UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS

MAESTRÍA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Caracterización de la Enzima Pinguinaina Microencapsulada

TESIS

Que presenta

IIA. Christian Valenzuela Berrelleza

Para obtener el grado de

MAESTRA EN CIENCIA Y
TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Directores

DR. ERNESTO AGUILAR PALAZUELOS
DRA. IRMA LETICIA CAMACHO HERNÁNDEZ

Culiacán, Sinaloa, México Abril de 2017

El presente trabajo de investigación titulado “Caracterización de la Enzima Pinguinaina Microencapsulada” se realizó en el laboratorio de Análisis Nutracéuticos de la Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos, de la Facultad de Ciencias Químico-Biológicas, de la Universidad Autónoma de Sinaloa, bajo la dirección de la Dra. Irma Leticia Camacho Hernández y del Dr. Ernesto Aguilar Palazuelos, a su vez, contó la asesoría de la Dra. Noelia Jacobo Valenzuela. Este proyecto fue financiado del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT). Christian Valenzuela Berrelleza recibió apoyo de CONACYT.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA

CARTA CESION DE DERECHOS

En la Ciudad de Culiacán, Sinaloa, el día 7 del mes de abril del año 2017, el (la) que suscribe Christian Valenzuela Berrelleza alumno (a) del Programa de Posgrado en Ciencia y Tecnología de Alimentos con número de cuenta 01082973, de la Unidad Académica de la Facultad de Ciencias Químico-Biológicas, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de Irma Leticia Camacho Hernández y Ernesto Aguilar Palazuelos y cede los derechos del trabajo titulado "Caracterización de la Enzima Pinguinaina Microencapsulada", a la Universidad Autónoma de Sinaloa para su difusión, con fines académicos y de investigación por medios impresos y digitales.

La Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México) protege el contenido de la presente tesis. Los usuarios de la información contenida en ella deberán citar obligatoriamente la tesis como fuente, dónde la obtuvo y mencionar al autor intelectual. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Christian Valenzuela Berrelleza

Nombre completo y firma

Dedico esta tesis:

A mis hijos; ***Christian Raúl y Ana Cristina****, esperando entiendan que es una muestra de amor hacia ustedes, ser mejor cada día es el ejemplo que quiero darles y que sientan que cada logro en la vida solo es la cosecha de cada uno de nuestros esfuerzos. A mis padres:* ***Sergio*** *y* ***Manuelita*** *porque gracias a ellos puedo encontrarme aquí y han hecho de mí una persona de bien, dándome siempre un apoyo sin condiciones. A ti* ***Juan****, por apoyarme en todo momento y hacerme ver que en la vida nos tenemos que poner retos y que nunca nada es suficiente siempre y cuando sea para mejorar. Los amo en gran medida. Fueron, son y seguirán siendo mi soporte.*

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a las personas e instituciones que han contribuido directa e indirectamente en este proyecto y que hicieron posible la culminación de este reto profesional y personal.

A **Dios** por permitirme llegar hasta aquí, por darme hoy las respuestas que una vez le pedí y que en su momento no entendía…hoy se por qué. A **MIS PADRES** por nunca rendirse y estar conmigo siempre ya fuera en los buenos y en los malos momentos. **A MIS HIJOS**; Chris y Anita, sé que sin ustedes me hubiese rendido antes. A ti JUAN, sabes que te quiero mucho y estoy muy agradecida contigo por llevar esta mochila junto conmigo.

A la **Dr. Irma Leticia Camacho Hernández** por haberme brindado la oportunidad de realizar esta tesis bajo su dirección, por hacerme participe de sus proyectos, por abrir las puertas de su laboratorio, su apoyo, asesoría y confianza, además de brindarme su amistad y juntas ser cómplices de muchos secretos, por cuidarme como mi mamá cuando me enfermé…la aprecio mucho usted lo sabe y la quiero, espero poder seguir en amistad con usted más allá de los proyectos académicos.

Al **Dr. Ernesto Aguilar Palazuelos** por su confianza y apoyo incondicional como persona, maestro y director de tesis, por sus asesorías y las molestias ocasionadas cuando no entendía algo de las gráficas y del análisis de datos. Es también un amigo para todos y eso ha generado un ambiente de confianza, nos hace sentir mejor.

A la **Dra. Noelia Jacobo Valenzuela** por su asesoría brindada para la realización de este trabajo y también por ser una gran persona, siempre la he visto

de buenas, además que siempre iba al laboratorio a preguntarme si se me ofrecía algo.

A mis compañeros de laboratorio: Amado (mi hermanito de proyecto), Luis, Perla, Xóchitl, Eibrajam, Chuy, Marquito, Agustín, Paty, Silveria, Jesica, Victor, Kike, Urrea……compartí tantos momentos muy padres con todos ustedes que la verdad no olvidaré….también fueron las mejores comidas, por algo somos y seguiremos siendo los Gordos Fitness☺.

A mis compañeras que compartíamos laboratorio, **MC. Claudia Barraza Elenes** con quien en este tiempo logramos hacer una bonita amistad, la cual valoro mucho. **Bianca** y **Lupita** porque no solo estuvimos en clase, compartimos también más momentos al estudiar hasta tarde y vivir juntas un tiempo….pasamos todo el proceso juntas, como olvidarlo.

A todos mis compañeros de generación, es especial a mis amigas **Alfa** y **Celeste**, somos y seguiremos siendo siempre los chicos de extrusión, al igual que **Chuy** y **Luis** y también de otras generaciones quienes de una u otra manera contribuyeron, también gracias.

A todos los maestros del programa de posgrado de la UAS, **Dr. José Ángel López Valenzuela**, **Dr. José de Jesús Caro Corrales**, **Dr. José Zazueta Morales**, **MC. José Zazueta Niebla**, **Dr. Misael Odín Vega García**, **Dr. Roberto Gutiérrez Dorado**, **Dr. Francisco Delgado Vargas** y **Dr. Armando Carrillo**.

Al **QFB. Israel Partida López** por prestarnos su liofilizadora cada vez que se necesitó y ser muy amable y servicial.

A la **Universidad Autónoma de Sinaloa** (UAS) y la **Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos**, por aceptarme y permitir formarme como estudiante de este posgrado.

A la **Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo (UAEH)**, Unidad Pachuca, por sus recursos e instalaciones para la etapa de MICRIENCAPSULACIÓN. Agradezco al Dr. Carlos Alberto Gómez Aldapa y a la Dra. Nayely Falfán Cortéz por aceptarme en mi estancia de investigación y ayudarme con las técnicas de laboratorio.

Y a la institución que con su apoyo económico hizo posible este proyecto, **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)**, por la beca otorgada.

Y por último, pero no sin menos importancia, a toda mi familia que ha contribuido positivamente en mi formación, ayudándome con mis hijos, ha sido un gran apoyo ya que sin ustedes no hubiese tenido el tiempo para dedicarme a mis estudios a tiempo completo, hoy pueden estar seguros que han hecho bien su trabajo y que lo tomaré en cuenta siempre, dentro de estas valiosas personas se encuentran mi hermana Mónica, hermano Sergio, mis tía Delmy y tío Arnoldo, además de las ninas Victoria y Chendy ☺.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS iv

ÍNDICE DE CUADROS v

I RESUMEN 1

ABSTRACT 3

II INTRODUCCIÓN 5

III REVISIÓN DE LITERATURA 7

A ENZIMAS 7

1 Clasificación 8

2 Conformación de la enzima y propiedades del centro activo 11

3 Métodos para la determinación de la actividad proteolítica 12

a Método de Sorensen 13

b Método de Balls y Hoover 13

c Método de Anson 13

4 Factores que afectan la actividad enzimática 14

a Efecto del pH 14

b Efecto de la temperatura 15

c Efecto de las concentraciones 16

5 Proteasas 17

a Clasificación de las proteasas 18

b Aplicación de las proteasas en la industria alimentaria 20
B FAMILIA BROMELIACEAE 22
1 *Bromelia pinguin* L 25
C MICROENCAPSULACIÓN 28
1 Microencapsulación mediante secado por aspersión 32
D ALMIDÓN 35
1 Amilosa 36
2 Amilopectina 36
3 Estructura del gránulo de almidón 39
4 Almidón nativo 39
5 Almidón modificado 40
a Tipos de modificaciones 41
1) Modificación por sustitución 41
a) Almidón succinatado 41
b) Almidón acetilado 42
c) Almidón modificado por el proceso de extrusión 43
IV JUSTIFICACIÓN 46
V HIPÓTESIS 47
VI OBJETIVOS 48
VII MATERIALES Y MÉTODOS 49
VIII RESULTADOS Y DISCUSIÓN 63
IX CONCLUSIONES 98

X BIBLIOGRAFÍA 100

Xi ABREVIATURAS 111

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Descripción	Pág.
1	Planta de *Bromelia pinguin* L.	26
2	Frutos de *Bromelia pinguin* L.	27
3	Morfología de los diferentes tipos de microcápsulas	31
4	Esquematización de un secador por aspersión	33
5	Polímeros de amilosa y amilopectina	38
6	Esquema de un extrusor y sus componentes	45
7	Micrografías del almidón de maíz ceroso	80
8	Micrografías de las microcápsulas de almidón nativo e hidrolizado	83
9	Micrografías de las microcápsulas obtenidas con almidón nativo y almidón hidrolizado	84
10	Efecto de PH sobre la actividad proteolítica de las microcápsulas	88
11	Efecto de la temperatura sobre la actividad proteolítica de las microcápsulas	91
12	Efecto de la fuerza iónica sobre la actividad proteolítica de las microcápsulas	94
13	Actividad proteolítica de la PPP microencapsulada durante dos meses de almacenamiento a 4°	96

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Descripción	Pág.
1	Clasificación enzimática	10
2	Especies del género de Bromelias	23
3	Análisis fisicoquímicos del jugo de aguama	65
4	Contenido de proteína y actividad proteolítica de la PPP	67
5	Índice de absorción en agua (IAA)	69
6	Índice de solubilidad en agua (ISA)	72
7	Porcentajes de sustitución de almidones modificados	75
8	Grado de sustitución de almidones modificados	76
9	Tamaño del gránulo del almidón nativo e hidrolizado	79

I. RESUMEN

Las enzimas son de gran importancia en la industria alimentaria debido a su especificidad y estabilidad, ayudando a mejorar los procesos para la obtención de productos. En la actualidad, se ha reportado que las plantas son fuente importante de enzimas. El estado de Sinaloa posee una gran diversidad de plantas silvestres, de las cuales se conoce poco, entre ellas podemos encontrar a *Bromelia pinguin* L, esta planta silvestre, contiene la proteasa pinguinaina, enzima que hasta el momento no ha sido aprovechada debido a que ha sido poco estudiada. Debido a la falta de estabilidad que presentan las enzimas una vez que han sido aisladas, es necesario el uso de in método que le brinde protección, como es el caso de la microencapsulación. En este trabajo se extrajo la enzima pinguinaina parcialmente purificada (PPP) del jugo de los frutos de Bromelia pinguin L. y se analizaron algunas características funcionales de la enzima sin encapsular y encapsulada. La actividad proteolítica específica (APE) de la PPP fue de 7.77 (Ucas/mg). Las matrices para la microencapsulación utilizadas fueron de almidón de maíz ceroso en estado nativo, hidrolizado y con modificación química mediante acetilación y succinatación. Se evaluó el comportamiento de la enzima sin encapsular y encapsulada respecto a factores que resultan importantes en el procesamiento de alimentos. Todos los tratamientos presentaron la máxima actividad proteolítica a pH 7.6 con valores de 7.77, 1.56, 1.74, 5.97 y 6.82 (Ucas/mg) para PPP sin encapsular, cápsulas de almidón nativo, hidrolizado, acetilado y succinatado respectivamente. Se observó una alta actividad proteolítica específica a los 75°C bajo las condiciones de este

estudio para la PPP sin encapsular (11.60 Ucas/mg), cápsulas de la PPP en almidón acetilado (7.82 Ucas/mg) y cápsulas de la PPP en almidón succinatado (10.33 Ucas/mg), mientras tanto, las cápsulas de PPP obtenidas con almidón de maíz nativo y almidón de maíz hidrolizado, presentaron la máxima actividad proteolítica específica a los 65°C (1.08 y 1.84 Ucas/mg) respectivamente. Se obtuvieron los mayores valores de actividad proteolítica específica en la PPP sin encapsular a concentraciones de NaCl bajas (de 0 a 0.6 M), mientras tanto, para los tratamientos encapsulados se pudo observar a concentraciones de 0.2 hasta 1.5 M la máxima actividad. Se evaluó el efecto del tiempo de almacenamiento sobre la actividad enzimática la PPP sin encapsular, presentando a tiempo cero la máxima actividad proteolítica específica (7.77 Ucas/mg) en comparación de las cápsulas de PPP en almidón nativo (1.56 Ucas/mg), cápsulas de PPP en almidón hidrolizado (1.74 Ucas/mg), cápsulas de PPP en almidón acetilado (5.96 Ucas/mg) y cápsulas en almidón succinatado (6.82 Ucas/mg). La PPP sin encapsular presentó solo 0.66 (Ucas/mg) de actividad proteolítica al segundo mes de almacenamiento, lo cual significa el 8.49% de su actividad inicial y los tratamientos encapsulados con almidón modificado por sustitución lograron retener una actividad enzimática más alta, 65.60% con almidón acetilado y 77.03% para almidón succinatado. Mientras tanto, las cápsulas obtenidas con almidón nativo y almidón hidrolizado retuvieron un 8.49% y 25% de su actividad inicial. Se sugiere el uso de la enzima pinguinaina microencapsulada en matrices de almidón acetilado y succinatado en el procesamiento de alimentos debido a sus atributos ya mencionados.

ABSTRACT

The enzymes are important in the food processing industry due to their stability and specifity, helping to improve the process for the obtaining products. Now day, there has been reported that the plants are important source of enzymes. The Sinaloa state, has a great diversity of native plants, of which it is know little, among them is *Bromelia pinguin* L., enzyme that is not taken advantage up to the moment, since it has been slightly studied. In this work the partially purified enzyme pinguinain was extracted (PPP) of the juice of fruits of *Bromelia pinguin* L. Because of the lack stability of enzymes when they are isolated of counterfoil of origin, is necessary to use a method of protection, it is the case of the microencapsulation. The proteolytic activity (PA) of PPP it was 7.77 (Ucas/mg). The materials we used for microencapsulation were a waxy maize starch: native, hydrolyzed, and with chemical modification for substitution with succinic acid and acetic anhydride. The behavior of the enzyme was evaluated unencapsulated and encapsulated with regard to factors that are important in the food processing (pH, temperature and ionic strength). Every treatment presented highest proteolytic activity to PH 7.6 with values of 7.77, 1.56, 1.74, 5.97 and 6.82 (Ucas/mg) for PPP unencapsulated, native starch capsules, hydrolyzed starch capsules, acetylated starch and succinated starch capsules, respectively. An increase was observed in the proteolytic activity to them 70° C under the conditions of this essay for PPP unencapsulated (11.60 Ucas/mg), capsules of PPP in succinated starch (10.33 Ucas/mg) and capsules of PPP in acetylated starch (7.82 Ucas/mg). Meanwhile, the capsules obtained with native starch and hydrolyzed, they presented the maximum proteolytic activity to them 65° C (1.08 and 1.84

Ucas/mg) respectively. The high proteolytic specifies activity of the PPP unencapsulated was obtained to concentrations of NaCl (0.2 M), in the encapsulated treatments it was observed to saline concentrations from 0.2 up to 1.5 M. The storage time was evaluated on the enzymatical activity, presented in zero-time one proteolytic activity of 7.77 (Ucas/mg) in comparison with the capsules of PPP in native starch (1.56 Ucas/mg), capsules of PPP in hydrolyzed starch (1.74 Ucas/mg) capsules of PPP in acetylated starch (6.82 Ucas/mg) and capsules of PPP in succinated starch (6.82 Ucas/mg). The PPP unencapsulated presented only 0.66 (Ucas/mg) of proteolytic activity to the second month of storage, which means 8.49% of their initial activity and the treatments encapsulated with modified starch by substitution, they managed to retained one enzymatical activity of 65.60% with acetylated starch and 77.03% with succinated starch. The capsules obtained with native starch and hydrolyzed starch retained 8.49% and 25.0% of their initial activity. An enzymatical source of our state, it is pinguinain, it can be used well stability if is it encapsulated with materials elaborated of maize starch modified chemically for acetylated and succinated, thus increasing, the application in the food processing industry.

Keywords: modified starches, microencapsulation, pinguinaina enzyme, proteolytic specifies activity.

II. INTRODUCCIÓN

El uso de las enzimas en la industria alimentaria ha tenido un crecimiento importante en los últimos años y han sido utilizadas para mejorar las características de las materias primas o bien, para generar nuevos productos. Las proteasas son un tipo de enzimas encargadas de la hidrólisis proteica, causando la ruptura de enlaces peptídicos y como consecuencia, se generan péptidos de menor tamaño, así como aminoácidos libres (Rudenskaya 1998).

La enzima pinguinaina es una proteasa cisteínica que puede ser aislada de los frutos de Bromelia pinguin L., es conocida también como aguama y esta especie pertenece a la familia de las Bromeliáceas la cual es nativa del Estado de Sinaloa (Pío 2012).

Una vez que son retiradas de su matriz de origen, las enzimas presentan una estabilidad limitada en cuanto a su estructura y funcionalidad (Soberanes 2014).

La tecnología basada en la microencapsulación tiene diversas aplicaciones en la industria de alimentos procesados. Es una técnica ampliamente usada para preservar sustancias bioactivas, las cuales se introducen en una matriz o sistema pared para protegerlos contra el deterioro (Yañez y col 2002).

En la actualidad se encuentran una gran diversidad de agentes encapsulantes en el mercado, pero su alto costo puede limitar su uso. Es posible obtener diferentes matrices encapsulantes a base de almidón modificado químicamente por extrusión.

Se hace necesaria la modificación del almidón ya que de manera nativa sus aplicaciones en la industria se ven limitadas debido a sus propiedades intrínsecas.

Con base en lo anteriormente mencionado, el objetivo de este trabajo es caracterizar la enzima pinguinaina microencapsulada en una matriz de almidón de maíz ceroso modificado y evaluar el la estabilidad de la misma con base en su actividad proteolítica respecto a distintos parámetros importantes en el procesamiento de alimentos (pH, temperatura y fuerza iónica) además de evaluar la protección adquirida por las distintas matrices encapsulantes durante el tiempo de almacenamiento sobre el componente activo.

III. REVISIÓN DE LITERATURA

A. ENZIMAS

Las enzimas son catalizadores biológicos que llevan a cabo reacciones bioquímicas a muy altas velocidades y con un elevado grado de especificidad, en su ausencia, la mayoría de las transformaciones químicas requeridas para mantener activas las células tardarían mucho tiempo en efectuarse o simplemente no procederían (Badui 1993).

Las enzimas presentan características propias, entre las cuales se pueden mencionar:

- Su gran poder catalítico

- Alto grado de especialización

- Elevado grado de especificidad en lo que a sus sustratos se refiere

- Funcionan bajo ciertas condiciones de temperatura, pH y en soluciones acuosas.

El efecto catalizador de las enzimas se debe a que disminuyen la energía de activación de la reacción y facilita la unión de los reactantes en una posición adecuada para que se lleve a cabo la misma. Las enzimas son capaces de sintetizar cientos de reacciones de manera consecutiva en las rutas metabólicas, lo que permite la absorción, asimilación y degradación de nutrimentos necesarios para la sobrevivencia del ser vivo, y, debido a su capacidad de regulación, permiten a su vez que las rutas metabólicas funcionen de manera armoniosa y de acuerdo a los requerimientos del organismo (Laguna y Piña 1990).

Existen una gran cantidad de enzimas, es importante conocer su nomenclatura y clasificación que permitan diferenciar entre una y otra para que sea más fácil su utilización.

1. Clasificación enzimática

La nomenclatura y clasificación de las enzimas está basada en el tipo de reacción química a la cual catalizan, de esta forma, es asignado un código de cuatro números (Código EC) en el cual, el primer número indica la clase de la enzima, esto se explica en el **Cuadro 1**; el segundo número corresponde a la primera subclase y se refiere al grupo o enlace que lleva a cabo la transformación o está siendo donado; el tercer número identifica la tercera subclase e identifica el compuesto aceptor, una característica secundaria del grupo que está siendo transformado, un tipo de reacción o una característica posicional, dentro de esta subclase, el número 99 es asignado a aquéllas cuyo mecanismo no ha sido definido aún; el cuarto y último número es solamente usado como identificación específica para la enzima en cuestión (Nelson y Cox 1993; Voet y Voet 1995).

Cada una de las diferentes clases se divide a su vez en subclases, en el caso de las hidrolasas las subclases se distinguen según el enlace que es sometido a hidrólisis, así tenemos:

1. Enlace éster

2. Enlace glucosídico

3. Enlace éter

4. Enlace peptídico

5. Enlace C-N que no constituye una unión peptídico.

De acuerdo a lo anterior mencionado, las proteasas se encuentran dentro de la clase 3 correspondiente a enzimas hidrolíticas y a su vez, a la subclase 4, por llevar a cabo la hidrólisis de enlaces peptídicos.

Cuadro 1. Clasificación enzimática de acuerdo a su reacción de catálisis.

Número EC	Clase	Descripción
1	Óxidoreductasas	Catalizan reacciones que involucran la transferencia de electrones.
2	Transferasas	Transfieren un grupo de un compuesto a otro.
3	Hidrolasas	Hidrolizan enlaces químicos mediante la adición de agua.
4	Liasas	Adicionan grupos a dobles enlaces, o forman dobles enlaces mediante la remoción de grupos.
5	Isomerasas	Transfieren grupos dentro de una molécula produciendo isómeros.
6	Ligasas	Ligan dos moléculas a través de una reacción usando eventualmente ATP como fuente de energía.

Fuente: Voet y Voet (1995).

2. Conformación de la enzima y propiedades del centro activo

La propiedad catalítica de las enzimas parece depender de la facilidad con la que ayudan a que se pongan en contacto las sustancias reactantes para dar el producto o productos de la reacción.

Esto implica que el sistema enzimático tenga una conformación especial o sea, una disposición adecuada de los grupos funcionales, aminoácidos de la apoenzima y grupos prostéticos, cuando existen estos y de las moléculas mismas de los sustratos que se unirán a aquellos y permitirán que se lleve a cabo la reacción química. Este acercamiento de las sustancias reactantes de los grupos prostéticos y los grupos funcionales fue las razón del modelo de Ehrlich, conocido clásicamente como de la "llave y la cerradura" (Nelson y Cox, 1993). Así las enzimas pueden sufrir un cambio en su estructura desde el momento en que entran en contacto con los reactantes, sustratos y cofactores, y es posible que todos ellos modifiquen el arreglo tridimensional de la enzima; la enzima los recibe en un orden determinado y cada uno de ellos al unirse a la enzima, modifica su estructura. La nueva analogía es la del "guante y la mano"; aquel no representa una estructura de negativo tridimensional mientras no se halla la mano en el, ya que antes pueden tener diversas formas y disposiciones, una vez que ha entrado la mano que a su vez también puede adoptar distintas posiciones, se ponen en contacto todas las partes correspondientes, es decir, en el caso de la enzima, las partes reactivas del sistema enzimático, con las partes reactantes, o sea los sustratos. Se ha preservado con esta nueva idea, el aspecto de la armonía estructural del sustrato y la enzima pero se introduce el nuevo concepto de que es necesario provocar un cambio en la estructura proteica que

favorezca la colocación adecuada de todos los elementos que interviene en la reacción enzimática. Los cambios de la estructura proteica se denominan conformacionales. El cambio en la disposición tridimensional puede hacerse a distancia y en muchas ocasiones la unión del sustrato a una parte de la enzima modifica otras zonas de ella y aún su estructura completa, debido a plegamientos que acercan o alejan diversos grupos colocados a lo largo del péptido que forma la enzima. Esta alteración múltiple y de tipo flexible, permite entender mejor el proceso de entrada ordenada de los sustratos, y los cofactores y la reacción en la que se participan. También permiten comprender porque un sustrato entra a una enzima y es atacado y uno que no lo es aún muy parecido a él, puede quedar excluido del centro activo (Laguna Piña 1997). La enzima actúa con máxima eficacia sobre el sustrato natural y con menor eficacia sobre los sustratos análogos. Entre las enzimas poco específicas están las proteasas digestivas como la quimotripsina, que rompe los enlaces amida de proteínas y péptidos de muy diverso tipo.

2. Métodos para la determinación de la actividad proteolítica

El primer requerimiento para aislar una enzima es encontrar un ensayo cualitativo de actividad, mediante el cual pueda valorarse convenientemente. Para decidir si un paso de la purificación tiene sentido, es necesario medir la cantidad de enzima y la cantidad de impurezas antes y después de esta paso, y posteriormente realizar una comparación de los resultados de varios procedimientos posibles (Calvo 2003).

La naturaleza del ensayo va a depender del tipo de reacción que cataliza la enzima, a veces resulta conveniente la medición de la aparición o degradación de algún sustrato en específico.

a. Método de Sorensen

Conocido también como titulación formólica, por este método se puede medir directamente la hidrólisis de enzima-sustrato realizada por una cantidad conocida de enzima. Los sustratos usados comúnmente son la caseína y la gelatina (Sinche 2009).

b. Método de Balls y Hoover

Este método se basa en la habilidad de la enzima para coagular la leche, tomando como referencia de actividad proteolítica el tiempo necesario para que una cantidad conocida de enzima coagule un determinado volumen de solución de leche, y la actividad se expresa en términos de unidades de leche coagulada por g de preparación enzimática (Chaverri 1983).

c. Método de Anson

Se basa en la hidrólisis de proteínas y tiene como base la cuantificación de la cantidad de producto formado por la proteólisis enzimática de un sustrato proteico como la caseína y la hemoglobina. Ésta técnica, detiene la acción de la hidrólisis con la adición de ácido tricloroacético (TCA) a la mezcla de reacción, de modo que se precipita el sustrato aún sin degradar, como la enzima, mientras que los péptidos resultantes se mantienen estables en la solución (Sinche 2009).

3. Factores que afectan la actividad enzimática

Según Badui (1993), los cambios en la conformación suelen ir asociados en cambios en la actividad catalítica. Los factores que influyen de manera más directa sobre la actividad de una enzima son: el pH, la temperatura y las concentraciones.

a. Efecto del pH sobre la actividad enzimática

Las enzimas tienen un pH óptimo o un intervalo de pH en el que su actividad es máxima; a valores superiores o inferiores de pH la actividad disminuye. Esto no es sorprendente dado que algunas cadenas laterales de aminoácidos pueden actuar como ácidos o base débiles que desarrollan funciones críticas en el sitio activo del enzima. El cambio en el estado de ionización de grupos del sitio activo es un motivo frecuente, que aunque no único, del cambio de actividad. El grupo ionizado podría también afectar a algún aspecto crítico de la estructura de la proteína. La eliminación de un protón de un resto de His fuera del sitio activo podría, por ejemplo, eliminar una interacción iónica esencial para la estabilización de la conformación activa del enzima. Menos frecuente son los caos en los que el grupo titulado se halla en el sustrato (Badui, 1993).

El intervalo de pH en el que cambia la actividad puede proporcionar alguna pista sobre el aminoácido implicado. Por ejemplo, un cambio en la actividad enzimática cerca de pH 7.0 refleja frecuentemente la ionización de un residuo de Histidina (His). No obstante, el efecto del pH ha de interpretarse con cautela. En el ambiente compacto de una proteína, el pK de las cadenas laterales de los aminoácidos puede cambiar significativamente. Por ejemplo, una carga positiva próxima puede disminuir

el pK de un residuo Lys mientras que la proximidad de una carga negativa puede aumentarlo. Estos efectos dan lugar, en ocasiones, a valores de pK que están modificados en 2 o más unidades de pH. Hay un residuo de Lys en el enzima acetodescarboxilasa que tiene un pK de 6.6 (el normal es 10.5) debido a los efectos electrostáticos de cargas positivas cercanas (Nelson y Cox 1993).

La papaína se extrae del látex de la papaya en donde se encuentran en una concentración de 10% aproximadamente, un pH óptimo de 6.5 y en su centro activo se encuentra un grupo sulfidrilo. Por su parte la bromelaína es una glicoproteína que contiene manosa, xilosa, mucosa y N-acetil-D-glucosa-mina, de pH óptimo de 5 a 8. La pepsina presenta dos carboxilos en su centro activo, tiene un punto isoeléctrico de 1.0 actúa mejor a pH 1.8 La renina se obtiene del cuarto estomago de becerros, cabritos, corderos y terneras, en sistemas modelos presenta una mayor actividad a pH 3.8, pero en la leche lo hace mejor a pH 5.0 (Badui 1993).

b. Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática

En general, los aumentos de temperatura aceleran las reacciones químicas: por cada 10 ºC de incremento, la velocidad de reacción por lo general se duplica. Las reacciones catalizadas por enzimas siguen esta ley general. Sin embargo, al ser proteínas, a partir de cierta temperatura, se empiezan a desnaturalizar por el calor. La temperatura a la cual la actividad catalítica es máxima se llama temperatura óptima. Por encima de esta temperatura, el aumento de velocidad de la reacción debido a la temperatura es contrarrestado por la pérdida de actividad catalítica

debida a la desnaturalización térmica, y la actividad enzimática decrece rápidamente hasta anularse (Nelson y Cox 1993).

Las velocidades de reacción son generalmente sensibles a la temperatura. En el caso de las reacciones biomoleculares, un aumento de 10 ºC incrementa su velocidad entre 1,5 y 5 veces. Para explicar este hecho se postuló que al incrementar la temperatura aumenta la fracción de moléculas capaces de tener una energía suficiente para alcanzar un "estado activado" que luego se transforme en producto de la reacción por formación o ruptura de enlaces químicos (Nelson y Cox 1993). Se admite que las únicas moléculas que reaccionan son aquellas que al chocar llevan consigo una energía mayor que un cierto valor mínimo.

Éste valor de energía necesaria se le denomina energía de activación y es un factor de suma importancia para determinar la magnitud de la velocidad de reacción (Roberts 1977).

c. Efecto de la presencia de iones en la actividad enzimática

En el caso de la fuerza iónica, ésta altera su estructura tridimensional, lo que trae consigo modificaciones del sitio activo. Por otra parte, los iones de metales pesados, como mercurio, plata y plomo, generalmente inhiben la acción enzimática, mientras que varios cationes y aniones actúan como activadores; tal es el caso de los cationes de calcio, magnesio, cobre, cobalto, sodio, níquel, potasio, manganeso, hierro y cinc, así como aniones de cloro, bromo, yodo. Para cada enzima, deberá analizarse la necesidad de alguna de estas especies, o bien, el daño que pudieran ocasionar. El efecto activador se debe a que en ocasiones forman parte del sitio activo, se

requieren para la interacción de la enzima con el sustrato o ayudan a mantener la conformación tridimensional, interactuando con alguna región de la enzima. Algunas enzimas requieren de otros cofactores para poder presentar la actividad catalítica (Badui 1993).

A veces, una enzima requiere para su función la presencia de sustancias no proteicas que colaboran en la catálisis: los cofactores. Los cofactores pueden ser iones inorgánicos como el Fe++, Mg++, Mn++, Zn++ etc.; casi un tercio de los enzimas conocidos requieren cofactores. Cuando el cofactor es una molécula orgánica se llama coenzima. Muchos de estas coenzimas se sintetizan a partir de vitaminas (Nelson y Cox 1993).

4. Proteasas

Las enzimas proteolíticas o proteasas comerciales hidrolizan los enlaces peptídicos con diferentes grados de intensidad y de selectividad; por este motivo, se usará la enzima más adecuada de acuerdo con la necesidad de la transformación requerida. Existen de origen vegetal (papaína, bromelaína), animal (pepsina tripsina y quimiotripsina) y microbiológico (hongos y bacterias); en general, las primeras hidrolizan las uniones que contienen aminoácidos básicos, leucina o glicina (Badui 1993).

La proteólisis juega un rol importante en muchos procesos biológicos, tales como digestión, recambio de proteínas y la defensa de patógenos (Ross y col 1994), así como también participa en la fisiología de la planta, llevando a cabo la catálisis de importantes procesos como hidrólisis de proteínas de almacenamiento durante la

germinación de la semilla, activación de proenzimas, degradación de proteínas defectuosas, etc. (Rudenskaya y col 1998).

Hoy en día, las proteasas de origen vegetal son de especial interés para la medicina y la industria debido a que son activas dentro de un amplio rango de temperatura y pH (Uhlig 1998).

a. Clasificación

De acuerdo a la EC-IUBMB, las proteasas se dividen en endopeptidasas y exopeptidasas.). Las exopeptidasas se dividen a su vez en aminopeptidasas (3.4.11-14.) y carboxipeptidasas (3.4.15-17).

Las endopeptidasas son aquéllas que hidrolizan enlaces internos de la proteína y pueden ser de acuerdo al residuo aminoacídico involucrado en el sitio activo y responsable de la actividad de la enzima:

1) Proteasas serínicas

Estas proteasas se caracterizan por presentar un residuo de serina (Ser) en su sitio activo, responsable del ataque nucleofílico sobre el carbonilo del enlace peptídico. La mayoría de las proteasas serínicas poseen en su sitio activo la llamada triada catalítica, compuesta por el residuo de Ser (nucleófilo del mecanismo catalítico), una histidina (His) (residuo básico que desprotona el tiol) y un aspartato (Asp) (grupo electrófilo). También se han descrito proteasas serínicas con triadas e incluso diadas catalíticas diferentes (Hedstrom 2002).

2) Proteasas aspárticas

Estas proteasas llamadas también acídicas, se caracterizan por poseer dos residuos de Asp altamente conservados en su sitio activo. En este caso, el grupo nucleofílico es una molécula de agua que se desprotona por el ataque de un Asp del sitio activo (Rao y col 1998). La gran mayoría de las proteasas aspárticas presentan actividad máxima a valores de pH bajos (entre 3 y 4).

3) Proteasas metálicas

Se caracterizan por presentar un ión catiónico en su sitio activo, que coordina una molécula de agua y el oxígeno carbonílico del enlace peptídico a atacar, siendo el ion metálico el responsable de activar la molécula de agua para transformarla en un nucleófilo. Todas las proteasas metálicas comparten la característica de inhibirse con agentes quelantes como el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), entre otros. En catión más frecuente en ella es el zinc, aunque también se han encontrado (Rao y col 1998).

4) Proteasas cisteínicas

El mecanismo catalítico de las proteasas cisteínicas involucra la formación de un intermediario enzimático acilado. El ataque nucleofílico se realiza a través del grupo tiol reactivo de una cisteína presente en el sitio activo. El tiol se transforma en un nucleófilo al desprotonarse gracias a un residuo de His adyacente (Tan y col 2013).

b. Aplicaciones de las proteasas en la industria alimentaria

La producción de enzimas para uso industrial tuvo sus orígenes en Dinamarca y Japón, a finales del siglo XIX, cuando se produjeron las primeras preparaciones de renina a partir del estómago de terneros y de amilasa de origen fúngico (Carrera, 2003).

La incorporación de enzimas a los procesos de transformación de alimentos los vuelve más eficientes y menos costosos, es de esta manera que se pueden procesar altos volúmenes de materiales ya que con bajas cantidades de enzima se puede transformar grandes cantidades de sustrato (Briones y col 2008).

Las proteasas constituyen el grupo más importante de las enzimas que más se utilizan en la industria de alimentos, Bruno (2008) menciona que representan más del 50% del total de las ventas generadas por todas las enzimas comerciales.

La mayor parte de la producción de enzimas en el mundo está destinada a la obtención de proteasas (Carvajal y col 2010). La función de las proteasas es hidrolizar proteínas, es decir, catalizar la disociación del enlace peptídico (carbono-nitrógeno), produciendo cadenas más cortas llamadas polipéptidos y liberando aminoácidos. Las proteasas son funcionales sobre una proteína en particular sólo si la proteína se encuentra en una forma física específica (Moodie 2001).

Medir la actividad proteolítica sobre algún sustrato es una manera sencilla de conocer la especificidad de las enzimas, proporcionando información importante para las aplicaciones biotecnológicas que éstas pudieran tener, por ejemplo: producción de péptidos bioactivos obtenidos de proteínas alimentarias, como las caseínas y

proteínas del suero de leche (Walsh 2002). La hidrólisis enzimática es fuertemente preferida sobre los métodos químicos debido a que produce hidrolizados que contienen mezclas de péptidos bien definidos y evita la destrucción de L aminoácidos como lisina y alanina y la formación de sustancias tóxicas (Lahl y col 1994; Mahmoud 1994).

Las proteasas son herramientas que han sido usadas tanto en la medicina como en la industria por cientos de años. Sin embargo, en años recientes, su utilidad se ha vuelto de vital importancia dada su disponibilidad, potencia y preparaciones activas con buena solubilidad, estabilidad y olor, de ésta manera las proteasas de plantas han recibido especial atención en el campo de la medicina y la industria debido a la propiedad de ser altamente activas en un amplio rango de temperaturas y pH (Uhlig, 1998). Se ha encontrado también que ciertas proteasas son útiles en el ablandamiento de carnes, por ejemplo, la papaína y bromelaína, las cuales se utilizan en la industria cárnica debido a que es muy eficiente en la degradación de proteínas fibrosas y tejidos conectivos, también se aplican proteasas en la panadería para la degradación del gluten, mejorando así el ablandamiento y textura de la masa (Neklyudov y col 2000).

Actualmente, en la industria de los alimentos se prefiere el uso de proteasas de origen vegetal debido a que la FDA (Food and Drugs Administration) las considera como seguras para el consumo (GRAS) ya que provienen de frutos comestibles que no presentan toxicidad para el consumo humano (Soberanes 20014).

Entre las proteasas vegetales de interés alimentario, se encuentran las cisteínicas o sulfhidrílicas, las cuales generalmente se pueden extraer de platas de la familia de las Bromeliáceas. Se han obtenido enzimas provenientes de bromelias, por ejemplo, la papaína, bromelaína, fiscina, hemisfericina, pinguinaina, entre otras, las cuales pudieran tener un campo de acción comprometedor en la industria alimentaria, ya que se ha reportado anteriormente que las enzimas vegetales son activas en un amplio rango de pH y temperatura (Uhlig 1998). Las aplicaciones industriales tradicionales se refieren a la producción de una transformación útil por alguna enzima, ya sea que esté presente de manera natural o añadida intencionalmente. Una de las fuentes de proteasas de origen vegetal son las plantas de la familia de las bromelias.

B. FAMILIA BROMELIACEAE

Bromeliaceae es una familia botánica que se encuentra casi exclusivamente en el Neotrópico (excepto por *Pitcairnia feliciana*, que es africana). Según Givnish y col (2011), la familia posee cerca de 3,140 especies en 58 géneros. En México se pueden encontrar 342 especies y 18 géneros (Espejo y col 2007).

Bromelia es un género de las plantas americanas tropicales caracterizadas por las flores con una hendidura profunda en el cáliz. Las especies que conforman este género se encuentran el **Cuadro 2**.

Las plantas de la familia BROMELIACEAE usualmente producen grandes cantidades de peptidasas, las cuales no tienen función aparente en el crecimiento y desarrollo de la planta (Boller 1986).

Cuadro 2. Especies del género de las Bromelias.

Bromelia antiacantha	***Bromelia goeldiana***
Bromelia arenaria	***Bromelia goyazensis***
Bromelia humilis	***Bromelia hieronymi***
Bromelia karatas	***Bromelia palmeri***
Bromelia macedoi	***Bromelia scarlatina***
****Bromelia balansae***	***Bromelia serra***
Bromelia chrysantha	***Bromelia sylvicola***
Bromelia flemingi	***Bromelia pinguin***

Fuente: Barraza (2016).

Las bromeliáceas son plantas monocárpicas que sólo florecen una vez en su vida, su flor puede durar varios meses. Luego mueren lentamente, no sin antes haber dado unos hijos que crecerán, florecerán y morirán tras haber dado nuevos hijos (Plantencyclo 2005).

1. *Bromelia pinguin* L.

La aguama (*Bromelia pinguin* L.) pertenece a la familia BROMELIACEAE, la cual está formada por 56 géneros (Sajo y col 2004). Esta familia BROMELIACEAE se caracteriza por tener un alto contenido de compuestos flavonoides. Por la presencia y la variedad de estos compuestos es única entre las monocotiledóneas (Abreu 2001).

Bromelia pinguin crece en el Caribe, en el sur de Panamá, Guyana Francesa y México; en México se encuentra distribuida desde el estado de Sonora hasta Chiapas por toda la Costa del Pacífico, y en los estados de Veracruz y Yucatán, encontrándose también en el Estado de Sinaloa (Limón 2002).

La planta de *Bromelia pinguin* L. es también conocida localmente como aguama, ésta tiene hojas largas, con forma de espada, color verde oscuro, mismas que tienen espinas dorsales curveadas en sus bordos de alrededor 5 mm de largo, las hojas típicas de aguama se pueden apreciar en la **Figura 1**.

En particular el fruto de aguama contiene aceites secantes, carotenos, hidrocarburos, azúcares reductores, triterpenos-esteroles, saponinas, taninos, aminoácidos y flavonoides. En la **Figura 2** se muestran los frutos de aguama una vez que fueron retirados de su tallo. Existen muchas aplicaciones que la población de

América Latina le ha dado a los frutos de *Bromelia pinguin* L, por ejemplo en el tratamiento de enfermedades como tos, vómitos con sangre, diabetes, y problemas renales. Además, el fruto es consumido como alimento, y la población lo consume con semilla ya que se tiene la creencia de que tiene propiedades que ayudan a la digestión de los alimentos (Abreu y col 2000).

Toro y col (1968) reportaron que en los frutos de aguama se puede encontrar la proteasa pinguinaina (1.3 g/100 mL de jugo), la cual, no ha sido explotada comercialmente, proceso que pudiera llevarse fácilmente a escala industrial. Las aplicaciones industriales tradicionales se refieren a la producción de una transformación útil por alguna enzima, ya sea que esté presente de manera natural o añadida intencionalmente.

Figura 1. Planta de *Bromelia pinguin* L.

Figura 2. Frutos de *Bromelia pinguin* L.

Si bien es conocido, las enzimas presentan mayor inestabilidad al ser aisladas de su matriz de origen y son más susceptibles a la pérdida de su actividad por lo tanto, se necesita de algún método que le brinde protección durante su almacenamiento y la microencapsulación mediante secado por aspersión ha demostrado ser una buena alternativa para lograr éste propósito.

C. MICROENCAPSULACIÓN

La encapsulación se puede definir como una técnica por la cual gotas líquidas, partículas sólidas o gaseosas, son cubiertas con una película polimérica porosa conteniendo una sustancia activa (Araneda y Valenzuela 2009), esta membrana, barrera o película está generalmente hecha de componentes con cadenas para crear una red con propiedades hidrofóbicas y/o hidrofílicas (Fuchs y col 2006). Se utiliza de igual manera el término de microencapsulación en la industria alimentaria, cuando se encapsulan sustancias de bajo peso molecular o en pequeñas cantidades, aunque los dos términos, encapsulación y microencapsulación, se emplean indistintamente (Yañez y col 2002).

El término microcápsula aplica para aquellas partículas que tienen tamaños que van desde 1 µm a 500 µm (Lozano 2009).

Una encapsulación eficiente depende del desempeño del agente encapsulante el cual debe presentar las siguientes funciones (Castro 2014):

-Proteger al componente activo de la oxidación, de la luz, humedad y del contacto con otras sustancias en almacenamiento.

-Prolongar los tiempos de vida de anaquel.

-Prevenir la pérdida de los componentes volátiles encapsulados.

-Obtener un producto final con libre flujo, de fácil manejo y que se incorpore con los alimentos secos.

La estructura formada por el agente microencapsulante alrededor de la sustancia microencapsulada (núcleo) es llamada pared, esta protege el núcleo contra el deterioro y liberación bajo condiciones deseadas (Young y col 1992; Madene y col 2006).

Existen muchos tipos de microcápsulas, las cuales presentan una amplia variedad de estructuras, las hay esféricas, pueden ser simples, de una sola pared con cubierta de membrana, estructura multipared, irregulares o bien, con paredes de algunas o varias composiciones o numerosos núcleos dentro de una estructura de pared (Lozano 2009), en la **Figura 3** se presentan los distintos tipos de microcápsulas y su morfología.

Por otro lado, se pueden tener microcápsulas de tipo matricial, es decir, cuyo material activo se encuentra altamente disperso en la matriz polimérica. Pueden tener una estructura en forma de espuma en donde el material activo se encuentre repartido en toda la microcápsula y la cubierta puede permanecer intacta o bien en una estructura abierta en forma e red. También se pueden encontrar microcápsulas en las que el material activo esté disperso en el material que sirve como cubierta tanto como esfera llena como en la periferia (Lozano 2009).

En general, la microencapsulación se ha convertido en un proceso muy atractivo en las últimas décadas. Entre las primeras aplicaciones prácticas se destaca la industria farmacéutica, médica, textil, alimentos (Dutta y col 2009; Rai y col 2009), pesticida (Araneda y Valenzuela 2009; Li y col 2009), cosmética, química (Fuchs y col 2006), de imprenta (Madene y col 2006) agroquímica (Villamizar y Martínez 2008) fragancias, tintes, agentes antimicrobianos (Zong y col 2009) biomédica (Champagne y Fustier 2007; Luo y Pozrikidis 2009) y de plásticos (Dutta y col 2009).

La microencapsulación ha sido adecuada para los ingredientes alimentarios, teniendo el propósito de incrementar la estabilidad y vida media de anaquel de estos productos (Fuchs y col 2006). Ésta técnica ha permitido solucionar algunos problemas limitando las aplicaciones de ingredientes y aditivos alimenticios, puesto que puede controlar la pérdida de saborizantes durante el procesamiento, así como reducir volatilidad, higroscopicidad y reactividad incrementando la estabilidad de productos bajo condiciones ambientales adversas (Favaro y col 2010).

La encapsulación es usada por un gran número de industrias con una amplia variedad de técnicas o procesos disponibles (Risch 1995). Para preparar las microcápsulas hay numerosas técnicas, pero la selección del proceso de encapsulación para una aplicación considera el tamaño medio de la partícula requerida y las propiedades fisicoquímicas del agente encapsulante y la sustancia a encapsular, las aplicaciones para el material encapsulado, el mecanismo de liberación deseado y el costo.

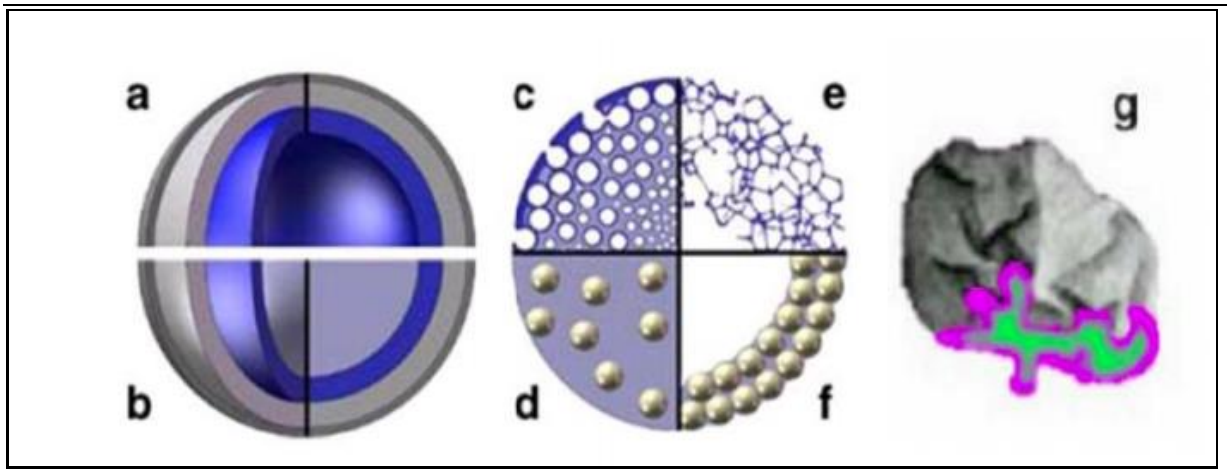

Figura 3. Morfología de los diferentes tipos de microcápsulas. a, forma esférica; b, forma multipared; c, d, e y f, estructuras matriciales; g, forma irregular. Fuente: Vehring 2008.

1. Microencapsulación mediante secado por aspersión

El secado por aspersión consiste, en atomizar el material que se encuentra en estado líquido, ya sea como disolución o como dispersión, atomizándolo en forma de finas gotas sobre una corriente de aire caliente. Cuando las pequeñas gotas del líquido se ponen en contacto con el aire a mayor temperatura, se produce una rápida evaporación del disolvente, formándose una fina película del material de recubrimiento que se encuentra disuelto en él (Martínez 2007), lo cual puede apreciarse en la **Figura 4.**

En el caso de las enzimas, al no ser estables cuando se encuentran en solución, el secado por aspersión se utiliza para mejorar la estabilidad durante el almacenamiento.

La elección del método de secado depende de los parámetros de calidad de la enzima, las aplicaciones finales y del costo del mismo. El diseño de un proceso de secado debe garantizar un alto nivel de retención de la actividad enzimática.

De manera general, la actividad enzimática después del secado es una función de la composición del líquido inicial para deshidratar, los parámetros del proceso y de las características fisicoquímicas de la enzima, es por ello que cada una de ellas debe ser considerada de manera individual (Vithalrao 2007).

El secado por aspersión de una emulsión, solución o suspensión, es el método más común de encapsulación de ingredientes alimenticios, como ejemplos se tienen:

vitaminas (C, E), ácido fólico, aromas, orégano, citronela, aceite de cardamomo,

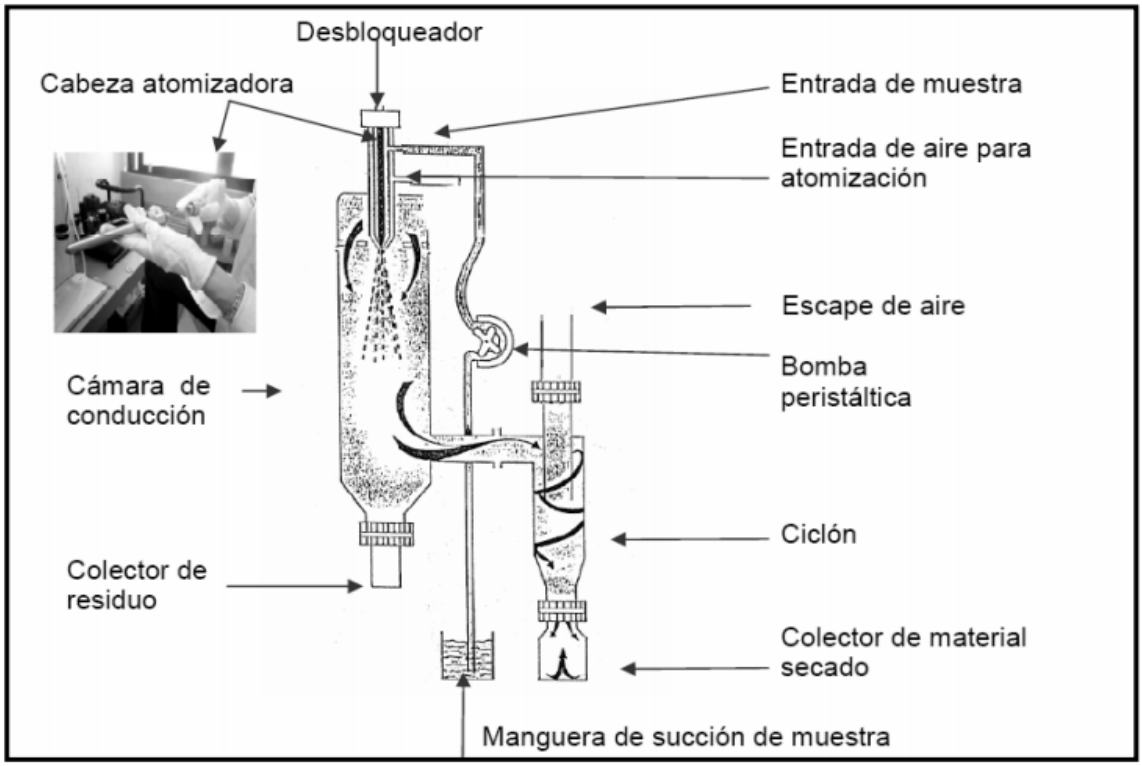

Figura 4. Esquematización de un secador por aspersión. Fuente: Martínez 2007.

bacterias probióticas, lípidos, ácido linoléico, aceites vegetales; minerales como hierro; pigmentos de antocianina y leche entre otros alimentos (Wandrey y col 2010). Este método es el más utilizado en la industria alimenticia por ser el más económico y conservar los nutrientes (Young y col 1992; García y col 2004; Murúa y col 2009; Parize y col 2008; Semyonov y col 2010), disponibilidad fácil de equipamientos, costos de procesamiento bajo, buena estabilidad del producto final y flexible (Favaro et al., 2010),

Cuando se trata de emulsiones, el material pared actúa como un estabilizador y la emulsión secada por aspersión es capaz de dispersarse de nuevo en agua (Soberanes 2014).

Actualmente existen diversos agentes encapsulantes en el mercado, pero su alto costo puede ser una limitante para su uso. El encapsulante con mayor aplicación en la industria de alimentos es la goma arábiga y es el material tradicional utilizado en el método de microencapsulación mediante secado por aspersión (Reineccius 1999). El costo y suministro de la goma arábiga, hace necesaria la búsqueda de materiales que sean accesibles y que presenten propiedades encapsulantes, Murúa y col (2009) sugerían los productos derivados del almidón de maíz, el cual, al ser modificado químicamente mediante el proceso de extrusión, pueda conseguir un producto con vida de anaquel estable y que sea de bajo costo.

D. ALMIDÓN

El almidón es el principal carbohidrato de reserva de la mayoría de los productos agrícolas y probablemente es el segundo carbohidrato más abundante en la naturaleza después de la celulosa. Este polisacárido representa una fracción importante en un número de productos agrícolas, tales como los cereales, cuyos contenidos de almidón varían desde 30-80% y entre estos se encuentra el maíz (Bello y col 1999). El almidón es utilizado en diversos alimentos para modificar la textura y modificar consistencia, como agente espesante o aglutinante e incluso como agente para encapsular olores y sabores. Sin embargo, no sólo la cantidad de almidón si no de igual manera el tipo de almidón es crítico para conferir la funcionalidad deseada a un alimento en específico (Biliaderis 1991).

El almidón está organizado en partículas discretas conocidas como gránulos, cuya morfología y composición química son características de cada especie. La variación de tamaño en los gránulos de almidón va de .5 a 100 µm. (Lineback 1984). El tamaño de partícula, incluyendo la distribución de tamaño, es una de las características que más afecta las propiedades funcionales de los gránulos de almidón. Químicamente, el almidón consiste de dos polímeros de diferente estructura, amilosa y amilopectina. La proporción de estos dos polímeros y su organización física dentro de la estructura granular le confieren propiedades fisicoquímicas y funcionales características a los diferentes almidones (Biliaderis y Zawastowski 1990). La amilosa es una cadena lineal con enlaces glucosídicos α (1-4) y la amilopectina además de tener este tipo de enlace presenta enlaces α (1-6) en

los puntos de ramificación entre las moléculas de glucosa (Yoshimura y col 1996). A continuación se describe cada una de ellas.

1. Amilosa

Conformada por moléculas de glucosa unidas con enlaces glucosídicos α (1-4). También presenta ramificaciones donde las cadenas de glucosa se unen por enlaces α (1-6), sin embargo, tales ramificaciones son muy escasas y espaciadas, por tal razón, la amilosa es considerada una molécula lineal, como se puede apreciar en la **Figura 5**. Su peso molecular varía entre 150,000 a 1, 000,000 Daltones dependiendo del origen biológico y la longitud de la cadena o grado de polimerización, donde este último fluctúa entre 500 a 6000 unidades de glucosa que pueden estar distribuidas en 1 a 20 cadenas (Hizukuri y col 1981). Por su contenido de amilosa, los almidones se pueden clasificar en diferentes grupos como son los almidones cerosos que tienen muy poca cantidad de amilosa, alrededor de 1-2%, los convencionales que contienen entre 17-24% y los altos en amilosa que contienen 70% o más de este polímero (Moore y col 1984).

2. Amilopectina

Es una molécula altamente ramificada formada por glucosa, que además de estar unida por enlaces α (1-4) que representan de un 92-96%, están presentes los enlaces α (1-6) en los puntos de ramificación, los cuales representan entre un 5-6% de los enlaces glucosídicos totales (MacAllister, 1979). Dichas ramificaciones, se localizan aproximadamente cada 15-25 ramificaciones de glucosa. En estado nativo,

presenta un peso molecular elevado, alcanzando los 2, 000,000 Daltones y puede tener una distribución de tamaño molecular muy amplia (Wang y White, 1994), en la **Figura 5** se puede apreciar su estructura química.

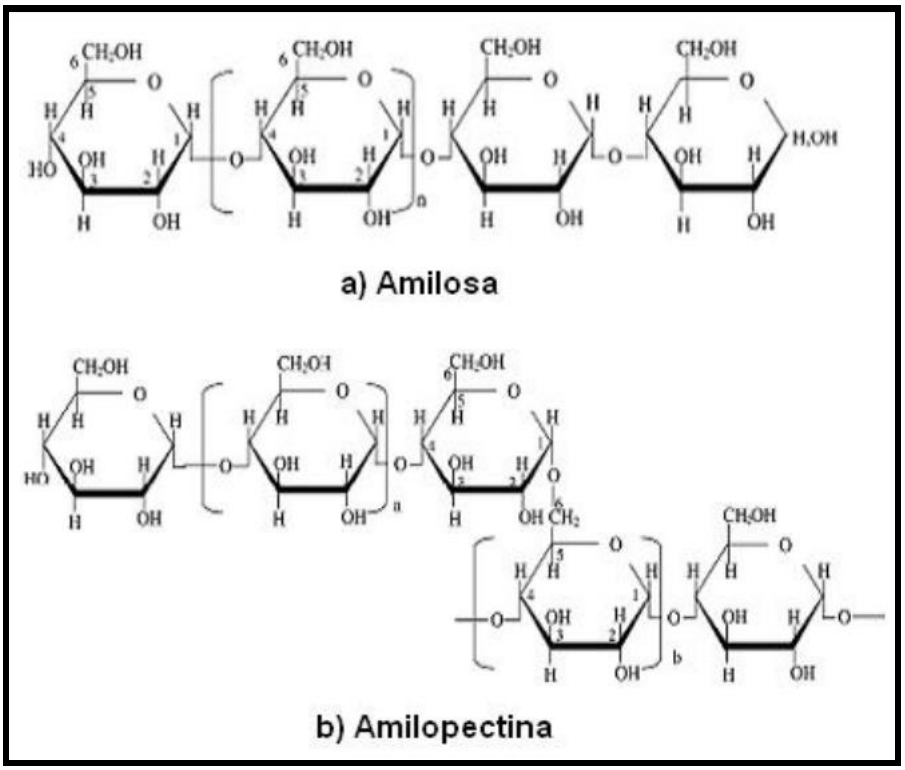

Figura 5. Polímeros de amilosa y amilopectina. Fuente: Soberanes 2014.

3. Estructura del gránulo de almidón

Los almidones nativos son estructuras semicristalinas. La cristalinidad de almidones nativos cae en el intervalo de 15-45% (Zobel 1988). El análisis por difracción de rayos X de almidones nativos produce dos tipos de patrones espectrales, del tipo A y tipo B, los cuales apuntan a dos tipos de estructuras cristalinas. Los almidones de cereales producen el patrón tipo A, mientras que los tubérculos y los almidones ricos en amilosa producen un patrón tipo B. los almidones de leguminosas producen un patrón de tipo intermedio denominado C, el cual es una mezcla de los patrones A y B (Imberty y col 1991). En el caso de los cereales, que poseen almidón de tipo A, las cadenas están cristalizadas con 12 unidades de glucopiranosa localizadas en dobles hélices enrolladas paralelamente a la izquierda y empacadas en forma paralela, la doble hélice es muy compacta y no hay espacio para agua u otra molécula en el centro (Imberty y Pérez 1988).

4. Almidón nativo

Los almidones nativos de diferentes fuentes vegetales, presentan propiedades únicas, que en gran medida son utilizadas en los procesos alimentarios para necesidades específicas (Martínez 2007). Cuando se calientan mezclas que contienen almidón nativo, los gránulos se hinchan de manera rápida, causando un aumento en la viscosidad, y posteriormente, cuando el gránulo se rompe, la viscosidad baja (Soberanes 2014). Los almidones nativos presentan picos estrechos de viscosidad y tienen una baja tolerancia a los procesos, además, en el caso de almidones para uso alimentario, producen texturas indeseables (Miller 1993). Los

almidones nativos, representan para la industria un elemento abundante, económico y de fácil obtención, y funcionan como espesantes con calidad aceptable en alimentos preparados en una sola etapa de cocción y consumo (Light 1990). Si bien es cierto que los almidones nativos pueden dar productos a bajo costo, éstos son pobres en su calidad, y el uso de almidones nativos se ve limitado en la industria alimentaria, debido a que los gránulos tienden a perder la integridad durante su procesamiento, sin embargo se puede obtener un mejoramiento y aumentar sus aplicaciones al ser sometidos a modificaciones físicas y químicas.

5. Almidón modificado

El almidón modificado se define como el producto obtenido de almidón nativo, en estado seco o húmedo, mediante reacciones químicas, físicas o enzimáticas, o de la combinación de éstas en la forma adecuada generando cambios en las propiedades originales (Ortíz y Valderrama 1977). Esto con el fin de desarrollar propiedades funcionales deseables, tales como solubilidad, viscosidad, textura, adhesión, dispersión y tolerancia al calor (Soberanes 2014), debido a la incorporación de un componente ajeno a su estructura original y nativa (Rodríguez 2009).

Los almidones y los derivados de los almidones (almidones modificados) se pueden encontrar en una amplia gama de alimentos manteniendo su funcionalidad en áreas como estabilizador de emulsiones, evitando el endurecimiento, confiriendo adhesión, dando firmeza a espumas, como glaseante, moldeante, estabilizante, espesante y como agente encapsulante (Ligth 1990).

a. Tipos de modificaciones del almidón

Ligth (1990) mencionaba que los almidones podían modificarse por vía química, física o por hibridación. La modificación química permite un cambio en las propiedades mecánicas de las pastas de almidón. El resultado de la modificación química del almidón es mejorar su estabilidad molecular al cizallamiento mecánico, hidrólisis ácida y a altas temperaturas, obteniendo una viscosidad deseada, incrementando la interacción con sustancias iónicas, electronegativas, electropositivas y reduciendo la retrogradación de un almidón nativo (Rodríguez 2009).Entre las modificaciones químicas podemos encontrar procesos como la conversión, la adición de grupos lipofílicos, el entrecruzamiento y la modificación del almidón por sustitución (Soberanes 2014).

1) Modificación por sustitución

La modificación química por sustitución se realiza introduciendo grupos químicos monofuncionales, como el acetilo y el succinilo a lo largo de las cadenas poliméricas, para formar enlaces éster o éter. La sustitución estabiliza al almidón previniendo la re-asociación de las cadenas que causan la retrogradación de los polímeros después de los tratamientos hidrotérmicos (Thomas y Atwell 1999), un ejemplo de este tipo de modificación química es el almidón succinatado y el acetilado.

a) Almidón succinatado

El reactivo comúnmente utilizado para producir almidones emulsificantes es el anhídrido del ácido n-octenil succínico (OSA). Los ésteres de almidón succinatado (n-OSA) son preparados comercialmente por la reacción básica de anhídridos de

alquenil succínico con el almidón granular en suspensión acuosa. La sustitución puede ocurrir en las posiciones 2 y 6 de la unidad de glucosa. Con la incorporación de grupos hidrofóbicos alquenil en una molécula de almidón normalmente hidrofílica, el almidón modificado adquiere propiedades de superficie activa las cuales son útiles para estabilizar emulsiones de aceite/agua (Murúa y col 2009)

Las emulsiones preparadas con almidones OSA han encontrado amplias aplicaciones como agentes encapsulantes sin conferir sabor, ya que presentan buena retención de volátiles de diferentes sustancias como aceites, perfumes, vitaminas en formulaciones secadas por aspersión (Varavinit y col 2001).

La modificación del almidón mediante ácidos dicarboxílicos anhídridos permite obtener ésteres de almidón que contienen grupos hidrofílicos e hidrofóbicos los cuales mejoran sus propiedades de emulsificación y también pueden ser usados eficientemente para encapsulación después de ser hidrolizados mediante extrusión.

b) Almidón acetilado

Los almidones acetilados se preparan comúnmente con anhídrido acético en una suspensión alcalinizada con hidróxido de sodio a un pH de 7.5 a 9.0, una vez que la reacción ha procedido se neutraliza y es lavada para eliminar los excesos de reactivo (Thomas y Atwell 1999).

El anhídrido acético forma un éster metílico al ligarse con uno de los grupos hidroxilos. Una de sus características es que no retrogradan cuando son enfriados (Serna 1996). La acetilación previene la sinéresis y la apariencia nebulosa de geles. El almidón acetilado debe estar compuesto de 0.5-2.5% de grupos acetil. La FDA

establece un límite máximo de 2.5% para que un almidón utilizado en la industria de los alimento sea considerado como seguro **(Murúa y col 2008).**

2) Almidón modificado químicamente mediante el proceso de extrusión

Recientemente, los extrusores han sido usados como reactores químicos para la producción de almidones modificados (Martínez 2007), lo cual permite obtener un elevado grado de sustitución con bajos niveles de contenido de agua, teniendo como ventaja posterior requerimientos menores de secado (Kim y col 1999).

La extrusión se define como un proceso de formado por el paso de materiales suaves o plastificados a través de dados con orificios con la aplicación de presión. El extrusor está constituido de un alimentador, un preacondicionador, un tornillo sinfín, un cilindro enchaquetado, una matriz y un sistema de corte; se comporta como intercambiador de calor debido al flujo de calor entre las paredes del cilindro, el tornillo y el material alimentado. De manera general, el material acondicionado de alimenta al extrusor para ser transportado mediante el tornillo sinfín a través del cañón, es aquí donde surgen los mayores cambios en el material. Debido al calor que se genera por la energía mecánica que produce el tornillo la misma transferencia del calor y la presión que va ejerciendo el material a través de los giros del tornillo a una velocidad dada provoca que se susciten transformaciones para formar el material viscoso y plastificado. El alineamiento de las macromoléculas que dan pauta a la formación de nuevas estructuras y la gelatinización del almidón son algunos de los cambios que se presentan (García 2011).

Entre las ventajas de producir almidones modificados mediante extrusión podemos encontrar que es una producción continua, el tratamiento de la muestra tiene un bajo costo y se pueden obtener propiedades físicas uniformes, sin dejar de mencionar que los extrusores son de construcción simple y de fácil operación (Soberanes 2014). En la **Figura 6** se pueden apreciar las partes por las cuales está compuesto un extrusor.

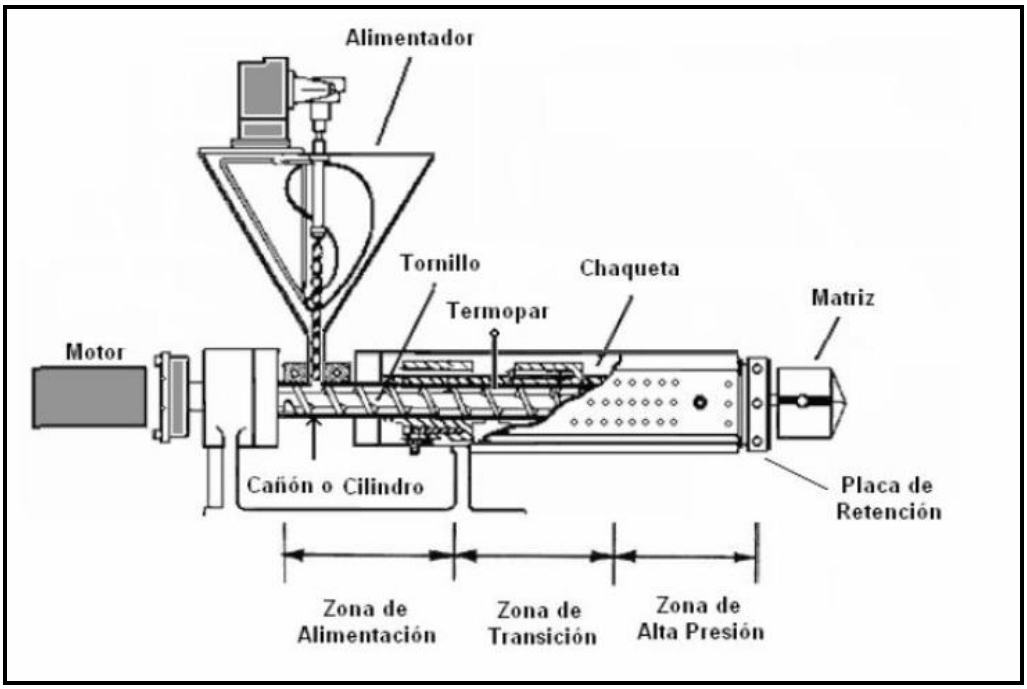

Figura 6. Esquema de un extrusor y sus componentes. Fuente: Murúa y col (2009).

IV. JUSTIFICACIÓN

Al ser aisladas de su matriz original, las enzimas se vuelven más inestables y en estas condiciones son más susceptibles a la pérdida de su actividad biológica cuando son expuestas a los factores desnaturalizantes del medio. El fruto de *Bromelia pinguin* L., es encontrado en el estado de Sinaloa, México y la enzima proteolítica Pinguinaina, con alta actividad proteolítica puede ser extraída del mismo, por lo tanto es importante caracterizarla para conocer sus propiedades y con ello buscar alternativas para su uso en la industria alimentaria. Es necesario buscar un método que le confiera estabilidad al ser almacenada después de haber sido extraída. La microencapsulación mediante el secado por aspersión es un método muy utilizado en la protección de componentes bioactivos de alto valor e interés en la industria alimentaria y farmacéutica. Diversos agentes encapsulantes se encuentran actualmente en el mercado, pero debido a su alto costo se buscan nuevas alternativas que confieran estabilidad como agentes de pared pero que a su vez sean de fácil obtención y más económicos y que tengan las mismas o incluso superen en la funcionalidad a los ya existentes y puedan ser usados de manera exitosa en la industria alimentaria como lo son los elaborados a base de almidón de maíz modificado por extrusión.

V. HIPÓTESIS

La enzima Pinguinaina microencapsulada presenta buena actividad proteolítica con propiedades útiles para su aplicación en la elaboración de alimentos.

VI. OBJETIVOS

A. OBJETIVO GENERAL

Caracterizar microcápsulas de la enzima Pinguinaína y evaluar las posibles aplicaciones en los alimentos.

B. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Obtención de la materia prima. Caracterizar fisicoquímicamente los frutos de *Bromelia pinguin* L. y extraer la enzima Pinguinaina Parcialmente Purificada (PPP).

2. Modificar químicamente los almidones de maíz ceroso (succinatación y acetilación) mediante el proceso de extrusión.

3. Obtener microcápsulas de la enzima Pinguinaina usando secado por aspersión utilizando almidón modificado de maíz ceroso como material de pared y caracterizar dichas microcápsulas en base a su estructura externa, rendimiento y eficiencia del proceso de encapsulado, y tamaño de partícula.

4. Evaluar la actividad proteolítica de las microcápsulas respecto al pH, temperatura y fuerza iónica.

5. Evaluar la actividad proteolítica de las microcápsulas de la enzima Pinguinaina durante 2 meses de almacenamiento comparado con la enzima no encapsulada (control).

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

A. MATERIALES

1. Almidón nativo de maíz ceroso.

Almidón de maíz alto en contenido de amilopectina (ceroso) de la marca Corn Products de México.

2. Frutos de *Bromelia pinguin* L.

Los frutos de aguama (*Bromelia pinguin* L.) se recolectaron en el poblado de Estación Naranjo, Guasave, Sinaloa, México. Los frutos se cosecharon tratando de dañar lo menos posible al fruto, se trasladaron a las instalaciones de la Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos y posteriormente se lavaron con agua corriente y se aplicó un segundo lavado con agua destilada. Se les extrajo el jugo con un extractor eléctrico, el cual, se filtró y almacenó a -70°C para su posterior análisis.

B. MÉTODOS

1. Caracterización fisicoquímica de los frutos de *Bromelia Pinguin* L.

a. Mediciones físicas

Para evaluar el tamaño se procuró cubrir la forma del fruto tomando 2 medidas (diámetro y longitud) tomando una muestra de 10 frutos seleccionados al azar, por cada uno de 5 racimos igualmente seleccionados al azar. Las medidas se realizaron utilizando un vernier de precisión (GENERAL, Suiza) y se calculó el valor promedio en centímetros para cada parámetro.

b. Peso promedio

A los frutos utilizados en la medición de tamaño se les determinó el peso en una balanza analítica Chyo (CHYO, Japón), posteriormente se calculó el valor promedio de los frutos.

c. pH

El pH se determinó directamente del jugo obtenido de los frutos de aguama, Para la medición del pH, se siguió la metodología 943.02 propuesta por la AOAC (2012), para la cual se utilizó un potenciómetro digital (Orion 420-A, USA). Todo esto se llevó a cabo con una previa calibración del equipo, donde se lavó el electrodo con agua destilada y se calibró con buffer pH 7 y buffer pH 4. Posteriormente, el electrodo se introdujo a una alícuota obtenida para el análisis de acidez titulable, generando las lecturas correspondientes. Las determinaciones se realizaron por triplicado.

d. Acidez titulable

El porcentaje de acidez titulable fue determinado directamente del jugo obtenido de los frutos de aguama, se llevó a cabo por triplicado de acuerdo al método oficial de la AOAC (2012) 942.15, que consiste en triturar 10 g de cada muestra en 50 mL de agua destilada neutra (pH=7), posteriormente filtrar y tomar una alícuota de 20 mL para proceder a titular con hidróxido de sodio 0.1 N hasta alcanzar un pH de 8.1 ± 0.2 (punto de vire de la fenolftaleína). Los cambios de pH fueron observados con un potenciómetro Orion 420-A, USA. El porcentaje de acidez titulable se calculó como ácido cítrico con la siguiente ecuación:

$$\textbf{AT (\%)} = \frac{[(VG)\,(MEqA)\,(N)\,(V)]}{(PM)\,(A)}\,(100)$$

Dónde:

VG=mL de NaOH gastados en la titulación

V=Volumen total de la disolución

N=Normalidad del NaOH (0.1N)

A=Alícuota de la muestra

MEqA=Peso miliequivalente del ácido cítrico (0.064 g)

PM=Peso de la muestra

e. Sólidos solubles totales

Los sólidos solubles se determinaron directamente del jugo obtenido de los frutos de aguama mediante refractrometría de acuerdo con el método 932.12 de la AOAC (2012), se colocó 1 gota de jugo en un refractómetro marca ATAGO 1-877-USA reportándose los resultados como °Brix (porcentaje de azúcar). Las cuantificaciones se realizaron a temperatura ambiente, por triplicado.

2. Extracción de la enzima pinguinaina parcialmente purificada (PPP)

Se realizó mediante la metodología descrita por Abreu y col (2008). El jugo extraído de los frutos se filtró a través de un trozo de manta a un vaso de precipitado. Se adicionó un volumen de etanol, acto seguido se dejó reposar por 30 min y se

centrifugó a 4,000 rpm durante 20 min a 4°C, se descartó el precipitado y se llevó el sobrenadante a un vaso de precipitado, se adicionaron 3 volúmenes de etanol, se dejó reposar nuevamente por 30 min y se centrifugó nuevamente a 4,000 rpm durante 20 min a 4°C. Todo el proceso fue desarrollado en frío. Se descartaron los sobrenadantes, el nuevo precipitado fue redisuelto en un volumen de agua destilada y la solución obtenida se centrifugó a 4,000 rpm por 30 min a 4°C. Los sobrenadantes reunidos constituyen la Pinguinaina Parcialmente Purificada (PPP), que se congeló inmediatamente a -70°C, para conservarla hasta su estudio.

a. Actividad Caseinolítica

Se realizó mediante la hidrólisis de caseína según lo reportado por Briones y col (2001). Se utilizó como sustrato caseína al 1 % en regulador de fosfatos 0.05 M, pH 7.6, previamente desnaturalizada por incubación a baño maría durante 20 min, conteniendo cisteína en una concentración de 15µM. La reacción enzimática se llevó a cabo a una temperatura de 37°C durante 10 min utilizando una alícuota de 0.1 mL de disolución enzimática más 1.9 mL de sustrato. La reacción se detuvo añadiendo 3 mL de ácido tricloroacético (ATC) al 5%. Los tubos se dejaron en reposo durante 20 min y se centrifugaron a 4,000 rpm x 25 min a 4°C. Los productos de la hidrólisis se leyeron en un espectrofotómetro GENESYS a 280 nm, contra un blanco sin enzima.

Al mismo tiempo se corrió un testigo al cual, al sustrato se le añadió ATC antes de la enzima. La actividad proteolítica se reportó en unidades caseinolíticas (Ucas), definidas como la cantidad de enzima que produce un incremento de una unidad en

la absorbancia (celdas de 1cm de longitud) por minuto bajo las condiciones de ensayo.

b. Cuantificación de proteína

El contenido de proteína se determinó mediante el método de Bradford (1976) utilizando albúmina sérica bovina como proteína estándar. A un tubo que contenía 0.1 mL de extracto se le agregaron 5 mL del reactivo de Bradford, posteriormente se mezclaron en un vortex y se dejaron reposar durante 5 min, la lectura se realizó a 595 nm, contra un blanco que contenía 0.1 mL de agua destilada y 5 mL del reactivo de Bradford.

c. Efecto del pH sobre la actividad proteolítica de la PPP y de las cápsulas

Para encontrar el pH de máxima actividad, se utilizó la metodología de (Barraza 2016) en la cual se determinó el efecto del pH desde 6.0 hasta 12, sobre la actividad de la Pinguinaina Parcialmente Purificada y en las microcápsulas obtenidas con almidón nativo, hidrolizado, acetilado y succinatado, utilizando a una concentración de 25 mM amortiguadores; para pH 6 de Carbonato, pH 7 MOPS, pH 8 TAPS, pH 9 y pH 10 CAPSO, pH 11 CAPS y para pH 12 Amortiguador de Fosfatos.

d. Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática de la PPP y de las cápsulas

Se construyeron curvas de actividad proteolítica del extracto a diferentes temperaturas (37,45, 55, 65 y 75°C) para la PPP y para las microcápsulas de

almidón nativo, acetilado, acetilado y succinatado mediante el método de cuantificación de actividad proteolítica antes descrito.

e. Efecto de la fuerza iónica sobre la actividad enzimática de la PPP y de las cápsulas

Se determinó la actividad proteolítica por el método ya descrito a diferentes condiciones de fuerza iónica incubando las muestras enzimáticas a 37°C, a pH 7.6 con diferentes concentraciones de NaCl (0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.5 y 2.5 M), dicho método se realizó a la PPP y a las microcápsulas obtenidas de los distintos almidones utilizados en el presente trabajo.

3. Modificaciones químicas del almidón nativo de maíz ceroso

a. Hidrólisis ácida

Con el objetivo de hacer más eficiente el grado de sustitución y aumentar su solubilidad, se llevó a cabo el proceso de hidrólisis ácida como etapa previa a la modificación del almidón nativo de maíz ceroso. Los almidones se hidrolizaron de acuerdo a lo reportado por Zambrano y Camargo (2001). Se preparó una suspensión de almidón al 40% de sólidos con una solución que contenía ácido clorhídrico (HCl) en una concentración de 3.4% con respecto a los sólidos de almidón. La hidrólisis se llevó a cabo a una temperatura de 50±2°C en un baño María, manteniéndose en agitación constante durante 6 horas. Posteriormente se ajustó el pH a 5.0 con una solución de hidróxido de sodio (NaOH) al 10% y la suspensión fue centrifugada a 6000 rpm, durante 10 min en una centrifuga Hermle Labortechnik, Germany modelo Z513K. El sedimento se recuperó y se lavó dos veces con agua destilada para

eliminar residuos de ácido. La pasta de almidón se secó en un horno Felisa a una temperatura de 45ºC por 24 h, después el almidón se molió en un equipo Mini Pulvex modelo 100 y se tamizó con una malla de 250 µm para su posterior modificación química.

b. Succinatación

Se realizó de acuerdo al método descrito por (Jeon y col 1999) con algunas modificaciones. Se preparó una suspensión en agua al 30% de sólidos del almidón sometido previamente a una hidrólisis ácida, dicha mezcla se mantuvo en agitación constante y se le adicionó por goteo, anhídrido succínico en una proporción del 2% respecto a los sólidos de almidón, posteriormente se agitó durante dos h y se ajustó el pH de 8.0-8.5 con una solución de NaOH al 3%. Se mantuvieron a las mismas condiciones durante un tiempo total de 6 h. Posteriormente se ajustó el pH a 5.0 y la suspensión se centrifugó a 4000 rpm, durante 10 min en una centrifuga Hermle Labortechnik, Germany modelo Z513K. El sedimento se lavó con agua destilada para eliminar residuos del reactivo. La pasta del almidón succinatado fue secada en un horno Felisa a una temperatura de 40 ºC por 24 h, luego se molió y se tamizó en una malla de 250 µm.

d. Extrusión

Las temperaturas de extrusión empleadas fueron de 80ºC, 130ºC y 180ºC para la zona de alimentación, de transición y de alta presión respectivamente. Se utilizó una velocidad de tornillo de 80 rpm, una velocidad de alimentación de 70 g/min (30 rpm), una relación de compresión del tornillo de 3:1 y un dado con un diámetro de

salida de 4.0 mm. Las muestras extrudidas se secaron en un horno Felisa a 40°C por 24 h, posteriormente fueron molidas en un equipo Mini Pulvex modelo 100 y se tamizaron a través de la malla de 250 µm para homogenizar el tamaño del almidón.

4. Caracterización fisicoquímica de los almidones

a. Morfología del granulo de almidón

Se determinó por microscopía electrónica de barrido de acuerdo con la metodología descrita por (Gunning y col 1999) con algunas modificaciones. Se utilizó un microscopio electrónico de barrido (ESEM Phillips, modelo XL30, Holanda), en condiciones de bajo vacío (0.7 mBar) con un voltaje de aceleración de 15.0-20.0 KV, aproximadamente 50 µA de corriente, un detector GSE (Gaseus Secundary Electron). Las muestras del almidón nativo y modificado fueron fijadas en un portamuestras de aluminio con semicírculos de cinta adhesiva de grafito doble cara y tratadas con un baño de oro.

b. Índice de solubilidad en agua (ISA) e índice de absorción de agua (IAA)

Estos análisis se realizaron al almidón en estado nativo y a los modificados, de acuerdo al método descrito por (Anderson y col 1969). Se colocaron 2.5 g de almidón en un tubo de centrífuga de 50 mL, posteriormente se adicionaron 40 mL de agua destilada a 30°C, se taparon y se agitó el tubo por un min. Los tubos se mantuvieron en agitación constante durante 30 min. Después las muestras se centrifugaron en un equipo Hermle Labortechnik, (modelo Z513K) a 3000 rpm durante 10 min. El peso del residuo sólido fue registrado y el sobrenadante se vació en un crisol de aluminio a peso constante, el líquido decantado se secó en un horno

Felisa a temperatura de 110º C. El sedimento del tubo se pesó y se registró el peso del residuo de evaporación para emplearse en las siguientes relaciones:

$$IAA = \frac{Rcent}{M - Revap}$$

$$ISA = \frac{Revap}{M} \times 100$$

Donde:

IAA = índice de absorción en agua.

ISA = índice de solubilidad en agua.

Rcent = peso del residuo de centrifugación.

Revap = peso del residuo de evaporación.

M = peso en base seca de la muestra.

5. Grado de sustitución de los almidones modificados

a. Grado de sustitución del succinato

El grado de sustitución de succinato se determinó de acuerdo al método descrito por (Praful y Rekha 2002) con algunas modificaciones. Esta determinación fue realizada los almidones nativos y a los modificados, se colocaron 1 g de muestra en un matraz Erlenmeyer de 250 mL y se adicionaron 50 mL de una solución de etanol-agua (75% v/v). La mezcla se agitó y se mantuvo a 50°C durante 30 min.

Posteriormente se dejó enfriar y se le agregaron 40 mL de NaOH 0.5 N, esta mezcla se mantuvo durante 72 h con agitación constante. El exceso de álcali se tituló con una solución estándar de ácido clorhídrico (HCl) 0.5 N, usando fenolftaleína como indicador. La solución se dejó en reposo por 2 h, si al transcurrir este tiempo la solución cambiaba nuevamente su coloración se debería titular nuevamente. Las muestras de almidón nativo fueron utilizadas como blancos.

El porcentaje de succinato y el grado de sustitución de las muestras se calcularon usando las siguientes fórmulas:

$$\%\ \text{Succinato} = \frac{(B - M) \times 0.1 \times N}{W} \times 100$$

$$GS = \frac{162 \times S}{10000 - (99 \times S)}$$

Donde:

B: volumen gastado en la titulación del blanco (mL).

M: volumen gastado en la titulación de la muestra (mL).

N: normalidad del ácido.

W: cantidad de muestra (g).

GS=: grado de sustitución de succinato.

S: porcentaje de succinato del almidón succinatado.

b. Grado de sustitución del acetato

Se determinó siguiendo la metodología para almidones succinatados, utilizando la misma ecuación, solo cambiando el peso molecular del anhídrido succínico por el del anhídrido acético (102).

5. Producción de las microcápsulas

Este método se llevó a cabo de acuerdo a lo escrito por (Bertolini y col 2001) con algunas modificaciones. Las microcápsulas preparadas con el almidón nativo y los modificados se obtuvieron mediante el proceso de secado por aspersión en un secador BUCHI Mini Spray Dryer B-191. Para preparar las muestras de los almidones modificados para la encapsulación, se tamizaron con una malla de abertura de 250 µm. Se preparó una emulsión en agua a 40°C con 15% de sólidos (p/p) del material de pared (almidón maíz ceroso nativo y modificados), la mezcla de la emulsión se homogenizó con un Ultraturrax IKA T-18 Basic durante cinco min, posteriormente se agregarán una proporción del 6.0 % (v/p) de la enzima proteolítica pinguinaina respecto a los sólidos de almidón y se homogenizarán nuevamente la emulsión a 5000 rpm por 3 min. La emulsión se mantuvo en agitación constante durante el secado. Las condiciones de secado por aspersión fueron las siguientes: temperatura del aire de entrada de 60 ºC y temperatura del aire de salida de 100ºC +/- 5 ºC. Las microcápsulas obtenidas se recolectaron y se almacenaron a -4 ºC para su posterior análisis.

6. Caracterización de las microcápsulas

a. Determinación de contenido de proteína en microcápsulas

El contenido de proteína se realizó mediante el método de Bradford (1976) el cual fue realizado de la siguiente manera: primero, se obtuvo una solución concentrada, que incluye 100 mg de azul de Coomassie G-250 (Sigma) con 50 mL de etanol al 95% y 100 mL de ácido fosfórico al 65%, se homogenizó y aforó a 1 L con agua desíonizada. Posteriormente, se hicieron reaccionar 100 µL del sobrenadante de las dispersiones en agua de PPP microencapsulada, con 2 mL del reactivo de Bradford, se agitaron por 5 segundos en un vortex, se dejaron reposar durante 15 min y la lectura se realizó a una absorbancia a 595 nm, en un espectrofotómetro GENESYS 10 uv, Thermo Electro Corporation. La curva utilizada para calcular el contenido de proteína se preparó utilizando albúmina sérica bovina (5 mg/10 mL de NaCl 0.15 M). El intervalo de concentraciones utilizadas para la preparación de la curva fueron de 0.05 mg/mL a 0.35 mg/mL de albúmina sérica bovina.

b. Determinación de la actividad proteolítica

La actividad proteolítica se determinó mediante el método de (Briones y col 2001) con algunas modificaciones, empleando como sustrato caseína al 1%. En tubos de ensayo se colocaron 0.95 mL de caseína para su incubación a 37°C. Posteriormente se agregarán 0.05 mL de Pinguinaina microencapsulada resuspendida y la mezcla actuar durante 10 min. La reacción se detuvo adicionando 1.5 mL de ácido tricloroacético (ATC) al 5%. También se realizó un testigo al cual se

le adicionó primero el ATC y al final la preparación de Pinguinaina microencapsulada. Al término de la reacción los tubos se centrifugaron a 4,000 rpm durante 6 min. Finalmente, al sobrenadante se le determinó la absorbancia a 280 nm en un espectrofotómetro (GENESYS 10 uv, Thermo Electro Corporation) ajustando el equipo con una mezcla de 1 mL de regulador de fosfatos 0.05 M pH 7.6 y 1.5 mL de ATC al 5%. Se determinó la actividad proteolítica y la actividad específica se reportó en Unidades de Caseína (UCas), definida como; µg de Caseína consumida por minuto por mg de proteína.

La actividad proteolítica de la enzima se determinó en la enzima microencapsulada y sin encapsular, durante un tiempo de almacenamiento de dos meses, las determinaciones se realizaron cada mes tomando en cuenta un tiempo 0.

c. Caracterización Morfológica de las microcápsulas

La morfología de las cápsulas se evaluó mediante microscopía electrónica de barrido (ESEM EDDAX, GSE detector), usando un voltaje de aceleración de 20 kV. La observación de las muestras del estudio de estabilidad se llevó a cabo en un equipo JEOL, JMS-T330 (Tokio, Japón) usando una aceleración de voltaje de 10 kV. Las microcápsulas se fijaron en un porta muestras con una cinta adhesiva de doble cara y cubiertas con un baño de oro en un evaporador Balzers (SCD 050, Baltec Lichtenstein, Austria), a una corriente de 40 mA, tiempo de exposición de 180 segundos, temperatura de 28°C, con una presión de vacío de 2X10-1 mbar).

7. Diseño experimental

Esto comprende cuatro diseños experimentales utilizados:

Primeramente, utilizó un diseño experimental para evaluar el efecto del pH y el tipo de encapsulante sobre la actividad proteolítica de la enzima, donde el primer factor (pH) tenía 8 niveles (6, 7, 7.6, 8, 9, 10, 11 y 12) y el segundo factor (tipo de encapsulante) se componía de 5 niveles (sin encapsulante (PPP), almidón de maíz ceroso nativo, almidón hidrolizado, almidón acetilado y almidón succinatado).

Posteriormente se realizó un segundo diseño, donde el objetivo era evaluar el efecto de la temperatura y del tipo de encapsulante sobre la actividad proteolítica de la enzima Pinguinaina. El primer, la temperatura, comprendía 37, 45, 55, 65 y 75°C respectivamente, mientras que los tipos de encapsulantes utilizados ya fueron mencionados anteriormente.

A su vez, el efecto de la fuerza iónica y del tipo de encapsulante sobre la actividad proteolítica también fue evaluado, teniendo concentraciones de NaCl de (0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.5 y 2.5 M) y los tipos de encapsulantes son los mismos utilizados en todo el estudio.

Para conocer la estabilidad en la actividad proteolítica durante el tiempo de almacenamiento de utilizaron tres niveles para el primer factor (tiempo 0, Mes 1 y mes 2), dependiendo del tipo de encapsulante (sin encapsular (PPP), almidón de maíz ceroso nativo, almidón hidrolizado, almidón acetilado y almidón succinatado).

En todos los diseños experimentales se realizó una prueba de comparación de medias de Fisher con un nivel de significancia del 95% utilizando el programa estadístico Statgraphics Centurion.

VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A. CARACTERIZACIÓN FISICOQUÍMICA DE LOS FRUTOS DE *Bromelia pinguin* L.

Los frutos de Bromelia pinguin L. presentaron tamaños desde 3 a 3.94 cm de longitud y de 2.15 a 3.19 de ancho. El peso osciló entre 12.39 a 20.24 g, dichos valores concuerdan con lo reportado por Limón (2002) y Carrión y col (2008). Soberanes (2014) reportó una longitud promedio de 3.97 cm y un peso de 19 g, esta similitud con la presente investigación puede deberse a que los frutos fueron colectados de la misma región geográfica y a que las condiciones ambientales en las que se encontraban las plantas silvestres eran casi las mismas.

En el **Cuadro 3** se muestran los valores de pH, acidez titulable y °Brix de los frutos de *Bromelia pinguin* L., el jugo presentó un pH de 3.63±0.03, una acidez titulable de 3.85±0.05 y 14.8±0.08 °Brix. Abreu y col (2008) reportan un valor de 3.62 para pH, 4.51 para acidez titulable y 10.38 °Brix, a su vez, Pío y col (2009) reportaron valores de pH de 3.7 y acidez titulable de 4.6. Soberanes (2014) encontró valores de pH de 3.38, una acidez titulable de 4.51 y 10.38 °Brix, valores similares encontrados en esta investigación, de igual manera, Barraza (2016) obtuvo un valor de pH de 3.7, una acidez titulable de 1.66 y 9 °Brix, estas diferencias en la acidez del fruto pueden deberse al estado de madurez en el cual se encontraban al momento de ser colectados. Por los valores de pH y acidez titulable obtenidos en los frutos de aguama, estos pudieran ser considerados como alimentos ácidos, siendo esta una característica importante en la conservación y almacenamiento de los mismos,

además, Limón (2002) menciona que tiene un efecto inhibitorio sobre el desarrollo de microorganismos.

Cuadro 3. Análisis fisicoquímicos del jugo de los frutos *de Bromelia pinguin* L.

	pH	**Acidez titulable	°Brix
Promedio*	3.63	3.85	14.8
Desv. Estándar	0.03	0.05	0.08
Máximo	3.75	1.73	11
Mínimo	3.66	1.6	9

* Valores de 10 repeticiones

** g de ácido cítrico por cada 100 g de jugo.

En el **Cuadro 4** se presenta el contenido de proteína y actividad proteolítica del extracto crudo (jugo) de los frutos de aguama y de la pinguinaina parcialmente purificada (PPP). Se observa que el contenido de proteína del extracto crudo fue de 1.06±0.1 (mg/mL), con una actividad proteolítica de 1.28±0.07 (Ucas/mL) y una actividad específica de 1.20±0.02 (Ucas/mg). La enzima Pinguinaina Parcialmente Purificada (PPP) presentó un contenido de proteína de 0.158±0.07 (mg/mL), una actividad proteolítica de 1.22 ±0.03 (Ucas/mL) y una actividad específica de 7.77±0.02 (Ucas/mg). Se puede observar que la actividad proteolítica, tanto del jugo como de la PPP presenta valores similares. Cuando se evalúa la actividad específica, se muestra que la PPP supera por mucho la actividad específica del extracto crudo, mostrando con ello que el extracto enzimático de PPP tiene una gran concentración de proteasas altamente activas en comparación con el extracto crudo, esto sugiere que los frutos de *Bromelia pinguin* L. podrían tener potencial aplicación en el sector alimentario.

Abreu y col (2009), al estudiar los mismos frutos reportó valores superiores tanto para contenido de proteína, 3.82 (mg/mL) y actividad proteolítica de 17.06 (Ucas/mL), esto puede deberse a que el origen de los frutos no es el mismo, además que posiblemente la manera en la que el jugo fue extraído es distinta a la de este ensayo, afectando directamente la proporción de los contenidos del mismo. Sin embargo, Soberanes (2014) reporta una actividad específica para el jugo de aguama de 7.42 (Ucas/mg), lo cual es muy similar a lo encontrado en este análisis.

Cuadro 4. Contenido de proteína, actividad proteolítica y actividad proteolítica específica del jugo de *Bromelia pinguin* L. y de la Pinguinaina Parcialmente Purificada (PPP).

	Proteína (mg/mL)	**Actividad proteolítica (Ucas/mL)**	**Actividad Específica (Ucas/mg)**
Jugo	1.06±0.10	1.28±0.07	1.20±0.02
PPP	0.158±0.07	1.22±0.03	7.77±0.02

Se presentan las medias de 3 repeticiones ± DE.

PPP (Pinguinaina Parcialmente Purificada).

B. CARACTERIZACIÓN FISICOQUÍMICA DEL ALMIDÓN DE MAÍZ CEROSO

1. Índice de absorción en agua (IAA) e índice de solubilidad en agua (ISA)

El índice de absorción en agua (IAA) se puede definir como los gramos de agua absorbida por cada gramo de almidón en base seca cuando está en contacto con ésta durante cierto tiempo a una temperatura dada (Guzmán 2010).

En el **Cuadro 5** se muestran los valores de IAA (g.a.a/g.s.s) para el almidón nativo (1.87±0.03), hidrolizado (1.98±0.07) y almidones modificados de maíz ceroso; acetilado (3.96±0.05) y succinatado (3.81±0.04).Se observa que el almidón nativo e hidrolizado presentaron un menor IAA en comparación con los almidones modificados. Martínez y García (2014) reportan que con la esterificación causada por la modificación química del almidón existía un aumento en el ISA e IAA, debido a la disrupción estructural del gránulo, al ser sometidos a extrusión, dicho proceso pudo haber contribuido al aumento de la capacidad de absorber agua (Landerito y Wang 2005), de igual manera, Li y col (2014) mencionan que la amilopectina es más susceptible a la degradación durante la extrusión, mientras que la amilosa muestra menos degradación porque sus moléculas tienen una estructura amorfa flexible. Chen y col (2010) indican que después de la hidrólisis se pierde el orden estructural del almidón, así como también el proceso de molienda facilita la hidratación o penetración de agua por el incremento del área superficial. Además, las altas temperaturas y fuerzas de corte del proceso de extrusión provocan en el almidón una ruptura en las zonas de ramificación causando una dextrinización adicional a la de la hidrólisis ácida. Se puede observar que el almidón acetilado absorbió más agua que

Cuadro 5. Índice de absorción de agua de almidón de maíz ceroso nativo, hidrolizado, acetilado y succinatado.

Tipo de almidón	IAA g.a.a/g.s.s
Almidón nativo	1.87±0.03[a]
Almidón hidrolizado	1.98±0.07[b]
Almidón acetilado	3.96±0.05[c]
Almidón succinatado	3.81±0.04[d]

Letras diferentes en cada columna indican diferencia estadística significativa entre cada una de las medias (Fisher, α=0.05), LSD= 0.0577, media de 3 repeticiones ± DE.

el almidón succinatado, habiendo diferencia estadística significativa entre estos dos últimos tratamientos.

Murúa y col (2008) reportaron valores de IAA para almidón de maíz ceroso nativo, hidrolizado, succinatado y acetilado de 2.22, 2.43, 3.62 y 3.45 respectivamente, esto concuerda con los resultados encontrados en el presente estudio. De igual manera, García (2011) menciona valores de IAA para almidón nativo de maíz ceroso, hidrolizado y succinatado de 2.68, 2.53 y 4.86 en cada uno de los tratamientos. Soberanes (2014) obtuvo valores de IAA de 2.08 para almidón de maíz ceroso nativo, 2.19 en almidón hidrolizado, 4.06 modificado por acetilación y un valor de 3.38 para almidón de maíz ceroso succinatado. Valores altos de esta respuesta no son recomendables para la aplicación de los almidones modificados como agentes de pared, ya que deben proveer protección a la humedad a los ingredientes encapsulados.

La capacidad del almidón de fijar agua puede deberse a las diferencias que existen en las proporciones de zonas amorfas y cristalinas dentro del gránulo (García 2011). Los valores bajos de absorción de agua pueden estar relacionados con la asociación intermolecular de los grupos hidroxilos y los enlaces covalentes entre los polímeros de almidón (Paredes y col 1989).

En el **Cuadro 6** se muestra el comportamiento del ISA en los almidones de maíz ceroso nativo, hidrolizado, acetilado y succinatado. Se observó un aumento en el ISA al realizar las modificaciones químicas por acetilación y succinatación, siendo el almidón succinatado el que presentó mayor solubilidad, con un valor de ISA de 81.39±0.8 %, seguido del almidón acetilado (66.38±0.7 %), almidón hidrolizado

(7.35±0.1 %) y almidón nativo (2.61±0.8 %). El proceso previo de hidrólisis ácida, la modificación química, además de las condiciones de extrusión (altas temperaturas, bajo contenido de agua y alta presión) pudieron causar la dextrinización del mismo, marcando una gran diferencia entre los modificados en comparación del almidón nativo. Murúa y col (2008) encontraron valores de ISA para almidón nativo de maíz ceroso, hidrolizado, acetilado y succinatado de 2.6, 3.6, 52.88 y 63.4% respectivamente. García (2011) reporta valores de ISA para almidón nativo de maíz ceroso nativo, hidrolizado y succinatado de 2.92, 7.22 y 83.92% para cada tratamiento. Soberanes (2014) muestra valores de 3.36, 7.53, 60.35 y 84.59% para almidón de maíz ceroso nativo, hidrolizado, acetilado y succinatado.

Es importante el estudio del comportamiento del IAA e ISA, ya que depende de esta variable de respuesta el uso que se le pudiera dar a cada tipo de almidón. Para materiales utilizados en la encapsulación de compuestos es deseable una alta solubilidad en agua para que estos puedan formar la dispersión adecuada con el material activo y puedan emulsificarse, mientras tanto, es deseable un IAA bajo para que el material logre aislar a los componentes encapsulados y proveer la protección deseada.

Cuadro 6. Índice de solubilidad en agua de almidón de maíz ceroso nativo, hidrolizado, acetilado y succinatado.

Tipo de almidón	ISA %
Almidón nativo	2.61±0.08[a]
Almidón hidrolizado	7.35±0.1[b]
Almidón acetilado	66.38±0.7[c]
Almidón succinatado	81.39±0.8[d]

Letras diferentes en cada columna indican diferencia estadística significativa entre cada una de las medias (Fisher, α=0.05), LSD= 0.586, media de 3 repeticiones ± DE.

2. Porcentaje y grado de sustitución de los almidones de maíz ceroso modificados

En el **Cuadro 7** se presenta el porcentaje de succinato y acetato de la modificación química del almidón de maíz ceroso. El almidón succinatado alcanzó un porcentaje de sustitución de 2.96±0.15, lo cual es similar a lo encontrado por García (2011) y Soberanes (2014), quienes indican porcentajes de succinato de 2.48 y 2.01 respectivamente. Los valores del porcentaje de sustitución de los almidones modificados tratados en el presente trabajo cumplen las especificaciones de la FDA, la cual recomienda un porcentaje no mayor al 3% para almidones modificados utilizados en la industria de alimentos. En el caso del porcentaje de acetatos se obtuvo un valor de 1.72±0.05 %, en este caso, la FDA establece un límite de grupos acetil del 2.5%, este parámetro cumple con tal especificación al igual que lo reportado por Soberanes (2014) quien reporta un valor de 2.48 %, esta similitud puede deberse a que se utilizó el mismo método en cada uno de los ensayos.

El grado de sustitución (GS) es el número promedio de los grupos hidroxilo sustituidos por unidad de glucosa en la molécula del almidón (Martínez 2007). El estudio de este factor es importante, ya que se puede conocer el grado de incorporación de los grupos funcionales a la molécula de almidón (Singh 2007), pudiendo adquirir este, propiedades deseables que son útiles en la formación de la emulsión, agente encapsulante-componente activo. En el **Cuadro 8** se muestra el GS del almidón nativo de maíz ceroso succinatado y acetilado. Se observó un GS en el almidón succinatado de 0.0508. Murúa y col (2008) reportaron un GS de 0.042 y

Soberanes (2014) un valor de 0.041 para almidones de maíz ceroso succinatados respectivamente, valores similares encontrados en esta investigación.

Después de la modificación por succinatación, el almidón es un efectivo emulsificante debido a la adición de grupos hidrofílicos e hidrofóbicos (Tesch y col 2002).

Cuadro 7. Porcentaje de grupos acetato y succinato en el almidón de maíz ceroso modificado.

Tipo de almidón	Porcentaje de sustitución (%)
Almidón acetilado	1.72 ± 0.05
almidón succinatado	2.96 ± 0.15

Media de 3 repeticiones ± DE.

Cuadro 8. Grado de sustitución del almidón de maíz ceroso acetilado y succinatado.

Tipo de almidón	Grado de sustitución (GS)
Almidón acetilado	0.0869 ± 0.003
Almidón succinatado	2.96 ± 0.007

Media de 3 repeticiones ± DE.

Bhosale y col (2006) reportan un grado de sustitución de 0.021 para almidón de maíz ceroso tratado con 3% de n-OSA, esta diferencia encontrada con el presente trabajo pudiera deberse a que el tiempo de reacción era distinto, por lo tanto la sustitución pudo llevarse en menor manera en tiempos más cortos en los que el almidón estuvo en contacto con el reactivo utilizado. El almidón acetilado presentó un GS de 0.0869±0.003. La concentración de anhídrido acético puede ser aumentada en el proceso de acetilación causando un mejoramiento en las propiedades hidrófobas del almidón (Murúa y Martínez 2009), esto concuerda con lo recomendado por la FDA para almidones acetilados con posible utilización en la industria alimentaria, la cual debe ser no mayor a 0.2. Murúa y col (2008) menciona un valor de 0.033 Y Soberanes (2014) un GS de 0.043, estas diferencias pueden deberse a las condiciones del ensayo, al origen del almidón y tipo de reactivos utilizados en la modificación química.

3. Morfología del gránulo de almidón de maíz ceroso

El almidón de maíz ceroso nativo presentó un tamaño irregular, una forma redonda y ovalada y un tamaño de 13.69±0.04 µm, dichas imágenes se presentan en el **Cuadro 9** y la **Figura 7**. García (2011) reporta una morfología para los gránulos de almidón nativo de redonda a ovalada y Soberanes (2014) un tamaño de partícula de 15.59 µm. La forma estructural del almidón hidrolizado con ácido clorhídrico al 3.4% durante 6 h a 50°C sigue presentado una estructura circular, pero con pequeños daños visibles a consecuencia de las condiciones ácidas (**Figura 6**), las cuales pudieron haber hidrolizado las zonas amorfas del gránulo (Qi y col 1999). Lee y col (2006) han reportado que en la hidrólisis realizada en dos etapas, en la primera no se

produce la pérdida de birrefringencia, esto pudiera deberse a que el ácido pudiera solo romper las zonas amorfas, compuesta principalmente de amilosa. En este trabajo, el material utilizado es almidón de maíz ceroso, compuesto casi en su totalidad por amilopectina; esta pudiera ser la razón por la cual no se observan cambios notorios, ya que la hidrólisis en las zonas cristalinas pudiera llevarse a cabo más lentamente. Se hace necesaria una dextrinización adicional para la obtención de almidones con buenas características para la encapsulación, ya que es deseable un agente encapsulante con una solubilidad alta y baja viscosidad para ser considerado como opción para el método de secado por aspersión (Murúa y col 2008). Éstas características se obtuvieron cuando el almidón fue sometido posteriormente de la hidrólisis ácida y de la modificación química por el método convencional al proceso de extrusión; en esta etapa, el gránulo se desintegra parcial o completamente dependiendo de la energía utilizada, el efecto del cizallamiento o la alta presión en el extrusor (Rubens y Heremans 2000), para darle al almidón las propiedades deseables en los materiales encapsulantes (características de emulsión, alta solubilidad y baja viscosidad), tal como lo menciona García (2011). Éste efecto se observa en la **Figura 7**, donde se muestra un cambio notorio en forma y tamaño en los almidones modificados sometidos al proceso de extrusión en comparación con el almidón nativo e hidrolizado.

Cuadro 9. Tamaño del gránulo del almidón nativo y almidón hidrolizado.

Tipo de almidón	Tamaño de partícula(µm)
Almidón nativo	13.69±0.04[a]
Almidón hidrolizado	11.88±0.06[b]

Letras diferentes en la misma columna indican diferencia estadística significativa (Fisher, α=0.05) LSD=0.427, media de 3 repeticiones ± DE.

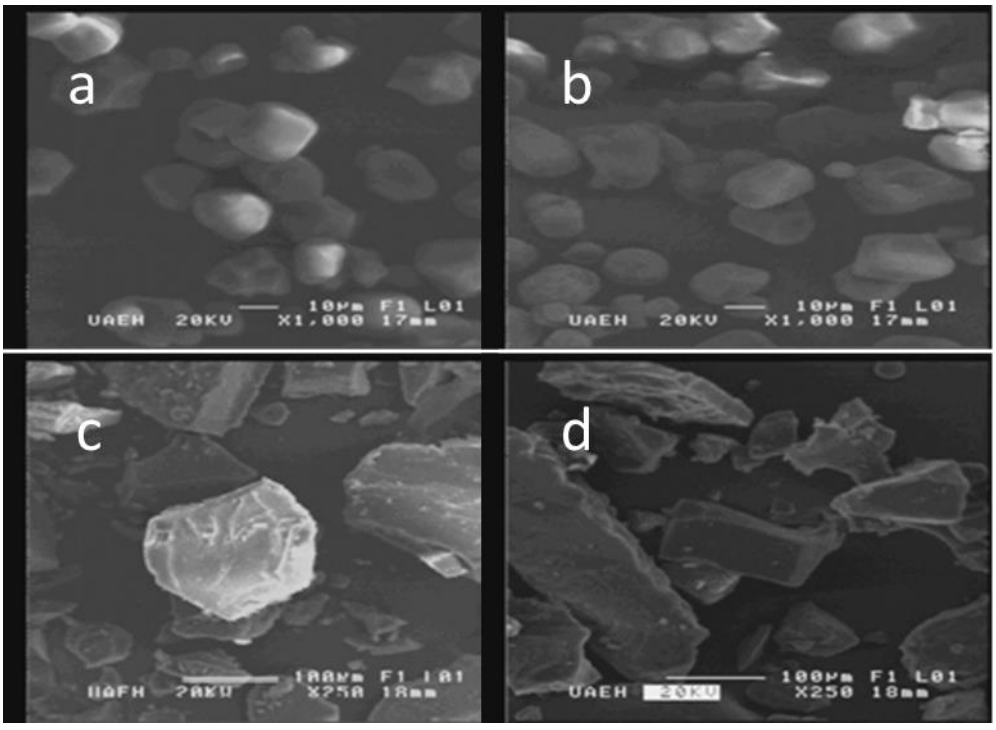

Figura 7. Micrografías del almidón de maíz ceroso. a) Almidón nativo, b) Almidón hidrolizado, c) almidón succinatado y d) almidón acetilado.

C. CARACTERIZACIÓN DE LAS MICROCÁPSULAS DE PINGUINAINA

1. Morfología de las microcápsulas elaboradas con los distintos tipos de almidón

En las **Figura 7** y **8** se muestran la morfología de las microcápsulas obtenidas con almidón ceroso nativo, hidrolizado, acetilado y succinatado, las cuales fueron observadas mediante microscopía electrónica de barrido. De manera general, las microcápsulas producidas con los cuatro diferentes agentes encapsulantes presentaron una forma esférica con una superficie arrugada.

El principal requisito para que un material de pared sea considerado como bueno, es su capacidad de retener y resguardar el componente activo dentro se su estructura durante el procesamiento y almacenamiento. La indicación de ésta habilidad está dada por el grado de integridad y porosidad de las microcápsulas (Rosenberg y col 1985).

Las microcápsulas de los derivados de almidón mostraron morfologías externas similares, en las cuales no se observaron grietas. Las abolladuras observadas pueden deberse al encogimiento de las pequeñas gotas al ser atomizadas durante el secado y al cambio brusco de temperatura (Sheu y Rosemberg 1998). También se observa una aglomeración leve entre las partículas, dicho comportamiento es reportado por Soottitantawat y col (2005) en cápsulas de limoneno obtenidas mediante una mezcla de almidón ceroso comercial y maltodextrina.

Su y col (2012) menciona que la ruptura de las partículas obtenidas mediante secado por aspersión es más frecuente en las partículas pequeñas que en las

grandes, asociando éste fenómeno con el secado rápido del proceso, el cual, solidifica la pared de la microcápsula causando las abolladuras. Por otra parte, Pérez y col (2006) mencionaron que la estructura de la superficie de las microcápsulas es sumamente dependiente de la naturaleza del biopolímero utilizado como agente encapsulante.

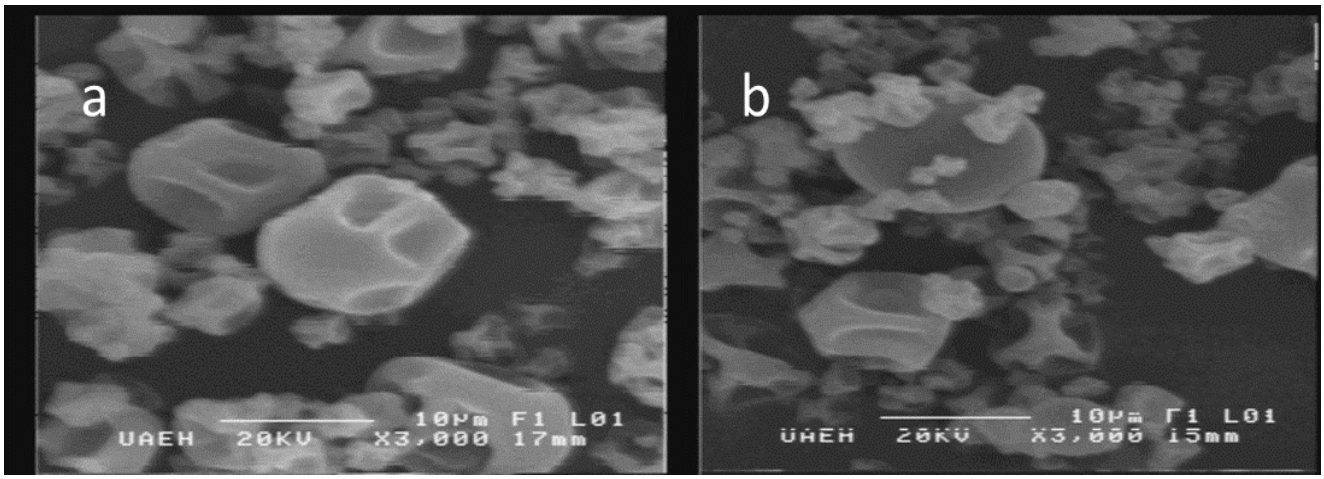

Figura 8. Micrografías de las microcápsulas obtenidas con (a); almidón nativo y (b); almidón hidrolizado.

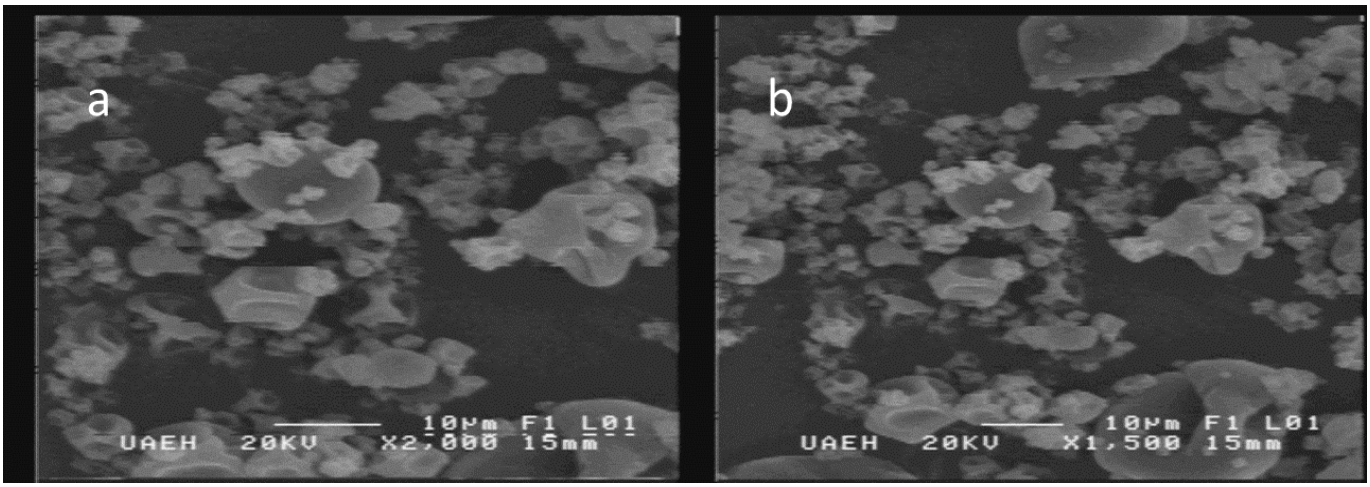

Figura 9. Micrografías de las microcápsulas obtenidas con a); almidón acetilado y b); almidón succinatado.

3. Actividad proteolítica respecto al pH

Es importante el estudio del comportamiento de la enzima respecto al pH ya que la actividad enzimática depende de la concentración de los iones hidrógeno del medio, pudiendo afectar directamente el grado de ionización de los aminoácidos que comprenden el sitio activo, así como también al sustrato o en su caso, al complejo enzima-sustrato, influyendo directamente en la afinidad que vaya a tener la enzima por el mismo.

En la **Figura 10** se muestra la actividad enzimática en un intervalo de pH de 6 a 12, se puede observar, que la actividad específica máxima de la PPP a un pH de 7.6, este comportamiento es muy notorio en comparación con los tratamientos de la enzima encapsulada en las distintas matrices de almidones nativos y modificados, probablemente pudiera deberse a que este factor fue estudiado en tiempo cero, es decir en cuanto las muestras fueron encapsuladas. La PPP al no ser encapsulada, no fue sometida al proceso de secado por aspersión en donde las muestras pueden alcanzar temperaturas de casi 100°C por cortos periodos de tiempo, pudiendo afectar la conformación de la enzima y por lo tanto, puede verse reflejado en su actividad proteolítica. Además, las distintas matrices encapsulantes pudieran no atrapar la misma cantidad de enzima. De manera general todos los tratamientos presentan la misma tendencia, en donde, a pH de 7.6 existe un aumento en su actividad. El almidón nativo e hidrolizado reflejaron la menor actividad en todo el intervalo de pH, esto pudiera deberse a que al no presentar buenas propiedades encapsulantes, no fijaron bien la enzima, por lo tanto, la actividad es mucho menor. En cambio, el

almidón acetilado y succinatado, presentan buena actividad a ´pH de 7 a 10, pudiéndose considerar para su aplicación en alimentos moderadamente alcalinos.

Moreno y col (2016) estudiaron la actividad proteolítica del extracto crudo de *Bromelia pinguin* L. en un rango de pH de 2 a 12, encontrando actividad proteolítica alta a pH 2. Mazorra y col (2013) mencionan que las proteasas activadas en condiciones ácidas, como pueden ser las aspárticas, estarían relacionadas con dicha actividad, ya que en extractos obtenidos de flores de *Citrus aurantium* la alta concentración de ácido a pH de 3.5-5.0 fue asociado a la presencia de proteasas aspárticas, lo cual, pudo ser confirmado mediante estudios de inhibición enzimática. Payrol y col (2005) estudiaron la actividad proteolítica de los frutos de *Bromelia pinguin* nativos de Cuba y reportan una actividad proteolítica máxima a pH de 7.0-8.5, este contraste de actividad máxima a pH extremadamente ácido y moderadamente alcalino pudiera sugerir la presencia de más de un tipo de proteasa en los extractos.

De igual manera otros autores han encontrado comportamientos similares en otras especies de bromeliáceas, Valles y col (2007) reportaron que en extractos enzimáticos de *Bromelia antiacantha* el pH óptimo donde se pudo observar una mayor actividad proteolítica fue de 6-9 respectivamente. Por otra parte, López y col (2009) reportan una máxima actividad proteolítica en *Pseudonanas macrodontes* en un rango de pH de 6.0-8.0.

Una alta actividad proteolítica ha sido encontrada a valores de pH neutro y ligeramente alcalino, lo cual ya ha sido reportado en estudios previos de *Bromelia*

pinguin L. (Payrol y col 2005), esto pudiera estar relacionado con el hecho de que las plantas de la familia Bromeliaceae generalmente producen una gran cantidad de proteasas cisteínicas en sus frutos (Moreno y col 2016). Un estudio que demuestra este comportamiento es el de Khan y col (2003), quienes encontraron actividad enzimática alta a pH neutro y alcalino en bromelaína extraída del tallo de *Ananas comosus*.

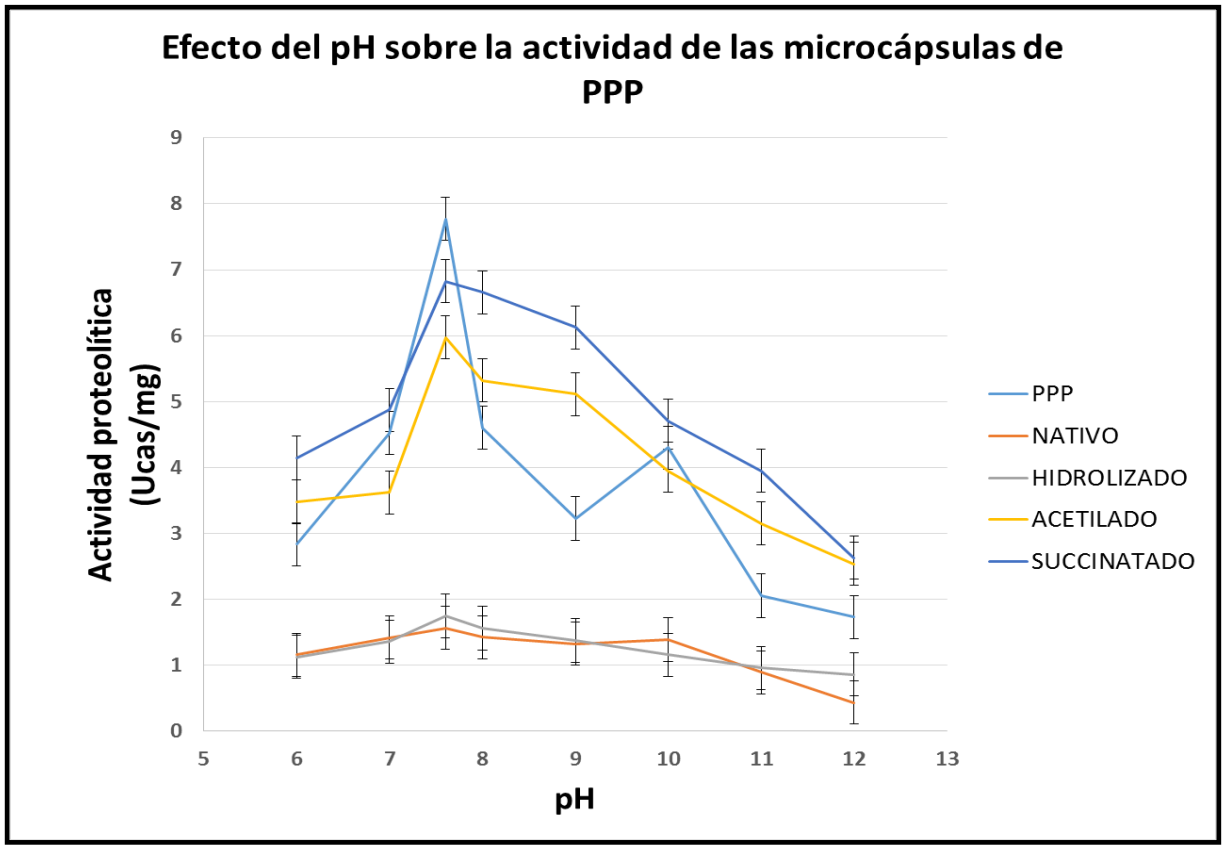

Figura 10. Actividad proteolítica de la PPP y de las microcápsulas respecto al pH y al tipo de almidón utilizado como encapsulante. Fisher α=0.05, LSD= 0.328.

4. Actividad proteolítica respecto a la temperatura

Al igual que ocurre con la mayoría de las reacciones químicas, la velocidad de las reacciones catalizadas por enzimas incrementan con la temperatura. La variación de tal actividad puede ser distinta de una enzima a otra en la barrera de la energía de activación catalizada. Sin embargo, a diferencia de lo que ocurre en otras reacciones químicas, se produce un brusco decremento cuando se alcanza la temperatura crítica, la cual es el efecto de desnaturalización térmica de la enzima cuando se alcanza dicha temperatura.

En la **Figura 11** se muestra el efecto de la temperatura sobre la actividad proteolítica de la enzima Pinguinaina Parcialmente Purificada y la enzima encapsulada en distintas matrices de almidón. Se puede observar que en la PPP y las encapsuladas en almidón acetilado y succinatado presentan el mismo comportamiento de aumento en la actividad conforme aumenta la temperatura, a su vez, la enzima presenta estabilidad aún en temperaturas de 55, 65 y 75°C respectivamente, Barraza (2016) reporta un comportamiento similar para la enzima Pinguinaina Parcialmente purificada, donde se presentó una temperatura óptima a los 65°C. Diversos autores mencionan que la temperatura óptima es el resultado del incremento habitual de la velocidad de reacción con la temperatura y la desnaturalización térmica de la enzima.

A diferencia de la mayoría de las enzimas, que tienen su temperatura óptima en un rango de 30 a 45°C, llegando a veces a la inactivación a los 55°C, la enzima Pinguinaina aún presenta actividad proteolítica alta desde los 55 a los 75°C. Valles y

col (2007) obtuvieron un comportamiento similar en extractos enzimáticos de *Bromelia antiacantha*, teniendo una actividad residual mayor al 90% después de ser calentada durante 60 min a 60°C, lo cual pudiera indicar que las proteasas obtenidas de la familia de las bromelias presentan este comportamiento. Del mismo modo, Rodríguez y col (2009) reportan que en extractos obtenidos de *Jacaratia corumbensis* la temperatura óptima de activad fue a los 55°C.

En la **Figura 11** se puede apreciar como la enzima encapsulada en almidón nativo y en almidón hidrolizado muestran una tendencia de disminución de actividad a temperaturas de 65 y 75°C, esto puede deberse a que los gránulos de almidón que componen las cápsulas pudieron alcanzar la temperatura de gelatinización, por lo tanto, no le proporcionaron protección a las mismas, favoreciendo con ello la desnaturalización y consecuentemente, la pérdida de su actividad.

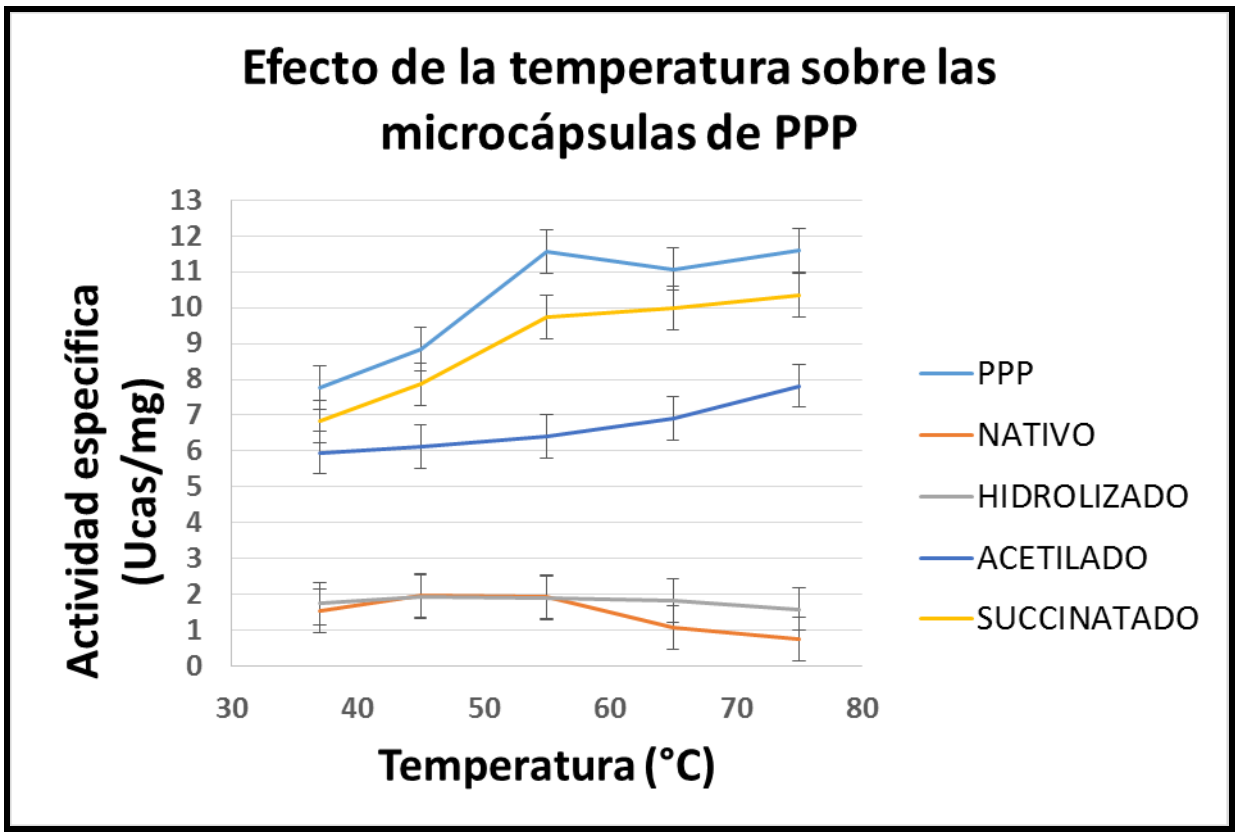

Figura 11. Actividad proteolítica de la PPP y de las microcápsulas respecto a la temperatura y al tipo de almidón utilizado como encapsulante. Fisher α=0.05, LSD= 0.6029.

5. Actividad proteolítica respecto a la fuerza iónica

En la **Figura 12**, se muestra el efecto de la concentración de iones sobre la PPP y las microcápsulas obtenidas con los distintos tipos de almidón modificado.

La presencia de iones y cationes altera la estructura tridimensional de la enzima, ocasionando modificaciones en el centro activo.

Se puede observar en el caso de la PPP sin encapsular, a 0.2 M de NaCl se presenta la máxima actividad y se mantiene constante desde 0.6 a 1 M, comenzando a decaer después de este punto. Este comportamiento puede deberse a que la sal pudiera estar interactuando con el grupo radical de los aminoácidos, provocando un cambio en la estructura propia de la enzima, que al ser una proteína es desestabilizada por la presencia de iones. A concentraciones bajas de sal, la solubilidad de la enzima puede ser mayor (salting in) ya que su actividad se ve afectada positivamente, en contraste, a concentraciones altas, esta pudiera estar compitiendo con la proteína por las moléculas de agua, disminuyendo la solubilidad de la misma causando la precipitación, por lo tanto, la pérdida de su actividad (Moreno y col 2016), este efecto es también conocido como salting out. Con base en este efecto de la sal sobre la actividad proteolítica sobre la enzima utilizada en el presente trabajo, pudiera recomendarse su uso en alimentos moderadamente salados.

Bruno y col (2002) reportan que a concentraciones de 0.2 M no afectan la actividad enzimática de extractos proteínicos obtenidos de *Bromelia hieronymi*, mientras tanto, a concentraciones de 2.5 M, la actividad residual disminuía un 52%.

Por otra parte, en los almidones modificados se observa una mayor tolerancia a la concentración de iones, en el almidón acetilado, a una concentración de 0.4 M presentándose el fenómeno de salting out. Es a concentraciones de 0.6 a 0.8 M cuando la máxima actividad se ve reflejada, es entonces, a partir de 1 M cuando la actividad comienza a decaer. Mientras tanto, el almidón succinatado tiene buena actividad hasta 1.5 M, este comportamiento en las cápsulas obtenidas con los dos tipos de almidón modificado antes mencionados, lograron proveer la protección del material encapsulado, dando con ello un margen más amplio en cuanto a aplicaciones en la industria se refiere.

López y Sequeiros (2010) reportaron para *Pseudananas macrodontes*, perteneciente a la familia Bromeliaceae, un 80% de actividad enzimática residual, cuando este extracto fue sometido a una concentración de 1M, lo cual concuerda con lo encontrado en esta investigación. Vallés y col (2007) estudiaron el efecto de la fuerza iónica sobre la actividad proteolítica de *Bromelia antiacantha*, teniendo como resultado que a concentraciones de 0.2 M de cloruro de sodio no se observaba una disminución en la actividad enzimática, mientras que a 2.5 M solo permaneció un 28% en comparación con la actividad inicial.

Las cápsulas de PPP obtenidas con almidón nativo e hidrolizado, tuvieron actividad enzimática mucho más baja respecto a los demás tratamientos, probablemente a que al no presentar buenas propiedades encapsulantes, no lograron retener la enzima en su matriz polimérica, dejando más en claro, las ventajas que tiene la modificación por sustitución en este tipo de materiales.

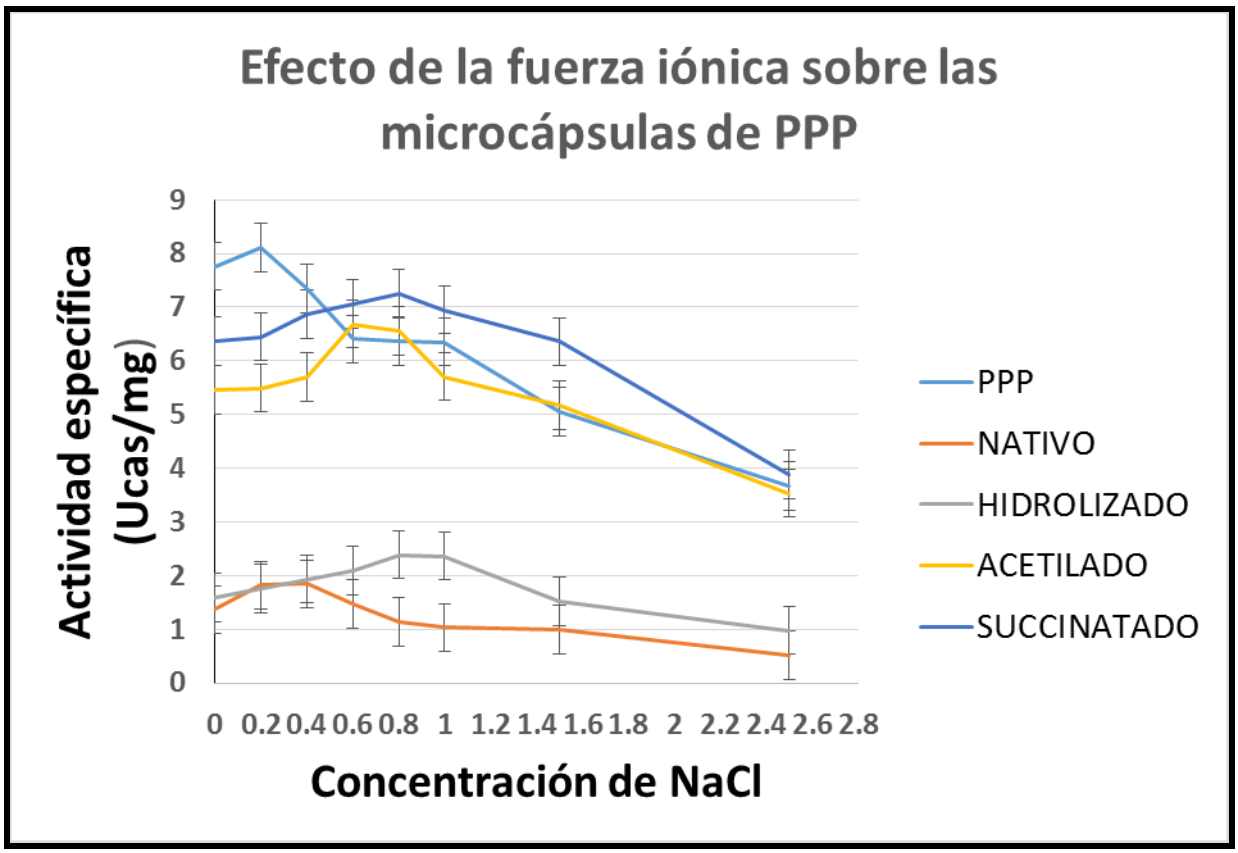

Figura 12. Actividad proteolítica de la PPP microencapsulada en diferentes tipos de almidón (nativo, hidrolizado, acetilado y succinatado) respecto a la fuerza iónica. Fisher α=0.05, LSD=0.44876.

5. Actividad proteolítica durante el tiempo de almacenamiento

Para evaluar la eficiencia del proceso de encapsulación es importante realizar un monitoreo de la actividad proteolítica de las microcápsulas de PPP durante un periodo de tiempo considerable.

En la **Figura 13** se muestra la actividad proteolítica de la PPP y de las microcápsulas hechas con los distintos tipos de almidón nativo y modificado, almacenadas durante dos meses a 4°C. Las pruebas se realizaron en tiempo cero, al primer y segundo mes de almacenamiento. Se puede observar que en el tiempo cero de almacenamiento, la PPP sin encapsular presenta mayor actividad (7.77 Ucas/mg) en comparación con las microcápsulas de almidón nativo, hidrolizado, acetilado y succinatado, teniendo éstos, actividades de 1.56, 1.74, 5,96 y 6.82 (Ucas/mg) respectivamente.

Es en el primer mes de almacenamiento cuando se hace notorio el efecto protector de la microencapsulación sobre la enzima. Todos los tratamientos presentan la misma tendencia en disminuir su actividad con el paso del tiempo, pero las cápsulas de almidón acetilado y succinatado obtuvieron una mayor actividad en comparación con la PPP sin encapsular, probablemente se debe a que el proceso de encapsulación es efectivo para ésta enzima y que el almidón acetilado y succinatado lograron proteger al componente activo, en este caso la enzima, ayudando en gran manera a conservar su actividad. La naturaleza hidrofóbica de los grupos acetilos y succinilo le confiere al almidón la capacidad de emulsificarse mejor, esto pudiera ayudar significativamente a retener más compuesto activo y formar mejor la mezcla

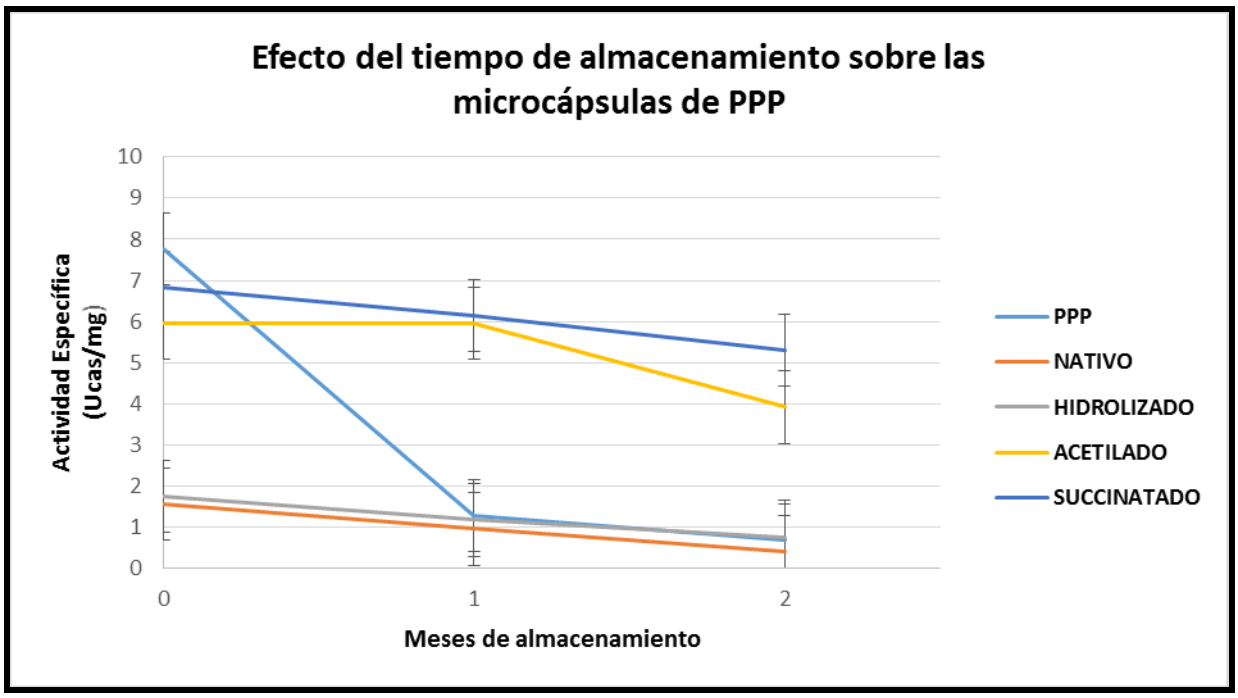

Figura 13. Actividad proteolítica de la PPP microencapsulada en diferentes tipos de almidón (nativo, hidrolizado, acetilado y succinatado) durante dos meses de almacenamiento a 4°C. Fisher α=0.05, LSD=0.8812.

para que interactúen en mayor medida la enzima con el almidón modificado. Qi y col (1999) mencionaban que los almidones modificados (acetilado y succinatados) cuando son combinados con un proceso previo de hidrólisis se pueden usar ampliamente en la encapsulación mediante secado por aspersión, debido a que presentan altas propiedades emulsificantes, ayudando en gran medida a retener al material activo en cuestión.

IX. CONCLUSIONES

Se encontró un contenido de proteína mayor en el jugo de aguama (1.06 ± 0.10 mg/mL) en comparación con la PPP (0.15 ± 0.04 mg/mL), esto sugiere la presencia de proteínas en el jugo que no necesariamente son enzimas.

La actividad proteolítica específica es mucho mayor en la PPP (7.77 ± 0.02 Ucas/mg) que presentada por el jugo crudo (1.20 ± 0.02 Ucas/mg).

Se observaron buenas características en los almidones modificados (acetilado y succinatado) para ser utilizados en la microencapsulación mediante secado por aspersión, teniendo un grado alto de sustitución pero permaneciendo dentro de los límites recomendados por la FDA para almidones modificados utilizados en la industria alimentaria, además, presentaron un ISA más alto en comparación con el almidón e hidrolizado, mejorando las propiedades de emulsificación para la formación de las microcápsulas, logrando una mezcla homogénea entre el agente encapsulante y la enzima.

Los almidones modificados (acetilado y succinatado) mostraron buenas propiedades como encapsulantes de la enzima pinguinaina, ya que en comparación con la enzima PPP no encapsulada y la enzima encapsulada en almidón nativo e hidrolizado, la acetilación y succinatación le brindaron propiedades protectoras a los almidones sobre la enzima en los factores estudiados en el presente trabajo (pH, temperatura, fuerza iónica y tiempo de almacenamiento).

Con el objetivo de explorar los usos biotecnológicos y de procesamiento específicos de las proteasas de *Bromelia pinguin* L., es necesario seguir con la investigación para poder encontrar el campo de aplicación adecuado.

X. BIBLIOGRAFÍA

Abreu PJ, Miranda M, Castillo O y Redondo D. 2001. (a) Ácidos Carboxílicos del Fruto de *Bromelia pinguin* L. (Piña de Ratón) Por HPLC, Rev. Cubana Farm 35(2):122-125.

Abreu PJ, Miranda M, Castillo O y Redondo D. 2001. (b) Extracto Etéreo de Frutos de *Bromelia pinguin* L. (Piña de Ratón) Por El Sistema Acoplado CG-EM", Rev. Cubana Farm 37:143-151.

Abreu PJ, Obregón DW, Nataluci CL y Caffini N. 2005. (c) Reinvestigation of the proteolytically active components of *Bromelia pinguin* fruit. Fitoterapia 76: 541-548.

AOAC Association of Official Analytical Chemists. 2012. Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL. 18ª ed. Estados Unidos de América: Association of Official Analytical Chemists.

Araneda C. y Valenzuela F. 2009. Microencapsulación de extractantes: una metodología alternativa de extracción de metales. Revista Ciencia Ahora 22(11): 9-19.

Bello LA, Paredes O.1999. El almidón, lo comemos pero no lo conocemos. Revista de la Academia Mexicana de Ciencias 50 (3): 29-33.

Briones R, Menéndez O, Flores G, Arroyo B y Cortés I. 2001. "Aislamiento y caracterización de una proteinasa catiónica de la *Bromelia karatas*. Especificidad de sustrato" CEPROBI IPN: 60-68.

Biliaderis G. 1991. Starch: Nutritrional Aspects, chapter 11. En: Carbohydrates in food. Charlotte-Eliasson, A. Ed. University of Lund, Sweden. Marcel Dekker, Inc., New York.

Bruno M, Pardo M, Caffini N y López L. 2002. “Purification of a New Endopeptidase Isolated form Fruits of B*romelia hieronymi* Mez (Bromeliaceae)”, Acta Farm. Bonaerense 21(1):51-56.

Bruno M, Pardo M, Caffini N y López L. 2003. “Hieronymain I, a New Cysteine Peptidase Isolated from Unripe Fruits of *Bromelia hieronymi* Mez (Bromeliaceae)”, Journal of Protein Chemistry 22(2):127-134.

Bruno M, Lazza C, Errasti E, López I, Caffini O, Pardo F, 2010. “Milk clotting and proteolytic activity of an enzyme preparation from *Bromelia hieronymi* fruits”, food science and technology 43: 695-701.

Calvo JC. 2003. “Enzimas” Departamento de Química Biológica. www.calvo.qb.fcen.uba.ar/Trabajo%20con%20enzimas.htm. Fecha de consulta: marzo de 2016.

Castro Y. 2014. Evaluación de la Protección de Diferentes Matrices de Almidón Modificado Como Materiales Encapsulantes Durante la Extrusión Termoplástica de Compuestos de Sabor Encapsulados. Tesis de Maestría. Centro de Investigación en Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada. Instituto Politécnico Nacional, Unidad Querétaro.

Champagne C y Fustier P. 2007. Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods. Current Opinion in Biotechnology 18(2): 184-190.

Chaverri A. 1983. “Comparación de la Actividad Proteolítica de la Papaína Secada por diferentes métodos”. Tesis de Licenciada en Tecnología de Alimentos, Universidad de Costa Rica, Costa Rica

Desai K, Liu C y Park H. 2006. Characteristics of vitamin C encapsulated tripolyphosphate-chitosan microspheres as affected by chitosan molecular weight. Journal of Microencapsulation 23(1):79-90.

Dutta PS, Tripathi G, Mazutti y Dutta J. 2009. Review: Perspectives for chitosan based antimicrobial films in food applications. Journal Food Chemistry 114(4): 1173–1182.

Espejo AR, López FI, Ramírez BK, Holst HE, Till W. 2007. Checklist of Mexican Bromeliaceae with notes on species distribution and levels of endemism. Selbyana 25(1):33-86.

Favaro C, Santana A, Monterrey E, Trindade M y Netto F. 2010. The use of spray drying technology to reduce bitter taste of casein hydrolysate. Food Hydrocolloids 24(4): 336-340.

Frascareli EC, Silva VM, Tonon RV y Hubinger MD. 2012. Effect of process conditions on the microencapsulation of coffee oil by spray drying. Food Bioprod. Process. 90,413–424.

Fuchs M, Turchiuli C, Bohin M, Cuvelier M, Ordonnaud C, Peyrat M y Dumoulin E. 2006. Encapsulation of oil in powder using spray drying and fluidized bed agglomeration. Journal of Food Engineering 75(1): 27-35.

García G, González M,Ochoa M y Medrano H. 2004. Microencapsulación del jugo de cebada verde mediante secado por aspersión. Revista Ciencia y Tecnología Alimentaria 4(4): 262-266.

Givnish T, Barfuss M, Van E, Rina R, Schulte K, Horres R, Gonsiska P, Jabaily R, Crayn D, Smith J, Winter K, Brown G, Evans T, Holst B, Lutter H, Till W, Zizka G, Berry P, Sytsma K. 2011. Phylogeny, adaptive radiation, and historical biogeography in Bromeliaceae: insights from an eightlocus plastid phylogeny. American Journal of Botany 98(5), 872-895.

Harper J.1992. Extrusion processing of starch. In: Alexander, R.J., Zobel, H.F. (Eds.), Developments in Carbohydrate Chemistry. A.A.C.C., USA.

Heldman D y Hartel R. 1997. Principles of Food Processing, chapter 10. En: Food Extrusion. An Aspen Publication. New York.

Hizukuri S, Takeda Y y Yasuda M. 1981. Multi branched nature of amylase and the action of disbranching enzymes. Carbohydrate Research. 147: 342-347.

Imberty A y Pérez S. 1988. A revist to the three-dimensional structure of B-type starch. Biopolymers. 27: 1205.1221.

Imberty A, Buleón A, Tran V y Pérez S. 1991. Recent advances in knowledge of starch structure. Starch-Starke. 43, 10: 375 -384.

Jeon Y, Lowell AV y Gross RA., 1999. Studies of starch esterification: reactions with alkenyl succinates in aqueous slurry systems. Starch 51, 90–93.

Kim YD, Morr CV. 1996.Microencapsulation properties of gum arabic and several food proteins: spray-dried orange oil emulsion particles. Journal of Agricultural and Food Chemistry44:1314-1320.

Li B, Wang L, Li D, Bhandari B, Jun S y Lan X. Chen and Z. Mao. 2009. Fabrication of starch-based microparticles by an emulsification-crosslinking method. Journal of Food Engineering 92(3): 250–254.

Li M, Hasjim J, Xie F, Halley PJ y Gilbert RG. 2014. Shear degradation of molecular, crystalline, and granular structures of starch during extrusion. Starch 66, 595–605.

Light J. 1990. Modified food starches: Why, what, where and how. Cereal Foods World. (35): 1081-1092.

Lineback D. 1994. The starch granule organization and properties. Bakers Digest. 13: 16-21.

Limón VV. 2002. Caracterización Fisicoquímica y Nutricional del Fruto de Aguama (*Bromelia pinguin* L.) Tesis Licenciatura. Culiacán, Sinaloa. Facultad de Ciencias Químico Biológicas, Universidad Autónoma de Sinaloa.10-70 p.

Lozano BM. 2009. Obtención de microencapsulados funcionales de zumo de *Opuntia stricta* mediante secado por atomización. Tesis de Licenciatura.

Cartagena. Universidad Politécnica de Cartagena, Escuela Técnica Superior de Ingeniería Industrial. 1-14.

Luo H y Pozrikidis C. 2009. Numerical simulation of particle encapsulation due to liquid thread breakup. Computers and Fluids 38(3): 564–571.

MacAllister RV. 1979. Nutritive sweetners made from starch. Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry, vol 36.

Madene A, Scher J y Desobry S. 2006. Flavor encapsulation and controlled release a review. International Journal of Food Science and Technology 4(1):1-21.

Martínez L. 2007. Obtención y caracterización de almidones de malanga, arroz y maíz ceroso modificados por extrusión termoplástica para su uso como encapsulantes de aceite esencial de naranja. Tesis de licenciatura. Universidad Veracruzana, Instituto de Ciencia Básicas. Xalapa, Veracruz.

Murúa B, Beristrain CI y Martinez F. 2009. Preparation of starch derivates using reactive extrusion and evaluation of modified starches as shell for encapsulation of flavoring agents by spray drying. Journal Food Engineering. 91: 380-386.

Murúa B, Beristain CI, Martínez F. 2009. Preparation of starch derivatives using reactive extrusion and evaluation of modified starches as shell materials for encapsulation of flavoring agents by spray drying. Journal of Food Engineering 91:380-386.

Ortíz H y Valderrama G. 1977. Obtención de almidón de yuca hidroxipropilado y su aplicación en la industria de alimentos. Tesis de licenciatura. Facultad de Ingeniería Química. Universidad Nacional de Colombia.

Pardo MF, López LM, Canals F, Avilés FX, Natalucci CL, Caffini NO. 2000. Purification of Balansain I, an endopeptidase from Unripe Fruits of *Bromelia balansae* Mez (Bromeliaceae). Journal of Agricultural and Food Chemistry 48(9):3795-3800.

Parize A, Rozone T, Costa I, Fávere V, Laranjeira M, Spinelli A y Longo E. 2008. Microencapsulation of the natural urucum pigment with chitosan by spray drying in different solvents. African Journal of Biotechnology 7(17): 3107-3114.

Payrol JA, Obregón WD, Natalucci CL y Caffini NO. 2005. Reinvestigation of the proteolytically active components of Bromelia pinguin fruit. Fitoterapia, 76, 540–548.

Pérez C, Beristain CI, Lobato C, Rodríguez ME y Vernon EJ. 2006.Thermodynamic analysis of the sorption isotherms of pure and blended carbohydrate polymers. J. Food Eng. 77, 753–760.

Rai M, Asthana P, Kant S, Jaiswal V y Jaiswal U. 2009. The encapsulation technology in fruit plants: A review. Biotechnology Advances 27(6): 671-679.

Rao MB, Tanksale AM, Ghatge MS y Deshpande VV. 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. Microbiology Molecular Biology Revist. 62:597-635.

Rodríguez ML. 2014. Efecto de tres agentes entrecruzantes sobre las propiedades fisicoquímicas y características morfológicas del almidón de plátano.

Rodríguez HM, Pedrosa IR, Prado BL, Beristain CI, Vernon CJ. 2004. Microencapsulación by spray drying of multiple emulsions containg carotenoids. Journal Food Science 69:351-359.

Rosenberg M, Kopelman I y Talmon Y. 1985. A scanning electron microscopy study of microencapsulation. Journal of Food Science 50, 139–144.

Rudenskaya GN, Bogacheva AM y Golovkin BN. 1998. Taraxalisin: a serine proteinase from dandeleon *Taraxacum officinale* Webbs S.I. Febss Letters. 427:237-240.

Semyonov D, Ramon O, Kaplun Z, Brener L, Gurevich N y Shimoni E. 2010. Microencapsulation of Lactobacillus paracasei by spray freeze drying. Food Research International 43(1): 193-202.

Shahidi F, Han, X.Q. 1993. Encapsulation of Food Ingredients. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 33: 501-547.

Sinche M. 2009. Aislamiento, Purificación parcial y caracterización cinética de las proteasas presentes en el látex de los frutos de una planta del Género Vasconcella. Tesis, Facultad de Ingeniería Química y Agroindustria. Escuela Politécnica Nacional, Quito- Ecuador.

Singh Sandhu K, Singh N y Limn S. 2007. A comparison of native and acid thinned normal and waxy corn starches, physicochemical, thermal, morphological and pasting properties. Food Sci. Technol.-Leb. 40, 1527–1536.

Soberanes A. 2014. Utilización de almidón de maíz y de arroz modificados en la microencapsulación de la enzima pinguinaina mediante el proceso de secado por aspersión. Tesis de maestría. Facultad de Ciencias Químico-Biológicas. Universidad Autónoma de Sinaloa, Unidad Culiacán.

Su YL, Fu ZY, Zhang JY, Wang WM, Wang H, Wang YC y Zhang QJ. 2008. Microencapsulation of Radix salvia miltiorrhiza nanoparticles by spray-drying. Powder Technol.184, 114–121.

Tattiyakul J, Rao MA. 2000. Rheological behavior of cross-linked waxy maize starch dispersions during and after heating. Carbohydrate Polymers. 43: 215-222.

Tesch S, Gerhards C y Schubert H. 2002. Stabilization of emulsions by OSA starches. Journal of Food Engineering 54, 167–174.

Thomas DJ, Atwell WA. 1999. Special Topics: Encapsulating agents, Chapter 9 and Starch Modification, Chapter 4. Starch. American Association of Cereal Chemists. 31-39 y 84-85.

Toro E, Maretzki A y Matos M. 1968. “Isolation, Purification, and Partial Characterization of Pinguinain, the Proteolytic Enzyme from *Bromelia pinguin* L.”, Archives of Biochemestry and Biophysics 126:91-104.

Uhlig H. 1998. Industrial enzymes and their applications, John Wiley & Sons, Inc., New York: 146-151.

Vehring R .2008. Pharmaceutical particle engineering via spray drying. Pharmaceutical Research 25 (5):999-1022.

Villamizar L y Martínez F. 2008. Determinación de las condiciones de microencapsulación de un baculovirus entomopatógeno mediante coacervación con Eudragit S100®. Revista Vitae 15(1): 123-131.

Voet D y Voet J. 1995. Biochemistry 2ºedición. New York: Jonh Wiley & Sons: 1360.

Wandrey C, Bartkowiak A y Harding S. 2010. Encapsulation technologies for active food ingredients and food processing, http://www.nottingham.ac.uk/ncmh/harding_pdfs/Paper329.pdf. 83-86 p.; consulta: noviembre de 2016.

Wang LZ y White PJ. 1994. Structure and properties of amylase, amylopectin and intermediate materials of oat starches. Cereal Chemistry. 71: 263-268.

Yañez J, Salazar J, Chaires L, Jimenez J, Marquez M y Ramos E. 2002. Aplicaciones biotecnológicas de la microencapsulación. Revista Avance y Perspectiva 21: 313-319.

Yoshimura M, Takaya T y Nishinari K. 1996. Effects of konjac-glucomannan on the gelationisation and retrogradation of corn starch as determined by rheology and differential scanning calorimetry. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 44: 2970-2976.

Young S, Sarda X y Rosenberg M. 1992. Microencapsulating properties of whey proteins whith carbohydrates. Journal Dairy Science 76(10): 2878-2885.

Zambrano F y Camargo CR. 2001. Optimisation of the conditions for the acid hydrolysis of cassava starch to obtain a fat replacer. Brazilian Journal of Food Technology. 4: 147-154.

Zobel HF. 1988. Molecules to granules: a comprehensive starch review. Starch/ Stärke. 40: 44-50.

Zong M, Deng Y, Cristopher B, Hua N, Zai X y Li Z. 2009. Microencapsulation of tamoxifen: Application to cotton fabric. Colloids and Surfaces. Biointerfaces 69(1): 85–90.

ABREVIATURAS

PPP	Pinguinaina Parcialmente Purificada
APE	Actividad Proteolítica Específica
°C	Grados Celsius
µA	Microamperes
µm	Micrómetros
bs	Base seca
Col	Colaboradores
DSC	Calorimetría Diferencial de Barrido
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación
g	Gramos
h	Horas
KDa	Kilodaltones
kg	Kilogramos
KV	Kilovoltios
M	Molaridad
mBar	MiliBar
mg	Miligramos
min	Minutos
mL	Mililitros
mm	Milímetros
M	Molaridad