

PRODUCCIÓN ENZIMÁTICA DE CICLODEXTRINAS A PARTIR DEL ALMIDÓN EXTRAÍDO DE *COLOCASIA ESCULENTA*.

**MsC. Marlene María Martínez Mora¹, MsC. Arley Pérez Rojas¹, Lic. Karel
Hernández Sánchez¹**

*1- Universidad de Matanzas “Camilo Cienfuegos”, Vía Blanca
Km.3, Matanzas, Cuba.*

Resumen.

En este trabajo, fue evaluada la enzima ciclodextrina transglucosilasa aislada de una especie de *Bacillus* alcalófila, para la producción de ciclodextrinas, utilizando como sustrato no convencional el almidón extraído de las cáscaras de *Colocasia esculenta* (malanga criolla). La enzima mostró una actividad específica frente al almidón de malanga de 3.12 U/mg, referida a la conversión del sustrato a β -ciclodextrina, con un pH y temperatura óptimos de 5.0 y 55°C, respectivamente. Se obtuvo un máximo de conversión a ciclodextrinas del 21.65% y la enzima produjo α -, β -y γ -ciclodextrina en una proporción de 0.29:1:0.848. El empleo de este almidón favoreció la producción enzimática de γ -ciclodextrina, producto que presenta un alto valor comercial.

Palabras claves: *Ciclodextrina-transglucosilasa; Ciclodextrina; Almidón de malanga.*

Introducción.

La sociedad moderna se caracteriza por los volúmenes y costos crecientes de los productos además de una baja disponibilidad de materias primas. Este patrón acelerado de consumo ha provocado el agotamiento de los recursos naturales con que contamos hoy. Por eso, durante los últimos años, debido a razones económicas y medioambientales, se incrementa cada vez más el interés por la recuperación, reciclado y mejoramiento de los residuales de producción (Laufenberg et al., 2003).

Dentro de las materias primas con gran potencial recuperable, se encuentran aquellas procedentes de residuos orgánicos ricos en almidón como por ejemplo los desperdicios derivados de tubérculos.

En Cuba, el 70.1% de toda la superficie que se destina al cultivo de viandas pertenece a los tubérculos y raíces, destacándose en este grupo por su importancia los cultivos del boniato, la malanga y la papa. De esta cifra el 13.6% concierne a la malanga criolla, cultivo de amplia distribución que ocupa el segundo lugar de la producción de tubérculos del país (Anual estadístico de Cuba, 2008).

Dos géneros se cultivan en Cuba bajo el nombre de malanga criolla: *Colocasia* y *Xanthosoma*. El primero originario del sureste de Asia entre la India e Indonesia, del cual se consumen indistintamente cormos y cormelos; y el segundo, originario de América, del que son comestibles solamente los cormelos, con excepción de la malanga de masa amarilla.

La malanga es un cultivo que presenta un alto contenido de almidón con respecto a otros tubérculos como la papa y la yuca y constituye un producto valioso en los países tropicales y subtropicales. Los valores nutricionales y su fácil cocción unida a sus cualidades digestivas, hacen de ella un producto de alta demanda en el mercado nacional (INIVIT, 2004).

En el año 2008, se produjeron 240 000 t de este cultivo que representó el 17.2% de las toneladas de tubérculos y raíces producidas y el 11% de toda la vianda cosechada en nuestro país (Anual estadístico de Cuba, 2008). Sin embargo, una parte de los frutos obtenidos no cumplen con los requisitos para el consumo debido a su bajo peso (inferior a 150g), y son utilizados como material de propagación. Para esta acción sólo se requiere la cuarta o sexta parte de la cosecha y la fracción restante se pierde, dejándose como desecho en el campo sin que sufran tratamiento alguno. Además los cormelos utilizados en la distribución nacional, no soportan un almacenamiento prolongado sin desmejorar su calidad y pueden producirse pérdidas de un 22-28% del producto (INIVIT, 2004).

Otra fuente importante de residuos a partir de la malanga lo constituye la generación de gran cantidad de cáscaras cuando esta es procesada. Estos desechos son generalmente arrojados a la basura o constituyen una fuente no convencional de alimento animal que no ha sido ampliamente extendida, debido a la presencia en ella de cristales de oxalato de calcio que provocan picazón en la boca al comerlas (Hernández, 2008).

En la actualidad, estos desechos no se procesan con la finalidad de extraer su almidón, polímero que tiene potencial como materia prima para obtener productos con valor agregado.

Durante la degradación del almidón, por acción de la enzima bacteriana ciclodextrina-transglucosilasa (CTGasa), se obtienen compuestos macrocíclicos denominados ciclodextrinas (CDs), las cuales están formadas por varias unidades de glucosa unidas mediante enlaces α -D-[1,4]. Ellas presentan una estructura molecular toroidal rígida, con una cavidad interior de volumen específico. Debido a la distribución de los grupos hidroxilos en su estructura, su cavidad interna es apolar, por lo que su característica más interesante es su capacidad de formar complejos de inclusión estables con una amplia variedad de compuestos de distinto peso molecular de naturaleza no polar (Martínez y Gómez, 2007).

La importancia que las ciclodextrinas están cobrando en la actualidad, se observa en el rápido desarrollo de su mercado y, sobre todo, en el constante número de trabajos de investigación, patentes y conferencias que están teniendo lugar en estos últimos años (Szejtli, 1997; Singh et al., 2002).

Los campos de aplicación son diversos. Su mayor potencial está relacionado con la industria farmacéutica. Esto se debe a que la mayoría de las drogas son poco solubles en agua y, consecuentemente, su absorción biológica es lenta y frecuentemente poco eficaz, son sensibles a la oxidación y pueden descomponerse por la luz y el calor. Muchas de estas moléculas son capaces de formar fácilmente complejos con las ciclodextrinas, por lo que la mayoría de sus limitaciones de uso pueden quedar solucionadas mediante dicha asociación (Frömming y Szejtli, 1993; Uekama et al., 1998). Otra de las aplicaciones de este oligosacárido es su empleo, aunque asociadas a sistemas poliméricos, para la purificación de aguas (Martínez y Gómez, 2007), constituyen un aditivo con múltiples aplicaciones en la industria alimenticia (Bertolini et al., 1998), son utilizadas para la eliminación de olores desagradables en el campo de la cosmética y aseo personal, constituyen una importante

herramienta en el desarrollo de la Química Supramolecular, entre otras aplicaciones (Singh et al., 2002).

Desarrollo.

El almidón como sustrato para la producción de ciclodextrinas.

El almidón es uno de los polímeros más abundantes en la naturaleza. Es la principal fuente de almacenamiento de energía en los vegetales, ya que se encuentra en grandes cantidades en las diversas variedades de plantas, como por ejemplo, en los granos de cereales, los cuales contienen entre un 60-75% de su peso seco de almidón, así como también, puede encontrarse en raíces y tubérculos, semillas de leguminosas y en algunas frutas variando su concentración con el estado de madurez de los mismos (Thomas y Atwell, 1999).

Estructuralmente, el almidón consiste de dos polisacáridos químicamente distinguibles: la amilosa y la amilopectina. La amilosa es un polímero lineal de unidades de glucosa unidas por enlaces α -1-4, en cuya estructura algunos enlaces α -1-6 pueden estar presentes. Esta molécula no es soluble en agua, pero puede formar micelas hidratadas por su capacidad para enlazar moléculas vecinas por puentes de hidrógeno y generar una estructura helicoidal que es capaz de desarrollar un color azul por la formación de un complejo con el yodo (Knutson y Grove, 1994). La amilopectina es un polímero ramificado de unidades de glucosa unidas entre un 94-96% por enlaces α -1-4 y en un 4-6% con uniones α -1-6. Dichas ramificaciones se localizan aproximadamente entre 15 y 25 unidades de glucosa. La amilopectina es parcialmente soluble en agua caliente y en presencia de yodo produce un color rojizo violeta (Guan y Hanna, 2004; Hernández et al., 2008).

En general, los almidones comunes están compuestos fundamentalmente entre un 15-25% de amilosa y un 75-85% de amilopectina. Estas dos fracciones varían sus proporciones para las diferentes fuentes de almidón lo cual contribuye a las diferencias en las propiedades físico-químicas de cada uno.

El almidón es una clase de hidrato de carbono de alto peso molecular con una solubilidad baja en su estado nativo, sólo levemente soluble en agua e insoluble en etanol acuoso y por lo general en solventes orgánicos (Hernández et al., 2008).

Tipos de almidones empleados en la producción de CDs.

El almidón soluble es el sustrato más frecuentemente utilizado para la producción de ciclodextrinas, aunque también para este fin muchos investigadores han explotado otras fuentes que incluyen: papa, maíz, soya, boniato, trigo, sago, arroz y yuca (Bertolini et al, 1998; Szerman et al., 2007).

Mundialmente, el consumo anual de ciclodextrinas se ha visto incrementado, por lo que el uso de nuevos sustratos económicamente viables ha sido reportado por algunos investigadores. Un ejemplo de ello fue Charoenlap et al. (2004), quienes optimizaron la producción de ciclodextrinas al usar el almidón obtenido a partir de una especie de palma denominada *Cycas revoluta* que se encuentra en el sureste de Asia. Entre los sustratos menos explotados para este fin tenemos el almidón de yuca que constituye un buen

material crudo debido a su alto contenido de amilopectina y su baja temperatura de solubilización (Szerman et al., 2007). En 1995, Goel y Nene observaron que el almidón de yuca daba altos rendimientos para la producción de CDs cuando se usaba la CTGasa proveniente de *Bacillus firmus*, exhibiendo un rendimiento más alto (49%) comparado con el almidón de maíz y de papa.

En esta investigación, se propone el uso del almidón obtenido a partir de la cáscara de la malanga criolla. Esta porción no comestible del tubérculo constituye de un 16-19% del fruto en general y contiene del 71.4-80.9% de almidón. El empleo de este sustrato para la producción de ciclodextrinas no ha sido reportado por la literatura especializada, por lo que constituye un aspecto novedoso del presente trabajo. Es consideración de los autores, como lógica de lo expuesto anteriormente, que la utilización de este almidón presente en un cultivo ampliamente distribuido en el país, nos provee de una nueva alternativa, no convencional y menos costosa para la producción de ciclodextrinas.

Métodos para la extracción de almidones.

Existen dos vías fundamentales para la extracción de almidón a partir de los diferentes tubérculos: la seca y la húmeda. La vía húmeda es la más utilizada a escala de laboratorio y puede ser realizada de diferentes formas. Una vía consiste en pelar y cortar los rizomas frescos en cubos de aproximadamente 3 cm por cada lado y luego remojarlos durante 30 minutos en una solución de bisulfito de sodio con una concentración de 1500 ppm, en una relación 1:3 (p/v). Los cubos se muelen en un procesador de alimentos durante 2 minutos, para reducir el tamaño de partícula. La masa resultante se pasa a unos recipientes que contengan una solución de bisulfito de sodio con una concentración de 1500 ppm de dióxido de azufre, en una relación 1:1 (v/v). La lechada de almidón se filtra en coladores de tela plástica (malla 80), para eliminar la fibra, y el filtrado se deja sedimentar a 4°C, durante 4 horas. Transcurrido este tiempo, la mayor parte del líquido sobrenadante se elimina por sifoneo y la lechada de almidón se lava tres veces con agua destilada, centrifugando en el último lavado a 2500 r.p.m, durante 12 minutos, con la finalidad de recuperar el almidón. Posteriormente, se seca en una estufa de convección a 55°C, durante 24 horas, y se muele hasta obtener un polvo, el cual se almacena en frascos de plástico con cierre de tapa hermética para su posterior uso (Novelo y Betancur, 2005; Hernández et al., 2008).

Otra alternativa de extracción es colocar una porción de los tubérculos pelados, limpios y troceados con una cantidad de agua igual en una licuadora, mezclándose a velocidad media por un minuto. El homogeneizado se filtra a través de un filtro de muselina y el residuo se resuspende en dos volúmenes de agua destilada, repitiéndose el procedimiento hasta obtener un filtrado claro, indicando que todo el almidón ha sido extraído. Los filtrados se centrifugan a 2000 r.p.m. durante 15 minutos, descartándose el sobrenadante. El residuo se lava varias veces con 10 ml de agua destilada para eliminar otros constituyentes presentes. El almidón extraído se seca en una estufa a temperatura de 45°C por 24 horas, pasándose luego a través de un tamiz malla 60 (250 μ m) y se almacena en bolsas plásticas cerradas (Rincón et al., 2000).

En el caso de la vía seca, los trozos de materia prima fresca y lavada se ponen a secar al sol o artificialmente por un período de 24-48 horas, rayándose posteriormente hasta obtener una harina gruesa. Esta harina sufre un proceso de reducción de tamaño o molienda mediante la utilización de molinos de martillo, rodillos, etc. El producto obtenido finalmente es sometido a un proceso de tamizaje obteniéndose un almidón refinado que es almacenado en bolsas plásticas selladas herméticamente (Cobana y Antezana, 2007).

Historia de las ciclodextrinas.

En 1891, Villiers publicó la primera referencia de las ciclodextrinas, al aislar una sustancia cristalina no reductora a partir de la degradación enzimática del almidón, que llamó celulosina. Poco después, la enzima ciclodextrina-transglucosilasa (CTGasa; E.C. 2.4.1.19) de origen bacteriano, fue aislada por primera vez del microorganismo *Bacillus macerans* y se utilizó en la degradación enzimática del almidón, obteniéndose mezclas de dextrinas lineales y cíclicas. Luego, Schardinger desarrolló en 1903 un trabajo sistemático en la síntesis y purificación de sustancias similares a la celulosina obtenida por Villiers, así como al estudio de sus compuestos de inclusión con yodo. Estos experimentos permitieron diferenciar la α -CD de la β -CD, identificándose como “dextrinas de Schardinger” (Villiers y Hebd, 1891; Szejtli, 1988).

En 1936, los trabajos relacionados con la hidrólisis enzimática de las dextrinas de Schardinger definieron la estructura cíclica de estas moléculas y la naturaleza de los enlaces glicosídicos tipo $\alpha(1\rightarrow4)$. En 1948, Freudenberg descubrió una nueva ciclodextrina, la γ -CD (Freudenberg et al., 1948). En la actualidad, las ciclodextrinas se producen industrialmente en grandes cantidades a partir de cepas del género *Bacillus* modificadas genéticamente, de forma tal que se obtiene selectivamente solamente una de las ciclodextrinas. Este método evita los procesos de separación de mezclas y hace más rentable el proceso, obteniéndose las ciclodextrinas como reactivos con grados de pureza superior al 99% (Szejtli, 1988).

Características generales.

Las ciclodextrinas son una familia de oligosacáridos cíclicos naturales no reductores, constituidos por 6, 7, u 8 unidades de D (+)-glucopiranosas unidas por enlaces $\alpha(1\rightarrow4)$ glicosídicos, denominadas α -, β - y γ -CD, respectivamente (Figura 1). Ellas son consideradas como la primera generación o ciclodextrinas padres. De ellas, la β -ciclodextrina es la forma más accesible por su bajo costo y es generalmente la más utilizada (Szejtli, 1998; Singh et al., 2002; Szerman et al., 2007). Son conocidas también ciclodextrinas con más de ocho unidades de D (+)-glucopiranosas (δ , ϵ y η -ciclodextrinas), hasta llegar a tener catorce unidades, aunque no son las más utilizadas por su pobre capacidad en la formación de compuestos de inclusión, debido al gran tamaño de la cavidad (Pulley y French, 1961; Szejtli, 1998).

La estructura de las ciclodextrinas ha sido elucidada a partir de estudios de difracción de rayos X y de neutrones (Easton y Lincoln, 1999). Como resultado de la conformación silla $4C_1$ de las unidades glucopiranosicas, las ciclodextrinas presentan una forma tridimensional de cono anular truncado (Lindner y Saenger, 1982) (Figura 1). Los grupos

hidroxilo primarios enlazados al carbono 6 de cada unidad glucopiranosica quedan orientados hacia el borde más estrecho del cono, mientras que los hidroxilos secundarios situados en los carbonos 2 y 3 quedan, por consiguiente, dirigidos hacia el borde más ancho del cono anular. Así, todos los grupos hidrofílicos se ubican alrededor de las aberturas de la cavidad y orientados hacia afuera. De esta forma, la ciclodextrina presenta un revestimiento externo de naturaleza altamente hidrofílica. Los átomos de hidrógeno metínicos de los carbonos 3 y 5, así como los pares electrónicos de los enlaces glicosídicos quedan orientados hacia el interior de la cavidad, dándole un carácter marcadamente hidrofóbico y apolar.

Esta peculiar característica, permite la formación de complejos de inclusión con una gran variedad de compuestos inorgánicos y orgánicos, mejorando así las propiedades físico-químicas de los mismos, lo cual contribuye al desarrollo de un gran número de aplicaciones de las ciclodextrinas en lo que respecta a la tecnología de los alimentos, la industria farmacéutica, textil, biotecnológica y cosmética (Cao et al., 2005; Szerman et al. 2007; Martínez y Gómez, 2007).

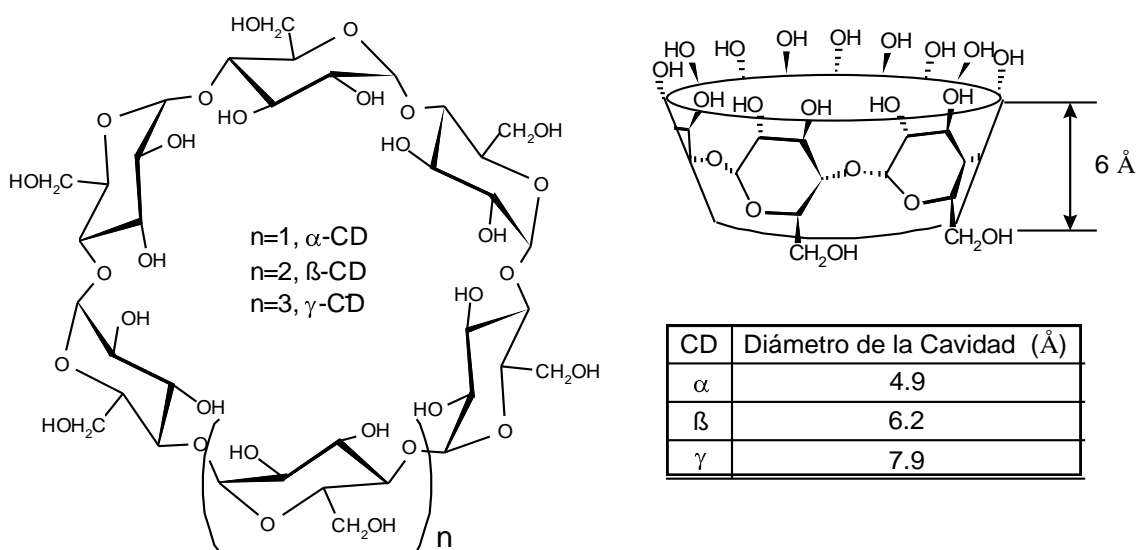


Figura 1. Estructura cíclica y dimensiones de las ciclodextrinas.

Fuente: Veen et al., 2000.

Propiedades de las ciclodextrinas.

Las ciclodextrinas son sólidos cristalinos incoloros. Las principales propiedades fisicoquímicas de las ciclodextrinas dependen del número de unidades de D (+)-glucopiranosas presentes en la molécula y se recogen en la Tabla 1.

Tabla 1. Principales propiedades fisicoquímicas de las ciclodextrinas.

Fuente: Szejtli, 1988.

Propiedades	α -CD	β -CD	γ -CD
Unidades de D(+)-glucopiranosas	6	7	8
Masa molar (g/mol)	973	1135	1297
Diámetro de la cavidad (Å)	4.7-5.3	6.0-6.5	7.5-8.3
Temperatura de descomposición (°C)	250-260	255-265	240-245
Solubilidad en H ₂ O (g /100 mL a 25°C)	14.5	1.85	23.2
Poder rotatorio de la luz polarizada [α]D ₂₅	150	162.5	177.4
Profundidad de la cavidad (Å)	7.9	7.9	7.9
Diámetro de la periferia (Å)	14.6	15.4	17.5
Volumen aproximado de la cavidad:			
Por molécula (Å ³)	174	262	972
Por gramo (Å ³)	0.10	0.14	0.20
Moléculas de H ₂ O en el interior de la cavidad	8	11	17

Complejos de inclusión en ciclodextrinas.

La estructura cíclica de las ciclodextrinas determina una cavidad apolar (receptor), que les permite la inclusión de moléculas huéspedes (sustratos), preferentemente apolares en su interior mediante interacciones no covalentes. Este tipo de ensamblaje forma estructuras más o menos estables, que pueden ser aisladas en fase sólida. Es de notar que la inclusión apenas afecta la estructura y la funcionalidad de los sustratos moleculares, aunque puede provocar alguna ligera deformación del receptor (Martínez y Gómez, 2007).

A pesar de ser muchos y variados los trabajos realizados acerca del poder acomplejante de las ciclodextrinas, todos los autores coinciden en que se trata de un fenómeno huésped-

hospedero. Pringsheim, en 1920, descubrió esta propiedad en las CDs y lo denominó “coordinación”, y al producto formado “complejo”. La terminología actual es de “complejo de inclusión”, propuesta por Schlenk 30 años después (Wenz y Angew, 1994).

El proceso de reconocimiento molecular de sustratos por las ciclodextrinas requiere que el receptor y el sustrato sean compatibles en cuanto a su tamaño y su forma. Si el sustrato posee grupos polares capaces de formar puentes de hidrógeno con los grupos hidroxilo, la interacción será más fuerte y, por tanto, la estructura será más estable. La fuerza motriz en la formación de complejos de inclusión es el desplazamiento, por parte del sustrato, de las moléculas de agua situadas en la cavidad de las ciclodextrinas en posiciones energéticamente desfavorables (interacción polar-apolar) (Wenz y Angew, 1994). Ello provoca un aumento de la entropía del sistema, favoreciendo el proceso de formación del complejo de inclusión.

La formación de complejos de inclusión provoca variaciones reversibles en las propiedades fisicoquímicas de la molécula huésped, tales como su solubilidad en agua, volatilidad y fotosensibilidad, confiriéndoles una gran utilidad industrial en la solubilización de drogas (Harada et al., 1977), la estabilización de sustancias volátiles (Buschmann y Schollmeyer, 2002), y la protección contra la oxidación (Harada et al., 1977). Otras propiedades fisicoquímicas de las moléculas huéspedes que sufren variaciones al formar complejos de inclusión son sus corrimientos químicos en RMN y la intensidad y posición de las bandas de sus espectros de absorción y de fluorescencia, los cuales son muy útiles para detectar la inclusión y determinar sus parámetros cinéticos y termodinámicos.

Enzima productora de las ciclodextrinas y microorganismos relacionados.

La enzima encargada de la bioconversión del almidón en CDs es la ciclodextrina transglucosilasa (CTGasa) (Figura 2). Esta es una enzima extracelular única, inducible y multifuncional, porque es capaz de catalizar cuatro reacciones diferentes: ciclización, desproporción, acoplamiento e hidrólisis (Bovetto et al., 1992). En la reacción de ciclización, la enzima transforma el α -1,4-glucano a oligosacáridos cíclicos no reductores, compuestos de 6, 7, 8 unidades de glucosa las cuales constituyen la α -CD, β -CD y γ -CD. En la reacción de desproporción, los extremos reductores de una cadena lineal son transferidos a una molécula aceptora, rindiendo una mezcla de oligosacáridos de diferentes grados de polimerización. En la reacción de acoplamiento, la CTGasa degrada las CDs formadas por la vía de transglucosilación molecular, resultando en una acumulación de productos lineales. Esta enzima también es capaz de desarrollar una actividad hidrolítica débil. La principal aplicación de esta enzima es la producción de CDs (Tonkova, 1998; Pishtiyski et al., 2008).

La CTGasa es producida únicamente por células microbianas, con la finalidad de convertir el almidón en compuestos como las CDs que no pueden ser utilizados por microorganismos competidores. Su biosíntesis ha sido reportada a partir de diferentes cepas de *Bacillus* (Tonkova, 1998), *Klebsiella* (Gawande y Patkar, 1999), *Paenibacillus* (Jemli et al., 2007), *Brevibacterium* (Mori et al., 1994), *Thermococcus* (Tachibana et al., 1999) *Thermoanaerobacterium* (Wind et al., 1998), *Anaerobranca* (Prowe y Antranikian, 2001).

Las propiedades bioquímicas de la enzima producida por cada una de las especies de estos géneros microbianos difieren significativamente (Tabla 2).

La CTGasa producida por las cepas de *B. macerans* y especies alcalófilas de *Bacillus* son las más estudiadas y están caracterizadas completamente, por lo que son las candidatas a utilizar en la producción de CDs a nivel industrial (Pishtiyski et al., 2008).

Todos los aislados enzimáticos producen los tres tipos de CDs a diferentes proporciones. Como la separación de los diferentes tipos de CDs es un proceso muy costoso y que además consume mucho tiempo, una CTGasa que sintetice predominantemente un tipo de CDs sería de gran interés industrial (Qi y Zimmerman, 2005).

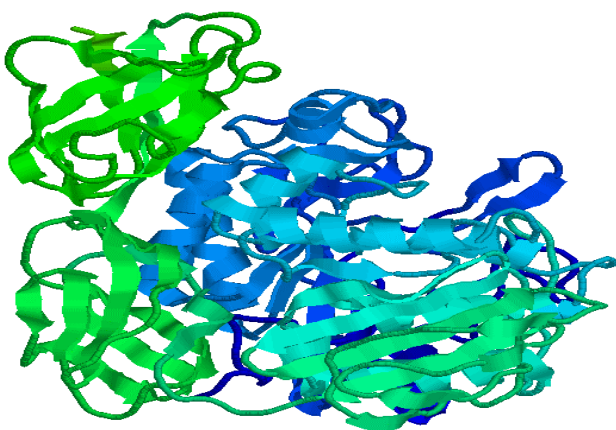


Figura 2. Estructura tridimensional de la CTGasa.

Fuente: (Veen et al., 2000).

El proceso de producción de CDs depende mucho de la CTGasa empleada, es por esta razón que la caracterización y aplicación de nuevas enzimas de este tipo nos provee de una alternativa diferente.

Tabla 2. Caracterización de las CTGasa a partir de diferentes cepas.

Cepa	pH óptimo	Temperatura óptima (°C)	Estabilidad pH	Estabilidad térmica	CD dominante	Referencia
<i>B. megaterium</i>	7.2	60	6.0-10.5	30	β	Pishtiyski et al., 2008
<i>B. macerans</i> 11	4.5	65	6.0-8.0	65	α	Abelyan et

						al., 2008
B. firmus No. 37	6.0	65	-	60	β	Matioli et al., 2001
B. firmus NCIM 51119	5.5-8.5	65	7.0-11.0	30	β	Gawande et al., 1999
B. agaradhaerens LC-3C	9.0	55	5.4-11.0	40	β	Martins y Hatti, 2002
Bacillus sp. 277	5; 8.5	60	6-10.0	70	β y γ	Cao et al., 2005
Bacillus sp. G1	6.0	60	7.0-9.0	60	β	Sian et al., 2005
Paenibacillus sp. F8	7.5	50	6.0-6.8	40	β	Larsen et al., 1998
K. pneumoniae AS-22	7.0-7.5	45	6.0-6.9	35	α	Gawande y Patkar, 2001
Anaerobranka sp.	6.0-9.0	65	-	66	α	Thiemann et al., 2004
Thermococcus sp.	5.0-5.5	90-100	-	100	α	Tachibana et al., 1999

Fuente: (Pishtiyski et al., 2008).

Aplicaciones de las ciclodextrinas.

Las CDs son ampliamente aprovechadas como agentes moleculares acomplejantes. Debido a su gran capacidad de formar complejos de inclusión, las propiedades de los compuestos con los que ella se acompleja, pueden ser significativamente modificadas. Como resultado de este fenómeno, las CDs son utilizadas en una gran variedad de productos industriales, tecnologías y métodos analíticos. Sus insignificantes efectos citotóxicos, son un atributo importante para su aplicación como molécula transportadora, en alimentos y sabores, en la cosmética, en el embalaje, en las industrias textiles, procesos de separación, en la protección del medio ambiente, fermentación y en la catálisis (Popova y Pishtiyski, 2001, Singh et al., 2002).

Farmacéuticos.

Una de las aplicaciones clásicas de las CDs es en el campo de la industria farmacéutica. Esta industria se caracteriza no sólo por la creación de nuevas formulaciones, sino también por reformular las drogas ya existentes y mejorar las propiedades físicas inadecuadas de

nuevos ingredientes activos. En este campo, las CDs ofrecen ventajas significantes sobre las formulaciones estándar. Los complejos de inclusión formados con los ingredientes activos pueden estabilizarlos, mejorar su solubilidad y biodisponibilidad además de disminuir los efectos adversos. Las CDs actúan como un sistema de distribución de medicamentos y son candidatas potenciales en muchas aplicaciones debido a su habilidad de alterar las propiedades físicas, químicas y biológicas de las moléculas huéspedes a través de la formación de complejos de inclusión (Uekama et al., 1998). Sus características multifuncionales y de bioadaptabilidad permiten aliviar los efectos indeseables de diferentes drogas en varias vías de administración que incluyen la oral, rectal (Szejli, 1998), nasal (Merkus et al., 1999), ocular (Loftsson y Jarvinen, 1999), subcutánea e intradérmica (Matsuda y Arima, 1999).

Medio ambiente.

Las CDs son también aprovechadas en las ciencias ambientales, en términos de solubilización de contaminantes orgánicos, enriquecimiento y eliminación de contaminantes orgánicos y metales pesados a partir del suelo, el agua y la atmósfera (Gao y Wang, 1998). Ellas también son aplicadas en sistemas de tratamientos de aguas para incrementar la acción estabilizadora, la encapsulación y adsorción de contaminantes. Usando CDs sustancias altamente tóxicas pueden ser eliminadas a partir de efluentes industriales por formación de complejos de inclusión (Wu y Fan, 1998).

Industria alimenticia.

Poseen numerosas aplicaciones en la industria alimenticia, las cuales van dirigidas fundamentalmente a la remoción y enmascaramiento de compuestos indeseables, control de la liberación de compuestos deseados así como la protección del sabor en las formulaciones de alimentos. Todo esto es posible porque ellas son capaces de formar complejos de inclusión con una amplia variedad de moléculas que incluyen ácidos grasos, sabores y colores (Prasad et al., 1999).

La mayoría de los sabores tanto naturales como artificiales son aceites volátiles o líquidos, por lo que acomplejarse con esta molécula permite su protección a través de los rigurosos métodos de procesamiento de los alimentos como son: la congelación, descongelación y el calentamiento. Esto proporciona que el sabor sea conservado por un período de tiempo mayor comparado con otros encapsulantes, además de convertirse en una alternativa diferente y prometedora para las tecnologías convencionales de encapsulación para la protección del sabor (Muñoz-Botella et al., 1995; Singh et al., 2002).

Analítica.

Las CDs son utilizadas ampliamente en los procesos de separación debido a su habilidad de discriminar entre isómeros de posición, grupos funcionales, enantiómeros y homólogos (Ilan, 1997). Esta propiedad hace de esta molécula un selector ideal en el reconocimiento molecular y una de las más empleadas en un amplio rango de separaciones. La forma, la talla y la selectividad de las CDs influyen mucho en este proceso. Esto es posible a su habilidad de formar complejos de inclusión con moléculas hidrofóbicas más pequeñas (Singh et al., 2002).

Industria cosmética y aseo personal.

La preparación de cosméticos es un área que demanda el uso de las CDs. El mayor beneficio que reportan es: la estabilización, control de olores, procesos de mejoramiento sobre la conversión de ingredientes líquidos a la forma sólida, protección y liberación del sabor en lápices labiales, aumenta la estabilidad térmica de aceites, etc. Otras aplicaciones incluyen su uso en las formulaciones de pastas dentales, cremas para la piel, toallas sanitarias y además permiten la eliminación de olores formados en la degradación microbiana del sudor, incorporándose con este fin en los desodorantes de barra. Permiten mejorar también la solubilidad de determinados compuestos como el retinol, empleados en formulaciones anti-envejecimiento, al tiempo que los complejos con CDs son más estables a la reacción de oxidación y a la acción de la radiación ultravioleta (Szetjli, 1998; Buschmann y Schollmeyer, 2002; Martínez y Gómez, 2007).

Resultados.

Extracción del almidón a partir de los residuos de la malanga.

Para la extracción del almidón a partir de las cáscaras de la malanga, se utilizó un proceso de molienda húmeda, seguida de deshidratación y tamizado. El rendimiento de este proceso fue del 14.3%, el cual se considera bajo, ya que se estima que la cáscara posee de un 71.4-80.9% de almidón, por lo que se requiere perfeccionar el procedimiento y la técnica.

Actividad específica y condiciones óptimas de la CTGasa frente al almidón de malanga.

La enzima mostró una actividad específica frente al almidón de malanga de 3.12 U/mg, referida a la conversión del sustrato a β -CD. Esta actividad específica fue superior en 1.4 veces a la correspondiente frente al almidón soluble comercial. Este hecho puede ser justificado por la diferencia estructural de los gránulos de almidón, los cuales presentan diferentes composiciones (amilosa y amilopectina), grado de cristalinidad y peso molecular en función de la fuente de origen (Guan y Hanna, 2004; Hernández et al., 2008).

La CTGasa mostró un pH óptimo igual a 5 en buffer citrato-fosfato de sodio frente al almidón de malanga (Figura 3). Resultados similares han sido reportados por otros investigadores (Tachibana et al., 1999; Cao et al., 2005; Pishtiyski et. al, 2008) confirmándose el intervalo expuesto por la literatura consultada para la mayoría de las CTGasa, que exhiben un pH óptimo entre 5.0 y 8.0 (Sian et. al, 2005). Existen excepciones como la CTGasa purificada a partir de *Brevibacterium* sp. no. 9605 que posee un alto valor de pH óptimo igual a 10 (Mori et al., 1994). La enzima fue completamente inactiva a pH inferiores a 4.0, lo que demuestra que los valores extremos de pH no son convenientes para que la CTGasa lleve a cabo la actividad cíclica.

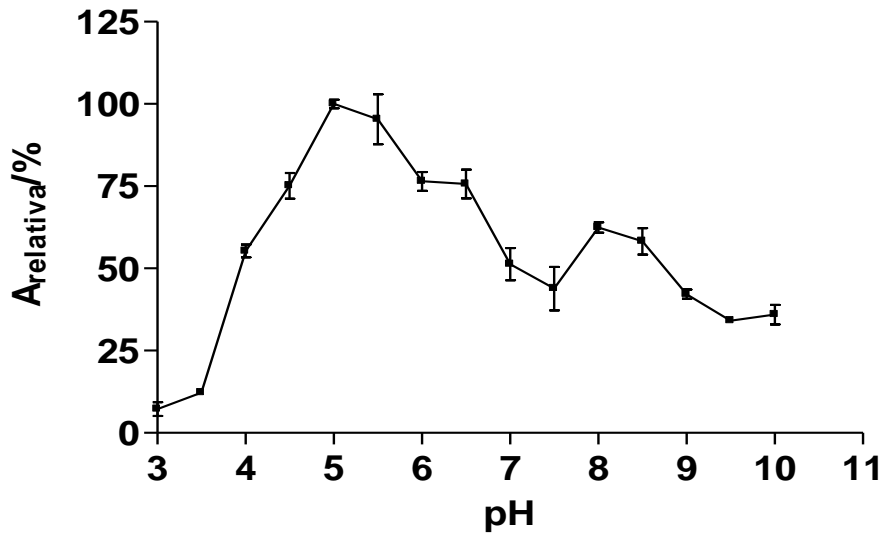


Figura 3. Gráfico de pH óptimo de la enzima CTGasa. El intervalo de pH evaluado fue de 3-10, con una diferencia de 0.5 unidades cada uno. La temperatura utilizada en el ensayo fue de 55°C por 10 minutos. Las barras representan la desviación estándar para las determinaciones por triplicado.

En trabajos previos, se han observado dos valores de pH óptimo para esta enzima, por lo general, uno a pH ácido y otro a pH básico (Gawande et al., 1999; Tachibana et al., 1999; Gawande y Patkar, 2001; Thiemann et al., 2004; Cao et al., 2005). Con respecto a esta tendencia, es de notar que a pH=8.0, la enzima muestra un pico con más de la mitad de la actividad relativa.

En la Figura 4, se observa que la enzima en estudio exhibió una actividad máxima a 55°C. Este mismo valor de temperatura óptima se obtuvo para las CTGasa pertenecientes a las cepas de *B. macerans* IFO 3490 (Kaneko et al., 1990), *B. megaterium* (Kitahata et al., 1974), *B. lentus* (Sabioni y Park, 1992) y *B. agaradhaerens* (Martins y Hatti, 2002). Es de destacar, que la enzima mantuvo la actividad relativa por encima de un 50%, entre 50-65°C y en el intervalo de temperaturas restantes la actividad relativa se perdió hasta un 60% aproximadamente.

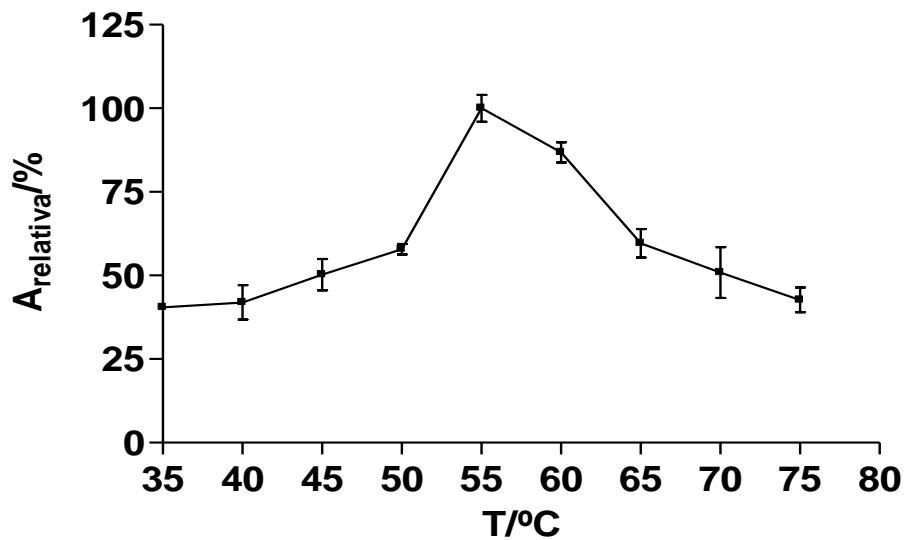


Figura 4. Temperatura óptima de la CTGasa. El intervalo de temperaturas evaluadas fue de 35-75 °C en buffer citrato-fosfato de sodio (pH=5.0, 50mM), por un período de 10 minutos. Las barras representan la desviación estándar para las determinaciones por triplicado.

Proporción de CDs producidas a partir del almidón de malanga.

El rendimiento y la proporción de las diferentes CDs formadas por la CTGasa está en dependencia no sólo de la fuente microbiana que la produce, sino también de las características del sustrato y de las condiciones de bioconversión (Szerman et al., 2007). La utilización de almidón de malanga como fuente no convencional para la producción de CDs produjo un cambio con respecto a la tendencia informada en la literatura frente a otros sustratos como por ejemplo el almidón soluble (β -CD > α -CD > γ -CD) (Thiemann et al., 2004; Cao et al., 2005), al rendir una proporción favorable hacia la producción casi al mismo nivel para la β - y γ -CD quedando muy por debajo de estas la α -CD (Figura 5). Esto sugiere que las diferentes fuentes de almidón pueden afectar la producción de CDs y este fenómeno es probablemente causado por las diferencias en la estructura de los gránulos de almidón y sus propiedades. La proporción obtenida en este caso fue de 0.29:1:0.848 (α -CD: β -CD: γ -CD) y se obtuvo un máximo de conversión a CDs del 21.65%. De este valor el 9.47% corresponde a la γ -CD, que es la que presenta, de los tres tipos de CDs el mayor valor comercial y es producida con poca frecuencia por las especies alcalófilas en esa proporción.

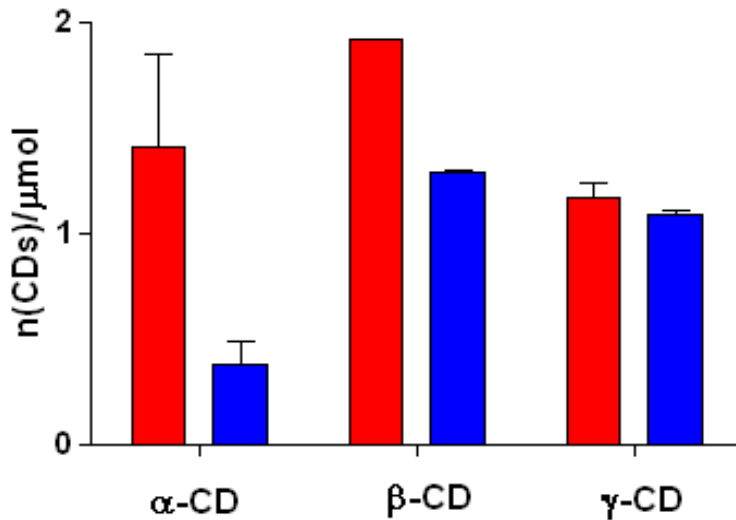


Figura 5. Proporción de CDs producidas frente a almidón soluble (rojo) y almidón de malanga (azul). El ensayo fue realizado a una temperatura de 55°C con almidón al 1.5% en buffer citrato-fosfato de sodio (pH=5.0, 50mM) por 60 minutos. La concentración de enzima utilizada fue de 0.27mg/mL.

Esta proporción resultó ser similar a la obtenida por Cao et al. (2005) (Tabla 2) al utilizar almidón soluble como sustrato, con el que logró un máximo de conversión del 34% y la proporción fue de 0.26:1:0.86 después de 12 horas de reacción a 60°C y pH 8.0.

Muchos investigadores han intentado el uso de varias fuentes de almidón para la producción de CDs. Sian et al. (2005), utilizó como sustrato para la CTGasa purificada a partir de *Bacillus* sp. G1 el almidón soluble, de yuca, sago, maíz y arroz y en todos obtuvo como producto mayoritario la β-CD con una pequeña porción de γ-CD.

Conclusiones.

En esta investigación, el empleo del almidón de malanga como sustrato para la enzima CTGasa resultó ventajoso, al producirse cantidades muy bajas de α-CD, lo que resulta muy conveniente para las preparaciones comerciales de β-CD y γ-CD purificadas. Estos resultados evidencian que el almidón de malanga tiene un gran potencial para la producción de ciclodextrinas y puede ser empleado para sustituir o reemplazar a los almidones convencionales utilizados para este fin.

Bibliografía.

- Anual Estadístico de Cuba, 2008. Oficina Nacional de Estadísticas de Cuba.
- Bertolini, A., Cereda, M. and Chuzel, G., 1998. **Fécula e farelo de mandioca como substrato na produção de ciclodextrinas.** Ciênc. Tecnol. Aliment. 18(2).
- Bovetto, L. J., Backer, D. P., Villette, J. R., Sicard, P. J., Bouquelet, S. J., 1992. Cyclomaltodextrin glucanotransferase from *Bacillus circulans* E 192I. Purification and characterization of the enzyme. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 15: 48–54.
- Buschman, H., Schollmeyer, E., 2002. *J. Cosmet. Sci.* 53:185.
- Cao, X., Jin, Z., Wang, X., and Chen, F., 2005. A novel cyclodextrin glycosyltransferase from an alkalophilic *Bacillus* species: purification and characterization. *Food Research International*. 38: 309–314.
- Charoenlap, N., Dharmsthiti, S., Sirisansaneeyakul, S., Lertsiri, S., 2004. Optimization of cyclodextrin production from sago starch. *Bioresour. Technol.* 92: 49–54.
- Cobana, M., Antezana, R., 2007. Proceso de extracción de almidón de yuca por vía seca. *Rev. Bol. Quím.* 24(1).
- Easton, C. J., Lincoln, S. F., 1999. *Modified Cyclodextrins.* Imperial College Press: London.
- Freudenberg, K., Cramer, F., Natusfursch, Z., 1948. 3b, 464.
- Frömmling, K. H., Szejtli, J., 1993. *Cyclodextrins in Pharmacy.* Kluwer Acad. Publ., Dordrecht.
- Gawande, B., and Patkar, A., 2001. *Biotechnology and Bioengineering.* 64: 168–173.
- Gawande, B., Goel, A., Patkar, A., and Nene, S., 1999. *Applied Microbiology and Biotechnology.* 51: 504–509.
- Goel, A., Nene, S., 1995. Modifications in the phenolphthalein method for spectrophotometric estimation of beta cyclodextrin. *Starch.* 47: 399-400.
- Guan, J., Hanna, A. M., 2004. Extruding foams from corn starch acetate and native corn starch. *Biomacromolecules.* 5: 2329-2339.
- Harada, A., Furue, M., Nozakura, S., 1977. *Macromolecules.* 10: 676.
- Hernández, M., Torruco, J. G., Chel, L., Betancur, D., 2008. Caracterización fisicoquímica de almidones de tubérculos cultivados en Yucatán, México. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 28(3).
- INIVIT, 2004. Instructivo técnico del cultivo de la malanga.

- Jemli, S., Messaoud, E., Ayadi-Zouari, D., Naili, B., Khemakhem, B., and Bejar, S., 2007. *Biochemical Engineering Journal*. 34: 44–50.
- Kaneko, T., Yoshida, M., Yamamoto, M., Nakamura, N., Horikoshi, K., 1990. Production of cyclodextrins by simultaneous actions of two CGTases from three strains of *Bacillus*. *Starch*. 42:277–281.
- Kitahata, S., Tsuyama, N., Okada, S., 1974. Purification and some properties of cyclodextrin glycosyltransferase from a strain of *Bacillus* species. *Agric. Biol. Chem.* 38:387–393.
- Knutson, C. A., Grove, M. J., 1994. Rapid method for estimation of amylose in maize starches. *Cereal Chemistry*. 71(5): 469.
- Laufenberg, G., Kunz, B., Nystroem, M., 2003. Transformation of vegetable waste into value added products: (A) the upgrading concept; (B) practical implementations. *Bioresource Technol.* 87: 167-198.
- Lindner, K. And Saenger, W., 1982. *Carbohydr. Res.* 99 :103.
- Loftssona, T., Jarvinen, T., 1999. Cyclodextrins in ophthalmic drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 36:59 – 79.
- Martínez, G. and Gómez, M., 2007. Ciclodextrinas: complejos de inclusión con polímeros. *Rev. Iberoam. Polim.* 8(4): 300-312.
- Martins, R., and Hatti-Kaul, R., 2002. A new cyclodextrin glucanotransferase from an alkaliphilic *Bacillus agaradhaerens* isolate: purification and characterization. *Enzyme and Microbial Technology*. 30: 116–124.
- Matioli, G., Zanin, G. and Moraes, F., 2001. Characterization of cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus firmus* strain No.37. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 91–93: 643–654.
- Matsuda, H., Arima, H., 1999. Cyclodextrins in transdermal and rectal delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 36:81 – 99.
- Merkus, F. W., Verhoef, J. C., Marttin, E., Romeijn, S. G., Van, P. H., Hermens, W. A., Schipper, N. G., 1999. Cyclodextrins in nasal drug delivery. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 36: 41 –57.
- Mori, S., Hirose, S., Oya, T and Kitahata, S., 1994. Purification and properties of cyclodextrin glucanotrasferase from *Brevibacterium* sp. no. 9605. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. 58 (11): 1968–1972.
- Novelo, C. L., Betancur, A. D., 2005. Chemical and functional properties of *Phaseolus lunatus* and *Manihot esculenta* starch blends. *Starch/Stärke*. 57(9): 431-441.

- Pishtiyski, I., Popota, V. and Zhekova, B., 2008. Characterization of Cyclodextrin Glucanotransferase produced by *Bacillus megaterium*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 144: 263-272.
- Popova, V., Pishtiyski, I., 2001. *European Food Research and Technology.* 213: 67–71.
- Prowe, S. and Antranikian, G., 2001. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.* 51: 457–465.
- Pulley, A. O., French, D., 1961. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 5: 11.
- Qi, Q. and Zimmermann, W., 2005. *Applied Microbiology and Biotechnology.* 66: 475–485.
- Rincón, A., Araujo, V. C., Padilla, F., Martín, E., 2000. Evaluación del posible uso tecnológico de algunos tubérculos de las dioscoreas: ñame congo (*Dioscorea bulbifera*) y mapuey (*Dioscorea trifida*). *Arch. Latinoamer. Nutr.* 50 (3): 286-290.
- Sabioni, J. G., Park, Y. K., 1992. Cyclodextrin glycosyltransferase production by alkalophilic *Bacillus lentus*. *Rev. Microbiol.* 23:128–32.
- Sian, H., Said, M., Hassan, O., Kamaruddin, K., Ismail, A., and Rahman, R., et al. 2005. Purification and characterization of cyclodextrin glucanotransferase from alkalophilic *Bacillus* sp. G1. *Process Biochemistry.*40: 1101–1111.
- Singh, M., Sharma, R., and Banerjee, U., 2002. Biotechnological applications of cyclodextrins. *Biotechnology Advances.* 20: 341–359.
- Singh, M., Sharma, R., and Banerjee, U., 2002. Biotechnological applications of cyclodextrins. *Biotechnology Advances.* 20: 341–359.
- Szejtli, J., 1988. *Cyclodextrin Technology.* Kluwer Academic Publishers: Dordrecht.
- Szerman, N., Schroh, I., Rossi, A., Rosso, A. M., et al., 2007. Cyclodextrin production by cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans* DF 9R. *Bioresource Technology.* 98: 2886–2891.
- Szejtli J., 1998. Introduction and general overview of cyclodextrin chemistry. *Chem. Rev.* 98:1743–53.
- Tachibana, Y., Kuramura, A., Shirasaka, N., Suzuki, Y., Yamamoto, T., Takagi, S., 1999. Purification and characterization of an extremely thermostable cyclomaltodextrin glucanotransferase from a newly isolated hyperthermophilic archaeon, a *Thermococcus* sp. *Appl. Environ. Microbiol.* 65(5):1991–1997.
- Thiemann, V., Dönges, C., Prowe, S., Sterner, R., Antranikian, G., 2004. *Archives of Microbiology.* 182: 226–235.

- Thomas, H. D., Atwell, W. A., 1999. Starches. Practical guides for the food industry. American Association of Cereal Chemist. St. Paul Minnesota, USA: Egan Press. p. 1-87.
- Tonkova, A., 1998. Bacterial cyclodextrin glucanotransferase. *Enzyme and Microbial Technology*. 22: 678–686.
- Uekama, K., Hirayama, F., Irie, T., 1998. *Chem. Rev.* 98: 2045.
- Veen, B. A., Uitdehaag, C. M., Dlikstra, W. Dijkhuizen, B., 2000. Engineering of Cyclodextrin Glycosyltransferase Reaction and Product Specificity. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1543: 336-360.
- Villiers, A. and Hebd, C. R., 1891. *Seances. Acad. Sci.* 112: 536.
- Wenz, G., Angew, T., 1994. *Chem. Int. Ed. Eng.*, 33: 803.
- Wind, R., Buitelaar, R., and Dijkhuizen, L., 1998. *European Journal of Biochemistry*. 253: 598–605.