (4.80%). Miao, Jiang y Zhang (2009) también observaron que la alta concentración de pululanasa y el poco tiempo de tratamiento incrementaban la cantidad de almidón de baja digestibilidad (ABD), mientras que un tiempo de desramificación más largo y completo promovía la producción de AR en almidón de maíz céreo. Por último, Shin, Choi et al. (2004) obtuvieron $74.4 \pm 1.7\%$ de AR a las 24 horas de desramificación con isoamilasa a partir de almidón céreo de sorgo.

8.2.2. Tiempo de almacenamiento

Los resultados del efecto del tiempo de almacenamiento en el contenido de AR retrogradado se muestran en la tabla 7. El rendimiento de todas las muestras se mantuvo entre 88.76 ± 2.48 y $92.30 \pm 2.87\%$, por lo que no hubo diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre ellas. El contenido de AR de las muestras hidrolizadas durante 12 h con 12 U y almacenadas a 2°C , incrementó conforme los días de almacenamiento aumentaron, obteniendo un $39.69 \pm 0.04\%$ con 1 día de almacenamiento y $60.26 \pm 0.04\%$ a los 6 días. Las diferencias entre las muestras fueron significativas ($p < 0.05$) en todos los casos. Resultados similares fueron observados indirectamente por Shin, Choi et al. (2004) al evaluar el

comportamiento del ABD en muestras de sorgo con respecto al tiempo de almacenamiento; encontraron que el contenido de éste aumentó hasta los 3 días de almacenamiento y después se mantuvo sin diferencias, sin embargo, el contenido de AR aumentó hasta los 6 días, obteniendo un máximo de $34.0 \pm 2.4\%$ en muestras desramificadas con pululanasa durante 8 h y almacenadas a 1°C . Esto se debe a que inicialmente se produce una rápida disminución de la digestibilidad del almidón debido a la rápida retrogradación de las moléculas de amilosa, pero cuando el almacenamiento es prolongado, se produce una disminución adicional y gradual de la digestibilidad debido a la menor velocidad de retrogradación de la amilopectina (Wang et al., 2015).

Tabla 7. Rendimiento y contenido de almidón resistente (AR) de haba a diferentes tiempos de almacenamiento

Muestras*	Rendimiento AR (%)	Contenido AR (%)
Almidón 1A	90.80 ± 1.38^a	39.69 ± 0.04^f
Almidón 2A	90.80 ± 0.45^a	45.63 ± 0.02^e
Almidón 3A	92.16 ± 5.62^a	48.94 ± 0.12^d
Almidón 4A	92.30 ± 2.87^a	54.48 ± 0.11^c
Almidón 5A	88.30 ± 1.22^a	57.46 ± 0.10^b
Almidón 6A	88.76 ± 2.48^a	60.26 ± 0.04^a

*Almidón 1A-6A días de almacenamiento de almidón desramificado con 12 U de pululanasa por gramo de almidón durante 12 horas a 2°C .

Medias con letras iguales en la misma columna no son estadísticamente diferentes (Prueba de Duncan, $p < 0.05$).

8.2.3. Temperatura de almacenamiento

El rendimiento, al evaluar el efecto de la temperatura de almacenamiento en el contenido de AR, mostró diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las muestras, sin embargo, todas superaron el 90% (tabla 8). En estas, el contenido de AR también fue diferente estadísticamente ($p < 0.05$), observándose el mayor porcentaje en muestras almacenadas a temperatura ambiente (TA), y el menor en muestras almacenadas a temperatura de congelación (TC). Aunque existieron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las muestras almacenadas a 2°C y las almacenadas a 20°C , su contenido de AR no fue tan diferente (tabla 8). A temperaturas de refrigeración ($4-5^{\circ}\text{C}$) las moléculas de amilosa (estructuralmente lineales), tienden a formar dobles hélices, cuando tienen adecuado contenido de humedad. Una vez retrogradada la amilosa (AR

III), presenta temperaturas de gelatinización por encima de los 170°C, aunque esta temperatura disminuye con el acortamiento de las cadenas (Birt et al., 2013). Nuestros datos sugieren que el contenido de AR en el almidón de haba aumenta proporcionalmente a la temperatura. Es decir, cuando la temperatura de almacenamiento se situó muy por debajo del punto de congelación del agua, el contenido de AR decreció, mientras que cuando superó los 0°C y se acerca a la temperatura ambiente (aprox. 20°C), el AR aumentó.

Tabla 8. Rendimiento y contenido de almidón resistente (AR) de haba a diferentes temperaturas de almacenamiento

Muestras*	Rendimiento AR (%)	Contenido AR (%)
TC	91.36 ± 4.61 ^{ab}	33.77 ± 0.13 ^c
TR	90.50 ± 0.81 ^b	47.80 ± 0.10 ^b
TA	97.33 ± 2.20 ^a	53.77 ± 0.13 ^a

*TC muestras almacenadas a temperatura de congelación (-30°C); TR muestras almacenadas a temperatura de refrigeración (2°C); TA muestras almacenadas a temperatura ambiente (20°C). Todas las muestras fueron desramificadas con 12 unidades de pululanasa por gramo de almidón durante 12 horas y almacenadas durante 3 días.

Medias con letras iguales en la misma columna no son estadísticamente diferentes (Prueba de Duncan, $p < 0.05$).

El aumento de AR a 20°C podría explicarse a través de tres pasos secuenciales que se dan en la cristalización: nucleación, propagación y maduración (Morris, 1990). La tasa de nucleación de cristales se aproxima a 0 a la temperatura de fusión (T_m) y es máxima a la temperatura de transición vítrea (T_g), mientras que la velocidad de crecimiento del cristal se aproxima a 0 a T_g y es máxima a T_m . Entonces, la tasa neta de cristalización se calcula como $T = (0,5) (T_g + T_m)$, la cual, es generalmente cercana a la temperatura ambiente (Eerlingen, Crombez y Delcour, 1993; Lertwanawatana et al., 2015). Lilia-Baby et al. (2016), también observaron mayores contenidos de AR a temperatura ambiente (20°C) en almidones de arroz, sin embargo, esta cantidad disminuyó proporcionalmente al aumento en el tiempo de gelatinización en autoclave. En resumen, por lo anterior podría pensarse que, a fin de incrementar el consumo de AR en la dieta, sea aconsejable un periodo de enfriado a temperatura ambiente después del cocinado de las leguminosas (Dundar y Gocmen, 2013).

8.2.4. Almidón resistente de haba, frijol y maíz

Después de determinar las condiciones óptimas de las diferentes variables evaluadas, nuevamente se produjo AR a partir de haba, pero también de maíz y frijol. Los resultados se describen en la tabla 9. Existieron diferencias significativas ($p < 0.05$) en los rendimientos, los cuales no superaron el 90%. El contenido de AR fue el mismo en las muestras de haba y frijol y significativamente ($p < 0.05$) menor en las muestras de maíz. Se debe destacar que el contenido de AR en las muestras de haba ($64.88 \pm 0.02\%$) fue menor que el que se obtuvo al evaluar las variables por separado ($77.12 \pm 0.51\%$) (tabla 6), donde las muestras se almacenaron durante 3 días a 2°C . Sin embargo, la discusión de la formación de cristales de AR a diferentes temperaturas y tiempos de almacenamiento ya ha sido abordada en líneas anteriores.

Tabla 9. Rendimiento y contenido de almidón resistente (AR) de muestras preparadas a partir de haba, frijol y maíz

Muestras*	Rendimiento AR (%)	Contenido AR (%)
Haba	88.76 ± 2.48^a	64.88 ± 0.02^a
Frijol	84.16 ± 3.85^a	64.84 ± 0.13^a
Maíz	85.56 ± 3.71^a	58.44 ± 0.27^b

*Las muestras se prepararon con las condiciones establecidas para la producción de AR de haba (18 U/g de enzima, 27 horas de desramificación, 6 días de almacenamiento a 20°C).

Medias con letras iguales en la misma columna no son estadísticamente diferentes (Prueba de Duncan, $p < 0.05$).

Algunas investigaciones sugieren que variables como la temperatura (Dundar y Gocmen, 2013; Lee, Mun y Shin, 1997) y el tiempo de gelatinización de los almidones (Sievert y Pomeranz, 1989), así como el pH del medio (Zhang y Jin, 2011a) y la concentración de almidón (Letwanawatana et al., 2015), modifican la cantidad de AR en las muestras. Aunque estas variables no se evaluaron, cabe la posibilidad que esas condiciones también hayan modificado en una magnitud desconocida la cantidad de AR final que obtuvimos en este estudio, y que el grado de influencia de cada una de las variables que si fueron evaluadas se haya modificado al conjuntarlas en un método final de preparación del AR. Por ejemplo, nosotros tratamos suspensiones al 10% en base al perfil de solubilidad; esto podría ocasionar que la cantidad de AR formado sea menor que si se hubieran utilizado concentraciones del 20%, debido a que la cantidad de agua era excesiva, lo cual pudo provocar obstrucción de la interacción molecular

entre los enlaces de hidrogeno de los fragmentos cortos obtenidos en la desramificación (Zhang y Rempel, 2012), tal como lo reporta Letwanawatana et al. (2015).

Morales-Medina et al. (2014) evaluaron la cantidad de AR en harinas de leguminosas sin tratamiento, y encontraron que las harinas de frijol tuvieron los porcentajes más altos de AR (31.84 y 30.84%) y los más bajos de AT (36.88 y 38.04%). La harina de garbanzo mostró el porcentaje más bajo de AR (0.88%) y uno de los más elevados porcentajes de AT (45.13%) junto con las lentejas. Después de la hidrólisis con pululanasa, la cantidad de AR disminuyó un 4%, 90% y 87% en los casos de la lenteja, el frijol y el frijol rojo respectivamente. En contraste, hubo un incremento del 431% y el 18% en muestras de garbanzo y haba respectivamente. De acuerdo con este y otros estudios, las leguminosas presentan buenas cantidades de AR naturalmente, sin embargo, son almidones resistentes de tipo I y tipo II, los cuales se destruyen durante los tratamientos térmicos o se pierden al extraer el almidón nativo como en el caso nuestro, pero que posteriormente dan lugar al AR III que se produce por retrogradación (Berry, 1986), lo cual permitió obtener cantidades de AR muy superiores a las presentes de forma natural en el haba (11.03 ± 2.94) (Morales-Medina et al., 2014). Vargas-Torres, Osorio-Díaz, Agama-Acevedo, Morales-Franco y Bello-Pérez (2006) encontraron cantidades máximas de AR del $5.41 \pm 0.1\%$ en distintas variedades de frijol, pero sólo el $2.65 \pm 0.1\%$ correspondía a almidón resistente retrogradado (AR III). En nuestro estudio, el AR I y el AR II se eliminaron al aislar y gelatinizar el almidón nativo, sin embargo, los tratamientos permitieron formar cantidades importantes de AR III el cual es más resistente a la digestión debido a su mayor tolerancia a los tratamientos.

8.3. Propiedades fisicoquímicas de los almidones

8.3.1. Morfología (MEB)

En la figura 10 se observan las microscopías de almidón nativo de haba (HN), frijol (FN), y maíz (MN). En todos los gránulos se observan superficies lisas y contornos bien definidos, limpios, sin ningún tipo de residuo correspondiente a remanentes de la

semilla, lo cual, junto con el análisis químico (AQP), refleja la eficiencia del método de extracción. HN mostró gránulos con formas ovaladas, con diámetros mayores a 10 μm , lo cual coincide con la revisión de Hoover et al. (2010). Los gránulos de FN fueron más redondeados, aunque también es posible distinguir la forma oval. En contraste, MN presentó gránulos más pequeños que HN y FN, de diversas formas entre las que se observan la oval, esférica y algunas formas poligonales poco simétricas. Los gránulos de leguminosas fueron más grandes y homogéneos que los del maíz, lo cual se debe al origen botánico de cada muestra (Zamudio-Flores et al., 2015).

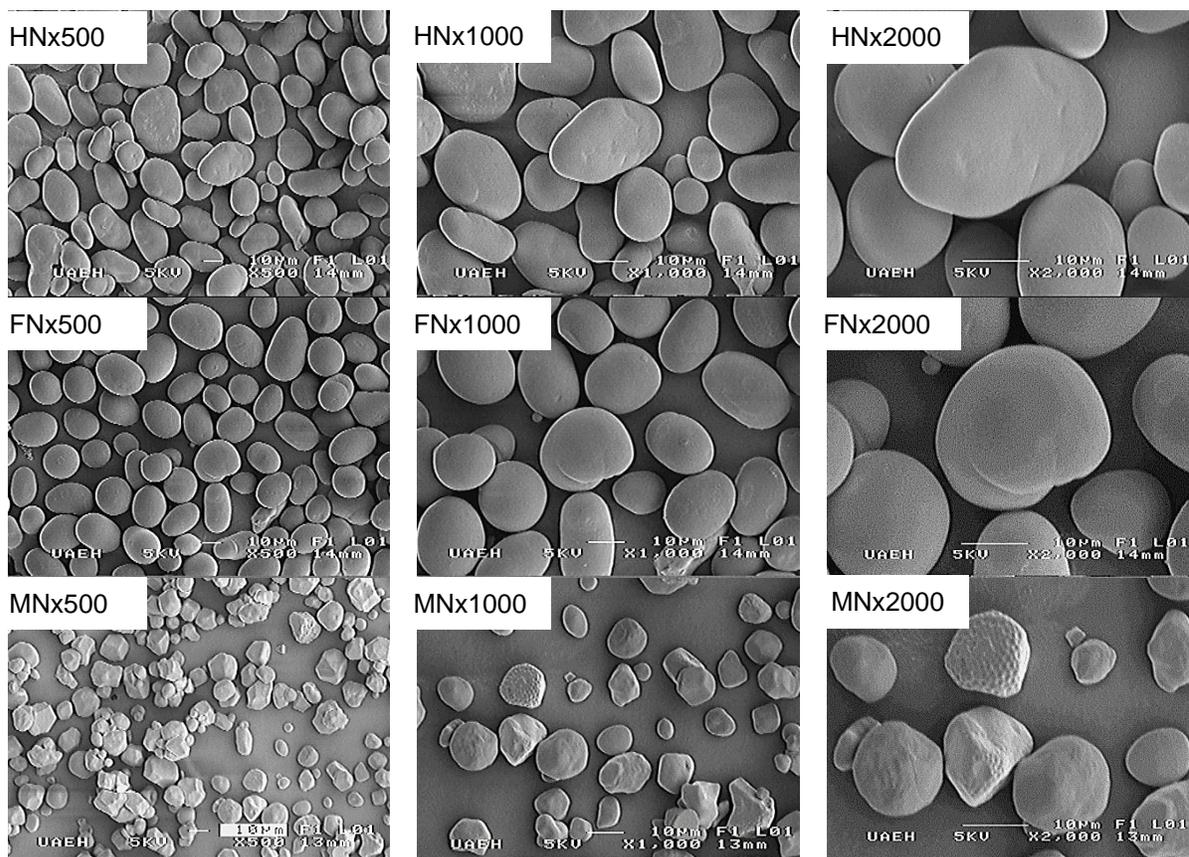


Figura 10. Microscopía electrónica de barrido (MEB) de almidones nativos de haba (HN), frijol (FN) y maíz (MN) a diferentes aumentos (x500, x1000 y x2000).

En las tres especies se observaron poros, aunque en el haba más bien parecen pequeñas hendiduras o cicatrices mientras que en el maíz se observaron grandes orificios distribuidos en algunos gránulos, que los hacen semejantes a una pelota de golf. En FN, estos poros son más discretos o poco visibles en la imagen (figura 10). Estos poros podrían ser atribuibles al método de extracción del almidón o al proceso

de secado, aunque pudieran producirse de forma natural desde la misma formación del gránulo para facilitar el ataque enzimático durante la hidrólisis (Uthumporn, Shariffa y Karim, 2012). De hecho, se ha sugerido que el principal factor que controla la susceptibilidad enzimática es la arquitectura de los gránulos, en particular las características de estos poros superficiales (Cai y Shi, 2014). Las diferencias en el tamaño, forma y extensión de estos poros entre los almidones de leguminosas y el del maíz, también pudieran deberse a que el método de extracción fue el mismo para el haba y el frijol, mientras que el almidón de maíz se adquirió como harina de fécula comercial en donde se ejerce fuerza de cizalla para disminuir el tamaño de partícula, según lo reporta Zamudio-Flores et al. (2015).

Los almidones retrogradados de haba, frijol y maíz se observan en la figura 11. En las muestras de haba no desramificadas (HND), las desramificadas con 12 U/g de pululanasa durante 12 h (HD12), las desramificadas con 18 U/g de enzima durante 27 h (HD18), las de frijol (FD18) y las de maíz (MD18) se aprecia una pérdida total de la estructura granular que dio paso a la aparición de formas muy irregulares semejantes a rocas ásperas y erosionadas. Aun en las muestras no desramificadas (HND), se observaron gránulos de almidón fundidos, conectados entre sí, formando una estructura irregular debido la retrogradación (Li, Xu et al., 2017; Zhang y Jin, 2011a) que se llevó a cabo en el almacenamiento después de su gelatinización, tal como lo describieron Miao et al. (2009). En HD12 se observa una estructura mucho más compacta que en HND, lo cual presumiblemente se debe a la cristalización que se vio favorecida con la desramificación con pululanasa. HD18 muestra una estructura más parecida a HND que a HD12, aunque más compacta aparentemente. Las estructuras que se formaron en el almacenamiento tuvieron tamaños mucho mayores a 10 μm . En el frijol (FR) se observaron estructuras menos tendientes a la formación de conglomerados, más amorfas y con fisuras, aunque en FDx1000 se percibe la formación de un material compacto. El maíz retrogradado mostró fisuras con menor profundidad y extensión que las otras muestras, lo cual puede estar relacionado con el tamaño de partícula de la fécula gelatinizada. Babu y Parimalavalli (2016) también observaron fisuras después de gelatinizar almidón de papa y desramificarlo con pululanasa. Resulta conveniente resaltar que, aunque el contenido de AR fue elevado

en el maíz (58.44 ± 0.27), éste no fue mayor al porcentaje de AR observado en las leguminosas (64.88 ± 0.02 haba y 64.84 ± 0.13 frijol). Esto sugiere que las imperfecciones de las estructuras retrogradadas y su apariencia menos o más amorfa no están completamente relacionadas con la susceptibilidad a las enzimas. Resultados distintos fueron reportados por Lertwanawatana et al. (2015) en un estudio con almidones de yuca desramificados, donde observaron que el contenido de AR III aumentaba a medida que aumentaba la estructura cristalina densa rígida.

A x1500 son más apreciables las diferencias entre el almidón no desramificado y los almidones desramificados (figura 10). En HND aparecen muchas grietas, lo que podría sugerir que el fenómeno de cristalización no se completó. Estas grietas pudieron permitir más fácilmente el acceso de las enzimas amilolíticas, lo cual se reflejó en un porcentaje de AR menor que las muestras tratadas, pero aun así mayor a la cantidad de AR de los almidones nativos. En las muestras hidrolizadas con pululanasa se observan superficies “picoteadas” que son más apreciables en HD12, lo cual podría deberse a la digestión enzimática (Shin, Choi et al., 2004). Las estructuras que se observan, se deben a que en el enfriamiento y secado de las muestras después de su desramificación, la amilosa (mayor en las muestras desramificadas) se reasoció como doble hélice, la cual fue sostenida por enlaces de hidrógeno, y la retrogradación hizo que las hélices se agregaran y formaran una estructura cristalina altamente compacta, aumentando así su resistencia (Li, Xu et al., 2017) a enzimas como la alfa amilasa, que atacan preferencialmente las regiones amorfas de los gránulos, mientras que las regiones sólidas son menos accesibles, por lo que se hidrolizan a una velocidad más lenta (Shin, Choi et al., 2004). En conjunto estos resultados evidencian la razón estructural del aumento de la cantidad de AR las muestras desramificadas y retrogradadas con respecto a los almidones nativos (figuras 10 y 11) y son similares a los observados en estudios con frijol rojo (*Phaseolus Vulgaris* L.) (Reddy, Suriya y Haripriya, 2013) plátano (*Musa AAB*) (Reddy et al., 2017), sorgo céreo (Shin, Choi et al., 2004), arroz rico en amilosa (Pongjantal et al., 2008) y yuca (Vatanasuchart, Tungtrakul, Wongkrajang y Naivikul, 2010).

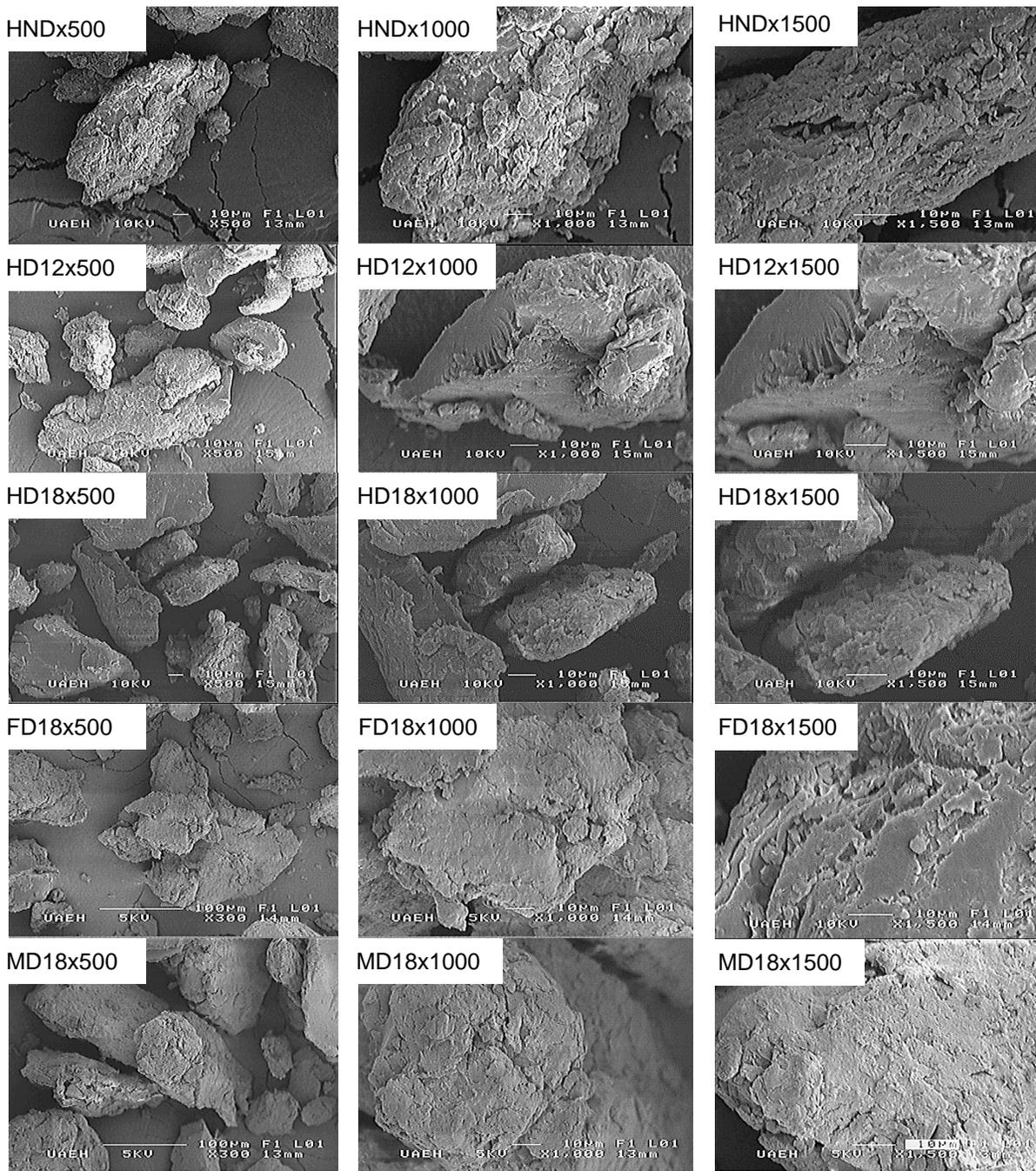


Figura 11. Microscopía electrónica de barrido (MEB) de almidones retrogradados no desramificados de haba (HND), desramificados con 12 (HD12) y 18 (HD18) U/g de pululanasa, de frijol (FD18) y de maíz (MD18) a diferentes aumentos (x500, x1000 y x1500).

8.3.2. Molecular (Grado de desramificación)

El grado de desramificación del almidón nativo de haba con 6, 12 y 18 U/g de pululanasa se muestra en la tabla 10. Se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las concentraciones enzimáticas en todos los tiempos excepto a las 24 y las 27 horas, cuando el grado de desramificación se aproximaba al 100%. Los comportamientos de desramificación por hidrólisis no se mostraron tan diferentes con 6 y 18 U, mientras que con 12 U de pululanasa sí. A las 6 h de desramificación con 12 U el grado de desramificación alcanzó un comportamiento lineal, mientras que con 6 y 18 U el grado de desramificación oscilaba entre $75.80 \pm 3.27\%$ y $71.41 \pm 5.54\%$, respectivamente; y ascendía al 100%. En la figura 12 se muestra el comportamiento de la desramificación con respecto al tiempo de incubación.

Tabla 10. Grado de desramificación (%) del almidón de haba por pululanasa I a diferentes tiempos y concentraciones enzimáticas (U/g)

Muestras*	6 U/g**	12 U/g**	18 U/g**
3D	65.76 ± 2.60^h	73.56 ± 0.21^{efg}	68.95 ± 5.00^{gh}
6D	75.80 ± 3.27^{def}	98.09 ± 4.09^a	71.41 ± 5.54^{fg}
9D	78.70 ± 1.06^{cde}	99.67 ± 3.86^a	83.77 ± 3.67^{bc}
12D	80.96 ± 2.90^{bcd}	99.34 ± 4.39^a	84.77 ± 2.34^b
24D	96.18 ± 1.13^a	98.55 ± 2.60^a	97.19 ± 3.89^a
27D	100.00 ± 0.00^a	100.00 ± 0.00^a	100.00 ± 0.00^a

*3D a 27D horas de desramificación enzimática a 46°C a una concentración del 1% (P/V)

**6 U/g, 12 U/g y 18 U/g unidades de pululanasa I por gramo de almidón.

Medias con letras iguales en la misma fila no son estadísticamente diferentes (Prueba de Duncan, $p < 0.05$).

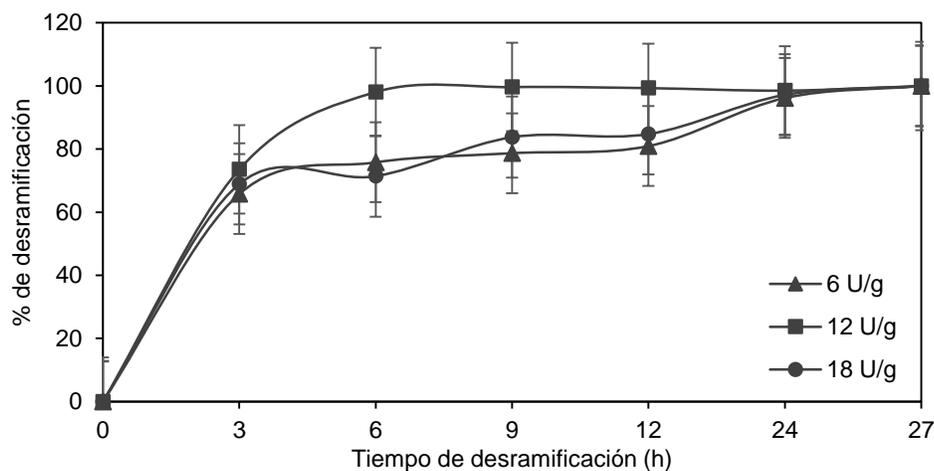


Figura 12. Porcentaje de desramificación del almidón de haba a diferentes concentraciones enzimáticas (U/g).

El grado de desramificación es un parámetro relativo para conocer la actividad desramificante de la pululanasa sobre nuestros sustratos. El 100% de desramificación corresponde a la máxima cantidad de oligosacáridos reductores obtenidos en 27 horas para cada concentración enzimática, por lo que el grado máximo de desramificación es diferente para cada concentración (tabla 10). Esto permite establecer relación entre el nivel de desramificación y la cantidad de AR observada. En la figura 13 se observa una correlación lineal positiva entre el grado de desramificación y el contenido de AR en las diferentes concentraciones enzimáticas evaluadas (6, 12 y 18 U/g). Con 6 U/g se obtuvo un coeficiente de correlación $r = 0.902$ ($p = 0.005$, figura 13a), con 12 U/g $r = 0.844$ ($p = 0.017$, figura 13b) y con 18 U/g $r = 0.949$ ($p = 0.001$, figura 13c). Las tres concentraciones mostraron una correlación lineal positiva entre el GD y el AR, pero fue mayor con 18 U/g.

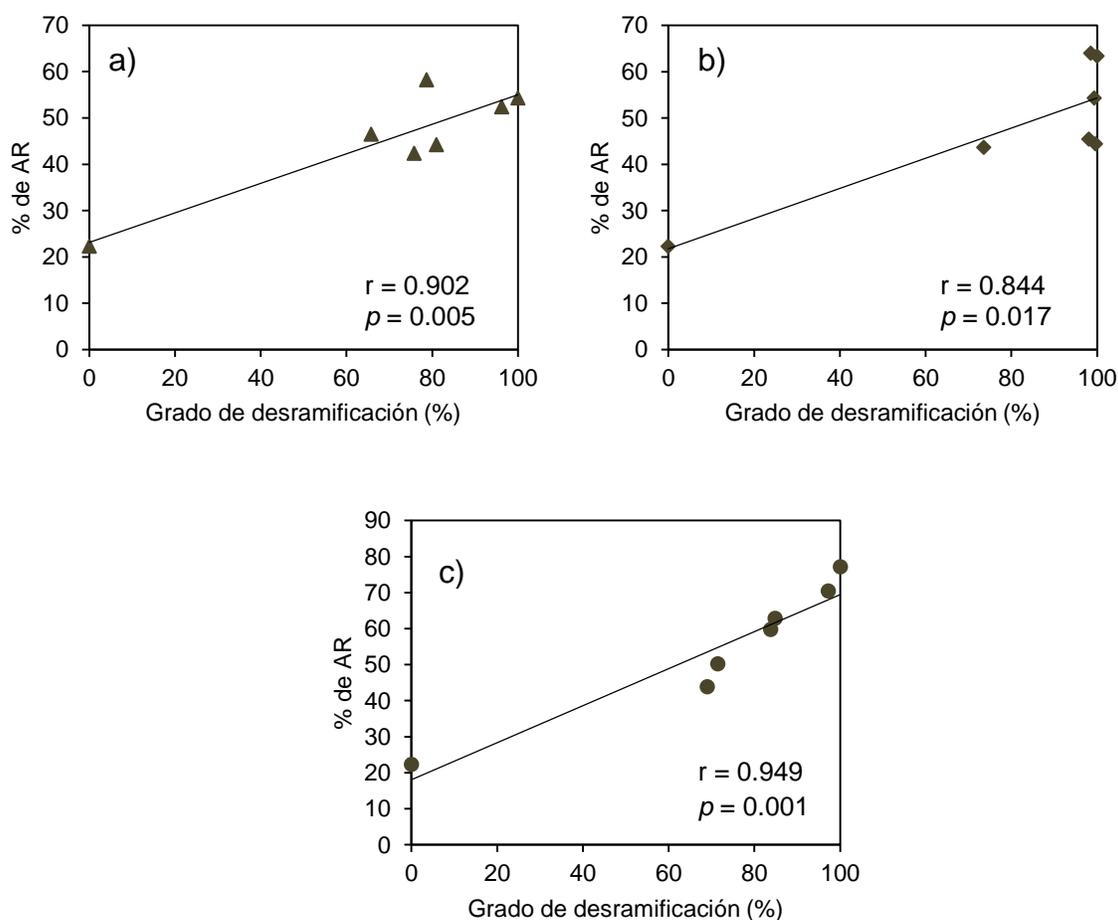


Figura 13. Correlación entre el contenido de AR de haba y el grado de desramificación con a) 6, b) 12 y c) 18 unidades de pululanasa por gramo de almidón (U/g).

Con 18 U/g, la cantidad de AR aumentó conforme el porcentaje de desramificación incrementaba, obteniendo el máximo contenido de AR (77.12 ± 0.51) al máximo grado de desramificación (100%), a diferencia de lo que sucedió con 12 U/g. En esta concentración enzimática se alcanzó el comportamiento lineal (máxima desramificación) desde las 6 h ($98.09 \pm 4.09\%$), pero la cantidad de AR no incrementó al máximo a las 6 h ($45.47 \pm 0.04\%$), más bien, fue incrementando gradualmente, lo que permite atribuir la cantidad de AR a otras variables. Con 6 U/g se obtuvo la máxima cantidad de AR a las 9 horas ($58.22 \pm 0.34\%$), posteriormente disminuyó y llegó a $54.31 \pm 0.06\%$ a las 27 h, todo esto mientras el grado de desramificación aumentaba. Resultados similares fueron observados por Shin, Choi et al. (2004) donde el contenido de AR en muestras de sorgo céreo aumentó proporcionalmente al tiempo de desramificación con isoamilasa, obteniendo $17.6 \pm 0.4\%$ de AR a las 4 h de tratamiento con un grado de desramificación del 31.4% y del $74.4 \pm 1.7\%$ de AR a las 24 h con un grado de desramificación del 100%. Guraya et al. (2001), también observaron incremento del AR conforme el tiempo de desramificación aumentaba en muestras de arroz y arroz céreo. Finalmente, Pongjantal et al. (2008) sugirieron que elevadas concentraciones de pululanasa (EC 3.2.1.41) y poco tiempo de tratamiento, incrementaban la cantidad de ABD, mientras que un tiempo de desramificación más largo y completo promovía la producción de AR en almidón de arroz rico en amilosa.

8.4. Propiedades nutrimentales de los almidones

8.4.1. Almidón digerible, almidón resistente y almidón total

La tabla 11 muestra las fracciones de almidón digerible (AD), almidón resistente (AR) y almidón total (AT) en las muestras nativas y retrogradadas. Pudieron observarse grandes diferencias ($p < 0.05$) entre las muestras. El AD en las muestras nativas fue mayor en el haba (MN) y frijol (FN), y menor en el haba (HN). Después del tratamiento, el contenido de AD disminuyó proporcionalmente al aumento del AR en todas las muestras, probablemente debido al efecto combinado de la desramificación y la retrogradación (Babu y Parimalavally, 2016; Vatanasuchart et al., 2010). El AR en las muestras nativas fue mayor en el haba (HN) y frijol (FN) y menor en el maíz (MN). Los elevados contenidos de AR en estas muestras se deben a que, en presencia de calor,

los enlaces de hidrógeno inter e intramoleculares entre las cadenas de almidón se interrumpen, permitiendo que los gránulos se hinchen y luego se desintegren, incrementando la disponibilidad de las cadenas de almidón para las enzimas digestivas (Chung et al., 2006), sin embargo, en nuestro método de cuantificación se emplearon muestras sin gelatinizar. Las cantidades de AR en las muestras retrogradadas en el haba (HR) y el frijol (FR) fueron iguales y estadísticamente mayores a las de maíz (MR). El contenido de AT se mantuvo sin cambios y alcanzó casi el 100% en todos los casos por tratarse de almidones aislados.

Tabla 11. Contenido de almidón digerible (AD), almidón resistente (AR) y almidón total (AT) en muestras de haba, frijol y maíz

Muestras*	AD (%)	AR (%)	AT (%)
HN	77.42 ± 0.05 ^b	22.67 ± 0.29 ^d	100.09 ± 0.24 ^a
HR	35.21 ± 0.26 ^e	64.88 ± 0.02 ^a	100.09 ± 0.24 ^a
FN	76.27 ± 0.47 ^c	23.27 ± 0.16 ^c	99.55 ± 0.31 ^a
FR	34.70 ± 0.44 ^e	64.84 ± 0.13 ^a	99.55 ± 0.31 ^a
MN	79.80 ± 0.19 ^a	18.03 ± 0.09 ^e	97.84 ± 0.28 ^b
MR	39.39 ± 0.55 ^d	58.44 ± 0.27 ^b	97.84 ± 0.28 ^b

*HN almidón nativo de haba; HR almidón retrogradado de haba; FN almidón nativo de frijol; FR almidón retrogradado de frijol; MN almidón nativo de maíz; MR almidón retrogradado de maíz. Las muestras se prepararon con las condiciones establecidas para la producción de AR de haba (18 U/g de enzima, 27 horas de desramificación, 6 días de almacenamiento a 20°C).

Medias con letras iguales en la misma columna no son estadísticamente diferentes (Prueba de Duncan, $p < 0.05$).

Esta tendencia también fue observada por Li, Fu et al. (2017) en su estudio con almidón de chufa (*Cyperus esculentus*) donde encontraron que, después del tratamiento con pululanasa, los contenidos de AR y ABD incrementaron, al mismo tiempo que el contenido de almidón de rápida digestibilidad (ARD) disminuyó. Babu y Parimalavally (2016) y Shin, Choi et al. (2004) observaron fenómenos similares en almidones de papa y sorgo, respectivamente. Las estructuras cristalinas parcialmente ordenadas en los almidones desramificados (anteriormente discutidas) se han considerado como la posible razón de la disminución de la fracción AD (Li, Fu et al., 2017).

8.4.2. Digestibilidad *in vitro*

8.4.2.1. Porcentaje de hidrólisis

La figura 14 muestra los patrones de hidrólisis de los almidones nativos gelatinizados y los gelatinizados retrogradados de haba (HN y HR), frijol (FN y FR) y maíz (MN y MR) y su comparación con la hidrólisis del pan blanco (PB), utilizado como referencia. Los patrones de digestibilidad fueron muy similares en el haba, y un poco más distintos en el frijol y el maíz. Al tratarse de almidones extraídos de los granos enteros, sus porcentajes de hidrólisis se mostraron superiores a la referencia (pan blanco) y aunque las muestras retrogradadas mostraron porcentajes de hidrólisis más bajos que los nativos, esta diferencia no fue tan pronunciada como se esperaba. En las muestras de haba, se observa que el almidón nativo tuvo un porcentaje máximo de hidrólisis del 93% mientras que en el almidón retrogradado fue del 85% aproximadamente (figura 14a). El frijol, sin embargo, mostró porcentajes de hidrólisis del 100 y del 90% en las muestras nativas y retrogradadas, respectivamente, y denota las más claras diferencias entre FN, FR y PB (figura 14b). Por su parte, el maíz nativo alcanzó el porcentaje promedio de hidrólisis del 94% a los 150 minutos y el retrogradado de 90% aproximadamente. El porcentaje de hidrólisis más alto en almidones nativos lo alcanzó el frijol y el más bajo el haba. En las muestras retrogradadas nuevamente el porcentaje más alto lo mostró el frijol y el más bajo el haba. Los porcentajes máximos de hidrólisis de los almidones nativos gelatinizados de haba, frijol y maíz (92.66 ± 2.00 , 102.29 ± 0.52 y 93.80 ± 1.83 , respectivamente) fueron similares a los observados por Chung, Lim y Lim (2006) en muestras gelatinizadas de arroz céreo ($96.3 \pm 0.9\%$), quienes tampoco observaron diferencias en la hidrólisis de almidones gelatinizados y retrogradados a 4°C por 2, 4 y 7 días, aunque no emplearon desramificación enzimática. En contraste, Sandhu y Lim (2008) encontraron porcentajes de digestibilidad muy bajos con respecto a los nuestros en diferentes almidones de leguminosas sin gelatinizar.

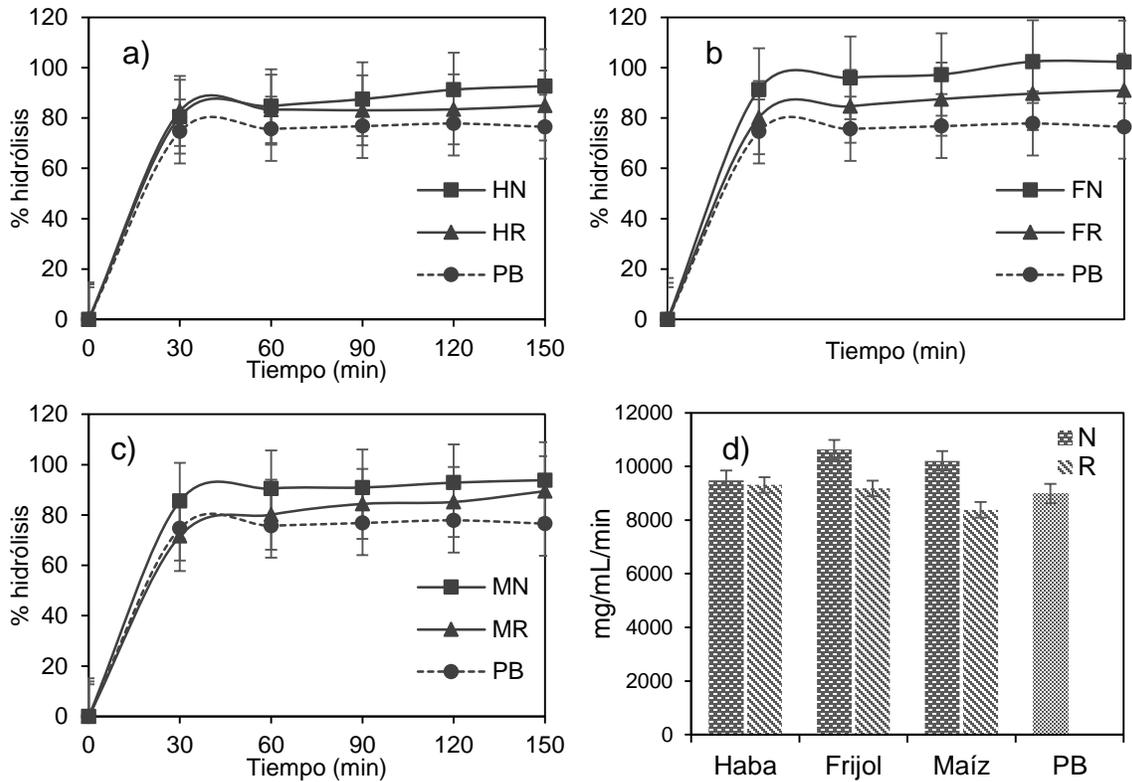


Figura 14. a) Porcentaje de hidrólisis de almidón de haba nativo (HN) y retrogradado (HR) y pan blanco (PB, referencia); b) Porcentaje de hidrólisis de almidón de frijol nativo (FN) y retrogradado (FR) y pan blanco (PB, referencia); c) Porcentaje de hidrólisis de almidón de maíz nativo (MN) y retrogradado (MR) y pan blanco (PB, referencia); d) Áreas bajo la curva de hidrólisis de muestras nativas (N) y retrogradadas (R) y de pan blanco (PB, referencia).

A los 30 minutos, la única muestra que se situó por debajo de la referencia e incluso por debajo de la muestra nativa fue MR, pero posteriormente adquirió un comportamiento ascendente hasta alcanzar casi el porcentaje de hidrólisis de MN (figura 14c). Este comportamiento se asemeja más al de un almidón de baja digestibilidad que a un resistente. FR mostró un comportamiento similar incrementando del 80 al 90% en el tiempo de digestión. Es de interés que el haba retrogradada (HR) se mantuvo prácticamente sin cambios a lo largo de la cinética, yendo del 83 al 85% en todo el tiempo de digestión, lo cual corresponde al comportamiento del AR. En resumen, todas las muestras (nativas y retrogradadas), mostraron incrementos aproximados del 10% entre la primera lectura (a los 30 min) y la última (a los 150 min), con excepción de MT que mostró un incremento del 20%. En HT hubo un incremento del 2% únicamente, lo cual denota un comportamiento lineal desde los primeros 30 minutos (máxima hidrólisis), presumiblemente debido a que el tratamiento combinado

(gelatinización, desramificación y retrogradación) logró reestructurar las moléculas modificadas por la enzima, impidiendo en cierta medida, la hidrólisis por parte de las enzimas amilolíticas.

8.4.2.2. Índice de hidrólisis y estimación del Índice Glucémico

En la tabla 12 se reportan los datos de la concentración de equilibrio (C_{∞}), la constante cinética (k), el área bajo la curva de hidrólisis (ABC), el índice de hidrólisis (IH) y la estimación del índice glucémico (IG_e) de los almidones nativos y retrogradados de haba (HN y HR), frijol (FN y FR) y maíz (MN y MR), calculados a partir del porcentaje de hidrólisis (PH). Se registraron diferencias significativas ($p < 0.05$), pero en todos los casos, la C_{∞} , entendida como la concentración de almidón hidrolizado al tiempo máximo (150 min), fue mayor en los almidones nativos que en los retrogradados; hallazgos que coinciden con los obtenidos por Chung et al., 2006 de almidón de arroz céreo. La constante cinética (k) mostró el valor más alto en MN y el más bajo en MR, misma que fue menor en HN y en FR (tabla 12) y no hubo diferencia estadística entre las muestras nativas y retrogradadas con excepción del maíz (MN y MR). Los valores más elevados de k indican que la hidrólisis se llevó a cabo más rápidamente mientras que los valores más bajos se deben a la resistencia enzimática, con excepción del haba, donde la k fue mayor en la muestra retrogradada (HR). El ABC de hidrólisis fue mayor en los almidones nativos, mostrando diferencias significativas ($p < 0.05$) con respecto a los retrogradados con excepción del haba, cuyos valores fueron estadísticamente iguales ($p < 0.05$) (figura 14d). El índice de hidrólisis (IH), calculado con base en la digestibilidad del pan blanco (PB, no presentado en tabla), no mostró diferencias ($p < 0.05$) entre las muestras de haba ni de frijol, pero sí en las de maíz (tabla 12). En todos los casos se superó el 100%. Por último, la estimación del índice glucémico (IG_e) fue igual ($p < 0.05$) en las muestras de haba (HN y HR) y frijol (FN y FR) pero no así en las de maíz (tabla 12).

En condiciones *in vivo*, los almidones de leguminosas promueven lentas y moderadas respuestas glucémicas e insulinémica, y tienen bajos valores de IG comparados con los cereales (García-Alonso et al., 1998; Sandhu y Lim, 2008), sin embargo, en nuestra determinación de la digestibilidad *in vitro*, los resultados parecen bastante similares, lo

cual podría deberse a las limitaciones del modelo. Por ejemplo, Sandhu y Lim (2008) evaluaron el IH y el IG en almidones de distintas leguminosas y sus resultados oscilaron entre 8.2 y 20.0 para IH y entre 44.2 y 50.7 para IG, sin embargo, aunque su método fue igual al nuestro (Goñi et al., 1997), las determinaciones se llevaron a cabo en almidones no gelatinizados y únicamente en muestras nativas.

Tabla 12. Concentración de equilibrio (C_{∞}), constante cinética (k), área bajo la curva (ABC), índice de hidrólisis (IH) y estimación del índice glucémico (IG_e) de almidones nativos y retrogradados de haba, frijol y maíz

* C_{∞} (%)**	K **	ABC (mg/mL)**	IH****	IG_e *****
HN 92.66±2.00 ^{bc}	0.107±0.014 ^{abc}	9486.91±235.77 ^b	104.48±5.45 ^{bc}	97.07±2.99 ^{bc}
HR 84.91±0.92 ^d	0.120±0.008 ^{ab}	9311.38±105.88 ^b	103.03±1.96 ^{bc}	96.27±1.08 ^{bc}
FN 102.29±0.52 ^a	0.109±0.014 ^{abc}	10627.68±399.29 ^a	116.98±4.88 ^a	103.93±2.68 ^a
FR 90.97±0.27 ^{bc}	0.098±0.002 ^{bc}	9182.46±9.67 ^b	107.11±1.05 ^{abc}	98.51±0.57 ^{abc}
MN 93.80±1.83 ^b	0.123±0.001 ^a	10210.77±114.45 ^a	113.21±7.75 ^{ab}	101.86±4.26 ^{ab}
MR 89.42±1.40 ^c	0.087±0.005 ^c	8381.14±279.41 ^c	100.19±3.27 ^c	94.71±1.80 ^c

*HN almidón nativo de haba; HR almidón retrogradado de haba; FN almidón nativo de frijol; FR almidón retrogradado de frijol; MN almidón nativo de maíz; MR almidón retrogradado de maíz
Medias con letras iguales en la misma columna no son estadísticamente diferentes (Prueba de Duncan, $p < 0.05$)

** C_{∞} y k se calcularon con la ecuación $C=C_{\infty}(1-e^{-kt})$

***ABC se calculó como $ABC_{0^{\infty}}=C_{0^{\infty}}(t-t_0) - C_{\infty}/k(1-e^{-kt})$

****El IH se calculó como $IH=ABC \text{ almidón}/ABC \text{ pan blanco} (100)$

*****El IG_e se estimó mediante la ecuación $IG_e=39.71+0.549 (IH)$

La digestibilidad del almidón medida *in vivo* es un proceso largo y caro que requiere la participación de muchos sujetos humanos con atributos específicos. Dado que no hay dependencia del humano en la medición de la digestión del almidón *in vitro*, la investigación de la digestibilidad *in vitro* como sustituto de la IG es un tema cada vez más investigado (Dona et al., 2010; Goñi et al., 1997). Sin embargo, en nuestro estudio, el PH, el ABC, el IH y el IG_e en las muestras retrogradadas no disminuyeron considerablemente con respecto a las muestras nativas (tabla 12 y figura 14) lo cual puede ser atribuido a diferentes situaciones. Primeramente, el método descrito por Goñi et al. (1997), al parecer está diseñado para la determinación de la digestibilidad de alimentos más no de almidones aislados. Esta digestibilidad, como primer punto, se vio incrementada al eliminar partes de la semilla en el aislamiento de los gránulos puesto que componentes como la fibra, la proteína y los taninos, por citar algunos, disminuyen la digestibilidad de las leguminosas enteras (Sandhu y Lim, 2008). Teóricamente, esto debería afectar la medición de la digestibilidad de los gránulos nativos, pero no la de los retrogradados puesto que éstos últimos han sido sometidos

a tratamientos que los vuelven resistentes a la digestión enzimática, sin embargo, en el proceso de la cinética, las muestras fueron sometidas a temperatura de ebullición para la inactivación enzimática de la alfa amilasa y posteriormente nuevamente a hidrólisis con amiloglucosidasa, según el método. Esta “re-gelatinización” de las muestras retrogradadas, ya modificadas estructuralmente por la gelatinización y desramificación previas, pudo ocasionar que la digestión *in vitro* fuera mucho mayor. Por ejemplo, Eerlingen, Jacobs et al. (1994) establecieron que si la digestibilidad del almidón se determina como la fracción que supera la incubación con una α -amilasa termoestable a 100°C, no se puede detectar AR, porque el orden molecular en la amilopectina retrogradada se perdería a esta alta temperatura. Los problemas en los métodos de determinación se han observado incluso en almidones modificados, cuyo contenido de AR generalmente se incrementa (Singh, Dartois y Kaur, 2010). Singh et al. (2010), sugirieron que la reticulación (para formar un almidón modificado) no afecta en gran medida su digestibilidad. Fabbri et al. (2016), también atribuyeron la disminución en la resistencia enzimática de leguminosas enteras cocidas al exceso de temperatura.

Por otro lado, se ha discutido anteriormente que la cristalización del almidón incluye la retrogradación a corto plazo de la amilosa y la retrogradación a largo plazo de la amilopectina (Haralampu, 2000; Zhang et al., 2008). Esto implica que las dobles hélices de amilosa se agregan y forman una estructura cristalina termoestable que es rehidratada sólo a temperaturas superiores a los 120°C (Raigond et al., 2014), las cuales son menores si las cadenas son cortas (Birt et al., 2013), no obstante, las cadenas de amilopectina, como se ha mencionado antes, retrogradan diferente. La retrogradación de esta molécula, por el contrario, es reversible entre 55-70°C (Raigond et al., 2014; Zhang et al., 2008). En nuestro estudio, atribuimos las elevadas cantidades de AR obtenidas a la amilosa, pero también a la desramificación de la molécula de amilopectina. Entonces, en la determinación de la digestibilidad del AR, se superó la temperatura de rehidratación de la amilopectina y se acercó a la de la amilosa, con lo cual las cadenas moleculares volvieron a ser enzimáticamente disponibles. Esto no necesariamente indica que la digestibilidad entre las muestras no cambió, puesto que en la mayoría de los productos alimenticios almidonosos, la

reducción del índice glucémico (IG) parece estar acompañada de elevados contenidos de AR (Pongjantal et al., 2008), más bien implicaría que el método de análisis debe ser modificado para este tipo de sustratos aislados, evitando, por ejemplo, las temperaturas de ebullición, las cuales no están presentes en un sistema *in vivo*.

Por último, en los procesos *in vitro* comúnmente se usa amiloglucosidasa fúngica o bacteriana en exceso como un paso final para convertir las dextrinas y maltosa limitantes producidas por la acción de la α -amilasa en glucosa, lo que contrasta con el sistema *in vivo* en el que las enzimas de la mucosa hidrolizan los productos de la acción de la amilasa a glucosa. Esto en conjunto con la descripción cinética de la reacción podría revelar una tasa de hidrólisis mayor a la que se obtendría *in vivo* (Dhital, Warren, Butterworth, Ellis y Gigley, 2017).

9. CONCLUSIONES

La cantidad de AR aumentó proporcionalmente a la concentración enzimática, tiempo de incubación (hidrólisis o desramificación) y al tiempo y temperatura de almacenamiento, sin embargo, las mayores cantidades de este material se obtuvieron almacenando las muestras 3 días a 2°C. Por lo tanto, se establecieron las condiciones óptimas de preparación de AR III a partir de almidón nativo de haba como: tratamiento desramificante con 18 unidades de pululanasa/gramo de almidón durante 27 horas y 3 días de almacenamiento a temperatura de refrigeración (2°C), obteniendo un producto óptimo con el 77.12±0.51% de AR.

El tratamiento de desramificación y el almacenamiento modificaron la estructura granular del almidón y dieron lugar a estructuras amorfas compactas que fueron responsables de la resistencia amilolítica. La cantidad de AR se correlacionó positivamente con el GD. El AR fue mayor en las muestras con mayor contenido de amilosa (haba y frijol) y menor en el maíz, esto debido a la disponibilidad de una mayor cantidad de moléculas lineales que intervinieron en la retrogradación.

En general, el tratamiento térmico-enzimático disminuyó la cantidad de AD en el haba, el frijol y el maíz, y aumentó significativamente su contenido de AR. El AT no se modificó. La digestibilidad *in vitro* entre los almidones nativos y tratados no cambió significativamente en el haba ni en el frijol, sin embargo, el maíz mostró las mayores diferencias, lo cual hace necesaria la adecuación de los métodos *in vitro* y el estudio del comportamiento de los materiales en sistemas *in vivo*.

Resulta necesaria la realización de pruebas adicionales como la determinación del grado de polimerización (GP) de las cadenas de amilosa y de amilopectina, la difracción de rayos X y la calorimetría diferencial de barrido (CDB), que permitan establecer mejores relaciones entre las modificaciones que sufren los almidones y la cantidad máxima de AR que se puede obtener de ellos. Asimismo, la evaluación del material en un modelo biológico permitiría ampliar el panorama en torno a los beneficios a la salud que este almidón en específico puede aportar.

El almidón de haba es una opción viable para la producción de AR III puesto que se han obtenido cantidades elevadas de este producto, por lo consiguiente, la creación de alimentos amiláceos ricos en AR de haba, que apoyen al tratamiento de enfermedades metabólicas como la diabetes, es una estrategia no farmacológica prometedora.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahmed, F., y Urooj, A. (2008). In vitro starch digestibility and nutritionally important starch fractions in processed roots and tubers. *Starch/Stärke*, 60(9), 493–499.
- Association of Official Analytical Chemists. (2005). Official Methods of Analysis of the AOAC, Arlington, Estados Unidos de América: 18° Ed. AOAC.
- Babu, A. S., y Parimalavalli, R. (2016). Effect of pullulanase debranching and storage temperatures on structural characteristics and digestibility of sweet potato starch. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, In press, 1-9.
- Bello-Pérez, L. A., y Paredes-López, O. (1996). Starch and amylopectin-effects of solutes on clarity of pastes. *Starch/Stärke*, 48(6), 205-207.
- Bello-Pérez, L. A., y Paredes-López, O. (2009). Starches of some food crops, changes during processing and their nutraceutical potential. *Food Engineering Reviews*, 1, 50-65.
- Berry, C. S. (1986). Resistant starch: Formation and measurement of starch that survives exhaustive digestion with amylolytic enzymes during the determination of dietary fibre. *Journal of Cereal Science*, 4(4), 301–314.
- Birt, D. F., Boylston, T., Hendrich, S., Jane, J. L., Hollis J., Li, L., McClelland, J., Moore, S., Phillips, G. J., Rowling, M., Schalinske, K., Scott, M. P., y Whitley, E. M. (2013). Resistant Starch: Promise for Improving Human Health. *Advances in nutrition*, 4(6), 587-601.
- Cai, L., y Shi, Y. C. (2014). Preparation, structure, and digestibility of crystalline A- and B- type aggregates from debranched waxy starches. *Carbohydrate Polymers*, 105, 341-350.
- Chung, H. J., Lim, H. S. y Lim, S. T. (2006). Effect of partial gelatinization and retrogradation on the enzymatic digestion of waxy rice starch. *Journal of Cereal Science*, 43, 353-359.

- Chun-Kuang, S., Shi-Hong, C., Wen-Chi, H., y Hsing-Hsien, C. (2007). A high-resistance-starch rice diet reduces glycosylated hemoglobin levels and improves the antioxidant status in diabetic rats. *Food Research International*, 40(7), 842–847.
- Cuerda, C., Luengo, L. M., Valero, M. A., Vidal, A., Burgos, R., Calvo, F. L., y Martínez C. (2011). Antioxidantes y diabetes mellitus: revisión de la evidencia. *Nutrición Hospitalaria*, 26(1), 68-78.
- Dhital, S., Warren, F. J., Butterworth, P. J., Ellis, P. R., Gigley, M. J. (2017). Mechanisms of starch digestion by α -amylase-structural basis for kinetic properties. *Critical reviews in food science and nutrition*, 57(5), 875-892.
- Dona, A. C., Pages, G., Gilbert, R. G., y Kuchel, P. W. (2010). Digestion of starch: In vivo and in vitro kinetic models used to characterize oligosaccharide or glucose release. *Carbohydrate Polymers*, 80, 599-67.
- Duc, G. (1997). Faba bean (*Vicia faba* L.). *Field Crops Research*, 53, 99-109.
- Dundar, A. N., y Gocmen, D. (2013). Effects of autoclaving temperature and storing time on resistant starch formation and its functional and physicochemical properties. *Carbohydrate Polymers*, 97, 764-771.
- Eerlingen, R. C., Crombez, M., y Delcour, J. A. (1993). Enzyme resistant starch. Quantitative and qualitative influence of incubation time and temperature of autoclaved starch on resistant starch formation. *Cereal Chemistry*, 70, 339-344.
- Eerlingen, R. C., Jacobs, H., y Delcour, J. A. (1994). Enzyme-resistant starch. V. Effect of retrogradation of waxy maize starch on enzyme susceptibility. *Cereal Chemistry*, 71(4), 351-355.
- Eerlingen, R. C., Van den Broeck, I., Delcour, J. A., y Levine, H. (1994). Enzyme resistant starch. VI. Influence of sugars on resistant starch formation. *Cereal Chemistry*, 71(5), 472-476.

- Englyst, H. N., Kingman, S. M., y Cummings J. H. (1992). Classification and measurement of nutritionally important starch fractions. *European Journal of Clinical Nutrition*, 46(2), S33-S50.
- Englyst, H. N., Veenstra, J., y Hudson, G. J. (1996). Measurement of rapidly available glucose (RAG) in plant foods: a potential in vitro predictor of glycaemic response. *British Journal of Nutrition*, 75(3), 327–337.
- Englyst, K. N., Englyst, H. N., Hudson, G. J., Cole, T. J., y Cummings, J. H. (1999). Rapidly available glucose in foods: an in vitro measurement that reflects the glycemic response. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 69(3), 448–454.
- Fabbri, A. D. T., Schacht, R. W., y Crosby G. A. (2016). Evaluation of resistant starch content of cooked black beans, pinto beans and chickpeas. *NFS Journal*, 3, 8-12.
- Fuentes-Zaragoza, E., Riquelme-Navarrete, M. J., Sánchez-Zapata, E., y Pérez-Álvarez, J. A. (2010). Resistant starch as functional ingredient: a review. *Food Research International*, 43 (4), 931–942.
- Gao, Q., Li, S., Jian, H., y Liang, S. (2011). Preparation and properties of resistant starch from corn starch with enzymes. *African Journal of Biotechnology*, 10(7), 1186-1193.
- García-Alonso, A., Goñi, I., y Saura-Calixto, F. (1998). Resistant starch and potential glycaemic index of raw and cooked legumes (lentils, chickpeas and beans). *European Food Research and Technology*, 206(4), 284-287.
- Giménez, M. A., González, R. J., Wagner, J., Torres, R., Lobo, M. O., y Samman, N. C. (2013). Effect of extrusion conditions on physicochemical and sensorial properties of corn-broad beans (*Vicia faba*) spaghetti type pasta. *Food Chemistry*, 136, 538-545.

- Giuberti, G., Gallo, A., Fortunati, P., y Rossi, F. (2015). Influence of high-amylose maize starch addition on in vitro starch digestibility and sensory characteristics of cookies. *Starch/Stärke*, 67, 1–7.
- Goñi, I., García-Alonso, A., y Saura-Calixto, F. (1997). A starch hydrolysis procedure to estimate glycemic index. *Nutrition Research*, 17(3), 427–437.
- Goñi, I., García-Diz, L., Mañas, E., y Saura-Calixto, F. (1996). Analysis of resistant starch: a method for foods and food products. *Food Chemistry*, 56(4), 445–449.
- Goyoaga, J. C. (2005). Estudio de factores no nutritivos en Vicia faba I. Influencia de la germinación sobre su valor nutritivo. (Tesis doctoral). Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España.
- Granfeldt, Y., Björck, I., Drews, A., y Tovar, J. (1992). An in vitro procedure based on chewing to predict metabolic response to starch in cereal and legume products. *European Journal of Clinical Nutrition*, 46(9), 649–660.
- Guillon, F., y Champ, M. M. (2002). Carbohydrate fractions of legumes: uses in human nutrition and potential for health. *The British Journal of Nutrition*, 88(3), S293–S306.
- Guo, Z., Jia, X., Zhao, B., Zeng, S., Xiao, J., y Zheng, B. (2017). C-type starches and their derivatives: structure and function. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1-15.
- Guraya, H. S., James, C. y Champagne, E. T. (2001) Effect of enzyme concentration and storage temperature of the formation of slowly digestible starch from cooked debranched rice starch. *Starch/Stärke*, 53, 131–139.
- Haralampu, S. G. (2000). Resistant starch—a review of the physical properties and biological impact of RS3. *Carbohydrate Polymers*, 41(3), 285-292.
- Hii, S. L., Tan, J. S., Ling, T. C., y Ariff, A. B. (2012). Pullulanase: role in starch hydrolysis and potential industrial applications. *Enzyme Research*, 2012, 1-14.

- Homayouni, A., Amini, A., Khodavirdivand-Keshtiban, A., Mohammad-Mortazavian, A., Esazadeh, K., y Pourmoradian, S. (2014). Resistant starch in food industry: a changing outlook for consumer and producer. *Starch/Stärke*, 66(1-2), 102-114.
- Hoover, R., Hughes, T., Chung, H. J., y Liu, Q. (2010). Composition, molecular structure, properties, and modification of pulse starches: a review. *Food Research International*, 43(2), 399-413.
- Hoover, R., y Ratnayake, W. S. (2002). Starch characteristics of black bean, chick pea, lentil, navy bean and pinto bean cultivars grown in Canada. *Food Chemistry*, 78(4), 489-498.
- Hussain, A., Claussen, B., Ramachandran, A., y Williams, R. (2007). Prevention of type 2 diabetes: a review. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 76(3), 317-326.
- Keenan, M. J., Zhou, J., Hegsted, M., Pelkman, C., Durham, H. A., Coulon, D. B., y Martin R. J. (2015). Role of resistant starch in improving gut health, adiposity, and insulin resistance. *Advances in Nutrition*, 6, 198–205.
- Kim, W. K., Chung, M. K., Kang, N. E., Kim, M. H., y Park, O. J. (2003). Effect of resistant starch from corn or rice on glucose control, colonic events, and blood lipid concentrations in streptozotocin-induced diabetic rats. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 14(3), 166–172.
- Klosterbuer, A. S., Thomas, W., y Slavin, J. L. (2012). resistant starch and pullulan reduce postprandial glucose, insulin, and GLP-1, but have no effect on satiety in healthy humans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(48), 11928–11934.
- Lee, S. K., Mun, S. H., y Shin, M. S. (1997). Effect of heating conditions on the resistant starch formation. *Korean Agricultural Chemistry and Biotechnology*, 40, 220–224.

- Lehmann, U., Rössler, C., Schmiedl, D., y Jacobasch, G. (2003). Production and physicochemical characterization of resistant starch type III derived from pea starch. *Nahrung/Food*, 47(1), 60–63.
- Lertwanawatana, P., Fraizer, R. A., y Niranjana, K. (2015). High pressure intensification of cassava resistant starch (RS3) yields. *Food Chemistry*, 181, 85-93.
- Lilia-Baby, Suman, K. T., Krishnan, S. y Indira, V. (2016). Effect of autoclaving and cooling on resistant starch formation in rice starch. *Asian Journal of Dairy and Food Research*, 35(2), 137-142.
- Lindeboom, N., Chang, P. R., y Tyler, R. T. (2004). Analytical, biochemical and physicochemical aspects of starch granule size, with emphasis on small granule starches: a review. *Starch/Stärke*, 56(3-4), 89-99.
- Li, P., He, X., Dhital, S., Zhang, B., y Huang, Q. (2017). Structural and physicochemical properties of granular starches after treatment with debranching enzyme. *Carbohydrate Polymers*, 169, 351-356.
- Li, X., Fu, J., Wang, Y., Ma, F., y Li, D. (2017). Preparation of low digestible and viscoelastic tigernut (*Cyperus esculentus*) starch by *Bacillus acidopullulyticus* pullulanase. *International Journal of Biological Macromolecules*, 102, 651-657.
- Li, Y., Xu, J., Zhang, L., Ding, Z., Gu, Z., y Shi, G. (2017). Investigation of debranching pattern of a thermostable isoamylase and its application for the production of resistant starch. *Carbohydrate Research*, 446-447, 93-100.
- López, R. M. (2011). Cocinando habas en la Región Centro de México. ICAMEX (Instituto de investigación y Capacitación Agropecuaria, Acuícola y Forestal del Estado de México). Conjunto SEDAGRO, Metepec, México. pp. 3-5.

- Maki, K. C., Pelkman, C. L., Finocchiaro, E. T., Kelley, K. M., Lawless, A. L., Schild, A. L., y Rains, T. M. (2012). Resistant starch from high-amylose maize increases insulin sensitivity in overweight and obese men. *The Journal of Nutrition*, 142(4), 717-723.
- Miao, M., Jiang, B., y Zhang, T. (2009). Effect of pullulanase debranching and recrystallization on structure and digestibility of waxy maize starch. *Carbohydrate Polymers*, 76, 214-221.
- Milašinović, M. S., Radosavljević, M. M., y Dokić, L. P. (2010). Effects of autoclaving and pullulanase debranching on the resistant starch yield of normal maize starch. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 75(4), 449-458.
- Miranda-Villa, P. P., Marrugo-Ligardo, Y. A., y Montero-Castillo, P. M. (2013). Functional characterization of bean Zaragoza starch (*Phaseolus Lunatus L.*) and quantification of the resistant starch. *Tecno Lógicas*, 30, 17-32.
- Morales-Medina, R., Muñío, M. M., Guadix, E. M., y Guadix, A. (2014). Production of resistant starch by enzymatic debranching in legume flours. *Carbohydrate Polymers*, 101, 1176–1183.
- Morris, V. J. (1990). Starch gelation and retrogradation. *Trends in Food Science & Technology*, 1, 2-6.
- Nugent, A. P. (2005). Health properties of resistant starch. *Nutrition Bulletin*, 30(1), 27–54.
- Perera, A., Meda, V., y Tyler, R.T. (2010). Resistant starch: a review of analytical protocols for determining resistant starch and of factors affecting the resistant starch content of foods. *Food Research International*, 43(8), 1959-1974.
- Polesi, L.F., y Sarmiento, S. B. S. (2011). Structural and physicochemical characterization of RS prepared using hydrolysis and heat treatments of chickpea starch. *Starch/Stärke*, 63, 226-235.

- Pongjantal, J., Utaipatanacheep, A., Naivikul, O., y Piyachomkwan, K. (2008). Enzymes-resistant starch (RSIII) fom pullulanase-debranched high amylose rice starch. *Natural Science*, 42(5), 198-205.
- Raigond, P., Ezekiel, R., y Raigond, B. (2014). Resistant starch in food: a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95(10), 1968-1978.
- Rebello, C. J., Greenway, F. L., y Finley, J. W. (2014). Whole grains and pulses: a comparison of the nutritional and health benefits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(29), 7029–7049.
- Reddy, C. K., Suriya, M., y Haripriya, S. (2013). Physico-chemical and functional properties of Resistant starch prepared from red kidney beans (*Phaseolus vulgaris L.*) starch by enzymatic food. *Carbohydrate Polymers*, 95, 220-226.
- Reddy, C. K., Suriya, M., Vidya, P. V., y Haripriya, S. (2017). Synthesis and physico-chemical characterization of modified starches from banana (*Musa AAB*) and its biological activities in diabetic rats. *International Journal of Biological Macromolecules*, 94, 500-507.
- Sajilata, M. G., Singhal, R. S., y Kulkarni, P. R. (2006). Resistant starch-a review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 5(1), 1-17.
- Sandhu, K. S., y Lim, S. T. (2008). Digestibility of legume starches as influenced by their physical and structural properties. *Carbohydrate Polymers*, 71(2), 245–252.
- Sharma, A., Sing-Yadav, B., y Ritika. (2008). Resistant starch: physiological roles and food applications. *Food Reviews International*, 24(2), 193-234.
- Shin, S., Byun, J., Park, K. H., y Moon, T. W. (2004). Effect of partial acid hydrolysis and heat-moisture treatment on formation of resistant tuber starch. *Cereal Chemistry Journal*, 81(2), 194-198.

- Shin, S. I., Choi, H. J., Chung, K. M., Hamaker, B. R., Park, K. H., y Moon, T. W. (2004). Slowly digestible starch from debranched waxy sorghum starch: preparation and properties. *Cereal Chemistry*, 81(3), 404-408.
- Sievert, D., y Pomeranz, Y. (1989). Enzyme-resistant starch. I. Characterization and evaluation by enzymatic, thermoanalytical, and microscopic methods. *Cereal Chemistry*, 66(4), 342-347.
- Silva-Cristóbal, L., Osorio-Díaz, P., y Bello-Pérez, L. (2007). Digestibilidad del almidón en haba (*Vicia faba* L.). *Agrociencia*, 41(8), 845-852.
- Singh, J., Dartois, A. y Kaur, L. (2010). Starch digestibility in food matrix: a review. *Trends in food Science & Technology*, 21, 168-180.
- Singh, N., Kaur, M., Sandhu, K. S., y Guraya, H. S. (2004). Physicochemical, thermal, morphological, and pasting properties of starches from some indian black gram (*Phaseolus mungo* L.) cultivars. *Starch/Stärke*, 56(11), 535-544.
- Suarez-Diéguéz, T., Palma-Orozco, G., Güemes-Vera, N., y Mendoza-Pérez, J. (2009). Development and characterization of a functional material of low digestibility of starch for be used in food processing low glycemic index. *Cereal Foods World*, 54(4), A1-A79.
- Suarez-Diéguéz, T., Palma-Orozco, G., y Nájera-Peña, H. (2009). Almidón ¿aliado o enemigo? *Revista Ciencia y Desarrollo*, 35(227); 22-27.
- Suarez-Diéguéz, T., Soriano-García, M., Anaya-Sosa, I., y Cruz y Victoria, M. T. (2009). Comparative studies of two α -amylases acting on two sorghum hybrids starches (Monticello's hybrid 2 and 3) and their significant differences in their catalytic activities. *Carbohydrate Polymers*, 75(3), 538-540.
- Tharanathan, R. N. (2005). Starch -- value addition by modification. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45(5), 371-384.
- Tharanathan, R. N., y Mahadevamma, S. (2003). Grain legumes -- a boon to human nutrition. *Trends in Food Science and Technology*, 14(12), 507-518.

- Tester, R. F., Karkalas, J., y Qi, X. (2004). Starch structure and digestibility enzyme-substrate relationship. *Words Poultry Science Journal*, 60(2), 186-195.
- Tovar, J., Melito, C., Herrera, E., Rascón, A., y Pérez, E. (2002). Resistant starch formation does not parallel syneresis tendency in different starch gels. *Food Chemistry*, 76(4), 455-459.
- United States Department of Agriculture (2016). Agricultural Research Service. National Nutrient Database for Standard Reference Release 27. Dirección: <http://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods>; Acceso: 30/04/2016; Actualización: 29/8/2015.
- Uthumporn, U., Shariffa, Y. N., y Karim, A. A. (2012). Hydrolysis of native and heat-treated starches and sub-gelatinization temperature using granular starch hydrolyzing enzyme. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 166, 1167-1182.
- Vargas-Torres, A., Osorio-Díaz, P., Agama-Acevedo, E., Morales-Franco, L., y Bello-Pérez, L. (2006). Digestibilidad del almidón en diferentes variedades de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). *Interciencia*, 31(12), 881-884.
- Vatanasuchart, N., Tungtrakul, P., Wongkrajang, K., y Naivikul, O. (2010). Properties of pullulanase debranched cassava starch and type-III resistant starch. *Natural Science*, 44(1), 131-141.
- Wang, L. Z., y White, P. J. (1994). Functional properties of oat starches and relationships among functional and structural characteristics. *Cereal Chemistry*, 71(5), 451-458.
- Wang, S., Li, C., Copeland, L., Niu, Q., y Wang, S. (2015). Starch retrogradation: a comprehensive review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 14, 568-585.

- Zamudio-Flores, P. B., Tirado-Gallegos, J. M., Monter-Miranda, J. G., Aparicio-Saguilán, A., Torruco-Uco, J. G., Salgado-Delgado, R., y Bello-Pérez L. A. (2015). Digestibilidad in vitro y propiedades térmicas, morfológicas y funcionales de harinas y almidones de avena de diferentes variedades. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 14(1), 81-97.
- Zemedelec 21 (2017). Evidencia de almidón en patatas. Dirección: <http://zemedelec21.cz/dukaz-skrobu-v-bramborach>; Acceso: 30/04/2016; Actualización: 2017.
- Zhang, G., y Hamaker, B. R. (1998). Low α -amylase starch digestibility of cooked sorghum flours and the effect of protein. *Cereal Chemistry*, 75(5), 710-713.
- Zhang, G., y Hamaker, B. R. (2009). Slowly digestible starch: concept, mechanism, and proposed extended glycemic index. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 49(10), 852-867.
- Zhang, G., Sofyan, M., y Hamaker, B. R. (2008). Slowly digestible state of starch: mechanism of slow digestion property of gelatinized maize starch. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 4695-4702.
- Zhang, H., y Jin, Z. (2011a). Preparation of products rich in resistant starch from maize starch by an enzymatic method. *Carbohydrate Polymers*, 86, 1610-1614.
- Zhang, H., y Jin, Z. (2011b). Preparation of resistant starch by hydrolysis of maize starch with pullulanase. *Carbohydrate Polymers*, 83(2), 865-867.
- Zhang, Y., y Rempel, C. (2012). Retrogradation and antiplasticization of thermoplastic starch. En El-Sonbati (Ed.), *Thermoplastic Elastomers* (pp.117–134). doi: 10.2772/35848
- Zhou, Y., Meng, S., Chen, D., Zhu, X., y Yuan, H. (2014). Structure characterization and hypoglycemic effects of dual modified resistant starch from indica rice starch. *Carbohydrate Polymers*, 103, 81-86.

- Zhou, Z., Wang, F., Ren, X., Wang, Y., y Blanchard, C. (2015). Resistant starch manipulated hyperglycemia/hyperlipidemia and related genes expression in diabetic rats. *International Journal of Biological Macromolecules*, 75, 316-321.
- Zhu, F. (2014). Structure, physicochemical properties, modifications, and uses of sorghum starch. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13, 597-610.
- Zia, F., Zia, K. M., Zuber, M., Kamal, S., y Aslam, N. (2015). Starch based polyurethanes: a critical review updating recent literature. *Carbohydrate Polymers*, 134, 784-798.