

**OPTIMIZACIÓN DE LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE ALMIDÓN DE GUANDUL
(*Cajanus cajan*): DETERMINACIÓN DE PROPIEDADES TECNOLÓGICAS DEL
HIDROLIZADO**

WILMAR FERNANDO ELVIRA TABARES

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
POPAYÁN
2013**

**OPTIMIZACIÓN DE LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE ALMIDÓN DE GUANDUL
(*Cajanus cajan*): DETERMINACIÓN DE PROPIEDADES TECNOLÓGICAS DEL
HIDROLIZADO**

**Trabajo de Grado
Presentado como requisito parcial para optar el título de Químico**

WILMAR FERNANDO ELVIRA TABARES

DIRECTOR

Ph D. Ricardo Benítez B.

**GRUPO DE INVESTIGACIÓN EN QUÍMICA DE PRODUCTOS NATURALES
Q.P.N.**

ASESOR

Ph D. Luis Alberto Lenis

**GRUPO DE INVESTIGACION EN QUÍMICA DE PRODUCTOS NATURALES
Q.P.N.**

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
POPAYÁN
2013**

Nota de aceptación

Director _____
Ph. D. Ricardo Benítez Benítez

Jurado1 _____
M Sc. José Luis Hoyos

Jurado 2 _____
M Sc. Sandra Ruby Rodríguez

Fecha de sustentación: Popayán, 26 de Abril del 2013

ACTO QUE DEDICO

- A: Dios: Por la vida, la salud y por ser el amigo por excelencia, porque sé que en sus planes estuvo esta fecha y porque sé que tiene un propósito muy especial para mi vida.
- A: Mi mamá: Nidia Amalfi Elvira: por tu apoyo incomparable, amor, consejos, regaños, pero sobre todo tu sabiduría; porque creíste en mí y sabías que podía lograrlo, gracias.
- A: Mi tío Víctor que a diario me fortalece con solo un pequeño gesto, por tu apoyo y amor. Por estar conmigo desde temprano y por tu gran ejemplo, gracias.
- A: Mi abuelita: María del Carmen (QEPD) que con su ternura, sencillez y amor me enseñó a ser una persona afectiva y humilde.
- A: Mi Familia: en especial a mis tíos Osman, Martha, Fanny, a mis primos Sebastián, Manuel, Favian, Angela, a mi madrina Licet y su familia, por todo su cariño, amor y buenos deseos, infinitas gracias.
- A: QPN, un grupo con excelente energía y buena dinámica de trabajo, conformado de compañeros y profesores con alta calidad humana.
- A: Mi novia María del Mar y su familia, siempre estuvieron pendientes de mi proceso y me brindaron apoyo y un lugar en su familia, mil gracias.
- A: Mis amigos: Paula mi mejor amiga y los amigos de la carrera Angélica, Katerine, Paola, Stefany, Marcela, Carolina, Cesar, Miguel, Sergio, Julián, Jonathan, Raúl, Luis, William, los llevo en el corazón porque con ustedes viví momentos buenos y malos que nunca se olvidaran.

AGRADECIMIENTO

A la Universidad del Cauca, por darme la oportunidad de aprendizaje.

A la Facultad de Ciencias Naturales Exactas y de la Educación, por permitirme estudiar en sus aulas y laboratorios, y formar en mí un nuevo profesional para Colombia.

A mi director: Ph.D. Ricardo Benítez, por su confianza en mis capacidades y la disponibilidad para ayudar en la realización de este trabajo de investigación.

A mi asesor: Ph.D Luis Alberto Lenis por su comprensión en la revisión para que este trabajo fuera hoy lo que es.

A la Facultad de Ciencias Agropecuarias por permitirme realizar análisis en los laboratorios de Biotecnología y Reología, en especial a los docentes José Luis Hoyos y Alcy René Cerón.

A la Unidad de Análisis Industrial, por facilitarme espacios en el laboratorio, a cargo del Químico Omar Miguel Portilla.

A mis padres, tíos y primos por creer en mí, por toda su ayuda, sus cuidados, su amor y por sobre todo por hacerme la persona que soy, por estar conmigo siempre en todo, Gracias.

A la familia Tejada López por brindarme apoyo y una familia en Popayán.

A mis amigos de carrera y de trabajo de grado por comprenderme, aguantarme y hacer que estos años de estudio sean inolvidables.

	CONTENIDO	Pág.
	RESUMEN	12
1.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	12
2.	OBJETIVOS	13
2.1	OBJETIVO GENERAL	13
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
3	MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE	13
3.1	EL GUANDUL (<i>Cajanus cajan</i>)	13
3.2	GENERALIDADES DEL ALMIDÓN	15
3.2.1	FUENTES DEL ALMIDÓN	15
3.2.2	COMPOSICIÓN DEL ALMIDÓN	15
3.2.3	MODIFICACIÓN DE LOS ALMIDONES	16
3.3.1	PROPIEDADES DE LAS DEXTRINAS	16
3.3.2	HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DEL ALMIDÓN	17
3.4.1	DETERMINACIÓN DEL GRADO DE HIDRÓLISIS	17
3.4.2	MÉTODO ÁCIDO DINITROSALICÍLICO (DNS)	18
3.5.1	LAS ENZIMAS	18
3.5.2	PROPIEDADES DE LAS ENZIMAS	18
3.5.3	ENZIMAS DEGRADADORAS DE ALMIDÓN	19
3.6.1	METODOLOGÍA SUPERFICIE DE RESPUESTA	20
3.7.1	DIGESTIBILIDAD <i>in-vitro</i>	20
3.8	PROPIEDADES TECNOLÓGICAS	21
3.8.1	CAPACIDAD DE RETENCIÓN DE AGUA (CRA)	21
3.8.2	SOLUBILIDAD	21

3.8.3	MICROSCOPIA DEL PROCESO DE HIDROLISIS	21
4	METODOLOGIA	21
4.1.1	TRATAMIENTO DE GRANOS DE GUANDUL (<i>Cajanus cajan</i>)	21
4.1.2	ANALISIS PROXIMAL DE LA HARINA DE GUANDUL	22
4.2	COMPLEJO ENZIMATICO	23
4.2.1	OPTIMIZACION DE LAS CONDICIONES HIDROLISIS	23
4.2.2	HIDROLISIS ENZIMATICA	24
4.2.3	DETERMINACION DE AZUCARES REDUCTORES POR EL METODO DE DNS	25
4.2.4	DETERMINACION DE LA CURVA ESTANDAR DE GLUCOSA	26
4.3	DETERMINACION DE PROPIEDADES TECNOLÓGICAS	26
4.3.1	CAPACIDAD DE RETENCION DE AGUA (CRA)	26
4.3.2	VISCOSIDAD	27
4.3.3	SOLUBILIDAD EN AGUA FRIA Y CALIENTE	27
4.3.4	PRUEBAS DE MICROSCOPIA	28
4.4.1	DIGESTIBILIDAD <i>in-vitro</i> DE HARINA DE GUANDUL E HIDROLIZADO DE GUANDUL	28
5	ANALISIS DE RESULTADOS	29
5.5.1	ANALISIS PROXIMAL DE SEMILLAS DE GUANDUL (<i>Cajanus cajan</i>)	29
5.2.1	METODO DEL DNS: CURVA DE CALIBRACION CON GLUCOSA	30
5.2.2	EVALUACION DEL PROCESO DE OPTIMIZACION DEL ALMIDON DE GUANDUL POR MSR Y TRES ENZIMAS DE LA FAMILIA α -AMILASAS	30
5.2.3	ANALISIS DE VARIANZA	31
5.2.4	DIAGRAMA DE PARETO DE LOS FACTORES EN LA HIDROLISIS ENZIMATICA	32
5.2.5	EFFECTOS PRINCIPALES	33

5.2.6	VALORES ÓPTIMOS EN LA HIDRÓLISIS POR MSR	34
5.2.7	GRÁFICA DE SUPERFICIE DE RESPUESTA	34
5.2.8	DIGESTIBILIDAD <i>In-vitro</i>	35
5.3	PRUEBAS TECNOFUNCIONALES	38
5.3.1	CAPACIDAD DE RETENCIÓN DE AGUA	37
5.3.2	ÍNDICE DE SOLUBILIDAD	38
5.3.3	VISCOSIDAD	39
5.3.4	MICROFOTOGRAFÍAS DE LA HARINA NATIVA E HIDROLIZADAS	40
6	CONCLUSIONES	43
7	RECOMENDACIONES	43
8	BIBLIOGRAFÍA	44

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Clasificación taxonómica del guandul	14
Tabla 2. Enzimas de la familia de las α -amilasas	20
Tabla 3. El análisis próximo de la semilla molida de guandul se llevó a cabo con los métodos planteados	22
Tabla 4. Factores del diseño experimental	23
Tabla 5. Datos de la base del diseño experimental planteado	23
Tabla 6. Diseño factorial de experimentos realizados, para la optimización de la hidrólisis enzimática de almidón de guandul. Número de experimentos:18	23
Tabla 7. Curva de calibración de glucosa (a partir de una solución de glucosa al 0,5% se preparó 7 soluciones de 25mL)	26
Tabla 8. Resultados Análisis Proximal, en base seca (B.S)	29
Tabla 9. Absorbancia promedio, desviación estándar y coeficiente de variación de curva de calibración de Glucosa	30
Tabla 10. Experimentos realizados, para la optimización de la hidrólisis enzimática de almidón de guandul. Número de experimentos: 18	31
Tabla 11. Valores-P de Varianza para %AR	32
Tabla 12. Respuesta Optimizada por Método de Superficie de Respuesta	34
Tabla 13. Digestibilidad <i>in-vitro</i> muestras de harina nativa e hidrolizada de guandul	36
Tabla 14. Capacidad de Retención de Agua	37
Tabla 15. Índice de Solubilidad en Agua	38
Tabla 16. Datos de curvas de empastamiento de muestras	40

LISTA DE FIGURAS

		Pág.
Figura 1.	<i>Cajanus cajan</i> : a) vaina de guandul, b) grano	14
Figura 2.	Estructura básica de la amilosa y amilopectina	15
Figura 3.	Reacción del DNS y glucosa	18
Figura 4.	Enzimas modificadoras de almidón	19
Figura 5.	Tratamiento físico del guandul	22
Figura 6.	Equipo de hidrólisis enzimática e hidrolizados	25
Figura 7.	Reómetro Rotacional Modelo 1500ex AR	27
Figura 8.	Curva de calibración para glucosa con DNS	30
Figura 9.	Diagrama de Pareto	33
Figura 10.	Efectos Principales	33
Figura 11.	Superficie de respuesta para %AR	35
Figura 12.	Representación de la digestibilidad <i>in-vitro</i>	36
Figura 13.	Microfotografías de las muestras hidrolizadas de harina de guandul	41

LISTA DE ACRÓNIMOS

AR	Azúcares Reductores
B.S.	Base Seca
cP	Centipoise
CRA	Capacidad de Retención de Agua
DNS	Acido 3,5 dinitrosalicílico
DT	Digestibilidad Total
E/S	Relación Enzima/Sustrato
ISA	Índice de Solubilidad en Agua
Min.	Minutos
MSR	Metodología de Superficie de Respuesta
RDS	Almidón Rápidamente Digestible
RS	Almidón Resistente
s	Desviación estándar
SDS	Almidón Lentamente Digestible
T	Temperatura
t	tiempo
OPT	Experimento Optimizado

RESUMEN

En el presente trabajo se llevó a cabo la optimización de la hidrólisis enzimática de almidón de guandul (*Cajanus cajan*), se determinaron las propiedades tecnofuncionales del hidrolizado.

La hidrólisis del almidón del Guandul se realizó empleando Amilasas de Novozymes como: Amylase™ AG 300L (Gluco-amilasa), Dextrozyme® GA 1.5X (Gluco-amilasa) y α -amilasa (EC.3.2.1.1.), utilizando un biorreactor Centricol y una relación de variables proporcionado por el software Statgraphics® como parte de la metodología de superficie de respuesta.

Los factores evaluados fueron temperatura, pH, relación enzima/sustrato y tiempo, teniendo como variable respuesta la producción de azúcares reductores (AR). Los resultados muestran como factor preponderante la relación de concentraciones enzima/sustrato con una correlación positiva, mientras la temperatura y el pH correlacionan negativamente con la producción de azúcares reductores, así mismo sugieren que no hay influencia del tiempo en esta producción. Los valores óptimos de las variables para la máxima conversión en azúcares reductores fueron: temperatura 43°C, pH 6.8, tiempo 270 min. y relación de concentración enzima-sustrato 1.84, para un %AR 3.49.

Palabras Claves: Hidrólisis enzimática, *Cajanus cajan*, almidón, amilasas, propiedades tecno-funcionales y digestibilidad *in-vitro*.

1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El guandul es una leguminosa que en Colombia está incursionando en el campo del comercio, es conocida como una fuente de proteína, carbohidratos y minerales; convirtiéndolo en un alimento muy completo para el ser humano. Se encuentra entre las ocho leguminosas más cultivadas en el mundo y ocupa el tercer lugar en cuanto al contenido proteico del grano seco, con un 25%, después de la soya y la lenteja que poseen 38 y 28%, respectivamente. Presenta un mínimo gasto de pesticidas y abono para su cultivo. Los principales protagonistas en el consumo de guandul son los niños y adultos de tercera edad, pero no existe un buen aprovechamiento de la harina de esta leguminosa, presentando el problema de tener baja digestibilidad en sus consumidores, por lo tanto no es aplicado como un alimento 100% [1].

Una solución viable, confiable y saludable para mejorar la digestibilidad del guandul es el uso del complejo enzimático de Amilasas de Novozymes, como la Amylase AG 300L (Gluco-amilasa), Dextrozyme GA 1.5X (Gluco-amilasa) y α -amilasa (EC.3.2.1.1.), que tienen la capacidad de catalizar reacciones con alta selectividad y porcentaje de rendimiento. Los productos obtenidos enzimáticamente, son los hidrolizados del almidón, siendo estas formas más biodisponibles y posiblemente más digestibles que el almidón nativo.

El principal producto de la reacción enzimática son las dextrinas, que al evaluarlas en sus propiedades funcionales tanto del hidrolizado como de la harina nativa, y principalmente comparando la digestibilidad *in-vitro*, se encontrará si este hidrolizado puede ser utilizado para potenciar la industria de alimentos y sobre todo en mejorar la digestibilidad.

Este estudio plantea a largo plazo el incentivo del cultivo de *Cajanus cajan*, como una alternativa de fuente de alimentación a nivel mundial y en el ámbito regional puede afianzarse en diferentes programas como: Programa de alimentación y nutrición escolar (PANES) y plan departamental de seguridad alimentaria y nutricional, que actualmente tienen cultivos en municipios como Bolívar, Rosas, Balboa, Entre otros [1].

2 OBJETIVOS

2.1 GENERAL

Optimizar la hidrólisis enzimática del almidón presente en la harina de Guandul, mediante el método de superficie de respuesta.

2.2 ESPECÍFICOS

- Realizar el análisis proximal de la semilla de guandul, cultivadas en el departamento del Cauca
- Caracterizar fisicoquímicamente las dextrinas obtenidas durante la hidrólisis.
- Mejorar la digestibilidad de semillas de guandul a través de hidrólisis enzimática del almidón.
- Determinar las propiedades tecnofuncionales del hidrolizado: solubilidad en agua, absorción de agua y viscosidad

3 MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE

3.1 EL GUANDUL (*Cajanus cajan*)

En todas las culturas y por miles de años se han consumido granos de leguminosas por ser nutritivos, de bajo costo, fáciles de preparar, altamente versátiles, muchos de ellos en abundante suministro y ser poco perecederos.

El guandul (*Cajanus cajan*) es una leguminosa de alto valor nutritivo y de fácil producción en muchas zonas marginales para otros cultivos. Los análisis de la semilla seca de guandul reportan un 15,2% de humedad; 22,3% de proteína; 1,7% de grasa; 3,6% de cenizas (siendo los minerales más importantes Ca, Fe y P); 57,2% de carbohidratos; caroteno evaluado como vitamina A y vitamina B1 de 0,72mg por 100g [2].

La leguminosa, *Cajanus cajan*, viene en vainas que contienen entre dos y seis semillas de color variado (ver figura 1), y es importante por su valor nutritivo y versatilidad de preparación. Su consumo principal es como grano cocido, en sopas o guisado, pero sus propiedades nutricionales y funcionales permiten su empleo como harina cocida para obtener una amplia gama de productos [2]. El guandul se encuentra como semilla en vaina y forma redonda también conocido con los nombres de guandul, chícharo de árbol, chícharo gandul, frijol de árbol, frijol caballero, frijol de palo, quinchoncho posee una categoría taxonómica superior así:

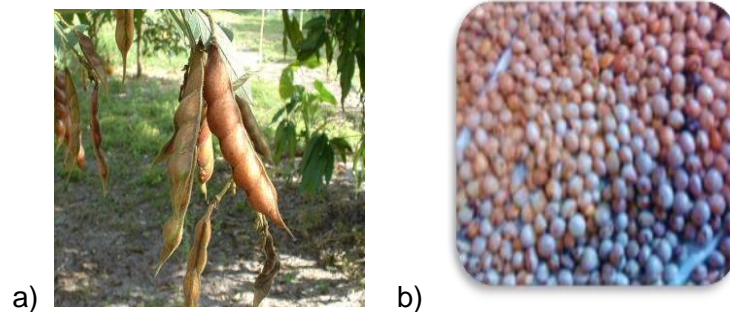
Tabla 1. Clasificación taxonómica del guandul

Reino	Plantae
Sub-reino	Tracheobionta (plantas vasculares)
Supervisión	Spermatophyta (plantas con semillas)
División	Magnoliophyta (plantas con flor)
Clase	Magnoliopsida (dicotiledóneas)
Subclase	Rosidae
Orden	Fabales
Familia	Fabaceae
Género	<i>Cajanus</i>
Especie	<i>Cajanus cajan</i>

Fuente: Sistema Integrado de Información Taxonómica

El guandul se ha sembrado desde tiempo atrás pero solo hasta unos diez años atrás ha crecido la producción a nivel global, puesto que en el año 2000 la producción superó lo esperado, siendo la India el principal productor. La distribución de este cultivo se ha encontrado en más de 30 países en Asia, 37 países en África y también en países de Sur y América Central. En la tabla 1 se presenta la clasificación taxonómica del guandul según el Sistema Integrado de Información Taxonómica (SIIT) [3].

Figura. 1 *Cajanus cajan*: a) vaina de guandul, b) grano



3.2 GENERALIDADES DEL ALMIDÓN

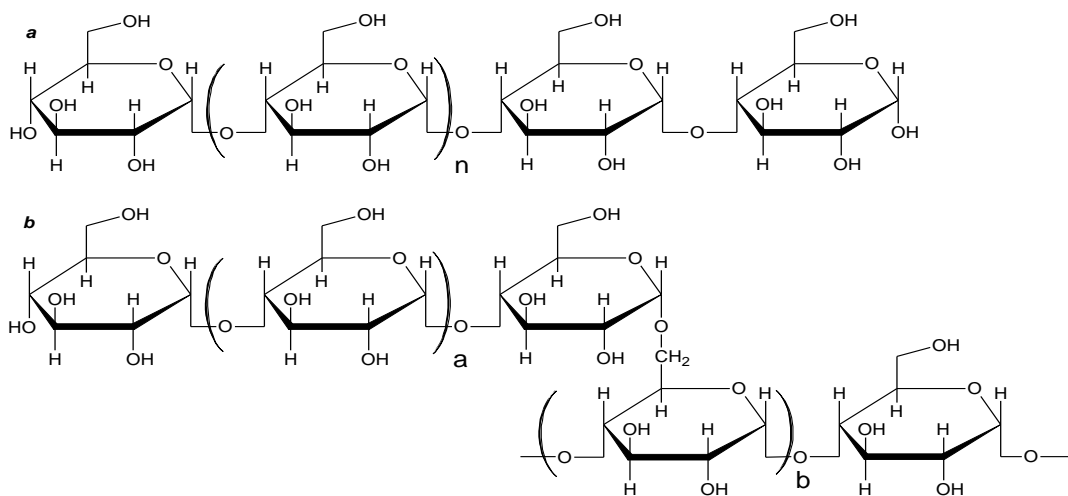
3.2.1 FUENTES DEL ALMIDÓN

El almidón nativo es un material semicristalino sintetizado como gránulos casi esféricos en muchos tejidos vegetales incluyendo polen, hojas, tallos, raíces, tubérculos, bulbos, rizomas, frutos, y semillas. Comercialmente, el almidón es extraído en forma pura de una variedad de fuentes. El maíz es la principal, pero el trigo, papa y yuca hacen una significativa contribución. Otras fuentes incluyen cebada, avena, guandul y guisantes [4].

3.2.2 COMPOSICIÓN DEL ALMIDÓN

El almidón puro consiste predominantemente de α -D-glucano (99% de la materia seca) en la forma de amilosa y amilopectina. La amilosa es una molécula esencialmente lineal que contiene ~99% enlaces α , 1-4 y ~1% α , 1-6. La amilopectina es más pesada que la amilosa y está abundantemente ramificada. Cada cadena de amilosa está en el orden 1000 unidades de glucosa de longitud mientras las unidades de la cadena de amilopectina promedian de ~12 a 120 unidades de anhidroglucosa. La proporción de estos dos polímeros y su organización física dentro de la estructura granular confieren propiedades fisicoquímicas y funcionales características a los diferentes almidones. En la figura 2. se representa la composición del almidón en una molécula lineal (amilosa) que puede tener pocas cadenas de longitud moderada ligadas α -(1-6) y una estructura de amilopectina con puntos de ramificación que para la cadena exterior $a = 12-23$. Para cadena interior $b = 20-120$, tanto a como b pueden variar de acuerdo al origen botánico [4].

Figura 2. Estructura básica de la **amilosa (a)** α -(1-4) glucano, (promedio $n = 1000$) y **amilopectina (b)** α -(1-6) puntos de ramificación.



3.2.3 MODIFICACIÓN DE LOS ALMIDONES

La gran diversidad de características y propiedades funcionales de los diferentes tipos de almidón permite su utilización en industria de tipo alimenticio con aplicaciones en panificación, coladas, espesante de sopas instantáneas, productos enlatados, fabricación de salsas, productos dietéticos, dulces y gomas, entre otros; y en industrias farmacéutica, de adhesivos, y papelera. Sin embargo, los almidones naturales no cubren la gama de propiedades físico-químicas requeridas por las industrias, ya que la estructura nativa del almidón puede ser menos eficiente debido a que las condiciones del proceso como la temperatura, el pH y la presión, reducen su uso en otras aplicaciones industriales.

Por las razones antes mencionadas, es necesario conocer las propiedades funcionales de los almidones nativos y someterlos a procesos de modificación, por vía física, química o enzimática, para obtener tipos adecuados para usos específicos, dando como resultado un almidón modificado con propiedades deseables para aplicaciones específicas [5].

Las modificaciones del almidón pueden clasificarse en físicas, químicas y enzimáticas, las cuales generan diferentes productos de acuerdo a sus condiciones de reacción tales como: dextrinas, maltosa, glucosa, azúcares con diferentes grados de endulzamiento y adherencia; productos que finalmente se aplican como alimentos y bebidas fermentadas [5].

La modificación física puede ser efectuada por el roce (ejemplo, molienda), por esto los gránulos de almidón “dañados” son fácilmente dispersados en agua fría hasta promover pastas o geles los cuales son digeribles.

Entre las modificaciones químicas se incluye a los almidones hidroxipropilados, de enlaces cruzados y acetilados, que muestran características como: la estabilidad en el ciclo congelamiento-deshielo, la claridad de pasta y menor tendencia a la retrogradación. Estas modificaciones son usadas para intensificar características deseables de almidones, como el “entrecruzamiento” que promueve una resistencia química y térmica y también la adición de sustancias para prevenir la recristalización (retrogradación) de geles del almidón [5].

En la modificación enzimática para la hidrólisis de almidón, se utilizan tipos de enzimas capaces de generar diferentes productos; como la familia de las α -amilasa y amiloglucosidasa que son ampliamente aplicadas en la obtención de jarabe de glucosa, maltodextrinas y glucosa cristalina (dextrosa); y el tipo β -amilasa produce dextrinas y maltosa [6].

3.3.1 PROPIEDADES DE LAS DEXTRINAS

Una dextrina es un almidón modificado, producto de la degradación de almidón obtenido por efecto químico, térmico o enzimático en un mecanismo de conversión que involucra

procesos de ruptura hidrolítica, reorganización de moléculas y repolimerización. Los factores que influyen son: la temperatura de conversión, el tipo de almidón, la enzima, el pH y el tiempo de reacción, por tanto pequeñas variaciones de estos factores pueden dar un producto con características diferentes.

Las dextrinas tienen aplicaciones como en operaciones de fundición, insecticidas, tratamiento de aguas residuales, aglomerados de carbón y otros agregados minerales. Dada la gran variedad de tipos de dextrinas que pueden ser obtenidas, estas pueden ser usadas en diferentes sectores industriales como: alimentos, adhesivos, textiles, tinturas, farmacéutica y cosméticos [7].

Es indispensable conocer las propiedades funcionales para direccionar las aplicaciones del producto final (hidrolizado) y estas pueden ser: capacidad de retención de agua, solubilidad en agua fría y caliente, determinación del pH, conductividad eléctrica, resistencia a la congelación y enfriamiento, resistencia a la esterilización, estabilidad y claridad de las pastas, acidez titulable, índice de hinchamiento, determinación del punto de gelatinización, microscopía del proceso de gelatinización, densidad verdadera, densidad promedio y porosidad [8].

Este tipo de hidrólisis enzimática requiere hacer pruebas funcionales específicas como la evaluación del grado de hidrólisis por método del ácido 3,5-Dinitrosalicílico (DNS), solubilidad, viscosidad, humedad, que son necesarias para aplicar las dextrinas obtenidas como suplemento alimenticio para niños y ancianos.

3.3.2 HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DEL ALMIDÓN

La hidrólisis enzimática del almidón puede ser considerada como una técnica para modificar almidón por reducción de su peso molecular promedio. Los productos de la conversión enzimática del almidón comprenden desde glucosa hasta dextrinas de alto peso molecular.

Las α -amilasas son ampliamente usadas para la depolimerización de almidones en la preparación de maltodextrinas. La susceptibilidad de los gránulos de almidón a la α -amilosis depende de su origen botánico, de la fuente de α -amilasa y si el almidón está realmente disperso, en parte gelatinizado o suspendido como gránulos intactos.

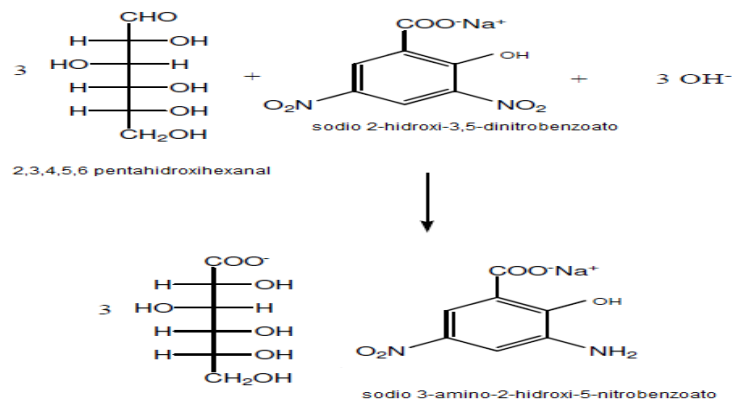
3.4.1 DETERMINACIÓN DEL GRADO DE HIDRÓLISIS

Para determinar cuantitativamente los azúcares reductores (AR) (producto de la hidrólisis del almidón) se utiliza un parámetro empleado comúnmente que mide el grado de hidrólisis; el método del DNS, propuesto por Miller (1959) [12], en el que se elabora una curva de calibración (concentración de glucosa vs Absorbancia) y las lecturas de absorbancia se toman en un espectrofotómetro UV-VIS.

3.4.2 MÉTODO ÁCIDO DINITROSALICÍLICO (DNS)

En disolución alcalina el azúcar se hidroliza produciendo un compuesto que se reduce a un grupo nitro del DNS, para dar el producto monoamino correspondiente. Esta reacción da un producto colorido en solución alcalina. La reacción que se lleva a cabo es propuesta en la figura 3 [13].

Figura 3. Reacción del DNS y glucosa



3.5.1 LAS ENZIMAS

Las enzimas que realizan la hidrólisis del almidón son conocidas como amilolíticas

3.5.2 PROPIEDADES DE LAS ENZIMAS

Condiciones para que las enzimas actúen óptimamente: pH, temperatura, tiempo y relación Enzima /Sustrato:

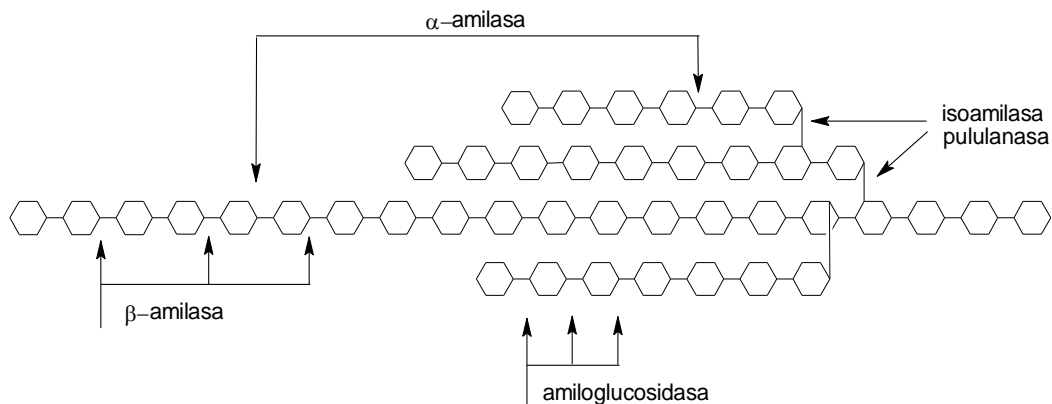
- **pH:** todas las enzimas son sensibles a variaciones del cambio de pH del medio. Existe un pH óptimo para lo cual la actividad enzimática es máxima, puede ser básico o ácido en función de la enzima.
- **Temperatura:** las enzimas tienen un rango de temperatura en el cual la actividad enzimática es máxima. En general, es preferible utilizar enzimas que soporten altas temperaturas para permitir el aumento de la cinética de reacción y proteger el medio contra eventuales contaminaciones microbianas
- **Tiempo:** En una reacción química en general el tiempo es una de las variables más importantes, debido a que este determina la cantidad de reactivo(s) convertido a producto. A pesar de esto, se debe tener en cuenta factores como el tipo de reacción, la presencia o no de catalizadores, entre otros.

- **Enzima/Sustrato:** Las reacciones enzimáticas se basan en la unión de la enzima con el sustrato, denominado como complejo ES, y su posterior conversión a producto, un aumento en la concentración de sustrato logrará que todos los sitios activos de la enzima se encuentre ocupados, por tanto para evitar este equilibrio es necesario retirar producto del medio, un aumento en la concentración nos llevará a un comportamiento similar [14].

3.5.3 ENZIMAS DEGRADADORAS DE ALMIDÓN

Varias enzimas, incluyendo endo y exo-amilasas actúan como enzimas amilolíticas sobre el almidón (ver figura 4.) [15]. En general, la funcionalidad de estas enzimas comprende varios aspectos, tales como su acción sobre los gránulos de almidón, su especificidad y la degradación formando los productos.

Figura 4. Enzimas modificadoras de almidón



Fuente: HANS, G.; CHRISTOPHE M. Courtin y JAN A. Delcour. (2006)

La familia α -amilasa, comprende una variedad de enzimas amilolíticas, que hidrolizan los enlaces α -(1,4) y/o α -(1,6) entre los niveles de residuos de glucosa, tales como α -amilasas y enzimas desramificantes, como la pululanasa e isoamilasa que son capaces de hidrolizar enlaces α -(1,6) del almidón. Las α -amilasas son típicas endo-enzimas, que generan bajo peso molecular de α -dextrinas siguiendo una hidrólisis más o menos al azar de los enlaces α -(1,4) en los polímeros de almidón (ver figura 4).

Las principales exo-amilasas, son las β -amilasas y amiloglucosidasas respectivamente. Estas enzimas son típicos de inversión de exo-amilasas, que actúan sobre los enlaces α -(1,4) en los extremos no reductores de las moléculas de almidón. Los productos finales de β -amilasa sobre el almidón de acción son β -maltosa y β -límite de dextrinas. En el caso de, amiloglucosidasa es capaz de hidrolizar al mismo tiempo enlaces α -(1,6) y α -(1,4).

La familia de la α -amilasa comprende un grupo de enzimas que tienen las siguientes características: actúan sobre enlaces α -glicosídicos e hidrolizan estos enlaces para

producir mono u oligosacáridos α -anomérico (hidrólisis), de enlaces α -1-4 o α -1-6 glicosídicos (transglicosilacion), o una combinación de ambas actividades. En la tabla 2 citan algunas de las enzimas de la familia de las α -amilasas y el substrato sobre el que actúan.

Tabla 2. Enzimas de la familia de las α -amilasas

ENZIMA	SUBSTRATO
Glucano ramificante	Almidón, glicógeno
Ciclodextrina glicosiltransferasa	Almidón
Amilomaltasa	Almidón, glicógeno
α -amilasa	Almidón
Glucamilasa	Almidón
Amilopululanasa	Pulunano
Isoamilasa	Amilopectina

3.6.1 METODOLOGÍA DE SUPERFICIE DE RESPUESTA

Metodología de superficie de respuesta se compone de un grupo de técnicas empíricas dedicadas a la evaluación de las relaciones existentes entre un grupo de control de los factores experimentales que midieron las respuestas, de acuerdo con uno o más criterios determinados. Un conocimiento previo y la comprensión del proceso y las variables del proceso que se investigan son necesarios para lograr un modelo más realista.

Para el estudio de la optimización, es necesario determinar cuáles son las variables independientes que intervienen, además de definir el rango de acción de cada una de ellas y finalmente se puede encontrar un conjunto de efectos sobre la variable respuesta.

Si todas las variables tienen que ser optimizados consecutivamente, serán necesarios muchos experimentos, sobre todo cuando las variables tienen efectos interactivos. Por lo tanto, se deben desarrollar diseños eficientes para la experimentación [16].

3.7.1 DIGESTIBILIDAD *in-vitro*

La digestibilidad es el principal factor a tener en cuenta cuando se habla de la calidad de un alimento, debido a que este representa la biodisponibilidad de los nutrientes presentes en el alimento, existen varios métodos para medir la digestibilidad un alimento, métodos *in vitro* e *in vivo*. Cada uno con sus respectivas variaciones complicaciones y ventajas.

Los métodos de digestión *in-vitro* persiguen en general dos objetivos distintos, aunque normalmente compatibles: por un lado, pretenden reproducir total ó parcialmente la digestión que lleva a cabo el animal y, por otro, predecir el valor nutritivo de los alimentos.

3.8 PROPIEDADES FUNCIONALES

3.8.1 CAPACIDAD DE RETENCIÓN DE AGUA (CRA)

El almidón es insoluble en agua fría; pero es capaz de retener agua. El agua se adhiere a la superficie de los gránulos de almidón, algo se introduce por las grietas y lleva el gránulo a su hinchamiento. Este comportamiento puede ser atribuido a la relación amilosa/amilopectina, ya que las moléculas de agua quedan atrapadas en la estructura de la amilopectina, así como también a la diferencia en la distribución de la longitud de la cadena [17]. En un gránulo normal la CRA se asegura con la formación de enlaces de hidrógeno con la amilasa y la amilopectina, lo cual ocasiona en estas moléculas un aumento de volumen creando un mayor espacio permitiendo así la entrada de moléculas de agua.

3.8.2 SOLUBILIDAD

La solubilidad indica el grado de asociación existente (enlaces intergranulares) entre la amilosa y la amilopectina y se determina a diferentes temperaturas permitiendo observar cómo influye en la solubilidad y así determinando si el gránulo absorbe o no agua, siendo de importancia en el proceso de gelatinización y en la solubilización de moléculas de amilosa [7].

3.8.3 MICROSCOPIA DEL PROCESO DE HIDRÓLISIS

El proceso de hidrólisis enzimática se puede seguir microscópicamente, y determinar los cambios en la forma del gránulo de almidón. La microscopía representa una herramienta valiosa para explicar el comportamiento del almidón durante la hidrólisis a las diferentes condiciones experimentales.

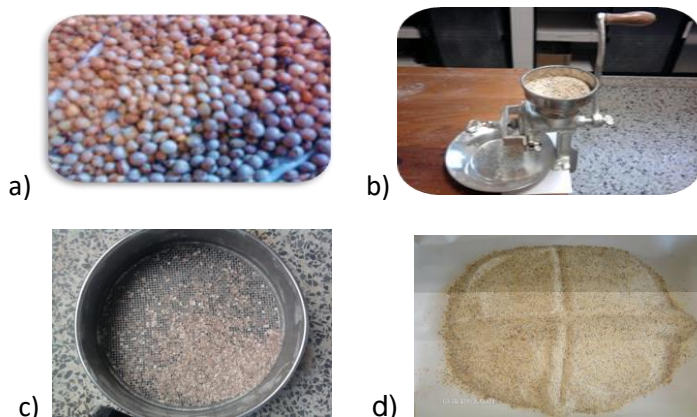
4 METODOLOGÍA

4.1.1 TRATAMIENTO DE GRANOS DE GUANDUL (*Cajanus cajan*)

La muestra de guandul fue suministrada por agricultores de la vereda La Carbonera, ubicada en el Municipio de Bolívar, Departamento del Cauca. Este cultivo está vinculado a la fundación Cauca sin hambre, proyecto de la Gobernación del Cauca.

El grano de guandul se colectó en base húmeda (figura 5a), eliminando manualmente malezas y posteriormente lavado con agua destilada, se secó al sol y una vez seco se pasó por un triturador o molino (figura 5b), hasta obtener una muestra con tamaño de partícula de textura fina (harina) con ayuda de un tamiz nro. 10 (figura 5c). La harina obtenida se le realiza un cuarteo previo para extraer los 100g necesarios para cada prueba. (figura 5d)

Figura 5. Tratamiento físico del guandul. a) semilla guandul, b) molienda del grano, c) tamiz nro. 10, d) cuarteo de harina de guandul.



4.1.2 ANÁLISIS PROXIMAL DE HARINA DE GUANDUL

En la tabla 3 se indican las determinaciones realizadas a la semilla triturada de guandul con una breve descripción y se indica el método empleado.

Tabla 3. El análisis próximo de la semilla molida de guandul se llevó a cabo con los métodos planteados:

DETERMINACIÓN	DESCRIPCIÓN	MÉTODO
Humedad	Deshidratación a 100-105°C en estufa a presión constante hasta peso constante	AOAC 950.43
Ceniza	Calcinación a 550°C por 4 horas	AOAC 991.36
Extracto etéreo	Extracción Soxhlet por 4 horas	AOAC 920.153
Proteína bruta	Kjeldahl: Digestión ácida y destilación de nitrógeno (N x 6.25)	AOAC 968.06 (adaptado)
Fibra bruta	Weende: Digestión acido-base y calcinación	AOAC 962.09
Extracto no nitrogenado (ENN)	Por diferencia	

4.2 COMPLEJO ENZIMÁTICO

En el presente trabajo se emplearon las Amilasas como α -amilasa (EC.3.2.1.1.) producida por *Bacillus Species* (estado sólido), la Amylase™ AG 300L (Gluco-amilasa), Dextrozyme® GA 1.5X (Gluco-amilasa) se presentan como una preparación comercial

líquida, de Novozymes, con una actividad declarada de 300 AGU/mL y 400 AGU/g respectivamente y son producidas por *Aspergillus niger*.

4.2.1 OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE HIDRÓLISIS.

La optimización de las condiciones de hidrólisis se efectuó mediante el empleo de la metodología de superficie de respuesta (MSR) con un diseño factorial completamente al azar, empleando el software Statgraphics® (versión plus 5.1), en la tabla 4 se pueden observar los cuatro factores (pH, temperatura, el tiempo y la relación enzima/sustrato) empleados en el diseño y sus niveles máximo y mínimo. El grado de hidrólisis (%AR) se empleó como variable respuesta. En la tabla 6 se muestran las condiciones generadas por el software para la realización de 16 experimentos con valores de cada variable con tres niveles equidistantes (-1, 0 y +1), es decir un valor medio, un valor superior y un valor inferior, además dos experimentos con un valor mayor y menor del rango establecido en cada factor, y de esta forma completar 18 experimentos en total.

Tabla 4. Factores del diseño experimental.

Factor	Valor Mínimo	Valor Máximo
pH	3.5	6.0
Temperatura	50°C	70°C
Relación de concentración Enzima/sustrato	0.5%(w/w)	1.5%(w/w)
Tiempo	120 min	300 min

Tabla 5. Datos de la base del diseño experimental planteado

Número de factores experimentales	4
Número de ensayos	18
Número de respuestas	1
Aleatorizado	Si

Tabla 6. Diseño factorial de experimentos realizados, para la optimización de la hidrólisis enzimática de almidón de guandul. Número de experimentos: 18

N.	Temperatura (°C)	pH	Tiempo (Minutos)	° Relación Enzima/Sustrato% (w/w)
1	60	6.8	210	1.00
2	77	4.8	210	1.00
3	70	3.5	300	1.50
4	50	3.5	300	0.50
5	70	6.0	300	0.50
6	70	6.0	120	0.50

7	60	4.8	210	1.00
8	60	4.8	210	0.16
9	70	3.5	120	1.50
10	50	6.0	300	1.50
11	60	4.8	210	1.00
12	60	2.6	210	1.00
13	60	4.8	59	1.00
14	50	3.5	120	0.50
15	43	4.8	210	1.00
16	60	4.8	361	1.00
17	50	6.0	120	1.50
18	60	4.8	210	1.84
B	70	6.0	300	-

° Por cada 100g de harina de guandul, se tienen 54,38% de carbohidratos en base húmeda, por lo tanto la cantidad de enzima utilizada fue:

Relación 1 E/S (w/w): 0.5438mL - 0.5438g

Relación 0.5 E/S (w/w): 0.2719 mL - 0.2719g

Relación 1.5 E/S (w/w): 0.8157 mL - 0.8157g

Relación 1.84 E/S (w/w): 1.0000mL – 1.0000g

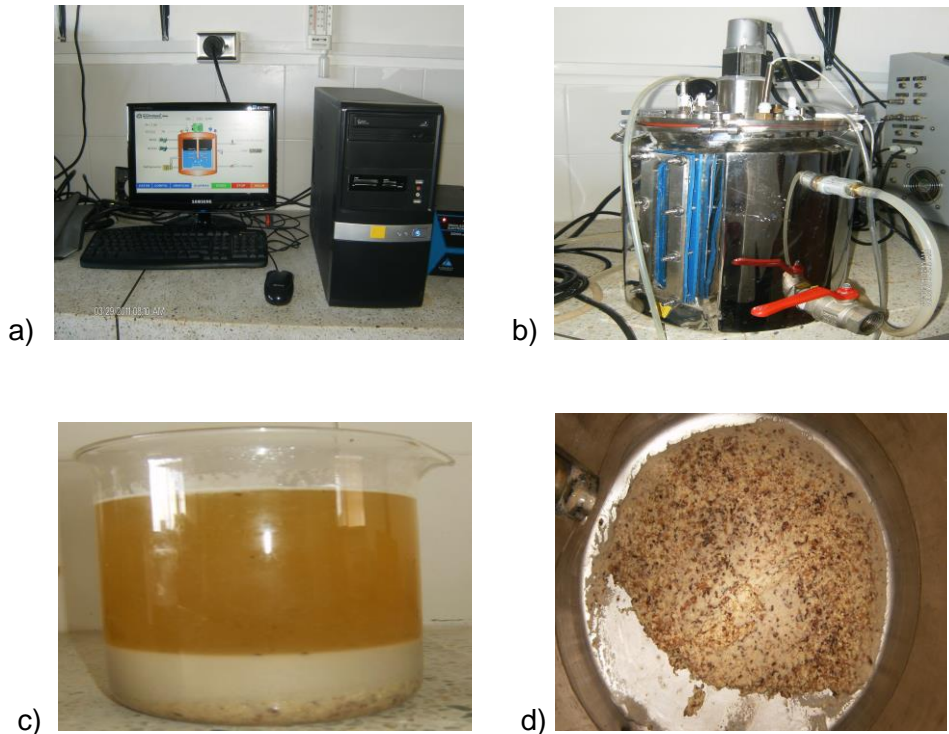
Relación 0.16 E/S (w/w): 0.0870mL - 0.0870 g

4.2.2 HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA.

Las reacciones de hidrólisis, se realizaron en un bio-reactor con capacidad de 20 Litros (Centricol) del laboratorio de biotecnología de la facultad de Ciencias Agropecuarias (figura 6a-6b), el cual tiene control automático de temperatura y velocidad de agitación. Los experimentos se realizaron de acuerdo a la tabla 5, para esto se pesaron 100g de muestra, que contienen 63% (w/w) de carbohidratos, la cantidad de enzimas correspondiente a la relación [E/S] de cada experimento, con un volumen de 1.0L de agua. Para obtener una actividad enzimática óptima de la solución se preparó un buffer de ácido cítrico ($C_6H_8O_7$) y fosfato ácido de sodio (Na_2HPO_4).

En todas las reacciones enzimáticas planteadas se llevó a cabo la desactivación de la enzima por medio de calentamiento a 90°C por un tiempo de 20 minutos. Seguido se separó el líquido (figura 6c) del sólido (figura 6d); el primero se centrifugó a 4500 rpm y es guardado a una temperatura de 4°C, en este líquido se determinó el grado de hidrólisis de acuerdo a la cantidad de azúcares reductores por método del DNS en un espectrómetro UV-VIS GENESYS y al sólido, se le realizaron pruebas funcionales, viscosidad, microscopía óptica y digestibilidad *in-vitro*.

Figura 6. Equipo utilizado en hidrólisis enzimática de harina de guandul. a) Software de reactor, b) reactor, c) hidrolizado líquido, d) hidrolizado sólido.



4.2.3 DETERMINACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES POR EL MÉTODO DE DNS.

El análisis de los azúcares reductores se llevó a cabo, siguiendo la metodología descrita por Miller (1959) [12] de la siguiente manera:

Se preparó una solución de ácido dinitrosalicílico (DNS) al 1%: Disolviendo con agitación 5g de tartrato sodio-potasio y 12.5mL de NaOH, calentando a 50°C. Adicionar 0.25g de DNS, 0.05g fenol y 0.0125g de bisulfito de sodio, aforar con agua destilada a 25mL y se almacenará en frasco ámbar en refrigeración durante 24horas, necesarios para su estabilidad.

Para la curva estándar se preparó una Solución de Glucosa al 0,5%: Disolviendo 0,5 g de D(+)-Glucosa en 75 mL de agua destilada, se transfirió a balón de 100 mL y se aforó con agua destilada.

4.2.4 DETERMINACIÓN DE LA CURVA ESTÁNDAR DE GLUCOSA

Tabla 7. Curva de calibración de glucosa (a partir de una solución de glucosa al 0,5% se preparó 7 soluciones de 25mL):

Vol. de solución de Glucosa 0,5% (mL)	Concentración final (mg/L)
1	200
2	400
3	600
4	800
5	1000
6	1200
7	1400

Para elaborar la curva de calibración de glucosa con el método del DNS, se tomó 0.2 mL de la solución de 200 ppm, y se transfieren a un tubo de ensayo adicionando 1.2mL del reactivo de DNS. Posteriormente el tubo de ensayo se llevó a baño de agua en ebullición por exactamente 15 minutos y se pasó inmediatamente a baño de hielo por 5 minutos. Seguidamente se aforó con agua destilada a 5mL.

Las absorbancia de las soluciones se determinaron a 540nm cuando pasaron 45 minutos desde el inicio del proceso. El proceso se repitió con las restantes diluciones de glucosa.

El procedimiento se realizó por triplicado y se repite para las muestras, excepto que para aforar se realizó en balón de 50mL.

Las lecturas fueron hechas en un espectrómetro UV-Genesys.

4.3 DETERMINACIÓN DE PROPIEDADES TECNOFUNCIONALES

4.3.1 CAPACIDAD DE RETENCIÓN DE AGUA (CRA)

La capacidad de absorción de agua se determinó por el método de Anderson et al. (1969) [18]. Se prepararon 40 mL de una suspensión de harina al 1% (b.s.), en agua destilada a 30 °C. Se calentó a una velocidad de 1,5 °C/minuto hasta alcanzar 30, 60, y 90 °C y se mantuvieron a esas temperaturas durante 30 minutos con agitación. Se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se centrifugaron a 2500 rpm, durante 15 minutos, en una centrífuga.

El gel resultante se pesó. La capacidad de absorción de agua para cada temperatura se calculó como el peso (g) del gel por g de muestra seca. Indicado en la ecuación 1.

$$\text{CRA} = \text{Peso gel g.} / \text{peso muestra g.} \quad \text{Ecuación (1)}$$

4.3.2 VISCOSIDAD

Para determinar la viscosidad se disminuyó el tamaño de partícula triturando las muestras en el equipo FRITSCH pulverisette sistema molino planetario y pasadas por tamiz nro. 100, convirtiendo la muestra más homogénea. La viscosidad se midió en el equipo Reómetro Rotacional Modelo 1500ex AR (ver figura 7), Posteriormente se preparó una suspensión de harina (8% p/p; 25g peso total) en base seca y se utilizó agua destilada (25mL aprox.); directamente en el recipiente del Reómetro, se programan las condiciones y se empieza el ciclo de medida. El perfil de temperatura utilizado para el análisis de la harina de guandul nativa y las muestras de harina hidrolizada fue la siguiente:

1. Se inició a 50 °C y se agitó durante 30 segundos 715rpm.
2. Se calentó a una velocidad constante de 10 °C/min hasta alcanzar los 90 °C. con agitación de 160rpm
3. La temperatura permaneció constante en 90 °C durante 5 minutos.
4. Se enfrió a una velocidad de 10 °C/min hasta 50 °C.
5. Por último, la temperatura permaneció constante en 50 °C durante 2 minutos. Estos análisis se realizaron en el laboratorio de Reología de la Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad del Cauca.

Figura 7. Reómetro Rotacional Modelo 1500ex AR



4.3.3 SOLUBILIDAD EN AGUA FRIA Y CALIENTE

El índice de solubilidad en Agua (ISA) se determinó agregando 50mL de agua destilada a 0.5g de harina de guandul, después se agitó manualmente por dos minutos, y la muestra se centrifugó a 1250 rpm durante 15 minutos; se extrae una alícuota de 12.5mL de sobrenadante y es transferida a una caja de Petri, que estaba previamente pesada en una balanza analítica y se secó en un horno por 24 horas, por ultimo por diferencia de peso se calculó el porcentaje de solubilidad (ver ecuación 2), la prueba se realizó a 30, 50 y 70° [8].

$$\text{ISA} = \text{g muestra soluble} / \text{g muestra total. Ecuación (2)}$$

4.3.4 PRUEBAS DE MICROSCOPIA

Las imágenes del gránulo de almidón son observados con un lente de aproximación de 40x y 100x, en un microscopio óptico Nikon eclipse 80i con software NIS-Elements F2.30. Se comparan los almidones de harina hidrolizada vs el almidón de harina nativa, teniendo en cuenta la forma del gránulo respecto a deformaciones y ruptura del mismo por la hidrólisis enzimática.

4.4.1 DIGESTIBILIDAD *in-vitro* DE HARINA DE GUANDUL E HIDROLIZADO DE GUANDUL

La digestibilidad *in vitro* del almidón en la muestra nativa y las muestras hidrolizadas de guandul se determinaron de acuerdo con el procedimiento de Englyst et al. (1999) [19] con modificaciones, empleando enzimas digestivas, así: solución de enzimas: una muestra de α -amilasa Pancreática porcina (6,0 g, 8x actividad USP/g), (N^o 7545, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) se dispersó en agua (40,0 mL) mediante agitación magnética durante 10 min y la dispersión se centrifugo a 15000 x g. El sobrenadante (32,0 mL) se transfirió a un vaso de precipitado, se añadieron a la solución de enzima amiloglucosidasa (2,0 mL, actividad; 5.000-8.000 unidades/mL) (N^o 9913, Sigma-Aldrich) y agua desionizada (3 mL).

Esta solución de enzima se preparó fresca para cada análisis de digestión. Solución de muestras: Las diferentes muestras de guandul (1000 mg) se adicionaron con 10 mL de solución de goma guar (5 g/L en HCl 0,05 M) y 5 mL de solución de acetato de 0,5 M de sodio (pH 5,2), se pasó cada una a un tubo de ensayo de 50 mL.

La solución de goma guar se añadió para homogenizar la viscosidad de las diferentes muestras. Se adicionaron 10 mL de la solución de enzima y siete bolas de vidrio (10 mm de diámetro) a cada tubo, seguido de incubación en un baño de agua con agitación (37 °C, 170 rpm).

Se tomaron alícuotas de (0,5 mL) a intervalos de 30, 60, 90 y 120 minutos, se mezcló con 4 mL de 80% de etanol y se centrifugó a 15000 xg durante 10min.

El contenido de glucosa en el sobrenadante se determinó usando una glucosa oxidasa-peroxidasa kit de ensayo (N^o GAGO-20, Sigma-Aldrich). El experimento se efectuó por triplicado para los 3 primeros tiempos y por cuatuplicado para los 120 minutos.

5 ANÁLISIS DE RESULTADOS

5.1.1 ANÁLISIS PROXIMAL DE SEMILLAS DE GUANDUL (*Cajanus cajan*)

Tabla 8. Resultados Análisis Proximal, en base seca (B.S)

DETERMINACIÓN	RESULTADO % B.S
Ceniza	3.96±0.057
Grasa	3.87±0.071
Proteína bruta	22.63±0.197
Fibra bruta	6.53±0.186
Extracto no nitrogenado (ENN)	63.02±0.132

El análisis proximal es un estudio muy general sobre la composición química de un alimento o partes del mismo. En su análisis la procedencia, las condiciones en las que se desarrolla el alimento, la variedad, los factores genéticos, entre otros repercuten en la composición química y por ende en su valor nutritivo. Con el fin de determinar la composición de semillas de guandul se realizó un análisis próximo de su harina.

El porcentaje de cenizas es de 3.96%, este porcentaje se atribuye a valores reportados a elementos como Calcio, Sodio, Potasio, Magnesio, Zinc, Hierro, presentes en la semillas encontrado por Torres et. al (2006) [11].

El contenido graso de la harina de guandul fue 3.87%, este bajo valor se debe a la poca cantidad de grasa o compuestos lipídicos presentes en este tipo de semillas, facilitando los procesos de separación de los hidrolizados.

Uno de los valores más importantes es el de proteína presente en las semillas de guandul, este es de 22.63%, lo que permite clasificar el guandul como un alimento rico en proteínas, valor similar reportado por Chaparro Rojas et al. (2010) de 21.31% de importancia en el desarrollo y crecimiento tanto humano como animal, logrando ubicar al guandul como una de las leguminosas más ricas nutricionalmente [20].

El contenido en fibra bruta es de 6.53% esto es debido a la naturaleza de la materia, además las semillas no son sometidas a proceso de descascarado, y se molieron de forma entera; la cantidad de fibra en las semillas complementan este alimento nutricionalmente, debido a que la fibra ayuda y mejora el proceso digestivo en seres vivos. Por último y con el mayor porcentaje se encuentra el extracto no nitrogenado, donde se encuentra todo tipo de carbohidratos, poli, mono y disacáridos, fuente directa de energía para los seres vivos, el porcentaje de estos en la semilla de guandul es de 63.02%, con lo que se logra confirmar que las semillas de guandul son alimento nutritivo, balanceado y rico en componentes esenciales para el desarrollo humano y animal.

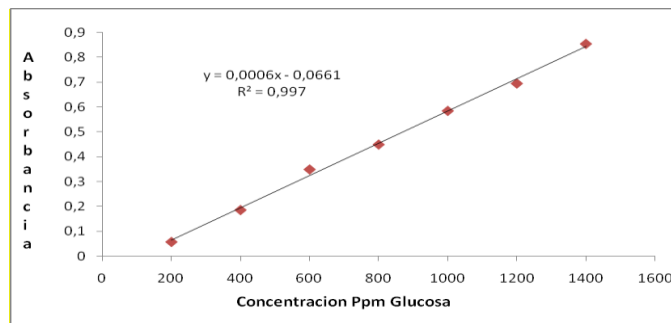
5.2.1 MÉTODO DEL DNS: CURVA DE CALIBRACIÓN CON GLUCOSA

Para determinar el grado de hidrólisis enzimática se utilizó el método del DNS, realizando una curva de calibración con glucosa (ver tabla 9 y figura 8), que se realizó por triplicado y con valores bajos en desviación estándar y un coeficiente de regresión de $R^2=0.997$ adecuado.

Tabla 9. Absorbancia promedio, desviación estándar y coeficiente de variación de curva de calibración de Glucosa

Concentración mg/L	Absorbancia promedio	s
200	0,058	0.004
400	0,186	0.005
600	0,349	0.010
800	0,449	0.014
1000	0,584	0.009
1200	0,694	0.008
1400	0,853	0.007

Figura 8. Curva de calibración para glucosa con DNS



5.2.2 EVALUACIÓN DEL PROCESO DE OPTIMIZACIÓN DEL ALMIDÓN DE GUANDUL POR MSR Y TRES ENZIMAS DE LA FAMILIA α -AMILASAS

La Metodología de Superficies de Respuesta (MSR), ha sido ampliamente utilizado en áreas donde el error experimental es tan pequeño que se puede considerar despreciable, especialmente en química. La MSR permite determinar los factores que están incidiendo en la variable respuesta de interés y encontrar los niveles de los factores que producen la respuesta óptima.

Establece que el uso de los procedimientos para determinar las condiciones óptimas no presenta obstáculos al aplicarlos, debido a que tienen un fundamento matemático exacto

que no dan lugar a dudas sobre los resultados obtenidos de su aplicación. Es por tanto que los procedimientos de optimización, son válidos y confiables en la medida en que el modelo fijado indique una falta de ajuste no significativa, determinación alta y error experimental pequeño [21]. El grado de hidrólisis en los 18 experimentos (tabla 10) y la muestra optimizada (muestra OPT) se encuentra en un intervalo de 0.58-3.49%, donde el mayor grado de hidrólisis se presenta en el experimento número 10 y muestra OPT, los cuáles presenta un valor mínimo de temperatura y valores altos de pH, relación E/S y tiempo, y el experimento con menor grado de hidrólisis es el número 6, con valores máximo para temperatura y mínimo en tiempo y relación E/S, destacándose influencia por parte de la cantidad del complejo enzimático utilizado y de la temperatura, principalmente, variando el grado de hidrólisis y por ende la aplicación final del hidrolizado.

Tabla 10. Experimentos realizados, para la optimización de la hidrólisis enzimática de almidón de guandul. Número de experimentos: 18

N.	Temperatura °C	pH	Tiempo Minutos	Relación Enzima/Sustrato% (w/w)	%AR	s ±
1	60	6.8	210	1.00	1.77	0.080
2	77	4.8	210	1.00	1.57	0.030
3	70	3.5	300	1.50	1.89	0.010
4	50	3.5	300	0.50	2.07	0.060
5	70	6.0	300	0.50	0.65	0.003
6	70	6.0	120	0.50	0.58	0.020
7	60	4.8	210	1.00	1.64	0.030
8	60	4.8	210	0.16	0.62	0.030
9	70	3.5	120	1.50	2.01	0.080
10	50	6.0	300	1.50	3.23	0.120
11	60	4.8	210	1.00	1.54	0.010
12	60	2.6	210	1.00	2.60	0.140
13	60	4.8	59	1.00	1.81	0.040
14	50	3.5	120	0.50	2.24	0.150
15	43	4.8	210	1.00	2.42	0.004
16	60	4.8	361	1.00	1.53	0.020
17	50	6.0	120	1.50	2.78	0.020
18	60	4.8	210	1.84	2.02	0.030
OPT	43	6.8	270	1.84	3.49	0.020
B	70	6.0	300	-	0.52	0.030

° Los valores de % AR son triplicados

B: Muestra blanco, sin adición de enzimas

5.2.3 ANÁLISIS DE VARIANZA

El análisis de varianza indica los parámetros más influyentes en el proceso, con un intervalo del 95%, es decir, con un error máximo permisible del 5%. Todos aquellos

factores o interacciones entre los mismos que obtengan un valor $P < 0.05$, serán considerados como los más relevantes en el proceso para obtener la máxima cantidad de azúcares reductores. El modelo presenta un excelente ajuste, indicando que el diseño experimental utilizado en esta investigación tiene una gran confiabilidad, debido a que el ajuste del modelo fue verificado por la determinación del coeficiente de regresión ($R^2=96.6455$) lo que indica que el método explica el 96.6 de la variabilidad de %AR minimizando las posibles causas de error a un 3,4 % restante.

En la tabla 11 se observa que cuatro de los efectos tienen valores-p inferiores a 0,05 estos son la temperatura, pH, Relación E/S e interacción pH- Relación E/S (A, B, D y BD) indicando que son significativamente diferentes de cero al 95,0% de nivel de confianza. La única variable de acuerdo al modelo que no influye en el proceso de hidrólisis enzimática es el tiempo. (C)

Tabla 11. Valores-P de Varianza para %AR

Fuente	Valor-P
A:TEMPERATURA	0,0198
B:pH	0,0234
C:TIEMPO	0,6547
D:RELACION	0,0049
AB	0,1716
AC	0,4412
AD	0,2003
BC	0,1181
BD	0,0121
CD	0,3322

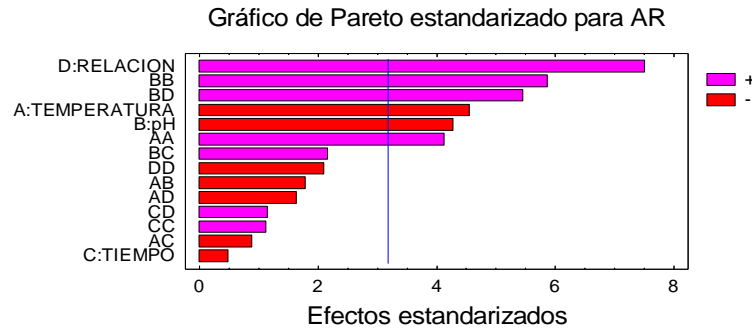
5.2.4 DIAGRAMA DE PARETO DE LOS FACTORES EN LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA

El diagrama de Pareto estandarizado, mostrado en la figura 9 es una representación gráfica donde se observan los factores más influyentes, en su respectivo orden (decreciente) sobre la optimización de AR.

Los efectos de color rojo (-) son inversamente proporcionales a la variable de respuesta (AR), mientras que los de color morado (+) son efectos directamente proporcionales a la variable de respuesta. El diagrama incluye una línea vertical cuya ubicación depende del intervalo de confianza determinado 95%. Todo efecto que sobrepase la línea será de considerable significancia para el proceso.

Del diagrama se observa que los factores más influyentes sobre el proceso son en su orden: relación E/S, interacción pH-relación E/S, temperatura y pH. Este orden de significancia sobre el proceso indica que un cambio en la relación E/S tendrá un efecto más relevante que cualquier otro cambio de otra variable, por lo cual la relación E/S es la de mayor importancia en el control del proceso.

Figura 9. Diagrama de Pareto

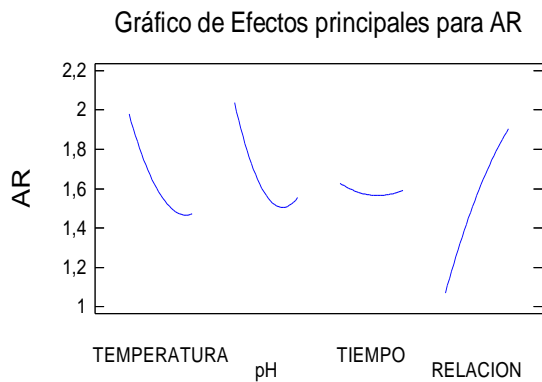


5.2.5 EFECTOS PRINCIPALES

De acuerdo a la gráfica de los efectos principales de los (ver figura 10) y complementando el análisis de Pareto se puede observar el efecto particular de cada una de las variables sobre la variable respuesta. Las representaciones de los efectos de la relación E/S, Temperatura y pH presentan pendientes que explican la significancia de estos efectos para el proceso y la sensibilidad de la variable de respuesta a estos factores. El efecto del tiempo presenta una línea con tendencia a ser constante, por lo tanto es una de las variables de menor importancia para el proceso. La variable que presenta mayor pendiente es la relación E/S, indicando que un pequeño cambio en el valor representa un gran aumento o disminución en la optimización de la hidrólisis enzimática del almidón del guandul.

La segunda variable con mayor pendiente es la temperatura y posteriormente la variable pH, con tendencia a ser constantes al aumentar tanto temperatura como pH.

Figura 10. Efectos Principales



5.2.6 VALORES ÓPTIMOS EN LA HIDRÓLISIS POR MSR

La Metodología de Superficie de Respuesta (MSR) permitió mediante el programa Statgraphics plus 5.1 encontrar los valores óptimos para la maximización de la variable respuesta %AR, los cuales se encuentran dentro del rango determinado previamente para el diseño de experimentos, sin embargo, la variable relación E/S, Temperatura y pH tienden a estar ubicadas en los extremos del rango de cada variable y la variable Tiempo, por tener menor influencia que las demás variables tiene un valor alejado del punto máximo. Estas condiciones son aplicadas a la muestra optimizada denominada Muestra OPT.

Tabla 12. Respuesta Optimizada por Método de Superficie de Respuesta

Factor	Inferior	Mayor	Óptimo
Temperatura(°C)	43	77	43
pH	2,6	6,8	6,8
Tiempo (min.)	59	361	270
Relación E/S	0,16	1,84	1,84

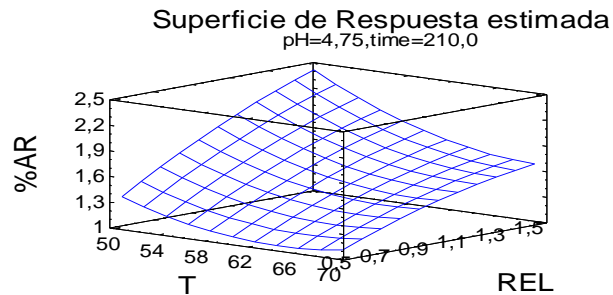
5.2.7 GRÁFICA DE SUPERFICIE DE RESPUESTA

En la figura 11 se muestra la superficie de respuesta que corresponde a la cantidad de Azúcares Reductores (%AR). En esta se representa dos de las variables como parámetros del gráfico (eje x y eje y) y una tercera que sería la variable de respuesta misma (eje z).

De acuerdo al modelo presentado por la metodología de superficie de respuesta, se grafica la variable relación y temperatura, las cuales son las variables que más influyen en el proceso de hidrólisis de enzimática, y las otras dos variables se dejan constantes, donde el desplazamiento se da a lo largo de los ejes, buscando una mayor relación del complejo enzimático y una menor temperatura, con una trayectoria de máxima inclinación en la cual la respuesta (cantidad de azúcares reductores) varía de forma más pronunciada.

En la superficie de respuesta se observa que para bajas temperaturas y altos valores de relación de enzima, se obtienen altos valores de rendimiento y aunque la gráfica no muestra un valor optimizado de la cantidad de azúcares reductores, sí satisface el objetivo de aumentar la digestibilidad de la harina de guandul, principalmente con el experimento optimizado (OPT) con valores de temperatura (43°C) y de relación E/S (1.84). Los datos de digestibilidad *in-vitro* se presentan más adelante en la tabla 13 y figura 12.

Figura 11. Superficie de respuesta para %AR



5.2.8 DIGESTIBILIDAD *In-vitro*

Para determinar la calidad nutricional del guandul se realizó la digestibilidad *in-vitro* del almidón presente en la harina de guandul y es definida como la capacidad de entregar más o menos glucosa, de manera más o menos rápida, a medida que ocurre el proceso de digestión en el organismo [22].

Las condiciones de digestibilidad *in-vitro* se clasifica así: rápidamente digestible (RDS), como el almidón que se hidrolizó dentro de 30 min de incubación, el almidón lentamente digerible (SDS) como el almidón digerido durante el período comprendido entre 30 y 120 min, y el almidón resistente (RS) como el almidón que no se hidrolizó en 120 min. Por lo tanto tenemos una Digestibilidad Total (DT) como la suma de SDS y RDS.

Los valores de digestibilidad encontrados se expresan en la tabla 13 y figura 12, y apuntan en general a una maximización del porcentaje de digestibilidad respecto de la harina nativa, cumpliendo con el objetivo establecido de mejorar este parámetro.

La harina nativa posee valores aproximados de RS de 25% y de DT de 75%, por el contrario todas las muestras de harina hidrolizadas presentaron mayor porcentaje de DT y bajos valores de RS. La muestra que presentó mejores valores de DT fue la muestra OPT, con un valor de DT 97.8% y RS 2.2%, mejorando notablemente el porcentaje de digestibilidad, en más de un 20% respecto al valor de harina nativa.

La hidrólisis enzimática realizada a la harina de guandul aumentó los valores de digestibilidad tanto en el almidón Rápidamente Digestible (RDS) como en el Almidón Bajamente Digestible (SDS), este incremento trae beneficios potenciales para la salud, como el SDS que está vinculado al metabolismo de la glucosa, manejo de la diabetes y la saciedad [23]. Además El SDS es completamente, pero más lentamente asimilado en el intestino delgado y es generalmente la forma más deseable de almidón de una dieta [24].

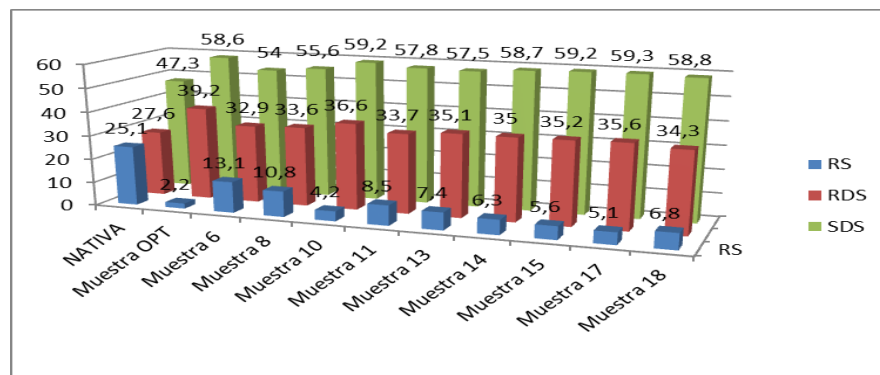
En cuanto al RDS es rápidamente y completamente asimilado en el intestino delgado y es asociado con elevación más rápida de la glucosa en plasma postprandial.

Finalmente el valor de RS disminuyó de un valor 25.1% de la harina nativa hasta un 2.2% en la muestra OPT, este bajo valor de almidón resistente (RS) no es absorbido en el intestino delgado pero se fermenta en el intestino grueso de los individuos sanos [27].

Tabla 13. Digestibilidad *in-vitro* muestras de harina nativa e hidrolizada de guandul.

MUESTRA	RDS (%)	SDS (%)	RS (%)	Digestibilidad total (DT) (RDS + SDS)%
NATIVA	27.6 ± 0.8	47.3 ± 0.3	25.1 ± 0.5	74.9
Blanco	29.9 ± 0.3	49.8 ± 0.4	20.3 ± 0.6	79.7
OPT	39.2 ± 0.4	58.6 ± 0.3	2.2 ± 0.2	97.8
Muestra 6	32.9 ± 0.5	54.0 ± 0.1	13.1 ± 0.3	86.9
Muestra 8	33.6 ± 0.9	55.6 ± 0.3	10.8 ± 0.3	89.2
Muestra 10	36.6 ± 0.4	59.2 ± 0.4	4.2 ± 0.4	95.8
Muestra 11	33.7 ± 1.2	57.8 ± 0.2	8.5 ± 0.2	91.5
Muestra 13	35.1 ± 0.9	57.5 ± 0.2	7.4 ± 0.2	92.6
Muestra 14	35.0 ± 0.5	58.7 ± 0.2	6.3 ± 0.2	93.7
Muestra 15	35.2 ± 0.8	59.2 ± 0.4	5.6 ± 0.4	94.4
Muestra 17	35.6 ± 0.3	59.3 ± 0.1	5.1 ± 0.2	94.9
Muestra 18	34.3 ± 1.2	58.8 ± 0.2	6.9 ± 0.2	93.1

Figura 12. Representación de la digestibilidad *in-vitro*



5.3 PRUEBAS TECNOFUNCIONALES

Las harinas se sometieron a los siguientes análisis: solubilidad en agua, absorción de agua y viscosidad, desarrollada en suspensiones acuosas de la harina. Los resultados de estos análisis se utilizan para determinar el efecto del proceso enzimático sobre las características físicas de las muestras.

Los índices de solubilidad y absorción de agua se utilizan como un indicativo del grado de modificación de la harina de guandul por tratamiento enzimático.

En las tablas 14 y 15 se presentan los valores que se obtienen en la determinación de las propiedades funcionales para la Capacidad de Retención de Agua (CRA) y el Índice de Solubilidad en Agua (ISA).

5.3.1 CAPACIDAD DE RETENCIÓN AGUA

La muestra optimizada según el programa de superficie de Respuesta, (muestra OPT) contiene el mayor valor de CRA, indicando que sería la mejor muestra para aplicaciones como productos, donde se requiere una buena viscosidad, como en sopas y salsas, también puede aplicarse en la extensión de la vida útil en productos cárnicos, es decir aplicaciones que impliquen retención de agua dentro de la molécula [28-29].

Los valores obtenidos en las mediciones de capacidades de retención de agua (CRA) de las muestras de *Cajanus cajan* de la tabla 14, muestran que la harina nativa presenta una menor CRA en las dos temperaturas, mientras que las muestras hidrolizadas presentan mayor CRA, además entre estas muestras y para cada temperatura en ascenso también aumenta el valor de CRA, por tanto la temperatura de reacción influye de manera positiva en la CRA de la harina nativa, pero aún más en las muestras hidrolizadas enzimáticamente. La capacidad de absorción de agua se incrementa con el paso de temperatura de 60°C a 90°C.

Las muestras evaluadas a temperatura de 30°C, no presentan cambios debido a la baja temperatura, por tanto no se reportan valores de CRA.

Tabla 14. Capacidad de Retención de Agua (CRA)

	60°C	90°C
Muestra	CRA (g gel/gmuestra) (BS)	CRA (g gel/gmuestra) (BS)
Harina	4,00±0.059	6,57±0.173
Blanco	5,74±0.311	7,93±0.054
1	6,00±0.126	9,95±0.087
2	6,02±0.067	6,87±0,046
4	6,04±0.058	8,87±0,096
5	6,15±0.063	7,81±0.067

6	5,82±0.246	7,17±0.026
7	6,11±0.036	8,80±0.376
8	5,88±0.057	9,56±0.048
9	5,70±0.018	9,28±0.087
10	5,71±0.146	7,69±0.278
11	5,63±0.294	8,37±0.043
12	5,62±0.029	8,75±0.100
13	5,74±0.087	7,60±0.234
14	5,03±0.091	9,67±0.254
16	5,69±0.027	7,47±0.153
17	6,43±0.301	8,55±0.058
18	5,54±0.027	7,03±0.064
OPT	7,46±0.150	9,91±0.105

5.3.2 ÍNDICE DE SOLUBILIDAD

En general todas las muestras presentan un incremento en la solubilidad, como consecuencia del hinchamiento de gránulos de almidón y del incremento de la temperatura, ya que a altas temperaturas se sucede una relajación progresiva de las fuerzas de enlace dentro del gránulo, esto se evidencia, en el rango de temperatura de 30°C a 50°C. (Ver tabla 15)

El valor más alto observado de solubilidad para las muestras de harina de guandul se presenta a 50°C esto se puede atribuir, a que, con el aumento de la temperatura el gránulo gelatiniza, resultando la ruptura del orden molecular dentro del gránulo y la solubilización de las moléculas de amilosa [30].

A 70°C la solubilidad disminuye debido a que en este momento los gránulos de almidón están cerca de la etapa de gelatinización y se encuentran en la retrogradación, en la cual los polímeros solubles del almidón y los fragmentos granulares insolubles presentes se reasocian después del calentamiento y se genera un incremento gradual en la rigidez [31].

Tabla 15. Índice de solubilidad.

	30°C	50°C	70°C
Muestra	Solubilidad g soluble/ gmuestra (BS)	Solubilidad g soluble/ gmuestra (BS)	Solubilidad g soluble/ gmuestra (BS)
Harina	6,48±0,38	24.94±0,004	24.67±0,130
Blanco	6,26±0,56	24.84±0,035	24.77±0,015
1	4.73±0,53	24.90±0,072	24.71±0,140

2	5.22±0,54	24.89±0,084	24.48±0,420
4	3.78±0,49	24.85±0,042	24.79±0,007
5	4.71±0,56	24.80±0,037	24.78±0,052
6	3.94±0,10	24.83±0,018	24.63±0,016
7	4.47±0,33	24.88±0,096	25.69±0,300
8	2.84±0,38	24.86±0,098	24.73±0,081
9	2.85±0,29	24.77±0,014	24.25±0,550
10	2.10±0,004	24.65±0,190	24.71±0,091
11	2.75±0,44	24.77±0,011	24.66±0,064
12	4.59±0,18	24.76±0,110	24.71±0,066
13	4.23±0,22	24.80±0,120	24.50±0,110
14	2.61±0,41	24.78±0,005	24.61±0,005
16	4.00±0,56	24.85±0,005	24.66±0,009
17	4.69±0,48	24.81±0,055	24.69±0,083
18	4.64±0,18	24.79±0,005	24.72±0,047
OPT	3.22±0,28	24.77±0,100	24.71±0,011

5.3.3 VISCOSIDAD

La alta temperatura de pasta o de gelatinización indica la presencia de almidón que es altamente resistente a la hinchazón. La temperatura de pasta ha sido reportada por Maninder Kaur, (2007), con un valor de 83.45 y las muestras de harina de guandul poseen valores en un rango entre 71.6°C-83.9°C. La viscosidad de pico es cuando un número suficiente de gránulos se hinchan y se produce un rápido aumento de la viscosidad.

Cuando la suspensión de harina de guandul (nativa e hidrolizada) con agua se calentó, los gránulos de almidón se hincharon hasta que alcanzó un punto en que la hinchazón es irreversible, este proceso es conocido como gelatinización y ocurrió en un rango de temperatura de 71.6-83.9°C. Durante este proceso, la amilosa lixivia del gránulo y causa un aumento en la viscosidad de la suspensión. Al aumentar la temperatura se produce la inflamación máxima de los gránulos y por tanto la mayor viscosidad, puesto que estos se rompen dando lugar a una dispersión completamente coloidal, dicha etapa estuvo en un intervalo de 90.0°C-91.8°C [32].

Finalmente se obtiene que el mejor valor de viscosidad en las muestras de harina hidrolizadas es la muestra OPT, (ver tabla 16) que puede ser utilizada como harina fina de guandul en pequeños gránulos, los cuáles son de baja solubilidad respecto a la harina nativa en las temperaturas de 30°C y 50°C (ver tabla 16) y debido a valores de baja viscosidad formaría suspensiones en agua que pueden ser mezclados y actuar como agente espesante en salsas.

Tabla 16. Datos de curvas de empastamiento de muestras

Muestra	Temperatura Gelatinización (°C)	Viscosidad máxima cP.
Harina nativa	75.6	70.6
1	77.5	23.9
2	87.1	16.8
3	82.2	23.4
4	77.3	30.8
5	83.1	20.6
6	82.3	19.8
7	77.3	21.2
8	76.7	23.6
9	83.9	17.1
10	76.6	19.3
11	78.2	19.0
12	76.5	18.3
13	77.3	21.2
14	76.5	26.0
15	-	-
16	79.0	22.1
17	76.5	21.3
18	78.2	20.2
OPT	71.6	56.6
Blanco	79	31.1

Muestra 15 agotada, no se pudo realizar el análisis.

5.3.4 MICROFOTOGRAFÍAS DE LA HARINA NATIVA E HIDROLIZADAS

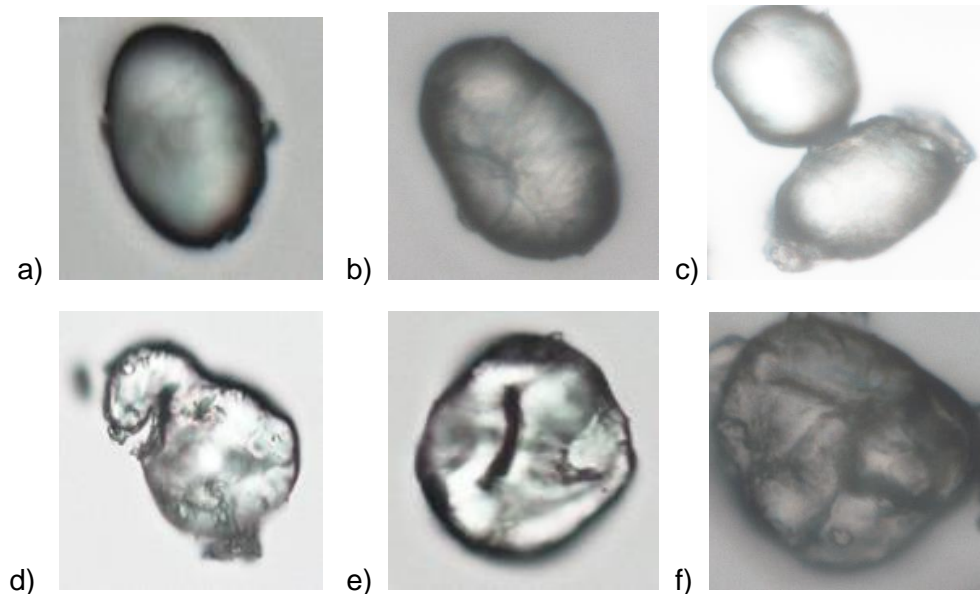
El método de microscopía óptica, permitió ver en tres dimensiones la forma y característica de la superficie de los gránulos de almidón, por lo tanto mostró la distribución de las diferentes estructuras en el gránulo y algunos de sus detalles después de la hidrólisis enzimática, comparándolo con la forma regular del almidón sin tratamiento enzimático, es decir de la harina nativa de guandul.

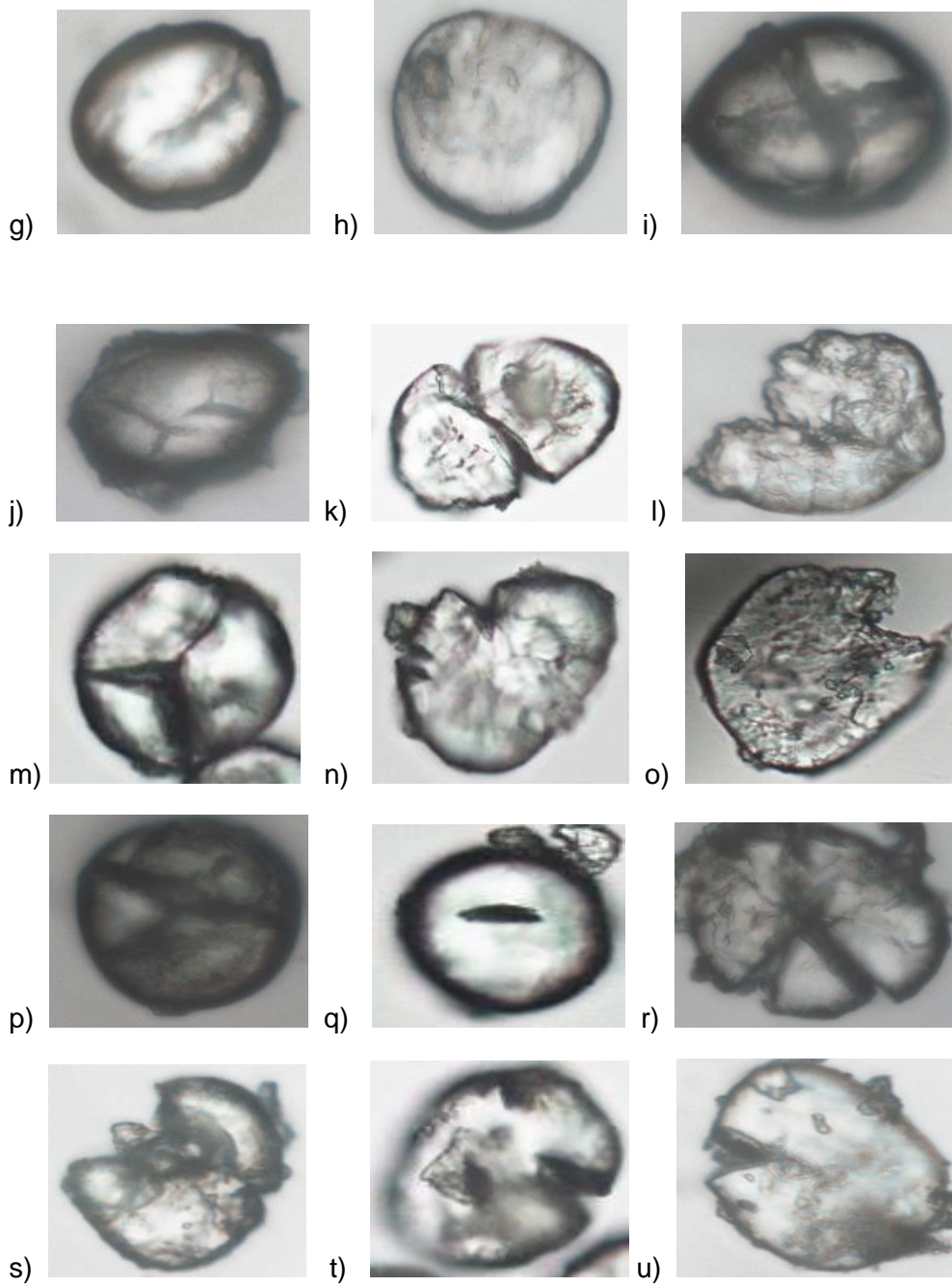
De acuerdo al grupo de enzimas endoamilasas y exoamilasas utilizadas en la hidrólisis, se encontró en las microfotografías alteraciones en la apariencia y estructura del gránulo de almidón, dando lugar a partículas de formas irregulares con superficies fragmentadas y rugosas como resultado del proceso de modificación enzimática. Estos cambios en la forma del gránulo se deben a las diferentes enzimas utilizadas, donde cada una es responsable del proceso de hidrólisis, por tanto la enzima α -amilasa (endoamilasa) actuó sobre los enlaces α -1-4 glucosídicos presentes en la parte interior (endo) de la cadena de amilosa y amilopectina. Los productos finales de la acción de la α -amilasa son

oligosacáridos de longitud variable una α -configuración y α -dextrinas límite, que constituyen oligosacáridos ramificados [32]. Para complementar la transformación enzimática era necesario utilizar enzimas tipo exoamilasas, y estas fueron Amylase™ AG 300L (Gluco-amilasa), Dextrozyme® GA 1.5X (Gluco-amilasa) con la función de atacar enlaces α -1-4 y α -1-6 glucosídicos; este tipo de enzimas exoamilasas y particularmente en este caso las gluco-amilasas, actúan sobre los residuos de glucosa exteriores de amilosa y amilopectina y por lo tanto producen solamente glucosa, además que el sustrato de preferencia es polisacáridos de cadena larga [32].

En la figura 13 se evidencia que la microfotografía de la harina nativa y la muestra blanco, poseen una forma elíptica, sin ningún tipo de deformación, con superficie suave y homogénea, característico de los gránulos de almidón sin modificación alguna. Por el contrario cada una de las muestras de harina sometidas a las diferentes condiciones de hidrólisis enzimática presentaron algún tipo de cambio en su estructura desde fisuras del gránulo, apariencia rugosa e irregular, cambios en su forma, hasta una deformación moderada, de acuerdo al conjunto de valores determinado para cada experimento con las variables pH, tiempo, temperatura y relación E/S.

Figura 13. Microfotografías de las muestras hidrolizadas de harina de guandul: a) Harina nativa(40x), b) blanco (100x), c) muestra 1. (100x), d) muestra 2. (40x), e) muestra 3. (40x), f) muestra 4. (100x), g) muestra 5. (100x), h) muestra 6. (100x), i) muestra 7. (100x), j) muestra 8. (100x), k) muestra 9. (40x), l) muestra 10. (100x), m) muestra 11. (40x), n) muestra 13. (40x), o) muestra 14. (x), p) muestra 16. (100x), q) muestra 17. (40x), r) muestra 18. (100x), s) muestra OPT. (100x), t) muestra 12. (40x), u) muestra 15. (100x).





6 CONCLUSIONES

- El análisis proximal del guandul, evidenció que es un alimento con alto valor nutritivo, destacándose el gran contenido de carbohidratos (63,02) y proteína (22,63).
- El mayor grado de hidrólisis enzimática se logró bajo las condiciones: temperatura 43°C, pH 6.8, tiempo 270 min. y relación de concentración enzima-sustrato 1.8, para un %AR 3.49, con potenciales aplicaciones, teniendo en cuenta las propiedades funcionales, como alimento de fácil digestibilidad, espesantes en sopas y extensión de vida útil en cárnicos.
- La digestibilidad de las muestras hidrolizadas enzimáticamente con α -amilasas mejoró hasta en un 20% comparado con la harina nativa, mejorando con ello la eficiencia parcial de utilización del alimento.
- La microscopía óptica corroboró la modificación de la hidrólisis enzimática evidenciado en la variación de la apariencia granular del almidón de acuerdo a los experimentos planteados por la metodología de Superficie de Respuesta.
- El modelo permite establecer condiciones para un tipo de aplicación específico, en la zona alimentaria puede implementarse para preparar alimentos compuestos, generando un alimento nutritivo y de digestibilidad rápida, aportando al proyecto PANES en la alimentación de niños y personas de la tercera edad.

7 RECOMENDACIONES

- Para incrementar la cantidad de %AR se recomienda incorporar al proceso enzimático enzimas que soporten altos valores de temperatura, (termamyl) o un pretratamiento de la harina como un precocido para facilitar la acción enzimática posterior y por tanto la hidrólisis.
- Por otro lado, se recomienda estudiar por separado la acción de cada enzima amilolítica sobre la harina de guandul.
- Se deben seguir realizando investigaciones tendientes a encontrar nuevas condiciones de hidrólisis, que permitan su aplicación como un alimento para requerimientos necesarios enmarcados en un campo alimentario y de salud.

8 BIBLIOGRAFÍA

- [1] Manual técnico para el manejo de guandul. Proyecto: asistencia técnica para el fortalecimiento de la producción agrícola y comercial de pequeños productores de quinua y guandul ubicados en trece municipios del departamento del Cauca. (2010). p.5-19.
- [2] TORRES, Alexia y GUERRA, Marisa. (2003). Sustitución parcial de harina de maíz precocida con harina de qinchoncho (*Cajanus cajan*) para la elaboración de arepas. INCI, nov. vol.28, no.11, p.660-664.
- [3] THU T, et al. (2003). *In vitro* regeneration and transformation of pigeonpea [*Cajanus cajan* (L.) Millsp.]. Molecular Breeding, Vrije Universiteit Brussel, Belgium 11: p.159.
- [4] TESTER, R.F y KARKALAS, X. (2004). Starch structure and digestibility Enzyme-Substrate relationship. World Poul Sci J, vol. 60: p.186-196
- [5] IMBACUAM, William Andrés y ARROYO, Julián Andrés. (2006). Producción de dextrinas de yuca a partir de almidón nativo en la rallandería TODOYUCA ubicada en el corregimiento Pescador (Municipio de Caldon, Departamento del Cauca) Universidad del Cauca. p. 42-43.
- [6] TESTER R.F y KARKALAS, X. (2006). Hydrolysis of native starches with amylases. Animal Feed Science and Technology vol.130 p.39–54
- [7] CAMARGO, C. J. y URZOLA, S. P. (2003). Evaluación de la modificación vía enzimática del almidón de ñame (*dioscorea trifida*) utilizando α -amilasa (termamil 120 I), Universidad de Sincelejo, Sucre, p. 35-37
- [8] ARISTIZABAL, J. A. (2004). Estudio de la viabilidad técnica y económica de la producción de dextrinas a partir de yuca utilizando tecnologías de vía seca. Proyecto Clayuca-ciat. Cali.
- [9] MARTINEZ PAMATZ, Rosa. (2002). Caracterización nutricional del guandul (*cajanus cajan*), basado en sus componentes químicos, desaparición *in situ* y cinética digestiva. Universidad de colima, México
- [10] NAN W. et al. (2009). Antioxidant Activities of Extracts and Main Components of Pigeonpea [*Cajanus cajan* (L.) Millsp.] Molecules. University Harbin. China
- [11] TORRES, Alexia. et al. (2006). Germinated *Cajanus cajan* seeds as ingredients in pasta products: Chemical, biological and sensory evaluation. Universidad Simón Bolívar, Caracas Venezuela
- [12] MILLER G.L. (1959). Use of Dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Anal. Chem. 31, p.426-428.

- [13] NIELSEN S. (1998). Food Analysis Second Edition; An Aspen Publication, Gaithersburg, Maryland.
- [14]. BENÍTEZ R, et al. Hidrolizados de proteína: procesos y aplicaciones. Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana. 2008; 42 (2): 227-36
- [15] HANS, G.; CHRISTOPHE M. Courtin y JAN A. Delcour. (2006). Use of enzymes in the production of cereal-based functional foods and food ingredients. Capítulo 11. p. 248.
- [16] FERNÁNDEZ C. Dolores y MELCÓN M. Piñeiro Barcia. Superficies de respuesta. Métodos y diseños. Pdf p.2-3
- [17] PEREZ, B. L. y ROGER, P. (1998). Macromolecular features of starches determined by aqueous highperformance size exclusion chromatography. Journal of Cereal Science 27: p.267-278
- [18] ANDERSON, R. et al. (1969). Gelatinization of corn grits by roll and extrusion cooking. Cereal Science Today, v. 14, p.4-12,
- [19] ENGLYST, K.N. et al. (1999). Rapidly available glucose in foods: an in vitro measurement that reflects the glycemic response. American Journal of Clinical Nutrition 69, p.448–454.
- [20] CHAPARRO R. et al. (2010). Efecto de la germinación sobre el contenido y digestibilidad de proteína en semillas de amaranto, quinua, soya y guandul. Facultad de Ciencias Agropecuarias vol 8 No. 1.
- [21] TORRES R. et al. (2003). Optimización en Modelos de Superficies de Respuesta. Rev. Facultad Agronomía. (Maracay) 29:p.69-83. Venezuela
- [22] BERTI C. et al. (2004). In vitro starch digestibility and in vivo glucose response of gluten- free foods and their gluten counterparts, Eur J Nutr; 43:p.198–204
- [23] LEHMANN, U. y ROBIN, F. (2007). Slowly digestible starch-its structure and health implications: A review. Trends in Food Science and Technology, 18, p.346–355.
- [24] JENKINS, D.J. et al. Glycemic index foods: A physiological basis for carbohydrate exchange. American Journal of Clinical Nutrition, 1981. 34, p.362-366.)
- [25] HOOVER, R. y ZHOU, Y. (2003). In vitro and in vivo hydrolysis of legume starches by α -amylase and resistant starch formation in legumes –A review. Carbohydrate Polymers, 54, p.401–417.
- [26] SAJILATA, M. G.; SINGHAL, R. S. y KULKARNI, P. R. (2006). Resistant starch A review. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 5, p.1–17

- [27] ASP. N.G. (1992). Resistant starch. Proceedings from the second plenary meetings of Eureka. European Journal of Clinical Nutrition, 46(Suppl.2), S1.
- [28] IDREES Ahmed Wani et al. (2013) Physico-chemical and functional properties of flours from Indian kidney bean (*Phaseolus vulgaris L.*) cultivars. LWT - Food Science and Technology xxx p. 1-7. India
- [29] PRAGATI Kaushal, et al. Comparative study of physicochemical, functional, antinutritional and pasting properties of taro (*Colocasia esculenta*), rice (*Oryza sativa*) flour, pigeonpea (*Cajanus cajan*) flour and their blends. LWT - Food Science and Technology Volume 48, Issue 1, September 2012, p 59-68. India.
- [30] SMITH, A. (2005). How plants make and degrade starch granules. In Proceedings Starch Update: The third conference on Starch Technology: 7-13 p.4-5 Bangkok, Thailand
- [31] BILIADERIS, C.G. (1992). Structures and phase transitions of starch in food systems. Food Technology. Vol 46, No. 6, p. 98-109,145.
- [32] MARC J.E.C. et al. (2002). Properties and applications of starch-converting enzymes of the α -amylase family. Journal of Biotechnology 94 p.137–155. The Netherlands.